

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И ИХ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОКОМПОЗИТОВ

Ю.И. Семенцов, Т.А. Алексеева¹, Н.А. Гаврилюк,
О.Н. Лазаренко², Г.П. Приходько

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, 0316,4 Киев-164*

¹*Институт металлофизики им. Г.В. Курдюмова Национальной академии наук Украины
бульв. акад. Вернадского, 36, Киев-142, 03680,*

²*Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика,
ул. Дорогожицкая, 9, Киев, 04112, Украина*

Методами атомно-силовой микроскопии и кондуктометрии изучена зависимость структуры конгломератов многостенных углеродных нанотрубок от концентрации электролитов и/или биомолекул в водных растворах. Сравнительный анализ результатов тестирования методом атомно-силовой микроскопии поверхности образцов полимеров (фторопласта-4, полипропилена и наноконкомпозитов этих полимеров с углеродными нанотрубками) in vitro и реакции живого организма на имплантированные образцы показал, что такое тестирование может быть методом первичного анализа совместимости новых материалов. Установлено, что углеродные нанотрубки в исследованных полимерных матрицах влияют на химические свойства поверхности наноконкомпозитов и на степень совместимости с живым организмом.

There was study the behavior of conglomerates of multy wall carbon nanotubes in water solutions depending on electrolytes or/and biomolecules concentration by the methods of atom force microscopy and electro conductivity. Comparative analysis of atom force microscopy testing the samples polymer's surfaces: polytetrafluoroethylene, polypropylene and nanocomposites "polytetrafluoroethylene – multy wall carbon nanotubes", "polypropylene - multy wall carbon nanotubes" in vitro with the reaction of living body on their implantation show that: 1) atom force microscopy may be use as the method of primary compatible testing of new materials; multy wall carbon nanotubes in polymer matrix change nanocomposites surface chemistry and influence on their biocompatibility.

Введение

Понятие «биосовместимость» не имеет точного определения. Одним из обязательных его отличительных признаков является установление степени воспалительной реакции организма реципиента на инородное тело. В данной работе это система «искусственный имплантат – окружающие ткани». Воспалительную реакцию и уровень ее интенсивности можно оценить по толщине фиброзно-соединительной капсулы (кармана), которая всегда образуется вокруг инородного тела [1], поэтому для определения биосовместимости имплантированного образца с организмом реципиента были использованы:

- результаты измерения толщины фиброзно-соединительной капсулы, которая образуется вокруг имплантата через 4 недели после операции;

- биохимические показатели плазмы крови реципиента до и в конце эксперимента (можно использовать не абсолютные значения, а соотношение этих показателей после/до);
- гистологические характеристики состояния тканей сопредельных с имплантатами.

Предложенная методика определения «биосовместимости» имплантатов приемлема и для экспериментов *in vivo*. При выявлении соответствующей корреляции между гистологическими данными и биохимическими показателями эта методика может быть действенным инструментом в прижизненной диагностике биосовместимости имплантатов с организмом реципиента. Так как в эксперименте используются стандартные и недорогие клинические биохимические методики, то с полным правом можно предположить, что данный метод оценки биосовместимости может быть широко применен и в практической медицине. Более того, он может являться удобным инструментом для корректировки биосовместимости новых имплантатов.

В атомной силовой микроскопии (АСМ) взаимодействие зонда с поверхностью образца определяется свойствами зонда, образца и среды, в которой проводится измерение, и, в общем случае, достаточно сложное. При исследовании незаряженных поверхностей в естественной атмосфере (на воздухе) основной вклад в силовое взаимодействие зонда и образца дают: силы отталкивания, вызванные механическим контактом периферийных атомов зонда и образца; силы Ван-дер-Ваальса; капиллярные силы, связанные с наличием пленки адсорбата (воды) на поверхности образца. По характеристикам взаимодействия зонда с близкими по своей природе поверхностям, очевидно, можно судить об их «активности». Таким образом, АСМ характеристика поверхности (сила взаимодействия зонда) может быть сопоставлена с результатами биохимических исследований биосовместимости проведенных *in vivo*, а при установлении корреляционных связей – использоваться как предварительный экспресс-анализ биосовместимости материалов.

