

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.12.073>

УДК 577.352.4:577.334:615.462

**Н.Т. Картель¹, Л.В. Иванов¹, А.Н. Ляпунов², О.А. Нардид³,
Я.О. Черкашина³, О.А. Гурова⁴, А.В. Окотруб^{4,5}**

¹ Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины, Киев

² НТК “Институт монокристаллов” НАН Украины, Харьков

³ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

⁴ Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, Новосибирск, Россия

⁵ Новосибирский государственный университет, Россия

E-mail: ivleon@ukr.net

Оценка влияния углеродных нанохорнов на микровязкость мембран эритроцитов и белки плазмы крови крыс методом спиновых зондов

Представлено академиком НАН Украины Н.Т. Картелем

Методом спиновых зондов изучено влияние исходных и окисленных углеродных нанохорнов на микровязкость мембран эритроцитов крыс, вязкость водно-белковой матрицы плазмы. Показано, что введение нанохорнов в концентрации 100 мкг/мл во взвесь эритроцитов приводит к увеличению микровязкости мембран в течение 4 ч (эффект около 60 %), повышению полярности микроокружения липофильных зондов в наружном слое мембран и разупорядоченности фосфолипидов мембран эритроцитов. Введение нанохорнов в плазму вызывает небольшое снижение вязкости водно-белковой матрицы, по-видимому, вследствие ее частичной деструкции, прежде всего макромолекул сывороточного альбумина. Цитотоксичность исходных и окисленных нанохорнов оценивается как более высокая по сравнению с наночастицами окисленного графена, но существенно ниже, чем у углеродных нанотрубок, которые способны резко увеличивать микровязкость мембран эритроцитов и нарушать их целостность.

Ключевые слова: углеродные нанохорны, цитотоксичность, микровязкость мембран эритроцитов, анизотропия спектров ЭПР, полярность микроокружения зонда в мембране, метод спиновых зондов, сывороточный альбумин.

Одностенные углеродные нанохорны (УНХ) впервые были обнаружены Ииджимой (Iijima) и сотр. [1, 2]. Они относятся к семейству одностенных углеродных нанотрубок (УНТ), которые закрыты с одной стороны рогоподобным концом с коническим углом около 20°, средним диаметром 2–4 нм и длиной около 40–50 нм [3].

УНХ, как правило, образуют сферические агрегаты диаметром 80–100 нм, внутри которых находятся беспорядочно ориентированные слои графена размером около 10 нм и с расстоянием между плоскостями примерно 4–5 нм [3]. В целом эти агрегаты представляют собой достаточно прочные образования, которые весьма трудно разделить на индивидуаль-

© Н.Т. Картель, Л.В. Иванов, А.Н. Ляпунов, О.А. Нардид, Я.О. Черкашина, О.А. Гурова, А.В. Окотруб, 2017

ISSN 1025-6415. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2017. № 12

73

ные наночастицы. Ковалентная функционализация УНХ придает им растворимость как в органических растворителях, так и в водных средах. Последнее имеет существенное значение для изучения биологических свойств нанохорнов. Так, водные дисперсии функционализированных нанохорнов, полученные без использования ПАВ, не вызывают гибель первичных фагоцитирующих клеток. Это указывает на то, что даже после проникновения в клетки углеродные наночастицы не оказывают на последних агрессивного действия как минимум в течение нескольких суток. Большинство исследователей, работающих с УНХ, считают, что функционализированные нанохорны не токсичны и могут успешно использоваться как носители биологически активных веществ и лекарственных препаратов для адресной их доставки в органы и ткани живых организмов [1, 3].

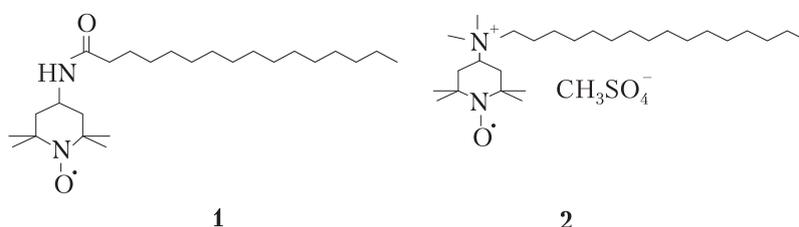
Пока что не выясненным остается вопрос о месте “впрыскивания” лекарственного препарата (внутри клетки или в поверхностном липидном слое мембраны) и связано ли это с деструктурирующим действием “иголок” агрегата нанохорнов на наружный слой клеточных мембран [3, 4].

Метод спиновых зондов [5, 6], использованный нами ранее для решения подобных задач [7], располагает наиболее чувствительным инструментарием — возможностью по спектрам ЭПР парамагнитных меток (стабильных нитроксильных радикалов) оценить параметр разупорядоченности фосфолипидов и увеличение полярности микроокружения зонда в наружном липидном слое мембран при ее повреждении.

