

## НАНОСТРУКТУРЫ, НАНОТРУБКИ

УДК 606:57.089:61

### ДИСПЕРГИРОВАНИЕ ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК В БИОСОВМЕСТИМЫХ СРЕДАХ

© 2020 г. Г. А. Тимербулатова<sup>1,2</sup>, А. М. Димиев<sup>3</sup>, Т. Л. Хамидуллин<sup>3</sup>, С. В. Бойчук<sup>1</sup>,  
П. Д. Дунаев<sup>1</sup>, Р. Ф. Фахруллин<sup>4</sup>, Н. Н. Хаертдинов<sup>4</sup>, Н. Н. Порфирьева<sup>1</sup>,  
Т. О. Халиуллин<sup>5</sup>, Л. М. Фатхутдинова<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Россия

<sup>2</sup> Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан, Казань, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательская лаборатория “Перспективные углеродные наноматериалы” Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Россия

<sup>4</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Россия

<sup>5</sup> Университет Западной Вирджинии, Моргантаун, США

\*E-mail: liliya.fatkhutdinova@gmail.com

Поступила в редакцию 18.07.2020 г.

После доработки 23.09.2020 г.

Принята к публикации 23.09.2020 г.

Уникальные физические и химические свойства углеродных нанотрубок (УНТ), в том числе ОУНТ (одностенных углеродных нанотрубок), позволяют их использовать во многих сферах, включая применение в биомедицине. Оптические свойства ОУНТ привлекательны для использования в области нанобиотехнологии по сравнению с МУНТ (многостенными углеродными нанотрубками). Важной задачей при использовании ОУНТ в биомедицинских целях является получение гомогенных дисперсий, обладающих биодоступностью и биосовместимостью. Изучена возможность получения гомогенных дисперсий различных типов ОУНТ в биосовместимых средах для дальнейшего использования в различных биомедицинских экспериментах и приложениях. Размеры агломератов ОУНТ в подготовленных дисперсиях оценивались методом динамического светорассеяния; биодоступность исследовалась с применением темнопольной микроскопии на клетках человеческого бронхиального эпителия BEAS-2B. Дисперсии исследованы на наличие бактериального загрязнения. Получены биосовместимые и биодоступные дисперсии на основе клеточных культуральных сред и 1%-ного бычьего сывороточного альбумина, которые могут быть использованы в экспериментах по оценке безопасности ОУНТ на биологических объектах, но имеющие ряд ограничений в области биомедицины. Дисперганты на основе компонентов легочного сурфактанта, которые могли быть использованы в биомедицинских приложениях (ДПФХ и Surgvanta®), не показали своей эффективности.

DOI: 10.1134/S1992722320040160

#### ВВЕДЕНИЕ

Углеродные нанотрубки (УНТ) обладают уникальными физическими и химическими свойствами, что позволяет использовать их во многих сферах, включая строительство, композитные материалы, нанoeлектронику [1]. В последние годы интенсивно исследуется возможность применения УНТ в биомедицине [2]. Наиболее перспективным является использование УНТ в качестве систем для доставки различных биологически активных молекул в клетки, в том числе лекарств [3], ДНК и РНК в целях генной терапии [4]. В зависимости от количества графеновых слоев, из которых состоят УНТ, различают одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ) и многостенные

углеродные нанотрубки (МУНТ). ОУНТ имеют ряд преимуществ, связанных с уникальными оптическими свойствами, что делает их более привлекательными для применения в области нанобиотехнологии по сравнению с МУНТ [5]. Такие свойства ОУНТ, как рамановское рассеяние, ближняя ИК-фотолюминесценция и высокая оптическая абсорбция, находят применение в методах биомедицинской молекулярной визуализации *in vitro* и *in vivo*, например, в качестве оптических меток [5] или контрастных агентов [6] для детекции и визуализации различных биомолекул, включая белки и ДНК [7]. Помимо этого, сильное оптическое поглощение ОУНТ в ближней ИК-области [2] позволяет применять их в фототермиче-

ской терапии рака, минимально инвазивной по сравнению с другими методами лечения, такими как лучевая терапия и хирургия [8]. Применение ОУНТ в биомедицине перспективно для разработки бионаносенсоров [7].