В последнее время углеродные нанотрубки (УНТ) начали интенсивно привлекаться для биомедицинского применения – от диагностики до фармакологии [2]. Использование углеродных наночастиц, наноматериалов и систем с их включением получило название «наномедицина», для которой определение токсичности и фармакологических свойств имеет первостепенное значение. Опасения относительно токсичности наноматериалов напрямую обусловлены их высокой дисперсностью, а значит, большой удельной поверхностью, которая определяет химическую активность и способность к проникновению в организм. Канцерогенность дисперсных материалов связывают, как правило, с наличием свободных радикалов, т.е. атомов и молекул поверхности вещества, способных активно окислять живую клетку. Экспериментами на морских свинках и крысах, которым вводили УНТ в легкие через трахею показано, что нанотрубки приводят к образованию в легких гранулем. Имплантация углеродных наноматериалов под кожу мышей на три месяца также привела к образованию гранулем, кроме того, произошли и изменения в клетках крови. При этом смертности животных не было, а фиброз был меньше, чем для асбестовых волокон. В то же время, эксперименты *in vivo* [2] показали, что УНТ не вызывают осложнений, а в [3] были изучены возможности вакцины, в которой в качестве носителя применялись УНТ. Модификация УНТ [4] приводит к их дезагрегации, что способствует равномерному распределению в среде. Полимеры, наполненные УНТ, проявляют уникальные физико-механические (существенно превышающие уровень характеристик исходных материалов) и электронные свойства [5] и могут представлять большой интерес для применения в качестве материалов с целью эндопротезирования.

В настоящей работе проводились исследования реакции организма в экспериментах *in vivo* на конгломераты очищенных УНТ, а также их нанокомпозиты: полипропилен

(ПП) и фторопласт-4 (Ф-4) с различной концентрацией наполнителя. Изменение химии поверхности нанокompозитов по отношению к исходным материалам изучали с помощью АСМ, поскольку состояние поверхности, имплантированного в живой организм материала определяет химические реакции на границе раздела твердой и жидкой фаз, т.е. реакцию организма и степень биосовместимости имплантата. Кроме этого в работе исследовали влияние состава раствора электролитов и биожидкостей на степень дезагрегации УНТ.

Экспериментальная часть

Методики получения и характеристики многостенных УНТ (рис. 1) описаны в [5]. Средний диаметр УНТ составлял 10 – 20 нм, удельная поверхность, определенная по десорбции аргона – 200 – 400 м²/г, насыпная плотность колебалась в пределах 20 – 40 г/дм³. Зольный остаток в неочищенных нанотрубках составлял 6 – 20 %, в очищенных – менее 1 %.

По результатам рентгеноструктурного анализа, параметр d_{002} графитоподобной решетки УНТ лежит в интервале 0,3431 – 0,3451 нм. Малые размеры областей когерентного рассеяния и микронапряжения приводят к существенному уширению рентгеновских рефлексов. Следует отметить, что анализ изображений трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), результатов рентгеновской дифракции и Рамановской спектроскопии, а также величина температуры начала интенсивной потери массы (853 – 883 К) не показывают присутствия заметного количества аморфной фазы.

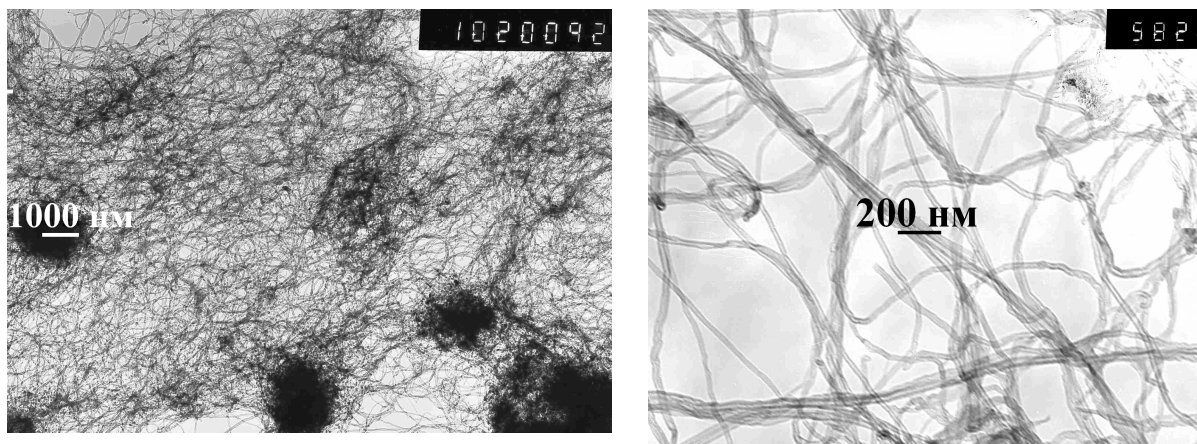


Рис. 1. Трансмиссионная электронная микроскопия многостенных углеродных нанотрубок.