Цель данного исследования состояла в изучении методом спиновых зондов особенностей влияния исходных и окисленных УНХ на микровязкость мембран эритроцитов крыс, а также изменение полярности и ориентации (разупорядоченности) фосфолипидов их наружного слоя. Предполагалось также оценить влияние УНХ на вязкость поверхностной водно-белковой матрицы плазмы крови, в первую очередь на сывороточный альбумин (СА), и особенности взаимодействия парамагнитных моделей лекарственных веществ с нанохорнами, как потенциальных средств их адресной доставки.

Материалы и методы исследований. В соответствии с используемым нами методом спиновых зондов по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) стабильных нитроксильных радикалов с липофильным органическим заместителем (что позволяет им внедриться в липофильный слой мембран эритроцитов) оценивали время корреляции броуновской вращательной диффузии зондов в мембранах клеток и гидрофобных полостях белков плазмы [5, 6].

Структура используемых зондов:



Зонд **1** совместим с гидрофобными средами, а зонд **2**, содержащий в своём составе четвертичный аммониевый фрагмент, может рассматриваться как ионогенное ПАВ, совместимое с гидрофобными и гидрофильными средами.

Зонды **1** и **2** вводили во взвесь эритроцитов или плазмы крови путем добавления их концентрированного раствора в ДМСО или метаноле таким образом, чтобы конечная концентрация растворителя во взвеси исследуемых образцов была в пределах 0,5–1%.

Методика приготовления эритроцитарной массы и плазмы из крови крыс дана в работе [7]. В наших экспериментах эритромассу и плазму после центрифугирования разбавляли в 2 раза физиологическим раствором. Концентрация эритроцитов составляла $\sim 9 \cdot 10^6/\text{мм}^3$, а СА в разбавленной плазме — 30 ± 5 мг/мл [7, 8]. Отбор и работу с животными, статистическую обработку результатов эксперимента проводили по той же схеме, что и в работе [7].

УНХ получены методом электродугового синтеза, описание которого детально представлено в работах [9, 10]. Для очистки от побочных продуктов и придания гидрофильных свойств УНХ синтезированный образец окисляли 3 М раствором азотной кислоты при 70 °С в течение 1 ч. После окисления образец промывали до нейтрального рН и высушивали в сушильном шкафу 10 ч при 100 °С. По данным электронной микроскопии УНХ представляют собой агломерированные наночастицы со средним диаметром ~ 60 нм, а после окисления — ~ 52 нм. Удельная поверхность образца до и после окисления составляла соответственно 230 и 443 м²/г.

Перед экспериментом водную взвесь нанохорнов обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин на установке Ultrasonic Cleaner. Конечная концентрация исходных или окисленных УНХ в водной взвеси эритроцитов или плазмы составляла ~ 100 мкг/мл.

Спектры ЭПР введенных во взвесь парамагнитных зондов регистрировали при 24 °С на радиоспектрометре ESR Spectrometer CMS8400. Микровязкость мембран эритроцитов оценивали на основе обработки интенсивности и ширины линий триплета ЭПР-спектров стабильных нитроксильных радикалов — спиновых зондов, взаимодействующих с внешним окружением (липидный бислой мембран эритроцитов, гидрофобные карманы СА, вода) [5, 6]. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (τ) используются такие характеристики спектров: ширина центральной компоненты (ΔH_0), интенсивности компонентов спектра ЭПР (h_0, h_{+1}, h_{-1}) с магнитным квантовым числом ядра ¹⁴N ($M = 0, +1, -1$), изотропная константа расщепления ($A_{\text{изо}}$), а также параметр анизотропии спектров ЭПР (ϵ). Последний параметр определяется следующим соотношением [5, 6]:

$$\epsilon = [(h_0 / h_{+1})^{1/2} - 1] / [(h_0 / h_{-1})^{1/2} - 1].$$

Результаты и их обсуждение. Спектр ЭПР липофильного зонда **1**, не имеющего заряда, в водных средах представляет широкий синглет (рис. 1, *a*), что ранее отмечалось нами в работе [7]. Наблюдаемый вид сигнала характерен для спектров жидких индивидуальных липофильных нитроксильных радикалов или их концентрированных растворов, в которых происходят быстрые обменные взаимодействия между нитроксильными фрагментами, чему способствует их “выталкивание” гидрофобной частью зонда из водной среды [7, 11, 12]. Рассчитать время корреляции липофильного зонда в присутствии нанохорнов не представляется возможным в лиофильных средах, в том числе и плазме крови крыс.

Напротив, спиновый зонд **2**, благодаря четвертичному азоту, можно отнести к ионогенному ПАВ, совместимому как с лиофобной, так и лиофильной средой. В водных растворах этот зонд образует мицеллы, напоминающие по строению липосомы мембраны клеток живых организмов. Спектры ЭПР зонда представляют четкий триплет, свидетельствующий об

