ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Турецкий Евгений Александрович

Создание стандартного образца водного раствора фуллерена

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент
Смирнов Валерий Валерьевич

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. Обзор литературы 10
1.1 Биологические свойства фуллеренов 10
1.1.1 Противовирусное 10
1.1.2 Дерматотропные эффекты 12
1.1.3 Фуллерены в онкологических исследованиях 15
1.1.4 Прочие системные эффекты фуллерена 17
1.1.5 Токсичность фуллерена и его производных 19
1.2 Получение водорастворимых форм фуллерена 24
1.2.1 Химическая модификация 25
1.2.2 Получение водных дисперсий и водорастворимых комплексов 27
1.3 Подходы к стандартизации водных дисперсий фуллерена 30
1.3.1 Определение качественного и количественного содержания фуллерена 30
1.3.2 Нанодисперсные системы в практике фармацевтического анализа. 33
ГЛАВА 2. Материалы и методы 36
2.1 Спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области 36
2.2 Спектроскопия в ближней инфракрасной области 36
2.3 Анализ элементного состава 36
2.4 Масс-спектрометрия 37
2.5 Изучение кинетики растворения фуллерена в 1-метил-2-пирролидоне 37
2.6 Тупиковая ультрафильтрация 37
2.7 Тангенциальная ультрафильтрация 38
2.8 Получение водных дисперсий фуллерена способом смены растворителей посредством обработки ультразвуком 39
2.9 Исследование коллоидных свойств дисперсий 40
2.10 Хроматография в тонком слое сорбента 41
2.11 Исследование хронической токсичности 41
2.12 Тест с нитротетразолием синим (NBT-тест) 42
2.13 Анализ цитотоксичности с использованием МТТ-теста 42

ГЛАВА 3. Разработка способа получения и методов фармацевтического анализа водного раствора фуллерена 44
3.1 Изучение кинетики растворения фуллерена в 1-метил-2-пирролидоне 44
3.2 Тупиковая ультрафильтрация 46
3.3 Тангенциальная ультрафильтрация 49
3.4 Изучение коллоидных свойств водных дисперсий фуллерена 52
3.5 Спектральные данные 58
3.6 Исследование хроматографического поведения водных дисперсий фуллерена 68
3.7 Изучение токсичности водной дисперсии фуллерена 72
3.8 Тест с нитротетразолием синим (NBT-тест) 76
3.9 МТТ-тест 77
ГЛАВА 4. Спецификация стандартного образца водного раствора фуллерена 82
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ 85
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 86
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 88

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Фуллерен C60 – это стабильная аллотропная модификация углерода, физико-химические свойства которой активно используются современными исследователями в области физики, электрохимии и медицинской и фармацевтической химии. Первый отчёт о его получении в искусственных условиях датируется 1985 годом, когда он был обнаружен и охарактеризован в опытах по возгонке графита лазерным излучением [1]. В 1990 году вышла статья, описывающая способ получения твёрдых фуллеренов с существенным выходом [2], и начали появляться работы по их реакционной способности. К настоящему времени эти работы сформировали отдельное направление «химии фуллеренов». Параллельно, исследования биологических свойств фуллеренов и их производных выявили их способность подавлять вирусные инфекции и аллергические воспалительные процессы, а также препятствовать развитию повреждений печени при интоксикациях. Было продемонстрировано отсутствие токсичности немодифицированных фуллеренов для млекопитающих. Тем не менее, на данный момент не существует общепринятых подходов к получению и стандартизации водных дисперсий фуллерена, часто называемых «водными растворами» [3, 4, 5]. В связи с высокой распространённостью термина в профессиональной среде, в данной работе ему отдаётся предпочтение над более корректным с технической точки зрения термину «дисперсия». Переход от лабораторных испытаний к медицинскому применению препарата требует установки норм качества водного раствора фуллерена, а также разработки более эффективного способа его получения.