По результатам рентгенофотоэлектронной спектроскопии содержание кислорода на поверхности многостенных УНТ составляет около 0,6 % ат., а их относительное распределение между различными типами кислородсодержащих центров, рассчитанное из разложения спектра С 1s, следующее: фенольные, спиртовые – 49,1 %, карбонильные, хинонные – 17,2 %, карбоксильные, эфирные – 17,2 %, карбонатные и/или адсорбированные СО, СО₂ – 16,5 %.

Для экспериментов *in vivo* были использованы также образцы нанокompозитов [5] ПП-УНТ с содержанием 0,05; 1,0; 3,0 и 5,0 % масс. УНТ и Ф-4 – УНТ с концентрацией 15 % масс. УНТ.

Для приготовления суспензии УНТ использовалась бидистиллированная, деионизированная вода, перемешивание осуществляли с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-2. Объем камеры для измерений составлял 2 см³. Так как в основу исследования было заложено взаимодействие УНТ с живым организмом, все измерения

проводили при температуре 310,5 К в термостатированной камере. По той же причине в систему «вода + 0,1 % масс. УНТ» вводили следующие составляющие: 0,9 % NaCl (физиологический раствор), альбумин до концентрации 2 % и гепарин – 1 % масс. Электросопротивление измеряли с помощью прибора Р-5068 (Точэлектроприбор, Киев, Украина) на частоте $f=1$ КГц, в камере с двумя вертикальными платиновыми электродами с площадью поверхности 1 см^2 . Результаты измерений электросопротивления представлены в табл. 1. Степень дезагрегации УНТ (форма агрегатов частиц и их размеры) регистрировалась с помощью оптической и атомно-силовой микроскопии. Использовался оптический микроскоп Carl Zeiss, NY/2E (Германия) и АСМ NANOSCANЕ II (Veeco corp).

Таблица 1. Электросопротивление в системе «вода – NaCl – УНТ – альбумин».

Образец	Электросопротивление, Ом
Вода	$42,13 \times 10^3$
Вода +1 % УНТ	$1,641 \times 10^3$
Вода + 0,9 % NaCl	41,4
Вода + 0,9 % NaCl + 0,1 % УНТ	41,25
Вода + 0,675 % NaCl + 0,1 % УНТ	49,03
Вода + 0,45 % NaCl + 0,1 % УНТ	67,42
Вода + 0,225 % NaCl + 0,1 % УНТ	111,8
Вода + 0,9 % NaCl + 2 % альбумин	44,61
Вода + 0,9 % NaCl + 2 % альбумин + 0,1 % УНТ	43,85
Вода + 0,9 % NaCl + 1,5 % альбумин + 0,1 % УНТ	43,25
Вода + 0,9 % NaCl + 1,0 % альбумин + 0,1 % УНТ	42,55
Вода + 0,9 % NaCl + 0,5 % альбумин + 0,1 % УНТ	42,12

Модификация УНТ в растворе различными компонентами от ионных до биомолекул приводила к изменению формы конгломератов исходных УНТ (рис. 2).

На рис. 2, *a* видно, что в водном растворе УНТ образуют плотные конгломераты достаточно больших размеров. По краям конгломератов наблюдаются отдельные вытянутые скопления, по-видимому, из нескольких УНТ. Добавление в воду 0,1 % масс УНТ уменьшает электросопротивление системы приблизительно в 25 раз. Растворение 0,9 % NaCl в воде приводит к падению величины электросопротивления в $\sim 10^3$ раз, а 0,1 % масс УНТ снижает его еще на 0,4 %. При этом наблюдается уменьшение размеров конгломератов и их уплотнение, по сравнению с системой «вода – УНТ». Как видно из табл. 1, при монотонном уменьшении концентрации NaCl соответственно возрастает величина электросопротивления.

Добавка 1 % альбумина (молекулярная масса – 60 кД) в систему «вода-NaCl» увеличивает электросопротивление на ~ 7 %, а введение УНТ снижает его (табл. 2). По истечению 5 мин в супернатанте наблюдаются агрегаты УНТ. Замена в системе альбумина на 1 % гепарина (14 кД) приводит к еще большему измельчению конгломератов УНТ. Более того, при меньшем размере молекулы гепарина в сравнении с УНТ в растворе наблюдается расслоение УНТ. Объяснить это можно тем, что молекула гепарина, в отличие от молекул альбумина, достаточно мала и заполняет пространство внутри агрегатов, что приводит к их диспергации. Кроме того, известно, что гепарин в организме образует комплексы с фосфолипидами (лиофильными соединениями). Взаимодействие гепарина с УНТ происходит таким же образом. Аналогичная картина наблюдается при использовании сурфактантов – неионных детергентов типа Triton X-305 (1,528 кД) [6].