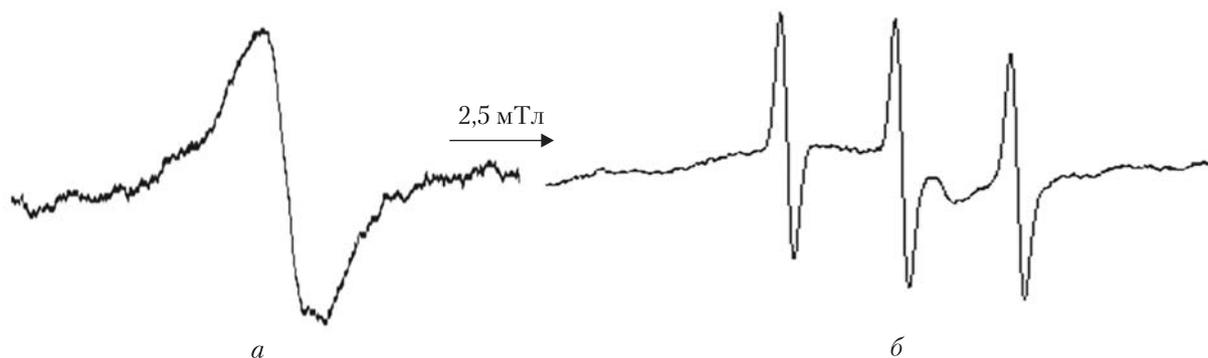


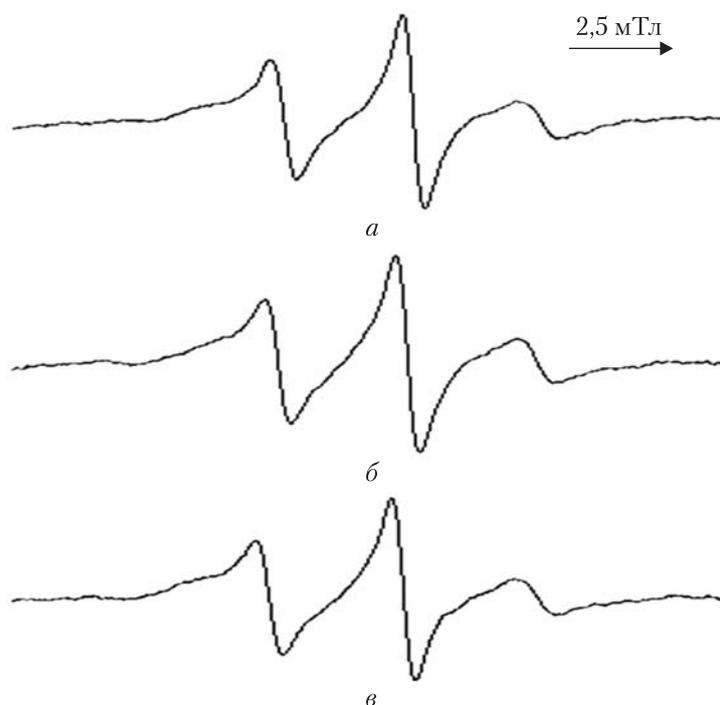
Рис. 1. Спектры ЭПР зондов **1** (а) и **2** (б) в физиологическом растворе через 24 ч после введения нанохорнов

отсутствии или ослаблении обменных взаимодействий между нитроксильными фрагментами (см. рис. 1, б). Обнаруживаемые в спектрах отклонения от идеального триплета 1 : 1 : 1 (уширение линий, увеличение полуширины линий, изменение соотношения интенсивностей линий, смещение g-фактора) свидетельствуют о существенном взаимодействии парамагнитного нитроксильного фрагмента с компонентами среды, где этот зонд находится. При инкубации мицелл зонда **2** с нанохорнами в течение суток наблюдается медленное, но прогрессирующее уменьшение времени корреляции τ и значительное (более чем в 2 раза) увеличение параметра анизотропии спектров ϵ (таблица). Это означает, что нанохорны обуславливают анизотропию броуновской вращательной диффузии зонда **2** в мицеллах [5]. Действительно, теория спектров ЭПР [5] связывает экспериментальный параметр ϵ с величиной анизотропии вращения свободного радикала d , равной отношению главных тензоров его диффузии D_{\parallel}/D_{\perp} . Сильное увеличение ϵ свидетельствует о значительном возрастании анизотропии вращения зонда d в мицеллах под действием нанохорнов. По-видимому, имеет место взаимодействие длинных алкильных “хвостов” зонда с конусовидными “иглами” агрегатов из УНХ, в результате чего происходит ориентирование зондов вдоль нанохорнов и, как следствие этого, возрастание анизотропии вращения зонда (анизотропии спектров ЭПР).

Спектры ЭПР зонда **2** в плазме крови крыс в присутствии УНХ достаточно информативны относительно воздействия нанохорнов на белковые составляющие. Из всех белков плазмы только СА имеет на поверхности глобулы три гидрофобные полости, которые эффективно связывают различные эндогенные гидрофобные субстраты, и переносит их с кровью. Эффекты связывания меченых жирных кислот с СА и соответствующие им спектры ЭПР хорошо описаны в работах [7, 13]. Фибриноген и ряд аполипопротеинов плазмы также обладают гидрофобными полостями, но их сорбционная способность по гидрофобным веществам значительно ниже, чем у СА [7]. Поэтому введение спиновых зондов на основе пальмитиновой кислоты в плазму гарантирует их эффективное связывание именно с основной гидрофобной полостью на поверхности СА, а результаты воздействия нанохорнов на белковую часть плазмы следует связывать прежде всего с макромолекулами альбумина.

