

УДК 539:548.732

СТРУКТУРА И ТОКСИЧНОСТЬ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀

© 2015 г. Е. А. Кизима^{1,2,*}, А. А. Томчук¹, Л. А. Булавин², В. И. Петренко^{1,2}, Л. Алмаши³, М. В. Коробов⁴, Д. С. Волков⁴, И. В. Михеев⁴, И. В. Кошлань⁵, Н. А. Кошлань⁵, П. Блаха^{5,6}, М. В. Авдеев¹, В. Л. Аксенов^{1,**}

¹Лаборатория нейтронной физики им. И. М. Франка Объединенного института ядерных исследований, 141980 Дубна, Московская область, Россия

²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, физический факультет, 03127 Киев, Украина

³Institute for Solid Physics and Optics Wigner Research Centre for Physics, H-1525 Budapest, Hungary

⁴Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

⁵Лаборатория радиационной биологии Объединенного института ядерных исследований, 141980 Дубна, Московская область, Россия

⁶Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University in Prague, 166 36 Prague, Czech Republic

*E-mail: alyona_kizima@mail.ru, **E-mail: aksenov@nf.jinr.ru,

Поступила в редакцию 22.01.2014 г.

В работе проводится сравнение двух видов растворов фуллерена C₆₀ в отношении их структурных особенностей и токсических свойств. Результаты обсуждаются с точки зрения их потенциального медико-биологического использования. Кластерное состояние фуллерена на наноуровне в данных растворах анализируется с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. Эксперименты по цитотоксичности указанных систем на клетках V-79 китайского хомячка показывают отсутствие токсичных эффектов в растворах.

Ключевые слова: фуллерен, водные растворы, токсичность, структура, малоугловое рассеяние нейтронов

DOI: 10.7868/S0207352815010126

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время важными являются проблемы нанотоксикологии и биобезопасности используемых и перспективных наноматериалов [1, 2]. Современные углеродные наноматериалы (фуллерены, наноалмазы, нанотрубки и пр.) все чаще проходят испытания в разработках комплексов для доставки лекарств, а также как основа противоопухолевых, антибактериальных и других медицинских препаратов [3–5]. В этой связи большой интерес проявляется к различным методам получения водных растворов углеродных нанобъектов, в том числе и фуллерена. Сюда следует отнести растворы фуллерена C₆₀, включая как растворы модифицированного C₆₀ (солюбилизация, комплексы с полимерами), так и растворы без использования стабилизаторов (конденсация, метод замены растворителя) [6]. Вопрос о токсичности такого рода систем в полной мере не изучен. В какой-то степени это вызвано различиями в методиках приготовления водных растворов C₆₀, что приводит к разным структурным параметрам растворов [6] с точки зрения их коллоидной органи-

зации. Вместе с тем, существует мнение [7, 8], что наличие кластеров в водных растворах C₆₀ может быть причиной образования супероксидных анионов, которые приводят к разрушению мембран клеток. Поэтому до сих пор активно ведутся работы по усовершенствованию существующих и разработке новых методов получения водных нетоксичных растворов C₆₀ с хорошим мембранотропным действием за счет низкой полидисперсности и меньших размеров кластеров, в идеальном случае – растворов отдельных молекул C₆₀. Таким образом, связь структурных параметров и токсичности растворов C₆₀ определяет необходимость детального структурного описания синтезируемых систем.

Дополнительным фактором, обуславливающим интерес к поиску путей синтеза растворов C₆₀ в воде, близких к молекулярным, является то, что биологическая активность C₆₀ возрастает с приближением к молекулярному состоянию. Следует отметить, что все без исключения существующие на сегодня методы получения водных растворов фуллерена C₆₀ дают коллоидные дисперсии, где

фуллерен полностью находится в кластерном состоянии. Недавно было показано [9, 10], что использование в качестве первичного растворителя N-метилпирролидона (NMP) при последующем смешивании с водой позволяет уменьшить размер агрегатов в конечной смеси. При этом в смеси наблюдаются и отдельные неагрегированные фуллерены. Из-за хорошей смешиваемости достаточно токсичного NMP с водой его экстрагирование из смеси представляет собой довольно трудную задачу. Однако факт образования раствора с одиночными фуллеренами и возможность уменьшения размера кластеров являются мотивацией исследования смешанных (NMP/вода) растворов и сравнения их с чисто водными растворами фуллерена. Естественным способом уменьшения токсичности в этом случае оказывается сильное разбавление водой при сохранении значимых с биологической точки зрения концентраций фуллерена в смеси.