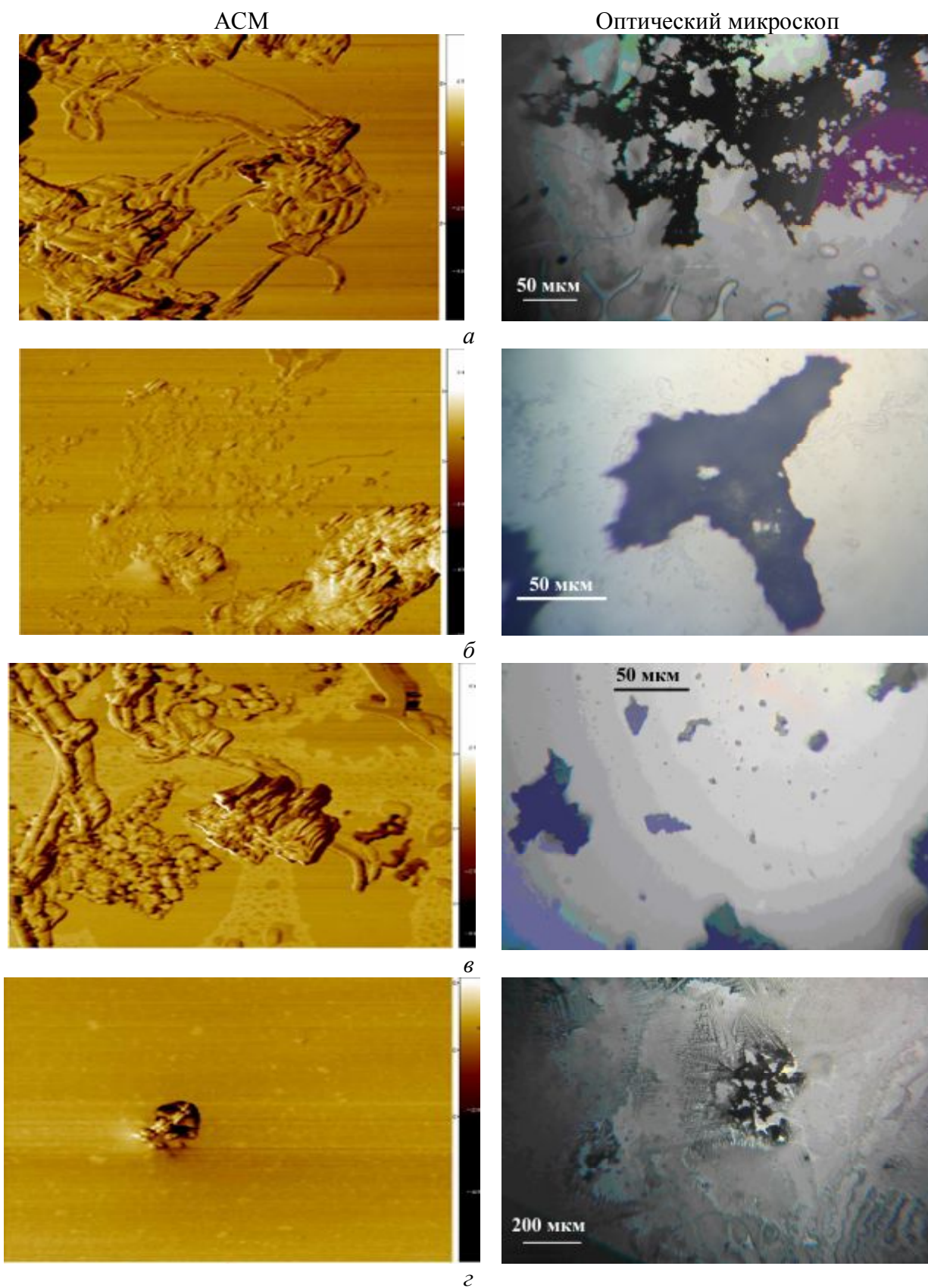


Рис. 2. АСМ (размер рис. 3 мкм×3 мкм) и оптическое изображение распределения УНТ в системах: *a*) 0,1 % УНТ в воде; *б*) 0,1 % УНТ в 0,9 % NaCl; *в*) 0,1 % УНТ в 0,9 % NaCl + 1 % альбумина; *г*) 0,1 % УНТ в 0,9 % NaCl + 1 % гепарина.

Таблица 2. Время седиментации УНТ в различных растворах.