На рис. 2 приведены спектры ЭПР зонда **2** в плазме (преимущественно в гидрофобных полостях макромолекул СА) до введения в нее нанохорнов, а также после 4 ч введения в систему исходных и окисленных УНХ. Несмотря на качественно близкий характер спек-

Рис. 2. Спектры ЭПР зонда **2** в плазме: *a* — исходный спектр; *б* — после 4 ч введения исходных УНХ; *в* — после 4 ч введения окисленных УНХ



ров в случае добавления нанохорнов в них наблюдаются отличия в параметрах, выявляемые после соответствующей компьютерной обработки сигналов в момент их записи. Полученные данные приведены в таблице. Так, значение параметра $A_{\text{изо}} = 16,0$ Гс для зонда **2** в гидрофобном кармане СА (рис. 2, *a*) свидетельствует о локализации зонда на поверхности глобулы белка (для зонда в воде $A_{\text{изо}} = 17,2$ Гс). Инкубация белков со взвесью исходных УНХ в течение 4 ч приводит к возрастанию

$A_{\text{изо}}$ с 16,0 до 16,9 Гс (см. рис. 2, *б*), т. е. нанохорны, взаимодействуя с глобулой СА, увеличивают доступность зонда к воде, ослабляют связь зонда **2** с гидрофобным карманом белка. При этом параметр анизотропии спектра ϵ не меняется, так как связь с гидрофобной полостью СА сохраняется. Анализ полученных данных (см. таблицу) показал, что инкубация СА с нанохорнами приводит к небольшому снижению (примерно на 7%) времени корреляции $\tau_{c+1/-1}$, которое наиболее чувствительно к изменениям подвижности зонда в среде. Взаимодействие (сорбция) макромолекул СА с поверхностью агрегатов из УНХ сопровождается многочисленными контактами с конусовидными “иголками” одностенных нанохорнов с водно-белковой матрицей СА, что приводит к ее некоторому разрыхлению и ослаблению связи зонда с гидрофобными полостями белка.

В случае добавления к системе “плазма—зонд” окисленных УНХ значение $A_{\text{изо}}$ после инкубации в течение 4 ч составило 16,4 Гс (см. рис. 2, *в*), т. е. полярность микроокружения зонда в районе гидрофобной полости белка сильно не изменилась (см. таблицу). Время корреляции зонда по параметру $\tau_{c+1/-1}$ имеет тенденцию к незначительному уменьшению по сравнению с исходной системой до введения нанохорнов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что действие окисленных УНХ на структуру белков плазмы несколько мягче, чем исходных гидрофобных нанохорнов.

На рис. 3 представлены спектры ЭПР зондов **1** и **2** во взвеси эритроцитов после 4 ч инкубации со взвесью УНХ (100 мкг/мл). Характер спектра зонда **1**, имеющий вид широкого асимметричного синглета, практически не претерпевает изменений в сравнении с таковым для контрольной системы “эритроциты—зонд”, описанным нами ранее в работах [7, 11, 12]. Рассчитать время корреляции этого зонда в мембране эритроцитов из спектров ЭПР такого вида (см. рис. 3, *a*) не представляется возможным.

Спектр ЭПР зонда **2** во взвеси эритроцитов после 4 ч инкубации (см. рис. 3, б) представляет собой сильно искаженный триплет, что свидетельствует о значительной заторможенности свободного вращения зонда при его локализации в липидном окружении в мембране [5, 6]. Присутствие в системе УНХ влияет на параметры спектров ЭПР, причем это влияние просматривается в динамике.

На рис. 4 приведены спектры ЭПР зонда **2** во взвеси эритроцитов при введении исходных и окисленных УНХ через 10 мин и 1ч. Полученные расчетные данные по параметрам спектров представлены в таблице.

Так, уже через 10 мин инкубации эритроцитов с УНХ несколько возрастает изотропная константа расщепления ($A_{\text{изо}}$) с 14,3 до 14,5 Гс и сильно увеличиваются все три параметра времени корреляции зонда **2** в мембранах эритроцитов (т. е. повышается микровязкость мембран). Через 1 ч инкубации значение $A_{\text{изо}}$ увеличилось до 16,1 Гс, что свидетельствует о возрастании полярности в области верхних слоев мембран и еще большем повышении их микровязкости. По нашим оценкам, возрастание микровязкости мембран эритроцитов под действием нанохорнов составляет более 60 %. Особая геометрия и достаточно развитая поверхность наночастиц УНХ, как и в случае с УНТ [11, 12], способствуют их свя-