В настоящей работе исследуются водный раствор C_{60} , ВДФ-60, приготовленный методом замены растворителя, и раствор $C_{60}/H_2O(NMP)$ с малым содержанием NMP. Структура ВДФ-60 на наномасштабе (до 100 нм) анализируется с помощью малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) и сравнивается с литературными данными по аналогичным системам, а также смешанным растворам $C_{60}/H_2O/(NMP)$. Для оценки дальнейшей перспективы применения в биологии этих растворов проведены исследования их токсичности на клетках V-79 китайского хомячка, в том числе изучено влияние содержания NMP в смешанных растворах на их токсичность. Конечная цель работы – определение влияния размера кластеров фуллерена в растворе на уровень его токсичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление водной системы $C_{60}/H_2O(NMP)$.

Водная система $C_{60}/H_2O(NMP)$ была получена с помощью растворения фуллерена C_{60} (Фуллереновые технологии, чистота >99.5%) в N-метилпирролидоне (Merck, чистота >99.5%) путем перемешивания в течение 6 ч с использованием магнитной мешалки при комнатной температуре. В дальнейшем раствор разбавлялся дистиллированной водой (Millipore) до необходимой концентрации фуллерена так, что в среде с клетками концентрация C_{60} составляла 0.05 мкг/мл. Доля NMP в таком растворе составляла 0.005%. Увеличение концентрации фуллерена в растворе коррелирует с увеличением доли первичного растворителя (NMP), который в больших дозах проявлял явное токсическое действие на клетки.

Приготовление водной системы ВДФ-60. Водная система ВДФ-60 была получена методом замены растворителя, описанным ранее [11]. Про-

цедура была несколько усовершенствована для получения растворов с большей концентрацией. Фуллерен C_{60} (НеоТекПродакт, Россия, чистота 99.5%+) растворяли в первичном растворителе, толуоле (Реахим, Россия, химически чистый). Далее первичный раствор смешивали с водой Milli-Q (Millipore) так, что объем органической фазы в сравнении с водной составлял 1 : 5. Смесь подвергали ультразвуковой обработке в течение 12 ч ежедневно на протяжении 23 дней до полного испарения толуола. Затем полученный раствор доводили до кипения и кипятили в течение 15 мин. После этого раствор был отфильтрован при помощи фильтра Шотта с использованием колбы Бунзена, отделяя частицы фуллерена, не перешедшие в водный раствор. Далее раствор вторично был отфильтрован при помощи микропористого фильтра с диаметром микропор 0.45 мкм и была определена концентрация фуллерена в водном растворе при помощи анализатора общего углерода (ТОС), действующего на основе высокотемпературного (до 1200°C) окисления образцов с последующим доокислением продуктов разложения на слое катализатора. При этом концентрация фуллерена в полученном ВДФ-60 составила 130 ± 2 мкг/мл (выход 54%), что значительно выше получаемой ранее по данной методике – 5 мкг/мл [12]. Такие результаты связаны с тем, что в предложенной модифицированной методике в сравнении с предыдущими процедурами было использовано значительно большее (в 4 раза) количество толуола.

Метод МУРН. Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов проводились на установке Yellow Submarine на стационарном реакторе Будапештского нейтронного центра (Будапешт, Венгрия). Измерялось и анализировалось дифференциальное сечение рассеяния на единицу объема образца (интенсивность рассеяния), усредненное по радиальному углу ϕ как функция модуля вектора рассеяния $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, где λ – длина волны нейтронов и θ – угол рассеяния. Использовался квазимонохроматический пучок нейтронов с длиной волны $\lambda = 1.175$ нм и $\lambda = 0.392$ нм. Позиционно-чувствительный детектор размером 64×64 см размещался за образцом на расстоянии 5.5 м. Таким образом, измеряемый q -диапазон составил 0.06–1.00 нм⁻¹. Для калибровки и приведения кривых рассеяния к абсолютным величинам использовался одномиллиметровый по толщине стандарт H_2O [13]. Для измерений МУРН использовались кварцевые кюветы толщиной 1 мм (Hellma Analytics). В качестве фоновых образцов служила дистиллированная вода. Все измерения проведены для обычных (недейтерированных) компонентов.