	Раствор	Время, с
1	Вода	23
2	0,9 % NaCl	25
3	0,9 % NaCl + 0,1% альбумин	57
4	0,9 % NaCl + 0,1% гепарин	68
5	Среда для культивирования клеток	97

Таким образом, проведенная АСМ УНТ в водных системах свидетельствует о том, что в соответствии с [2, 6] для диспергации (разрушения) агрегатов УНТ и стабилизации системы «УНТ – вода» необходимо наличие еще одной компоненты с размерами молекул больше 1,5 кД, но не более 13 кД.

Взаимодействие зонда АСМ с поверхностью образцов (рис. 3) характеризовалось величинами сил захвата и отрыва зонда, представленными в табл. 3.

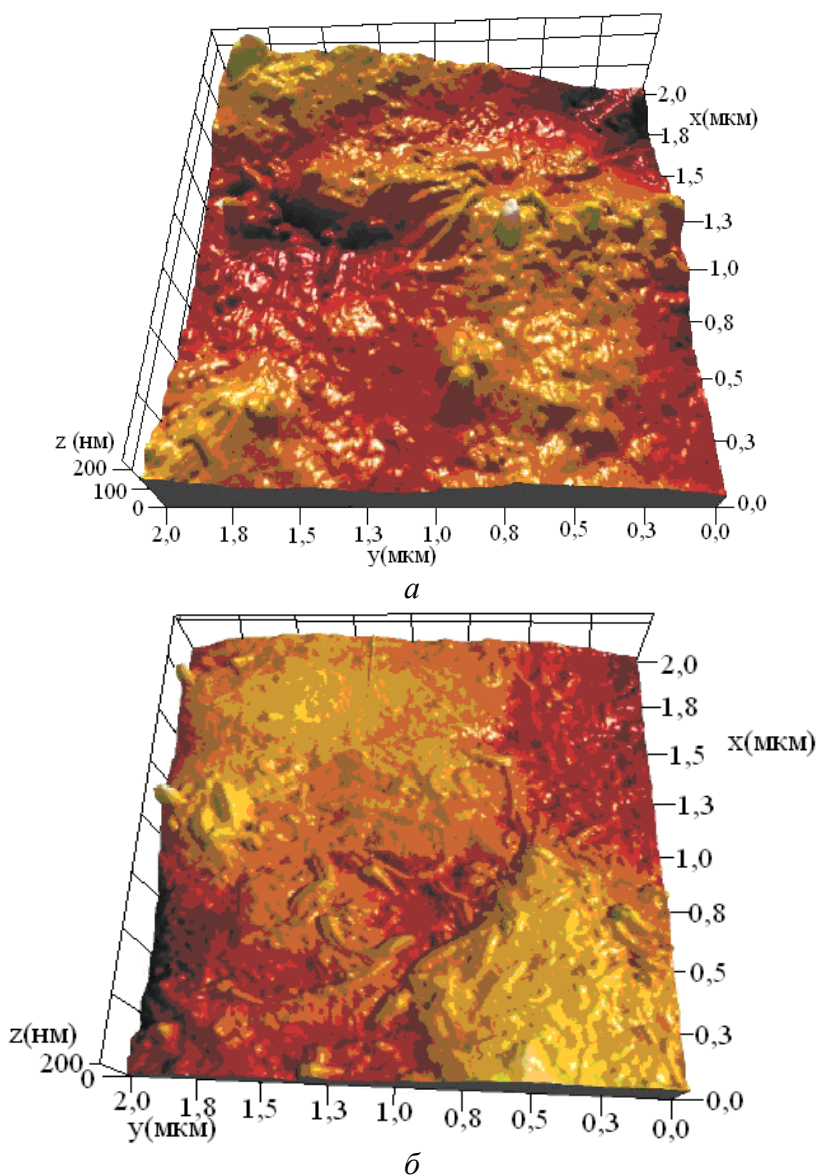


Рис. 3. Данные АСМ образцов Ф-4-УНТ: *а*) – до имплантации; *б*) – после имплантации.

Силы взаимодействия зонда с поверхностью определялись для образцов в исходном состоянии – Ф-4 исх. и Ф-4 – УНТ исх., и после пребывания в организме – Ф-4, и Ф-4 – УНТ, причем как в газовой среде, так и в среде физраствора, что в наибольшей степени моделирует состояние *in vivo*. В эксперименте использовали «чистый» зонд и модифицированный белком IgG. Модификацию зонда проводили [7] из раствора IgG концентрации 70 мкг/мл. В жидкой среде силы взаимодействия значительно ниже, чем на воздухе, что, очевидно, обусловлено экранированием поверхности близлежащими слоями воды. Сила захвата зонда поверхностью сопряжена с приложением определенного потенциала к зонду, который меняется в зависимости от состояния поверхности. Поэтому более информативной и достоверной величиной будет сила отрыва зонда от поверхности. При модификации зонда IgG сила притяжения зонда к поверхности композитов мала. Возможно, это связано с тем, что молекула IgG довольно большая (150 кД) и имеет жесткую пространственную форму в виде буквы Y.