Влияние взвеси УНХ на параметры спектров ЭПР зонда 2 в физиологическом растворе, плазме и эритроцитарной массе из крови крыс

| Среда нахождения зонда | $A_{\text{изо}}, \text{ Гс}$ | Время корреляции, с | | | ε |
|--|------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------|
| | | $\tau_{c+1} \cdot 10^9$ | $\tau_{c-1} \cdot 10^9$ | $\tau_{c+1/-1} \cdot 10^9$ | |
| Физиологический раствор | 17,1 | 0,058 ± 0,002 | 0,053 ± 0,002 | 0,118 ± 0,005 | 0,48 |
| Физиологический раствор с УНХ | | | | | |
| через 1 ч контакта | 17,1 | 0,035 ± 0,001 | 0,044 ± 0,002 | 0,102 ± 0,004 | 0,64 |
| через 4 ч контакта | 17,1 | 0,064 ± 0,002 | 0,043 ± 0,002 | 0,097 ± 0,004 | 0,32 |
| через 24 ч контакта | 17,0 | 0,003 ± 0,0001 | 0,026 ± 0,001 | 0,061 ± 0,002 | 1,05 |
| Плазма | 15,9 | 1,78 ± 0,09 | 1,03 ± 0,05 | 2,87 ± 0,14 | 0,21 |
| Плазма с УНХ | | | | | |
| через 10 мин контакта | 16,0 | 1,72 ± 0,08 | 1,02 ± 0,05 | 2,78 ± 0,14 | 0,22 |
| через 1 ч контакта | 16,1 | 1,65 ± 0,08 | 1,01 ± 0,05 | 2,63 ± 0,13 | 0,21 |
| через 4 ч контакта | 16,9 | 1,66 ± 0,08 | 0,94 ± 0,05 | 2,63 ± 0,13 | 0,21 |
| Плазма с окисленными УНХ | | | | | |
| через 10 мин контакта | 16,0 | 1,75 ± 0,08 | 1,04 ± 0,05 | 2,80 ± 0,14 | 0,21 |
| через 1 ч контакта | 16,4 | 1,75 ± 0,08 | 1,06 ± 0,05 | 2,79 ± 0,14 | 0,21 |
| через 4 ч контакта | 16,4 | 1,65 ± 0,08 | 1,00 ± 0,05 | 2,64 ± 0,13 | 0,21 |
| Эритроцитарная масса | 14,3 | 5,41 ± 0,43 | 1,86 ± 0,15 | 9,41 ± 0,75 | 0,23 |
| Эритроцитарная масса с УНХ | | | | | |
| через 10 мин контакта | 14,5 | 7,93 ± 0,63 | 2,80 ± 0,22 | 13,5 ± 1,08 | 0,19 |
| через 1 ч контакта | 16,1 | 8,87 ± 0,71 | 2,76 ± 0,22 | 15,26 ± 1,22 | 0,19 |
| Эритроцитарная масса с окисленными УНХ | | | | | |
| через 10 мин контакта | 14,3 | 8,63 ± 0,7 | 3,33 ± 0,26 | 14,3 ± 1,14 | 0,16 |
| через 1 ч контакта | 15,6 | 8,31 ± 0,66 | 2,96 ± 0,24 | 13,6 ± 1,08 | 0,19 |

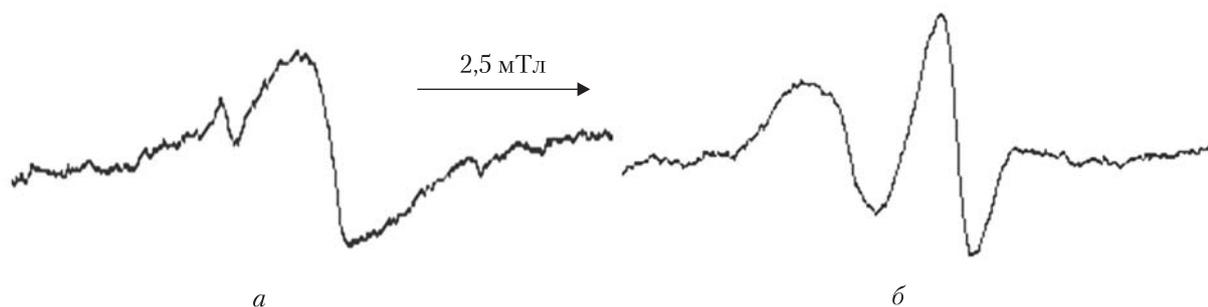


Рис. 3. Спектры ЭПР зондов 1 (а) и 2 (б) во взвеси эритроцитов после 4 ч введения взвеси УНХ