Культивирование клеток. В работе использована культура клеток китайского хомячка линии V-79. Клетки выращивали в растворе полной питатель-

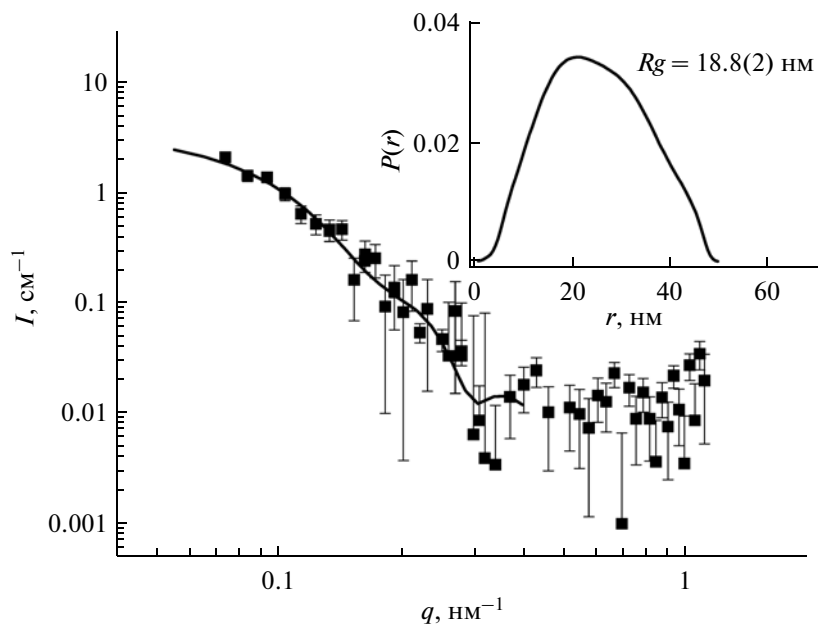


Рис. 1. Кривая МУРН для системы ВДФ-60. Концентрация фуллерена C₆₀ в растворе составляет 0.03 мг/мл. Сплошная линия – модельная кривая, полученная с помощью косвенного преобразования Фурье. Вставка: функция распределения парных расстояний как результат обработки кривой методом косвенного преобразования Фурье.

ной среды (ППС): 88.5% среды ДМЕМ, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% глутамина, 0.5% гентамицина. Культуру клеток культивировали в стандартных флаконах (Corning-Costar) с площадью поверхности 25 см², в которые вносили по 4.5 мл ППС. В каждый флакон помещали 3×10^5 клеток и добавляли по 0.5 мл исследуемого раствора фуллерена C₆₀ разных концентраций. Конечные концентрации фуллерена в среде с клетками составляли: 0.05 мг/мл, 0.5 мг/мл, 5 мг/мл. Клетки растили при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Через трое суток образовавшийся клеточный монослой, заполнивший 80–90% площади поверхности флакона, обрабатывали последовательно версеном и трипсином для снятия клеток и приготовления клеточной суспензии. Ресуспендированную до одиночных клеток суспензию разбавляли 0.4% раствором трипанового синего для определения их жизнеспособности. Спустя 2–3 минуты полученной смесью заполняли камеры гемоцитометра (камера Горяева). Подсчет окрашенных в камере Горяева клеток проводили на оптическом микроскопе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее методом малоуглового рассеяния нейтронов было проведено детальное структурное исследование системы C₆₀/H₂O(NMP) с различным содержанием NMP в растворе [14]. Средний размер кластеров в таком растворе составил 20 нм, если

доля воды составляла 50%, и уменьшался при большем разбавлении. При этом, как показано методом экстракции с помощью органического растворителя [10], в раствор активно выделялся фуллерен в мономерном состоянии.

Пример типичной экспериментальной кривой малоуглового рассеяния нейтронов на системе ВДФ-60 представлен на рис. 1. Отсутствие особенностей, как и для других аналогичных систем, говорит о полидисперсности агрегатов. С помощью косвенного фурье-преобразования была получена функция распределения парных расстояний $p(r)$ внутри частиц, которая представлена во вставке к рис. 1. Следует отметить, что вид этой функции соответствует сферической форме частиц с максимальным размером агрегатов в системе порядка 50 нм. Из полученной функции $p(r)$ был рассчитан радиус инерции частиц в растворе, который составил 18.8 ± 0.2 нм. В приближении однородности агрегатов и их сферической формы можно оценить радиус агрегатов C₆₀, $R = 24$ нм, что более чем в два раза превышает размеры кластеров в растворе C₆₀/H₂O(NMP). Следует отметить, что полученный радиус инерции кластеров C₆₀ в данном случае несколько меньше, чем представленный в литературе для аналогичной системы (28 нм) [15].