Серьезной проблемой, ограничивающей применение ОУНТ в биомедицине, является получение гомогенных дисперсий, в которых ОУНТ становятся биодоступными для биологических систем. Биодоступность ОУНТ в дисперсии является также важным параметром качества дисперсии в исследованиях по биобезопасности (биосовместимости) ОУНТ, проведение которых является обязательным этапом перед выведением на рынок новых наноматериалов. Особенно актуально получение биодоступных и биосовместимых дисперсий в биомедицине, где ОУНТ вводятся в организм человека. При этом биодоступность ОУНТ будет зависеть от типа, методов функционализации и диспергирования ОУНТ [9, 10].

Под действием ван-дер-ваальсовых сил ОУНТ склонны к образованию прочных агломератов, что обуславливает их крайне слабую диспергируемость в воде или органических растворителях [11, 12]. Методы создания гомогенных дисперсий ОУНТ все еще находятся в стадии разработки, хотя некоторые из них успешно апробированы в лабораторных условиях; ключевые аспекты при этом – выбор дисперганта, способ и режим диспергирования [11].

Основной проблемой при выборе диспергантов является подбор нетоксичного соединения, способного переводить ОУНТ в гомогенную дисперсию.

Различные подходы к диспергированию ОУНТ основаны на физических (классический ультразвуковой метод, диэлектрофорез, гелелектрофорез, градиентное ультрацентрифугирование, плазменные методы и методы облучения, хроматография) и химических (соли диазония; озонлиз; функционализация порфиринами, бромом, аминами, пиренами, ДНК, пептидами, полимерами, в том числе биологического происхождения, и т.д.) воздействиях [11]. При этом одним из основных подходов к диспергированию ОУНТ является использование поверхностно-активных веществ (ПАВ) [11]. Многие ПАВ, широко используемые для подготовки дисперсий ОУНТ, такие как додецилсульфат натрия (ДСС) и додецилбензолсульфонат натрия (ДДС) [14], тритон X-100, обладают потенциальной токсичностью в отношении биологических систем [12].

В ряде экспериментов для подготовки дисперсий ОУНТ с целью внесения в биологические системы изучались такие дисперганты, как дистиллированная вода, диметилсульфоксид (ДМСО), 1,2-дипальмитоил-Sn-глицеро-3-фосфохолин

(ДПФХ) в фосфатном буферном растворе (0.01 мг/мл), 0.5- и 1%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в физиологическом растворе, 1%-ный раствор Tween-80, Survanta® (150 мкг/мл) в фосфатном буферном растворе, клеточные культуральные среды с добавлением 10- и 15%-ной бычьей сыворотки [12, 14–17]. Использование дистиллированной воды и ДМСО не привело к образованию гомогенных 0.02-, 0.1- и 0.5%-ных дисперсий ОУНТ (Hanwha Nanotech, Корея) [12]. Гомогенные стабильные дисперсии получались при применении ДПФХ, 0.5%-ного БСА, 1%-ного Tween-80 для подготовки 0.02-, 0.1- и 0.5%-ных дисперсий ОУНТ (Hanwha Nanotech, Корея) при ультразвуковой соникации в течение 10 мин [12]. Хорошие диспергирующие свойства также были выявлены при применении аналога естественного сурфактанта – препарата Survanta® (150 мкг/мл в фосфатном буферном растворе) в качестве дисперганта ОУНТ HiPco с помощью ультразвуковой обработки при мощности 130 Вт, частоте 20 кГц в течение 5–10 с [14]. Диспергирование очищенных от металлических примесей ОУНТ (Institute for Nanotechnology, Германия) в клеточных культуральных средах F-12/К с добавлением 15%-ной бычьей сыворотки и Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) с добавлением 10%-ной бычьей сыворотки также позволило получить гомогенные дисперсии ОУНТ в концентрациях от 5 до 100 мкг/мл под действием ультразвуковой обработки [16]. При диспергировании ОУНТ (Research Association for Single Wall Carbon Nanotubes, Япония) использовался 1%-ный БСА в фосфатном буферном растворе; подготовка дисперсии ОУНТ в стоковой концентрации 1 мг/мл проводилась по двум протоколам: в первом из них ультразвуковая обработка дисперсий составляла 2 ч, во втором 30 мин. В обоих случаях получены гомогенные дисперсии [17].

Таким образом, не все биосовместимые среды в приведенных исследованиях оказались одинаково эффективными диспергантами ОУНТ [12]. Отметим, что при анализе результатов диспергирования может иметь значение оценка условий испытаний, в том числе концентрация, типы ОУНТ, параметры и продолжительность ультразвуковой соникации и т.д.