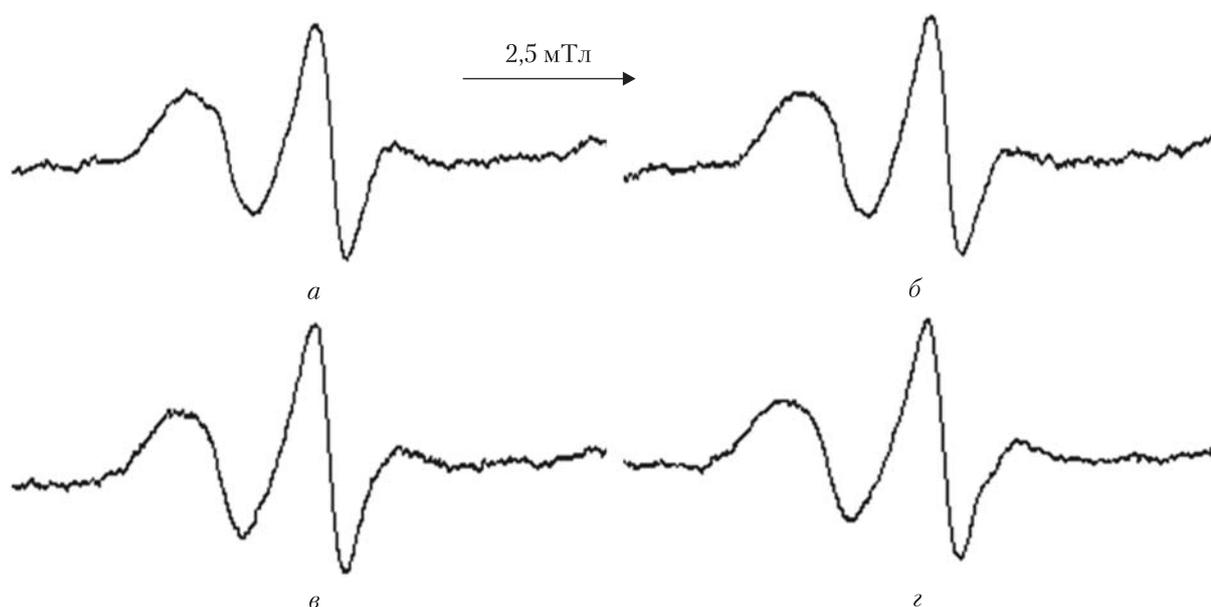


Рис. 4. Спектры ЭПР зонда (2) во взвеси эритроцитов через 10 мин (а, б) и 1 ч (в, г) после введения исходных (а, в) и окисленных (б, г) УНХ

зыванию с поверхностью мембран эритроцитов. Это приводит к резкому торможению (замедлению) конформационной подвижности фосфолипидов и снижению латеральной диффузии фосфолипидов вдоль поверхности мембран. О влиянии нанохорнов на разупорядочение фосфолипидов мембран свидетельствует также падение параметра анизотропии ϵ с 0,23 до 0,19.

Введение в систему “эритроциты—зонд” окисленных УНХ вызывает резкое повышение микровязкости мембран — увеличиваются все три параметра времени корреляции, а параметр анизотропии спектров ϵ “падает” до 0,16. Это свидетельствует о заметном изменении ориентации фосфолипидов (их разупорядочении) в результате связывания окисленных УНХ с клетками. Через 1 ч инкубации наблюдается некоторая релаксация состояния мембраны — значения микровязкости остаются высокими, но на 10–15 % ниже, чем сразу после введения в эритроциты окисленных нанохорнов. Параметр ϵ также “релаксирует” до 0,19. В этом случае, по-видимому, включаются адаптационные механизмы клетки после некото-

рого стресса, вызванного введением в эритроциты окисленных УНХ. К таковым можно отнести конформационные изменения основного белка мембран эритроцитов, который обеспечивает прочность структуры мембран, частичное восстановление начальной ориентации фосфолипидов в мембране и др. В то же время через 1 ч инкубации клеток с окисленными УНХ изотропная константа расщепления ($A_{\text{изо}}$) увеличилась с 14,3 до 15,6 Гс. Это может быть обусловлено возрастанием полярности в районе нитроксильной головки зонда **2**, что связано с внедрением углеродных наночастиц вглубь мембраны. Повышение микровязкости мембран эритроцитов, оцененное нами по параметрам $\tau_{c+1/-1}$, τ_{c-1} и τ_{c+1} , составляет соответственно 52, 79 и 60 %. Зафиксированный эффект релаксации мембраны эритроцитов после введения окисленных УНХ можно отнести в пользу наночастиц этого типа, как обладающих меньшей цитотоксичностью (по сравнению с исходными нанохорнами).

Увеличение полярности липидного слоя мембран эритроцитов и разупорядоченность фосфолипидов на поверхности мембран в присутствии нанохорнов объясняется деструкцией наружного слоя мембран под действием нанохорнов. В первую очередь это связано с особенностями игольчатой структуры нанохорнов. Возможно, это является основным механизмом цитотоксического действия нанохорнов.