Исследование токсичности растворов ВДФ-60 и C₆₀/H₂O(NMP) проводили в диапазоне концентраций 0.05–5 мкг/мл и 0.05 мкг/мл в соответствии с диапазоном концентраций водных растворов C₆₀, представленных ранее в литературе

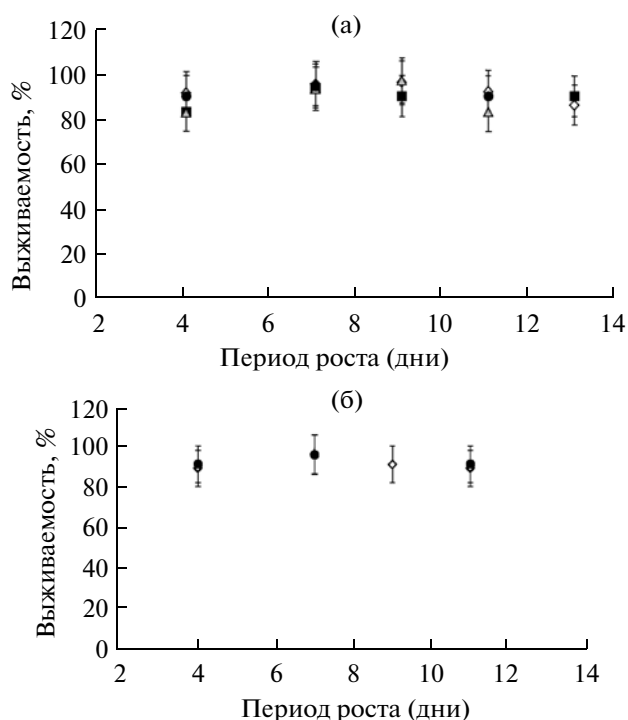


Рис. 2. Выживаемость клеток линии V-79 китайского хомячка в течение 13 дней при добавлении водного раствора ВДФ-60 (а) и C₆₀/H₂O(NMP) (б) для концентраций раствора C₆₀ 0.5 (Δ), 0.05 (■), 0.005 мкг/мл (◇) соответственно; (●) – контроль.

[16, 17]. Предварительно была изучена токсичность первичного растворителя NMP при его высоких концентрациях в смеси, и было определено его максимально возможное нетоксичное количество в растворе на уровне 0.1 об. %. Это, в свою очередь, определило выбор максимальной концентрации фуллерена в экспериментах по токсичности системы C₆₀/H₂O(NMP), которая составила 0.05 мкг/мл, с долей NMP в среде с клетками, равной 0.005%. Рост клеток продолжался в

течение 13 дней. Независимо от метода приготовления и концентрации фуллерена C₆₀ во всех образцах была получена высокая выживаемость клеток, более 85% (рис. 2).

Водные растворы немодифицированных фуллеренов, получаемые методом замены растворителя, являются на сегодня одними из наиболее перспективных для непосредственного использования в биомедицинских приложениях. Это обусловлено отсутствием влияния на свойства фуллерена стабилизирующих компонентов, используемых при модификации C₆₀, достаточно высокими итоговыми концентрациями C₆₀ в воде и относительно малыми размерами агрегатов, что практически недостижимо в случае длительного перемешивания порошка в H₂O. Однако в таких системах нельзя исключить следов первичного растворителя, который может проявлять свои токсические свойства. Получение водной системы C₆₀/H₂O(NMP) изначально предполагает наличие органической составляющей в конечном растворе. Выявленный уровень токсичности первичного растворителя N-метилпирролидона требует в дальнейшем проведение дополнительной очистки от первичного органического растворителя с целью увеличения общей нетоксичной концентрации C₆₀ в растворе.

Как видно из таблицы, выживаемость клеток для всех случаев сопоставима с контрольным образцом. Несмотря на то что в представленных в литературе работах для аналогичных концентраций фуллерена в водных растворах были выявлены токсичные свойства [16], изученные нами водные растворы ВДФ-60, полученные методом замены растворителя, показали отсутствие токсичности в экспериментах *in vitro* даже для больших концентраций фуллерена (вплоть до 5 мкг/мл). Это может быть связано с достаточно длительной (23 дня) процедурой испарения органического компонента (толуол) из раствора.