Рынок наноматериалов увеличивается с каждым годом, появляются новые типы ОУНТ, производство которых приобретает промышленные масштабы. В настоящее время некоторые производители, в частности группа компаний OCSiAL – производители ОУНТ TUBALL™, заявляют о том, что им удалось разработать технологию получения ОУНТ, значительно снижающую их стоимость [18], что позволит предприятию выйти на промышленное производство. Между тем исследований, связанных с диспергированием данного

типа ОУНТ с целью изучения биосовместимости и биодоступности, крайне мало. Учитывая большой потенциал ОУНТ в области биомедицинских применений, эти вопросы становятся чрезвычайно актуальными.

Цель настоящего исследования – получение однородных дисперсий ОУНТ в биосовместимых средах, которые могли бы быть использованы в экспериментах по изучению биобезопасности ОУНТ на биологических объектах, а также для применения ОУНТ в биомедицинских приложениях.

В эксперимент было решено включить ОУНТ разных типов, различающихся степенью изученности их биосовместимости.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали очищенные и неочищенные от металлических примесей ОУНТ TUBALL™, производимые по инновационной технологии и недавно выведенные на рынок, и ОУНТ типа HiPco (Raymor Industries Inc.) с хорошо изученными свойствами, в том числе в отношении их диспергирования в биосовместимых средах [9, 14].

В процессе размораживания, упаковки или обработки ОУНТ могут быть загрязнены бактериальными эндотоксинами (липополисахаридами – основными структурными компонентами наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий), вызывающими различные побочные реакции при воздействии на биологические объекты [19]; поэтому с целью устранения бактериального загрязнения наноматериалы, используемые для приготовления дисперсий, предварительно подвергали термической обработке в сухожаровом шкафу при 250°C в течение 30 мин.

Все работы, связанные с подготовкой дисперсий ОУНТ, проводили в асептических условиях (в биологическом шкафу).

Следуя критериям выбора сред – биосовместимость и способность образовывать однородные дисперсии, для эксперимента были выбраны следующие среды: ДПФХ (Sigma-Aldrich, P0763-50MG, США) 0.01 мкг/мл в фосфатном буферном растворе [12]; Survanta® 0.15 мг/мл в фосфатном буферном растворе [14]; 1%-ный БСА (Диаэм, BSA.0100, Россия) в фосфатном буферном растворе [12, 17]; клеточные культуральные среды [15–17]: DMEM (Sigma-Aldrich, D1145-500ML, Великобритания), Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) (Sigma-Aldrich, 511K-500, Германия). Выбор культуральных сред для диспергирования ОУНТ был ограничен используемыми в эксперименте клетками: RAW 264.7 и BEAS-2B. На основании анализа данных [15–17] в качестве потенциальных диспергантов ОУНТ были ото-

браны среды DMEM и BEGM (используемые в том числе для клеток RAW 264.7 и BEAS-2B соответственно), для которых были получены удовлетворительные результаты по диспергированию других типов УНТ.

Все перечисленные среды являются коммерчески доступными и стерильными, за исключением 1%-ного БСА, для стерилизации которого использовали фильтрующую насадку Миллекс (SLGP033RS, Millipore, Ирландия) с диаметром пор 0.2 мкм.

На основе выбранных сред на предварительном этапе были подготовлены дисперсии трех типов ОУНТ в стоковой концентрации 0.1 мг/мл. Данная концентрация позволила получить необходимые разведения для экспериментов *in vitro* в диапазоне концентраций 0.0001–10 мкг/мл; для экспериментов *in vivo* – 2–80 мкг/мл. Приведенные диапазоны доз подобраны с учетом реальных производственных экспозиций с последующим компьютерным моделированием депонирования ОУНТ в альвеолярной зоне дыхательных путей человека и крысы; а также охватывают нетоксические и токсические дозы ОУНТ, используемые в экспериментах *in vivo* и *in vitro* по данным других исследований [20, 21]. При этом начальные токсические эффекты в исследованиях *in vitro* (на клетках дыхательной системы) проявлялись при дозе 2.5 мкг/мл (0.8 мкг/см<sup>2</sup> поверхности клеточного монослоя), в экспериментах *in vivo* – 10 мкг/животное (при интратрахеальном введении в пересчете на крысу массой 180 г).

Для ультразвуковой соникации растворов использовали прибор Sonic Vibra Cell Sonicator (Sonics&Materials, США). После проведения серии предварительных экспериментов по выбору режима диспергирования для получения стоковой концентрации ОУНТ (0.1 мг/мл) были подобраны следующие параметры работы: 750 Ватт, 20 кГц, амплитуда 40%, пульс 5/6, время 30 мин.