Степень разработанности темы исследования

В современной научной литературе описано несколько методов получения водных растворов фуллерена, предполагающих растворение фуллерена в органическом растворителе с последующим замещением

растворителя на воду с использованием ультразвука, барботирования инертным газом или равновесного диализа через полупроницаемую мембрану. При этом концентрация, размеры частиц фуллерена и содержание остаточных растворителей в полученных растворах могут иметь значительные отличия, что не позволяет получать этими методами стандартные препараты для медицинского применения. Использование водного раствора фуллерена в медицинских целях требует разработки нормативной документации, обеспечивающей качество препарата. Поскольку водный раствор фуллерена является дисперсией, содержащей наночастицы, предложенный метод стандартизации должен также включать определение размера частиц.

Цель исследования

Цель исследования – разработать способ получения водного раствора фуллерена, предназначенного для стандартизации и контроля качества лекарственных средств, а также для изучения его безопасности.

Задачи исследования

1. Изучить современное состояние проблемы получения и стандартизации водных растворов фуллерена.
2. Разработать способ получения устойчивого водного раствора фуллерена для медицинского применения.
3. Провести комплексные исследования по изучению физико-химических свойств и разработке методик анализа стандартного образца водного раствора фуллерена с помощью методов ИК-спектроскопии, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии.
4. Оценить возможность применения хроматографических методов в контроле качества водного раствора фуллерена
5. Разработать способы оценки размера и строения наночастиц в растворах для фармацевтического анализа водного раствора фуллерена.
6. Определить биологическую безопасность стандартного образца водного раствора фуллерена в опытах in vivo и in vitro

7. Обосновать показатели качества водного раствора фуллерена и провести определение этих показателей в стандартном образце водного раствора фуллерена.

Научная новизна исследования

Разработана новая методика получения водного раствора фуллерена (ВРФ) с использованием тангенциальной ультрафильтрации (ТУФ), позволяющая почти на порядок повысить концентрацию фуллерена в растворе по сравнению с имеющимися методами.

Изучено влияние неионогенных ПАВ на процесс ультрафильтрации и структурные особенности наночастиц фуллерена в растворе. Показано увеличение седиментационной и агрегационной устойчивости дисперсий, сопровождаемое увеличением размеров частиц в дисперсиях.

Разработаны методики качественного и количественного определения фуллерена в растворе с применением методов ИК-спектроскопии, спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области, масс-спектрометрии, динамического светорассеяния.

Впервые определены показатели качества стандартного образца водного раствора фуллерена с учётом его физико-химических свойств.

Исследована безопасность in vivo водного раствора фуллерена при хроническом введении, изучена дифференциальная токсичность для различных тканей млекопитающих. Получены не описанные ранее в научной литературе данные о гистологических изменениях в тканях млекопитающих, связанных с хроническим введением фуллерена. В частности, показано накопление фуллерена в тканевых макрофагах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанный способ получения водного раствора фуллерена и создание методик анализа его качества позволяет с высокой воспроизводимостью получать раствор фуллерена для медицинского применения или включения в состав лекарственных средств. Анализ

строения и состава частиц фуллерена в растворах позволяет объяснить механизм стабилизации частиц фуллерена в водных растворах.

Основные положения, выносимые на защиту

- Разработанный способ получения водного раствора фуллерена методом ультрафильтрации, включая результаты исследования взаимодействия частиц фуллерена с различными материалами мембран (полисульфон, регенерированная целлюлоза).

- Разработанные методики контроля качества водного раствора фуллерена методами спектроскопии в ультрафиолетовой и инфракрасной области и масс-спектрометрии.

- Результаты исследований размера и формы частиц фуллерена в водных растворах методами динамического светорассеяния, электронной микроскопии и малоуглового рассеяния нейтронов.