Из данных табл. 3 следует, что взаимодействие чистого зонда с поверхностью нанокompозита Ф-4 – УНТ меньше, чем с поверхностью чистого Ф-4 (8,32 нН против 10,64 нН соответственно). Существенной разницы взаимодействия зонда с поверхностью Ф-4 исходного и образца Ф-4 через 4 недели после имплантации не наблюдается (10,32 нН и 10,64 нН, 0,22 нН и 0,79 нН соответственно).

Таблица 3. Сила взаимодействия зонда с поверхностью Ф-4 и нанокompозита Ф-4 – 15 % масс. углеродных нанотрубок.

Образец	Воздух		Вода	
	захват, нН	отрыв, нН	захват, нН	отрыв, нН
	«чистый» Si ₃ N ₄ зонд/силы взаимодействия, нН			
Ф-4	0,79 ± 0,26	10,64 ± 0,33	0,28 ± 0,06	3,72 ± 0,22
Ф4 – УНТ	0,13 ± 0,01	8,32 ± 0,38	0,08 ± 0,01	0,92 ± 0,06
Ф-4 исх.	0,22 ± 0,02	10,32 ± 0,28	не определялось	2,43 ± 0,07
	Si ₃ N ₄ + IgG зонд/силы взаимодействия, нН			
Ф-4	2,37 ± 0,22	26,28 ± 0,28	не определялось	1,82 ± 0,06
Ф-4 – УНТ	1,29 ± 0,03	9,63 ± 0,21	не определялось	0,48 ± 0,06
Ф-4 исх.	3,86 ± 0,11	23,83 ± 0,70	не определялось	4,72 ± 0,15
Ф-4 – УНТ исх.	1,93 ± 0,14	13,10 ± 0,22	не определялось	не определялось

Силы взаимодействия модифицированного зонда с поверхностями образцов существенно отличаются от их значений для чистого зонда. Например, сила удержания модифицированного зонда исходной поверхностью Ф-4 почти в 2 раза превышает силу взаимодействия модифицированного зонда с Ф-4 – УНТ (23,83 нН против 13,10 нН соответственно). Влияние организма на состояние поверхности образцов хорошо отражает взаимодействие модифицированного зонда и поверхностей через 4 недели после имплантации. Модифицированный зонд стал сильнее удерживаться Ф-4 по сравнению с исходной матрицей 26,28 нН против 23,83 нН, соответственно, а в случае композита уменьшилось по сравнению с интактным образцом (9,63 нН против 13,10 нН соответственно).

Таким образом, во всех случаях наполнение УНТ полимерной матрицы приводит к снижению силы взаимодействия зонда с поверхностью. Модификация зонда IgG дает еще более контрастное различие. Этот результат очень важен, т.к. IgG являются первыми биомолекулами, которые запускают механизм распознавания организмом инород-

ного тела. Чем больше сила взаимодействия модифицированного IgG зонда с поверхностью образца, тем сильнее будет реакция организма на его имплантацию.

Исходя из полученных данных, следовало ожидать меньшей “реакционной способности” нанокompозита по сравнению с исходным фторопластом в реакции с биосистемой организма подопытных животных. Образцы имплантировали экспериментальным животным в мышцы спины. Для уменьшения количества животных в эксперименте и получения достоверных результатов, животным имплантировали по 4 образца композиционных материалов в случае ПП – УНТ с различным содержанием УНТ а при использовании Ф-4 – УНТ – по 2 образца (Ф-4 и Ф-4 – УНТ соответственно). Через 4 недели образцы иссекались совместно с окружающими тканями для проведения дальнейших гистологических исследований состояния тканей и для изучения поверхности образцов. Степень реакции организма подопытного животного оценивалась по формированию фиброзно-соединительной капсулы вокруг него. На рис. 4 приведены толщина фиброзно-соединительной капсулы в зависимости от концентрации УНТ в ПП 0,05; 1,0; 3,0 и 5,0 % масс. УНТ и Ф-4 – УНТ с концентрацией 15 % масс., а также для чистого Ф-4.

Результаты гистологических исследований показали, что реакция тканей реципиента на внесенные образцы значительно отличается.