Распределение размеров агломератов ОУНТ в дисперсии оценивали методом динамического светорассеяния (ДСР). В основе метода ДСР лежит анализ флуктуации света, рассеянного частицами, находящимися в состоянии хаотического броуновского движения. В результате анализа флуктуаций определяется коэффициент диффузии и рассчитывается характерный размер частиц [14]. Несмотря на то что индивидуальные ОУНТ имеют волокнистую структуру, агломераты нанотрубок сферической формы можно изучать с помощью ДСР [22]. Анализ ДСР подготовленных дисперсий проводили на приборе Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Измерение проводили при температуре 25°C; каждый образец помещали в одноразовую кювету из полистирола (Brand, Германия) и анализировали не менее трех раз; одно измерение состояло из 15 по-

**Таблица 1.** Физико-химическая характеристика очищенных и неочищенных от металлических примесей ОУНТ TUBALL™, ОУНТ HiPco

Физико-химическая характеристика	Неочищенные ОУНТ TUBALL™	Очищенные ОУНТ TUBALL™	ОУНТ HiPco (Raymor Industries Inc.)
Содержание углерода	86 ± 1 мас. %	98 ± 1 мас. %	~85 мас. %
Содержание УНТ	81 ± 1 мас. %	93 ± 1 мас. %	~80 мас. %
Металлические примеси*	14 ± 1 мас. %	Менее 1%	~10–15 мас. %
Длина	>5 мкм	>5 мкм	~100–1000 нм
Средний диаметр УНТ	1.6 ± 0.4 нм	1.6±0.4 нм	~0.8–1.2 нм
Коэффициент G/D	83 ед.	83 ед.	
Полная удельная поверхность	410 м <sup>2</sup> /г	490 м <sup>2</sup> /г	~400–1000 м <sup>2</sup> /г

\* Возможно наличие частиц размером до 500 мкм; массовая доля таких включений не превышает 0.04%.

второв длительностью по 10 с каждый. Результат диспергирования считали удовлетворительным при достижении в процессе диспергирования размеров агломератов ОУНТ в дисперсии, соответствующих размерам респираторной фракции аэрозоля для области нижних дыхательных путей (до 1000 нм).

Одновременно с оценкой распределения размеров агломератов ОУНТ суспензии ОУНТ были протестированы на наличие бактериального эндотоксина с помощью ЛАЛ-реактива (лизированные амебоциты *Limulus Polyphemus*) (Endosafe KTA, серия K2422L) с использованием турбидиметрического кинетического метода [23].

Следующим этапом проведена оценка биодоступности ОУНТ на иммортализованных клетках нормального человеческого бронхиального эпителия BEAS-2B (Sigma-Aldrich, 504-05A, Германия) методом темнопольной микроскопии.

Клеточные линии BEAS-2B культивировали в клеточной культуральной среде BEGM с 5%-ной эмбриональной бычьей сывороткой (Research Grade, Sigma, F0804-500ML, Парагвай) и добавлением антибиотика (пенициллин/стрептомицин) (100 единиц, ПанЭко, А063, Россия) в термостате при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч.

Для визуализации ОУНТ в клетках методом темнопольной микроскопии для внесения в клетки из стоковых дисперсий трех типов ОУНТ, подготовленных на основе культуральной среды BEGM с добавлением 5%-ной бычьей сыворотки, были подготовлены дисперсии ОУНТ в концентрации 2.5 мкг/мл (минимальная концентрация из используемого в работе диапазона, на которой были получены токсические эффекты ОУНТ по данным других авторов на клетках дыхательной системы [21]). Клетки BEAS-2B подвергали воздействию суспензий ОУНТ в течение 48 ч.

Исследование клеточных культур проводили на микроскопе Olympus BX51, оснащенный темнопольным конденсором CytoViva® для визуализации

в режиме темного поля (ТП) с масляной иммерсией [24]. ТП-изображения были получены с использованием полуапохроматического объектива Olympus (×100, переменная числовая апертура 0.6–1.3), CCD-видеокамеры Dage xL и программного обеспечения Exponent 7 (Dage-MTI). Использование ТП-микроскопии позволяет визуализировать наноразмерные частицы в клетках [24].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химическая характеристика трех типов ОУНТ представлена в табл. 1.