-Результаты исследований токсичности водного раствора фуллерена in vivo и in vitro.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала подбор способа получения водного раствора фуллерена, методов его количественного и качественного анализа, протоколов изучения его токсичности. В ходе исследования использованы современные физико-химические методы исследования, включая элементный анализ, ИК-спектроскопию, УФ-спектроскопию, масс-спектрометрию, фотокорреляционную спектроскопию, малоугловое нейтронное рассеяние. Обработку первичных результатов проводили с использованием программного обеспечения Agilent Cary Win UV, Microsoft excel, STATISTICA 10.

Достоверность научных положений и выводов

Приведённые в диссертации данные являются достоверными и точными, получены с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную поверку и зарегистрированного в Реестре средств измерения.

Апробация результатов исследования

Основные положения и результаты исследований доложены на: 7-ой международной научно-методической конференции «Фармобразование-2018» (Воронеж, 2018 гг.), школы-конференции молодых учёных с международным участием: «Ильинские чтения» (Москва, 2018 гг.), международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018 гг.), 14-ой международной конференции “Advanced Carbon Nanostructures” (Санкт-Петербург, 2019 гг.). Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (протокол №12 от 29.07.19).

Личный вклад автора

Автору работы принадлежит первостепенная роль в выборе объекта и направления исследования, проведении экспериментальной части, обобщении полученных результатов, статистической обработке и анализе данных. Вклад автора является определяющими на каждом этапе проводимого исследования: от постановки цели и задач до их практической реализации, включая обсуждение результатов в научных публикациях, выступления с докладами и непосредственным внедрением в практику.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), и внедрены в работу лаборатории № 72 пептидных иммуногенов ФГБУ «ГНЦ Институт Иммунологии» ФМБА России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения, изложенные в диссертационной работе, соответствуют формуле паспорта специальности 14.04.02 –

«Фармацевтическая химия, фармакогнозия», а именно пунктам 1, 2, 3 областей исследования.

Связь исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Выполнение диссертационной работы проводилось в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по теме: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (номер государственной регистрации 01.2.011.68237).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 7 печатных работ, из них 1 патент, 1 статья в издании из перечня ВАК РФ, 1 - в издании, включённом в базы данных Scopus и Web of Science.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 100 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 35 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 экспериментальных глав, выводов, списка литературы (112 наименований, из них 112 на иностранных языках).

Полученные результаты работы были статистически обработаны, обобщены в таблицах, которые приведены в работе.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Биологические свойства фуллеренов

Почти сразу после их открытия, фуллерены привлекли внимание множества исследователей в области биологии и медицины. Благодаря низкой токсичности и широкому простору для химических модификаций, фуллерены стали идеальными кандидатами для создания ряда низкомолекулярных биологически активных соединений. В данной главе обобщены основные результаты почти 30 лет исследований биологических свойств фуллеренов и их производных.

1.1.1 Противовирусное

Противовирусное действие фуллерена C60 выявлено в отношении ряда сложных вирусов, включая такие высокопатогенные вирусы, как вирус иммунитета человека, вирусы гриппа, герпесвирусы и цитомегаловирусы. При этом противовирусная активность производных фуллерена в отношении различных вирусов изучалась независимо различными исследователями, из-за чего нет единого представления о механизме их действия. В одной из первых статей, посвящённых биологическим свойствам фуллерена и его производных описывается противовирусная активность фуллерена C60 в отношении вируса иммунодефицита человека. При этом противовирусная активность объясняется в этом исследовании конкурентным ингибированием вирусной протеазы (human immunodeficiency virus protease, HIVP) – ферментом, задействованным на этапе посттрансляционного процессинга вирусных протеинов — за счёт связывания с гидрофобными локусами протеазы [6]. Стоит отметить, что вывод о взаимодействии фуллереновых производных с HIVP был сделан в первую очередь на основании компьютерного моделирования молекулярного докинга, выполненного при помощи программы DOCK3, что создаёт несколько обстоятельств, важных для верной интерпретации этих данных: во-первых, методы вычислительной химии значительно продвинулись за 26 лет, прошедших со времени