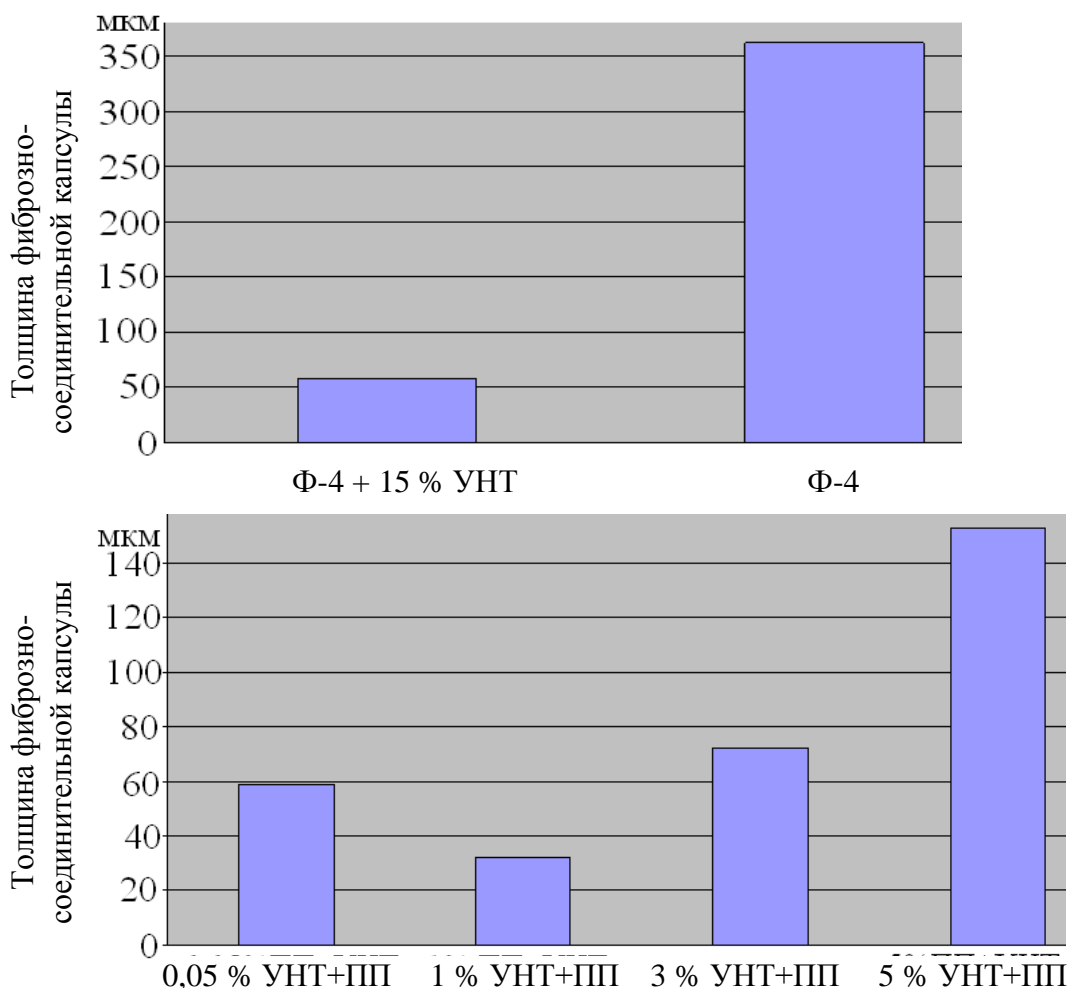


Рис. 4. Данные морфометрии гистологических срезов тканей после имплантации образцов чистого Ф-4 и Ф-4 – УНТ с концентрацией 15 % масс. УНТ и ПП – УНТ с содержанием 0,05; 1,0; 3,0 5,0 % масс. УНТ.

В случае исходного Ф-4, вокруг образца была сформирована толстая и очень плотная капсула ($362,6 \pm 24,7$ мкм), которая характеризовалась обильным включением инородных тел. Для композита с УНТ, фиброзно-соединительная капсула была толщиной $58,4 \pm 8,2$ мкм. В окружающих композит тканях также наблюдались включения инородного материала, но значительно реже, чем при исходном Ф-4. Концентрация УНТ в полимерной матрице не монотонно влияет на ее свойства совместимости с живыми тканями.

Из приведенных в табл. 4 данных следует, что наименьшая толщина фиброзно-соединительной капсулы (как показателя степени ответа организма на инородное тело) вокруг имплантата была у образца с содержанием 1 % масс. УНТ.