На начальном этапе были подготовлены дисперсии очищенных и неочищенных от металлических примесей ОУНТ TUBALL™ и ОУНТ типа HiPco с использованием всех сред, выбранных для эксперимента.

Результаты исследования дисперсий ОУНТ на наличие бактериальной загрязненности свидетельствовали о допустимом содержании бактериальных эндотоксинов (менее 0.01 ЕЭ/мл), что подтвердило правильно выбранный режим обработки материалов и соблюдение условий при приготовлении дисперсий, не допускающих их загрязнение.

При оценке результатов было выявлено, что использование ДПФХ (0.01 мкг/мл в фосфатном буферном растворе) и Survanta® (0.15 мг/мл в фосфатном буферном растворе) не привело к образованию гомогенных дисперсий в концентрации 0.1 мг/мл для всех трех типов ОУНТ; дисперсии представляли собой взвесь агломератов ОУНТ в среде для диспергирования (рис. 1, 2).

Диспергирование трех типов ОУНТ в 1%-ном БСА в фосфатном буферном растворе (рис. 3), клеточной среде DMEM с добавлением 10%-ной бычьей сыворотки (рис. 4), клеточной среде BEGM с добавлением 5%-ной бычьей сыворотки





Рис. 1. Дисперсии ОУНТ в DPPC 0.01 мкг/мл в фосфатном буферном растворе (0.1 мг/мл).



Рис. 2. Дисперсии ОУНТ в Survanta® 0.15 мг/мл в фосфатном буферном растворе (0.1 мг/мл).

(рис. 5) привело к образованию гомогенных суспензий ОУНТ.

По данным ДСР в дисперсиях трех типов ОУНТ, подготовленных на основе 1%-ного БСА и культуральных сред DMEM и BEGM, преобладали агрегаты размером до 1000 нм (табл. 2).

В дисперсии ОУНТ HiPco на основе Survanta® (0.15 мг/мл в фосфатном буферном растворе) по данным ДСР преобладали агрегаты размером около 2000 нм, существенно превышающие данные по размерам агрегатов ОУНТ, полученные на других диспергантах (1%-ный БСА и культуральные среды DMEM и BEGM); полученные результаты показали неэффективность Survanta® (0.15 мг/мл в фосфатном буферном растворе) как дисперганта для используемых в исследовании

разновидностей ОУНТ при заданных условиях диспергирования.

ТП-изображения клеток BEAS-2B позволяют убедиться в проникновении в цитоплазму клеток ОУНТ разных типов (указаны стрелками на рис. 6), что свидетельствует об их биодоступности. Отметим, что биодоступность ОУНТ напрямую зависит от размеров агрегатов ОУНТ в дисперсии, и оценка биодоступности исследуемых материалов является важным этапом при характеристике дисперсии ОУНТ, используемой для исследований на биологических объектах и применения в биомедицинских целях [9].

Таким образом, ДПФХ (0.01 мкг/мл в фосфатном буферном растворе) и Survanta® (0.15 мг/мл в фосфатном буферном растворе), рассматривав-



Рис. 3. Дисперсии ОУНТ в 1%-ном БСА в фосфатном буферном растворе (0.1 мг/мл).



Рис. 4. Дисперсии ОУНТ в культуральной среде DMEM с добавлением 10%-ной бычьей сыворотки (0.1 мг/мл).

шиеся как наиболее перспективные биосовместимые дисперганты ОУНТ, не показали эффективности в отношении всех трех типов изучавшихся ОУНТ. В исследованиях других авторов изучение диспергируемости ОУНТ TUBALL™ в биосовместимых средах не проводилось.

В исследовании [12] показана высокая эффективность ДПФХ (0.01 мкг/мл в фосфатном буферном растворе) в качестве дисперганта ОУНТ (Hanwha Nanotech, Корея) на более высоких концентрациях ОУНТ (0.2, 1 и мг 5 /мл) и при меньшей ультразвуковой обработке (в течение 10 мин, другие параметры авторами не указаны), но данные ОУНТ имели другие физико-химические характеристики.