публикации, во-вторых, молекулярный докинг не учитывает ряда факторов, присутствующих в реальных условиях, таких, как способность проникать через гистогематические барьеры и клеточную мембрану, взаимодействие вещества с суперкапсидом вируса и т.д. Таким образом, хотя в способности сферического центра фуллерена и его производных взаимодействовать с вирусными протеинами не вызывает сомнений, стоит рассмотреть прочие возможные механизмы действия. Так, например, в работе, рассматривающей действие аминокислотных производных фуллерена на герпесвирусы первого и второго типа и цитомегаловирус отмечается взаимосвязь между эффективностью фуллерена и соотношением поверхностного заряда производных и вирионов: отрицательно заряженные частицы были более эффективны в отношении положительно заряженных вирусов и наоборот, в связи с чем выдвигалось предположение о мембранотропном механизме вирицидного действия [7]. Нарушение структуры суперкапсида под воздействием водной нанодисперсии немодифицированного фуллерена C_{60} так же отмечалось на примере вируса гриппа [8]. В этом исследовании изменение структуры оболочки вириона наблюдали после воздействия водорастворимого комплекса фуллерена с поливинилпирролидоном посредством морфологического анализа при трансмиссионной электронной микроскопии. Данные гипотезы предполагают, что молекулярная мишень при противовирусном воздействии принадлежит вирусу, однако в литературе данный эффект так же объясняют воздействием на клетки организма-хозяина. В частности, при герпесвирусной инфекции эффективность производных фуллерена может объясняться нарушением перекисного окисления липидов в клеточной мембране, являющегося важным процессом для проникновения вируса в клетку [9]. В целом, хотя объяснения, предлагаемые для наблюдаемого явления, варьируются, сам факт наличия противовирусной активности широкого спектра у фуллерена и его производных подтверждается многочисленными исследованиями. Отдельно стоит отметить углеводородные производные фуллерена, которые активно

исследуются в качестве возможных противовирусных агентов, в том числе против вируса Эболы [10, 11]. Механизм их действия, как правило, объясняться взаимодействием углеводородных фрагментов с лектинами, блокируя адгезию вирусов (и многих бактерий) к клеткам организма-хозяина. В частности, активность в отношении вируса Эболы объясняется взаимодействием с лектином макрофагов и дендритных клеток DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin, CD209) [12]. Очевидно, что взаимодействие с лектинами обуславливается именно наличием сахарных остатков в структуре этих соединений, однако присутствие в их структуре фуллерена позволяет поддерживать глобулярную конформацию молекулы, что позволяет эффективно конкурировать за связывание лектинов с гликопротеинами инфекционных агентов. При этом гликозилированные фуллерены скорее следует рассматривать как исключение из правил: в случае с остальными производными терапевтическая активность препаратов связана именно со сферическим углеродным фрагментом фуллерена, а модификации требуются для улучшения технологических свойств (повышения растворимости, изменение поверхностного заряда). Таким образом, на основание данных современной литературы, для водной дисперсии немодифицированного фуллерена следует иметь в виду применение в качестве противовирусного средства.

1.1.2 Дерматотропные эффекты

Привлекательность использования фуллерена в качестве лекарственного или косметического средства для терапии заболеваний и повреждений кожи легла в основу ряда исследований и объясняется двумя основными факторами, обусловленными физико-химическими свойствами фуллерена. Первый – это способность проникать через защитный роговой слой эпителия. Роговой слой состоит из холестерина, свободных жирных кислот и длинных цепей керамидов; барьерная функция эпителия обеспечивается в основном благодаря высокой липофильности этих