На основании полученных и опубликованных нами ранее данных [7, 11, 12] можно констатировать, что цитотоксичность исходных и окисленных УНХ располагается между мало цитотоксичным окисленным графеном и достаточно цитотоксичными нанотрубками, способными существенно увеличить микровязкость мембран эритроцитов и нарушить их целостность. Благодаря невысокой токсичности, особой геометрии и высокой удельной поверхности, УНХ следует рассматривать как перспективные носители биологических веществ и лекарственных препаратов для адресной их доставки в мембраны клеток живых организмов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Iijima S., Yudasaka M., Yamada R., Bandow S., Suenaga K., Kokai F., Takahashi K. Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nano-horns. *Chem. Phys.Lett.* 1999. **309**, Iss. 3–4. P. 165–170.
2. Murata K., Kaneko K., Kokai F., Takahashi K., Yudasaka M., Iijima S. Pore structure of single-wall carbon nanohorn aggregates. *Chem. Phys. Lett.* 2000. **331**. P. 14–20.
3. Пиотровский Л.Б., Мелик-Оганджян Р.Г. Свойства и биологический потенциал одностенных углеродных нанохорнов (SWCNH). *ФАРМА*. 2011. № 1. С. 120–128.
4. Ajima K., Yudasaka M., Murakami T., Maigné A., Shiba K., Iijima S. Carbon nanohorns as anticancer drug carriers. *Mol. Pharm.* 2005. **2**. P. 475–480.
5. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. Москва: Наука, 1974. 256 с.
6. Метод спиновых меток. Теория и применения. Берлинер Л. (ред.). Москва: Мир, 1979. 639 с.
7. Картель Н.Т., Иванов Л.В., Карачевцев В.А., Ляпунов А.Н., Нардид О.А., Черкашина Я.О., Леонтьев В.С., Иванов А.Ю. Оценка взаимодействия окисленного графена с мембранами эритроцитов и белками плазмы крови крыс методом спиновых зондов. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2017. № 8. С. 71–79. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.08.071>
8. Моисеева Н.Н., Кравченко Л.П., Семенченко А.А., Петренко А.Ю. Влияние трансплантации гепатоцитов, подвергнутых гипотермическому хранению, на регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии. *Пробл. криобиологии*. 2002. № 1. С. 24–31.
9. Окотруб А.В., Шевцов Ю.В., Насонова Л.И., Синяков Д.Е., Чувилин А.Л., Гутаковский А.К., Мазалов Л.Н. Синтез монослойных замкнутых углеродных частиц в электродуговом разряде. *Неорган. материалы*. 1996. **32**, № 8. С. 974–978.

10. Гурова О.А., Омелянчук Л.В., Дубатолова Т.Д., Антохин Е.И., Елисеев В.С., Юшина И.В., Окотруб А.В. Синтез и модификация структуры углеродных нанохорнов для применения в гипертермии. *Журн. структ. химии*. 2017. **58**, № 6. С. 1253–1260.
11. Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Картель Н.Т., Нардид О.А., Окотруб А.В., Кирилук И.А., Черкашина Я.О. Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови. *Поверхность*. 2014. Вып. 6. С. 292–304.
12. Картель Н.Т., Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Нардид О.А., Окотруб А.В., Кирилук И.А., Черкашина Я.О. Оценка влияния углеродных нанотрубок на микровязкость мембран эритроцитов. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2015. № 3. С. 114–121. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.03.114>
13. Жданов Р.И. Парамагнитные модели биологически активных соединений. Москва: Наука, 1981. 280 с.

Поступило в редакцию 21.08.2017

REFERENCES

1. Iijima, S., Yudasaka, M., Yamada, R., Bandow, S., Suenaga, K., Kokai, F. & Takahashi, K. (1999). Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nano-horns. *Chem. Phys. Lett.*, 309, Iss. 3-4, pp. 165-170.
2. Murata, K., Kaneko, K., Kokai, F., Takahashi, K., Yudasaka, M. & Iijima, S. (2000). Pore structure of single-wall carbon nanohorn aggregates. *Chem. Phys. Lett.*, 331, pp. 14-20.
3. Piotrovsky, L.B. & Melik-Ogandzhanyan, R. G. (2011). Properties and biological potential of single-walled carbon nanohorns (SWCNH). *FARMA*, No. 1, pp. 120-128 (in Russian).
4. Ajima, K., Yudasaka, M., Murakami, T., Maigné, A., Shiba, K. & Iijima, S. (2005). Carbon nanohorns as anticancer drug carriers. *Mol. Pharm.*, 2, pp. 475-480.
5. Liechtenstein, G. I. (1974). The method of spin labels in molecular biology. Moscow: Nauka (in Russian).
6. Berliner, L. (Ed). (1979). The method of spin labels. Theory and applications. Moscow: Mir (in Russian).
7. Kartel, N.T., Ivanov, L.V., Karachevtsev, V.A., Lyapunov, A.N., Nardid, O.A., Cherkashina, Ya.O., Leontiev, V.S. & Ivanov, A.Yu. (2017). Estimation of the interaction of oxidized graphene with rat's erythrocyte membranes and blood plasma proteins by the method of spin probes. *Dopov. Nac. acad. nauk Ukr.*, No. 8, pp. 71-79 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.08.071>
8. Moiseeva, N. N., Kravchenko, L. P., Semenchenko, A. A. & Petrenko, A. Yu. (2002). Effect of transplantation of hepatocytes subjected to hypothermic storage on liver regeneration in rats after partial hepatectomy. *Probl. Cryobiol.*, No. 1, pp. 24-31 (in Russian).
9. Okotrub, A. V., Shevtsov, Yu. V., Nasonova, L. I., Sinyakov, D. E., Chuvilin, A. L., Gutakovskiy, A. K. & Mazalov, L. N. (1996). Synthesis of monolayer closed carbon particles in an electric arc discharge. *Inorganic materials*, 32, No. 8, pp. 974-978.
10. Gurova, O. A., Omelyanchuk, L. V., Dubatolova, T. D., Antohin, E. I., Eliseev, V. S., Yushina, I. V. & Okotrub, A. V. (2017). Synthesis and modification of the structure of carbon nanochannels for use in hyperthermia. *J. Struct. Chem.*, 58, No. 6, pp. 1252-1259.
11. Ivanov, L. V., Lyapunov, O. M., Kartel, M. T., Nardid, O. A., Okotrub, A. V., Kirilyuk, I. A. & Cherkashina, Ya. O. (2014). Delivery of spin probes by carbon nanotubes in erythrocytes and plasma of blood. *Surface*, Iss. 6, pp. 292-304.
12. Kartel, M. T., Ivanov, L. V., Lyapunov, O. M., Nardid, O. A., Okotrub, A. V., Kirilyuk, I. A. & Cherkashina, Ya. O. (2015). Estimation of the effect of carbon nanotubes on the microviscosity of erythrocyte membranes by the spin probe method. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 3, pp. 114-121 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.03.114>
13. Zhdanov, R.I. (1981). Paramagnetic models of biologically active compounds. Moscow: Nauka (in Russian).