В исследовании [14] при применении Survanta® (0.15 мг/мл в фосфатном буферном растворе) достигнута высокая степень диспергирования ОУНТ HiPco в концентрации 0.1 мг/мл с минимальной ультразвуковой обработкой в течение 5–10 с при мощности 130 Вт, частоте 20 кГц; в использованных ОУНТ HiPco содержание металлических примесей составило 0.23%. В настоящем эксперименте при использовании Survanta® (0.15 мг/мл в фосфатном буферном растворе) для диспергирования ОУНТ HiPco получены дисперсии хотя и с большей степенью однородности, чем при использовании ДПФХ (0.01 мкг/мл в фосфатном буферном растворе), но тем не менее содержащие взвесь крупных агломератов ОУНТ. По данным ДСР размеры агломератов ОУНТ составили около 2000 нм, что существенно превышает



Рис. 5. Дисперсии ОУНТ в культуральной среде BEGM с добавлением 5%-ной бычьей сыворотки (0.1 мг/мл).

шало размеры агломератов, полученные при оценке суспензий методом ДСР в [14], где они составили 380 нм.

Расхождение результатов других авторов с данными настоящего исследования предположительно связано с такими факторами, как различающиеся физико-химические характеристики, концентрации ОУНТ, различия в условиях экспериментов, которые, возможно, были упущены при описании предыдущих исследований. Даже незначительные изменения ионного состава используемых фосфатных буферных растворов могут повлиять на степень диспергируемости ОУНТ, что было выявлено на подготовительном этапе исследования.

Применение стерильных культуральных сред (DMEM с добавлением 10%-ной бычьей сыворотки и BEGM с добавлением 5%-ной бычьей сыворотки) представляется наиболее оптимальным для приготовления дисперсий ОУНТ при проведении экспериментов *in vitro* (на клеточных куль-

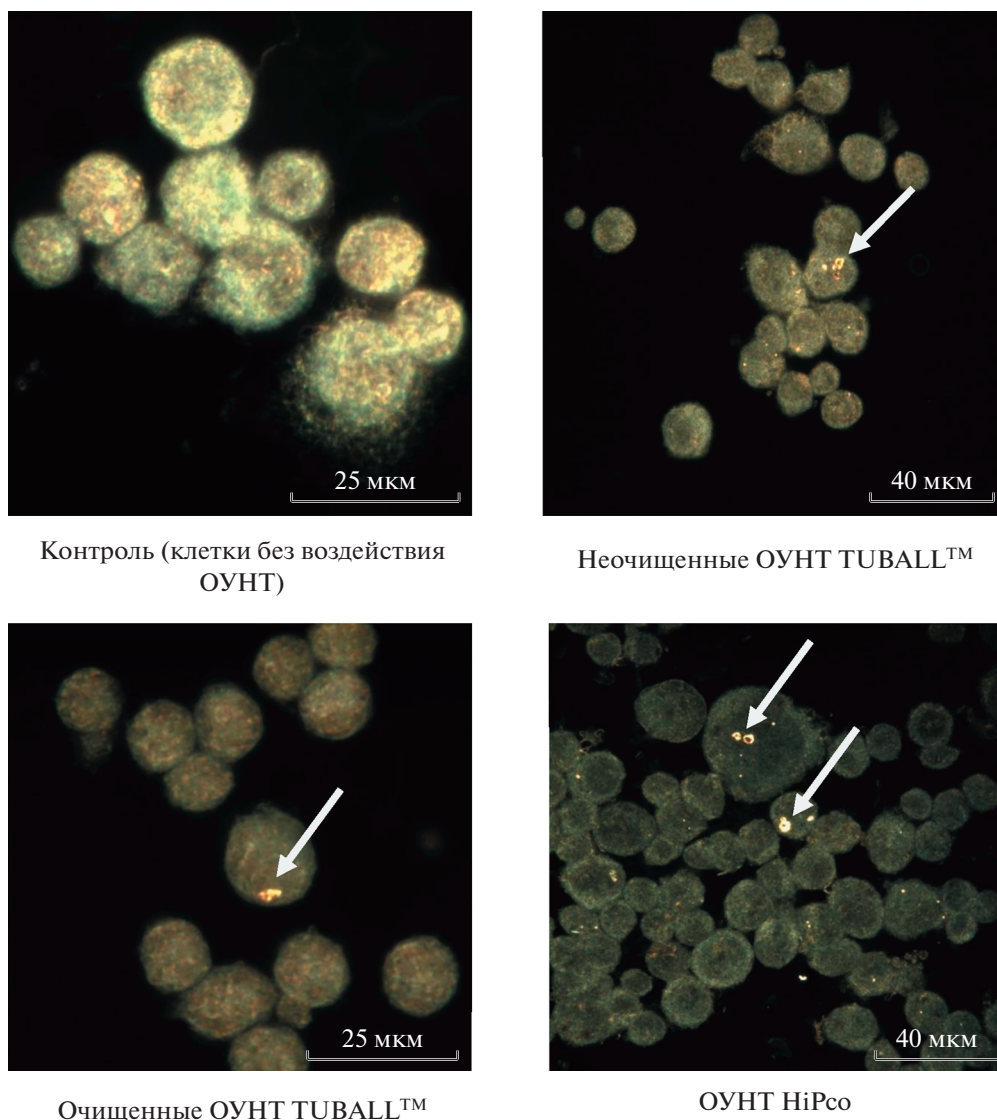
турах и культурах тканей). Использование 1%-ного БСА в качестве дисперганта исследуемых ОУНТ также привело к образованию гомогенных дисперсий и может быть рекомендовано при проведении *in vitro*-, *ex vivo*- и *in vivo*-исследований. Отметим, что для применения в биомедицинских приложениях указанные среды могут иметь ограничения, связанные с тем, что они состоят из комплекса натуральных и/или синтетических элементов (например, белки, факторы роста), различающихся по составу и физико-химическим свойствам от компонентов внутренней среды человека и животных, и которые могут вызывать нежелательные реакции при введении их в организм.