соединений [13]. Однако, нефункционализированный фуллерен, благодаря высокой липофильности, связанной с однородностью распределения электронной плотности в структуре молекулы, способен с высокой эффективностью проникать в более глубоколежащие слои эпителия, что, в частности, позволяет рассматривать его как средство интрадермальной доставки лекарственных веществ и как индивидуальный действующий компонент в составе лекарственных средств для терапии заболеваний кожи [14]. Второй фактор – это сильное антиоксидантное действие фуллерена, которым, как правило, объясняют защитное действие фуллеренов на кератиноциты. Наличие большого количества ненасыщенных атомов углерода в структуре фуллерена позволяет ему активно взаимодействовать с активными формами кислорода (АФК), образование которых является важным звеном в патогенезе многих воспалительных заболеваний, в том числе заболеваний кожи [15, 16]. Повышение устойчивости к апоптозу, обусловленному действием АФК подтверждено исследованиями на многочисленных клеточных культурах [17, 18]. Стоит отметить, что фуллеренол – гидроксилированное производное фуллерена – так же обладает способностью предотвращать повреждения клеток под воздействием АФК, не смотря на более низкое по сравнению с фуллереном количество ненасыщенных атомов [19], однако его применение ограничивается фармакокинетическими факторами: повышение степени гидроксилированности фуллерена отрицательно влияет на способность фуллерена проникать в клеточную мембрану [20]. Таким образом, действие фуллерена изучено при кожных воспалениях различной этиологии. Наиболее простым по механизму развития воспалением является воспаление в результате иррадиации лазерным излучением; оно часто развивается как нежелательная реакция при лучевой терапии раковых заболеваний. Положительное влияние фуллерена на подобное воспаление описано в литературе на модели безволосых мышей: обработка гелем, содержащим фуллерен приводило к снижению содержания АФК и, как следствие,

ингибировало выработку циклооксигеназы-2, которая катализирует превращение арахидоновой кислоты в провоспалительные цитокины [21]. Стоит отметить, что повреждение лазерным излучением является очень частным случаем повреждения клеток кожи. Защитное действие фуллерена было изучено и на примере значительно более распространённого повреждения ультрафиолетовым излучением *in vitro* на клеточной линии человеческих кератиноцитов HaCaT [18].

Фуллерен проявляет противовоспалительное действие на коже и в более сложных кожных воспалениях. Фуллерен, солюбилизированный поливинилпирролидоном демонстрировал активность против акне в клинических исследованиях на людях и в исследовании *in vitro* на себоцитах хомяка [22]. По сравнению со случаями клеточного повреждения, опосредованного жёстким электромагнитным излучением, патогенез воспаления при акне – значительно более сложный процесс, обусловленный действием дермальной микробиоты и увеличением секреционной активности сальных желёз. Помимо снижения внешних проявлений воспаления в данном исследовании так же наблюдали снижение инфильтрации нейтрофилов в очаг воспаления. Таким образом, данное исследование демонстрирует, что фуллерен способен подавлять кожное воспаление за счёт связывания АФК не только в случаях, когда их генерация является пусковым событием, но и когда их продукция выступает звеном в патогенезе. От большинства противовоспалительных препаратов фуллерен отличает то, что он способен подавлять как неаллергические, так и аллергические воспаления. В частности, использование эмульсионной мази, содержащей водную дисперсию фуллерена C_{60} подавляло развитие воспаления в мышиной модели атопического дерматита [23]. Любопытно, что помимо снижения содержания иммуноглобулинов класса E и провоспалительных цитокинов, в данном исследовании также наблюдалось увеличение экспрессии некоторых генов, ответственных за восстановление эпителиального слоя, в частности филаггрина. Схожим образом, исследование модели ранозаживления

показало увеличение экспрессии некоторых генов, так или иначе способствующих стимуляции процесса репарации эпителиальной ткани [24]. Помимо этого, фуллерен оказывал защитное действие на кератиноциты при воздействии 2,4-нонадиеналя в модели возрастных изменений кожи [25]. Таким образом, хотя подавление “окислительного взрыва” является важным звеном в механизме действия фуллерена в моделях заболеваний кожи, он, очевидно, не является единственным, и дальнейшие исследования, направленные на поиск биологических мишеней фуллерена должны быть проведены.

1.1.3 Фуллерены в онкологических исследованиях

Несколько научных работ исследуют возможность применения фуллерена и его производных в терапии онкологических заболеваний. При этом предполагается использование фуллерена в виде действующего вещества, в качестве средства доставки, либо в комбинации с другим видом терапии для снижения нежелательных реакций.