Таблица 4. Толщина фиброзно-соединительной капсулы вокруг нанокompозита ПП – УНТ

№	Содержание УНТ в ПП, %	Толщина капсулы, мкм
1	0,05	$58,9 \pm 12,6$
2	1,00	$32,1 \pm 5,2$
3	3,00	$72,4 \pm 14,8$
4	5,00	$152,6 \pm 24,8$

Степень реакции организма также определялась по изменению биохимических показателей крови: концентрации глюкозы, С-реактивного белка и холестерина. Приведенные в табл. 5 результаты биохимического анализа сыворотки крови животных показывают, что на 1-е сутки после операции значительно увеличиваются содержание глюкозы и С-реактивного белка. Этот рост характерен для послеоперационного периода и свидетельствует, что организм животных активно реагирует на вмешательство. Через 4 недели все три параметра практически не отличаются от исходных значений. Это говорит о том, что реакция тканей на имплантаты имеет местный асептический характер, а разница в толщине фиброзно-соединительной капсулы, которая образовалась вокруг образца, зависит от его химии поверхности.

Таблица 5. Изменение содержания глюкозы, С-реактивного белка и холестерина в сыворотке крови подопытных животных при имплантации образцов композиционных материалов

Показатели	До операции	1 сутки после операции	Через 4 недели после операции
Глюкоза	$5,3 \pm 0,52$ г/дл*	$17,6 \pm 2,8$ г/дл	$6,1 \pm 0,37$ г/дл
С-реактивный белок	$2,4 \pm 0,09$ мг/л	$16,2 \pm 4,1$ мг/л	$3,8 \pm 0,12$ мг/л
Холестерин	$36 \pm 4,8$ ммоль/л	Не измеряли	$42 \pm 12,1$ ммоль/л

*дл = 10 л

Выводы

Методами кондуктометрии и атомно-силовой микроскопии изучена зависимость структуры конгломератов многостенных углеродных нанотрубок от концентрации электролитов и/или биомолекул в водных растворах. Показано, что для диспергации (разрушения агломератов углеродных нанотрубок) и стабилизации системы «УНТ–вода» необходимо наличие еще одной компоненты, молекулы которой способны образовывать водородные связи с кислородсодержащими центрами углеродных нанотрубок более сильно выраженные, чем в случае «УНТ-вода». Анализ результатов тестирования методом атомно-силовой микроскопии поверхности образцов полимеров (фторопласта-4,

полипропилена и нанокомпозитов этих полимеров с углеродными нанотрубками) *in vitro* и реакции живого организма на имплантированные образцы показал, что такое тестирование дает возможность первичного анализа биосовместимости новых материалов. Установлено, что углеродные нанотрубки в исследованных полимерных матрицах влияют на химические свойства поверхности нанокомпозитов и на степень совместимости с живым организмом.

Литература

1. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine / M. Sumer, M. Muglali, E. Bodrumlu, T. Guveng // *J. Endodont.* – 2006. – V. 32. – P. 1094 – 1096.
2. Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology / L. Lacerda, A. Bianco, M. Prato, K. Kostarelos // *Adv. Drug Del. Rev.* – 2006. – V. 58. – P. 1460 – 1470.
3. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses / D. Pantarotto, C.D. Partidos, J. Hobeke, F. Brown, E. Kramer, J.P. Briand, S. Muller, M. Prato, A. Bianco // *Chem. Biol.* – 2003. – V. 10. – P. 961 – 966.
4. Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery / G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco // *Chem. Commun.* – 2006. – P. 1182 – 1184.
5. Синтез, структура, физико-химические свойства наноуглеродных материалов / Ю.И. Семенцов, А.В. Мележик, Г.П. Приходько, Н.А. Гаврилюк, М.Л. Пятковський В.В. Янченко // В кн.: Физико-химия наноматериалов и супрамолекулярных структур. Том 2. / Под ред. А.П. Шпака, П.П. Горбика. – Киев: Наук. думка, 2007. – С. 116 – 158.
6. Stability of the aqueous suspensions of nanotubes in the presence of nonionic surfactant / M. Lisunova, N. Lebovka, O. Melezhyk, Yu. Boiko // *J. Coll. Interf. Sci.* – 2006. – V. 299. – P. 740 – 746.
7. Attaching single biomolecules selectively to the apex of AFM tips for measuring specific interactions / J. Gu, Z. Xiao, C-M. Yam, G. Qin, N. Deluge, S. Boutet, C. Cai // *J. Biophys.* – 2005. – V. 89, № 5. – P. 31 – 33.