Received 21.08.2017

*М.Т. Картель¹, Л.В. Иванов¹, О.М. Ляпунов², О.А. Нардид³,
Я.О. Черкашина³, О.А. Гурова⁴, А.В. Окотруб^{4,5}*

¹ Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, Київ

² НТК "Інститут монокристалів" НАН України, Харків

³ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

⁴ Інститут неорганічної хімії ім. А.В. Ніколаєва СБ РАН, Новосибірськ, Росія

⁵ Новосибірський державний університет, Росія

E-mail: ivleon@ukr.net

ОЦІНКА ВПЛИВУ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОХОРНІВ НА МІКРОВ'ЯЗКІСТЬ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ І БІЛКИ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ МЕТОДОМ СПІНОВИХ ЗОНДІВ

Методом спінових зондів вивчено вплив вихідних і окислених вуглецевих нанохорнів на мікров'язкість мембран еритроцитів щурів, в'язкість водно-білкової матриці плазми. Показано, що введення нанохорнів у концентрації 100 мкг/мл у суспензію еритроцитів спричиняє збільшення мікров'язкості мембран протягом 4 год (ефект близько 60 %), підвищення полярності мікрооточення ліпофільних зондів у зовнішньому шарі мембран і розупорядкованості фосфоліпідів мембран еритроцитів. Введення нанохорнів у плазму призводить до невеликого зниження в'язкості водно-білкової матриці, вірогідно, внаслідок її часткової деструкції, перш за все макромолекул сироваткового альбуміну. Цитотоксичність вихідних і окислених нанохорнів оцінюється як більш висока порівняно з наночастинками окисленого графену, але істотно нижче, ніж у вуглецевих нанотрубок, які здатні різко збільшувати мікров'язкість мембран еритроцитів і порушувати їх цілісність.

Ключові слова: *вуглецеві нанохорни, цитотоксичність, мікров'язкість мембран еритроцитів, анізотропія спектрів ЕПР, полярність мікрооточення зонду в мембрані, метод спінових зондів, сироватковий альбумін*

*N.T. Kartel¹, L.V. Ivanov¹, A.N. Lyapunov², O.A. Nardid³,
Ya.O. Cherkashina³, O.A. Gurova⁴, A.V. Ocotrub^{4,5}*

¹ Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

² Institute for Single Crystals of the NAS of Ukraine, Kharkiv

³ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

⁴ Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry of the SB of RAS, Novosibirsk, Russia

⁵ Novosibirsk State University, Russia

E-mail: ivleon@ukr.net

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF CARBON NANOHORNS ON THE MICROVISCOSITY OF MEMBRANES OF ERYTHROCYTES AND RAT PLASMA PROTEINS BY THE METHOD OF SPIN PROBES

By the method of spin probes, we have studied the effect of initial and oxidized carbon nanohorns on the microviscosity of rat erythrocyte membranes and the viscosity of the water-containing plasma protein matrix. Introduction of nanohorns in a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ into erythrocyte suspension results in an increase in the membrane microviscosity within four hours (about 60 % effect), increasing the polarity of a microenvironment for lipophilic probes in the outer layer of membrane phospholipids, and a disorder of erythrocyte's membranes. Introduction of nanohorns in plasma leads to a slight reduction in the viscosity of water and the protein matrix, apparently, due to its partial destruction, especially macromolecules of serum albumin. Cytotoxicity of pristine and oxidized nanohorns evaluated by us is higher as compared to the nanoparticles of oxidized graphene, but is significantly lower than the carbon nanotubes, which are capable of dramatically increasing the microviscosity of membranes of erythrocytes and disrupting their integrity.

Keywords: *carbon nanohorns, cytotoxicity, microviscosity of erythrocyte membranes, anisotropy of SPR spectra, polarity of the microenvironment of a probe in the membrane, method of spin probes, serum albumin.*