Гидрофобные свойства ОУНТ создают затруднения при диспергировании ОУНТ в биосовместимых средах. Одним из методов улучшения степени диспергирования может быть проведение функционализации ОУНТ [25]. Однако данный способ повышения качества дисперсии ОУНТ не

Таблица 2. Результаты ДСР по распределению размеров агломератов неочищенных и очищенных ОУНТ TUBALL™ и ОУНТ HiPco (средний размер агломератов), ( $\bar{X} \pm \sigma$ )

	1%-ный БСА в фосфатном буферном растворе (средний размер агломератов ОУНТ)	Культуральная среда DMEM с добавлением 10%-ной бычьей сыворотки (средний размер агломератов ОУНТ)	Культуральная среда BEGM с добавлением 5%-ной бычьей сыворотки (средний размер агломератов ОУНТ)
Неочищенные ОУНТ TUBALL™	753 ± 94 нм	517 ± 54 нм	584 ± 53 нм
Очищенные ОУНТ TUBALL™	470 ± 91 нм	545 ± 30 нм	562 ± 138 нм
ОУНТ HiPco	973 ± 312 нм	687 ± 78 нм	814 ± 81 нм

Примечание. Данные о размерах агломератов представлены с учетом предположения о сферичности формы измеряемых агломератов.



Контроль (клетки без воздействия ОУНТ)

Неочищенные ОУНТ TUBALL™

Очищенные ОУНТ TUBALL™

ОУНТ HiPco

**Рис. 6.** Визуализация проникновения ОУНТ в цитоплазму клеток с помощью темнопольной микроскопии. Клетки BEAS-2B под действием ОУНТ разных типов в концентрации 2.5 мкг/мл.

подходит в случаях, где важно сохранить нативные свойства и состав ОУНТ, так как функционализация может повредить поверхность ОУНТ [26]. Таким образом, поиск новых путей диспергирования для подготовки биосовместимых и биодоступных дисперсий ОУНТ остается актуальной задачей и требует проведения дальнейших исследований.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены биосовместимые и биодоступные дисперсии ОУНТ TUBALL™, ОУНТ типа HiPco в концентрации 0.1 мг/мл на основе клеточных культуральных сред и 1%-ного БСА, которые могут быть рекомендованы для применения в экспериментах по проведению оценки биобезопасности

ОУНТ *in vitro* и *ex vivo* (на клеточных культурах и культурах тканей).

Оценена эффективность двух типов клеточных культуральных сред. Вероятно, подобные результаты могут быть получены при применении и других культуральных сред, но, учитывая их многообразие, при планировании исследований с использованием клеточных культуральных сред в качестве дисперганта ОУНТ следует проводить предварительные эксперименты по диспергированию.

Для проведения исследования *in vivo* (на лабораторных животных) средой выбора может служить 1%-ный БСА, так как культуральные среды не используются в *in vivo*-исследованиях. Отметим, что хорошей альтернативой БСА при прове-



дении исследований на крысах и мышах могут стать крысиный и мышиный сывороточные альбумины, оценка которых как диспергантов ОУНТ также требует дальнейших исследований.