Выживаемость клеток китайского хомячка линии V-79 в присутствии водных растворов C₆₀

Концентрация C ₆₀ в системе	Выживаемость				
	4-й день	7-й день	9-й день	11-й день	13-й день
ВДФ-60					
0.05 мкг/мл	95%	98%	98%	94%	88%
0.5 мкг/мл	85%	95%	92%	–	92%
5 мкг/мл	90%	94%	99%	85%	–
C₆₀/H₂O(NMP)					
0.05 мкг/мл	90%	95%	92%	90%	–
Контроль/H₂O					
0	92%	97%	–	92%	–

Несмотря на значительное различие размеров кластеров в указанных системах (более чем в два раза), результаты экспериментов по токсичности сопоставимы, что указывает на отсутствие корреляции между размерами агрегатов и токсичностью в данном диапазоне размеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурные исследования растворов фуллеренов, приготовленных разными методами, показали различие размеров кластеров фуллерена в два раза. Радиус инерции для раствора ВДФ-60 составил 18.8 ± 0.2 нм по сравнению с 8 ± 1 нм для раствора C₆₀/H₂O(NMP) [9]. Независимо от метода приготовления и размеров кластеров в растворах C₆₀ в воде обе исследованные системы — C₆₀/H₂O(NMP) и ВДФ-60 — показали отсутствие токсичности в экспериментах *in vitro* на клетках линии V-79 китайского хомячка для всего исследованного диапазона концентраций C₆₀ 0.05–5 мкг/мл. Тот факт, что N-метилпирролидон не проявляет высокую токсичность при указанных концентрациях фуллерена в растворе, позволяет рассматривать его в качестве базового растворителя при дальнейших попытках получения биосовместимых водных мономерных растворов C₆₀ при условии дополнительной очистки систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-23-01015 офи-м).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Forrest M.L., Stroeve P., Mahmoudi M.* // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. № 6. P. 2323.
2. *Zhao J., Castranova V.* // J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev. 2011. V. 14. № 8. P. 593.
3. *Nelsen G.D.* // Grundlagen und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. 2008. V. 103. P. 197.
4. *Wilson S.R.* // Biological Aspects of Fullerenes. Fullerenes: Chemistry, Physics and Technology. New York: John Wiley & Sons, 2000. P. 437.
5. *Ashcroft J.M., Tsyboulski D.A., Hartman K.B. et al.* // Chem. Commun. 2006. V. 28. P. 3004.
6. *Мчедлов-Петросян Н.О.* // Химия, физика и технология поверхности. 2010. Т. 1. № 1. С. 19.
7. *Андреев Г.Б., Минашкин В.М., Невский И.А., Путинлов А.В.* // Рос. хим. журн. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2008. Т. LII. № 5. С. 32.
8. *Yang X.L., Fan C.H.* // Toxicol. in Vitro. 2002. V. 16. P. 41.
9. *Aksenov V.L., Avdeev M.V., Kuzyma O.A. et al.* // Crystallogr. Rep. 2007. V. 52. P. 479.
10. *Kuzyma O.A., Korobov M.V., Avdeev M.V. et al.* // Chem. Phys. Lett. 2010. V. 493. P. 103.
11. *Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M. et al.* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995. V. 12. P. 1281.
12. *Brant J.A., Labille J., Bottero J.-Y., Wiesner M.R.* // Langmuir. 2006. V. 22. № 8. P. 3878.
13. *Jacrot B.* // Rep. Progr. Phys. 1976. V. 39. P. 911.
14. *Aksenov V.L., Avdeev M.V., Tropin T.V. et al.* // Physica B: Condens. Matter. 2006. V. 385. P. 795.
15. *Avdeev M.V., Khokhryakov A.A., Tropin T.V. et al.* // Langmuir. 2004. V. 20. P. 4363.
16. *Dhawan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K. et al.* // Environ. Sci. Technol. 2006. V. 40. P. 7394.
17. *Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevska O.P. et al.* // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2008. V. 16. P. 698.

Structure and Toxicity of Fullerene C₆₀ Water Solutions

O. A. Kuzyma, A. A. Tomchuk, L. A. Bulavin, V. I. Petrenko, L. Almasy, M. V. Korobov, D. S. Volkov, I. V. Mikheev, I. V. Koshlan, N. A. Koshlan, P. Bláha, M. V. Avdeev

In this paper two types of C₆₀ solution are compared with respect to their structural features and toxic properties. The results are discussed in terms of their potential medical and biological applications. Fullerene cluster state at the nanoscale in these solutions is analyzed using small angle neutron scattering. Experiments on the cytotoxicity of these systems on the V-79 cells of Chinese hamster show no toxic effects of the solutions.