Биомедицинское применение полученных дисперсий имеет ряд ограничений, связанных с несоответствием состава используемых сред физико-химическому составу сред внутренней среды человека и животных. Для биомедицинского применения ОУНТ могли бы подойти такие среды, как ДПФХ и Survanta®, являющиеся аналогами естественного легочного сурфактанта, однако использование данных диспергантов не показало своей эффективности. Принимая во внимание результаты проведенного исследования и исследований других авторов, а также уникальные области применения в биомедицине изучаемых наноматериалов, необходимо продолжать поиск и изучение новых биосовместимых диспергантов, имеющих минимальные ограничения при введении их в организм человека и животных.

Авторы выражают благодарность группе компаний OCSiAL за предоставление ОУНТ TUBALL™ для проведения исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-315-90046); разработка методов визуализации наноматериалов в клетках (Р.Ф. Фахруллин) выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых (№ МД-2153.2020.3).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- <https://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/carbon-nano-tubes-market.htm>
- Liu Z., Tabakman S., Welsher K., Dai H. // *Nano Res.* 2009. V. 2. P. 85. <https://doi.org/10.1007/s12274-009-9009-8>
- Bianco A., Kostarelos K., Prato M. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005. V. 9. P. 674. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.005>
- Kam N.W.S., Liu Z., Dai H.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. <https://doi.org/10.1021/ja053962k>
- Liu Z., Tabakman S.M., Chen Z., Dai H. // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 9. P. 1372. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.146>
- Cherukuri P., Bachilo S.M., Litovsky S.H., Weisman R.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 15638. <https://doi.org/10.1021/ja0466311>
- Chen R.J., Bangsaruntip S., Drouvalakis K.A. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 4984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0837064100>
- Zhou M., Liu S., Yaqi Jiang et al. // *Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25. P. 4730. <https://doi.org/10.1002/adfm.201501434>
- Wang L., Mercer R.R., Rojanasakul Y. et al. // *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2010. V. 73. № 5. P. 410. <https://doi.org/10.1080/15287390903486550>
- Dvash R., Khachatourians A., Solmesky L.J. et al. // *J. Control Release.* 2013. V. 170. № 2. P. 295. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.042>
- Kharissova O.V., Kharisov B.I., de Casas Ortiz E.G. // *RSC Adv.* 2013. V. 3. P. 258. <https://doi.org/10.1039/c3ra43852>
- Kim J.S., Song K.S., Lee J.H., Yu I.J. // *Archives of Toxicology.* 2011. V. 85. № 12. P. 1499. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0723-0>
- Islam M.F., Rojas E., Bergey D.M. et al. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. № 2. P. 269. <https://doi.org/10.1021/nl025924u>
- Wang L., Castranova V., Mishra A. et al. // *Particle and Fibre Toxicology.* 2010. V. 7. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-31>
- Davoren M., Herzog E., Casey A. et al. // *Toxicology in Vitro.* 2007. V. 21. № 3. P. 438. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.10.007>
- Pulskamp K., Diabaté S., Krug H.F. // *Toxicol. Lett.* 2007. V. 168. № 1. P. 58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.11.001>
- Fujita K., Fukuda M., Endoh S. et al. // *Inhalation Toxicol.* 2015. V. 27. № 4. P. 207. <https://doi.org/10.3109/08958378.2015.1026620>
- OCSiAL. <https://ocsial.com/en/material-solutions/tuball/>
- Li Y., Boraschi D. // *Nanomedicine (Lond).* 2016. V. 11. № 3. P. 269. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.19619>
- Ema M., Gamo M., Honda K. // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2016. V. 74. P. 42. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.015>
- Lam C.W., James J.T., McCluskey R. et al. // *Crit. Rev. Toxicol.* 2006. V. 36. № 3. P. 189. <https://doi.org/10.1080/10408440600570233>
- Murdock R.C., Braydich-Stolle L., Schrand A.M. et al. // *Toxicol. Sci.* 2008. V. 101. № 2. P. 239. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm240>
- Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) (утв. приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 г.).
- Чердиченко Ю.В., Евтюгин В.Г., Нугаматзянова Л.Р. и др. // *Российские нанотехнологии.* 2019. Т. 14. № 9–10. С. 64.
- Мележик А.В., Хохлов П.А., Любимов В.С., Ткачев А.Г. // *Вестн. ТГТУ.* 2013. № 3. С. 672.
- Chen C., Hou L., Zhang H. et al. // *J. Drug. Target.* 2013. V. 21. № 9. P. 809. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.829071>