Описано действие комплекса фуллерена с поливинилпирролидоном на клетки фибросаркомы линии HT1080. Внесение комплекса фуллерена в культуру в комбинации с иррадиацией видимым светам с интенсивностью, сравнимой с природным дневным светом, приводило к существенному замедлению роста клеток. При этом рост здоровых фибробластов линии DUMS16 в таких же условиях практически не изменялся [26]. Авторы исследования объясняют наблюдаемое действие образованием молекулярного кислорода под воздействием видимого света [27], однако это не объясняет избирательности действия в отношении раковых клеток. Тем не менее, данное исследование создаёт базу для будущего использования водных дисперсий фуллерена в качестве фотосенсибилизаторов при лучевой терапии. Большим преимуществом фуллеренов в данном контексте является, помимо избирательности действия, сравнительно низкая интенсивность необходимого облучения, что позволит сократить проявление нежелательных

реакций в ходе терапии. Помимо этого, противоопухолевый эффект фуллерена был зафиксирован на клетках человеческой карциномы линии HeLa с привитым геном, кодирующим флуоресцентные протеины GFP-LC3, облегчающим микроскопические наблюдения [28]. Как и в предыдущем исследовании, для проявления цитотоксического действия требовалось облучение клеток светом из видимого диапазона, и клеточная смерть была обусловлена генерацией свободных форм кислорода. В данном исследовании, однако, больше внимания уделяется механизмам специфического действия на опухолевые клетки: отмечается, что смерть клеток наступает в результате специфичного для опухолевых клеток протекания процесса аутофагии. Не менее важным является вывод исследователей о возможности использования фуллерена для терапии фармакорезистентных опухолей, обусловленной отличием в механизме действия фуллерена от других препаратов для химиотерапии опухолевых заболеваний.

Помимо этого, возможно использование фуллерена, модифицированного лизином, в качестве носителя для действующего вещества, в частности монометилфумарата [29]. В данном исследовании описывается использование pH-чувствительного линкера, подверженного гидролизу при значениях показателя кислотности среды, характерного для опухолевых клеток. Тропность фуллереновых производных к опухолевым клеткам всё ещё является предметом обсуждения, однако вероятнее всего в их интернализации задействован общий для наночастиц механизм активного транспорта, опосредованный аутофагией [30]. Отдельно стоит отметить преимущество данной терапевтической системы, заключающееся в способности проникать через гематоэнцефалический барьер, что делает возможным использование фуллерена для терапии опухолей головного мозга.

Наконец, возможно использование фуллерена и его производных для снижения токсичности и побочных действий препаратов для химиотерапии. Так, например, препарат иринотекан, применяемый в терапии солидных опухолей, способен при пероральном приёме вызывать лейкопению, воспаления слизистых оболочек и нарушение функций ЖКТ. Применение фуллеренола позволяло снизить проявление этих нежелательных лекарственных реакций [19]. Данный эффект связывают со снижением в исследованных тканях концентраций АФК и интерлейкинов класса 1β.

1.1.4 Прочие системные эффекты фуллерена

Исследования на модели интоксикации крыс тетрахлорметаном показали для фуллерена крайне выраженную гепатопротекторную активность [31]. Как и в случае с воспалительными повреждениями кожи, защитный эффект фуллерена на печень связывают с антиоксидантной активностью. Тетрахлорметан, метаболизируемый ферментами цитохрома p450 образует радикал трихлорметил, который запускает цепь перекисного окисления липидов, результатом которой становится повреждение клеточной мембраны и клеточная смерть [32]. Фуллерен, однако, способен эффективно связывать трихлорметильный радикал, предотвращая дальнейшее повреждение [33]. Помимо наблюдаемых визуально и микроскопически морфологических эффектов, введение фуллерена так же вызывало снижение выработки аскорбиновой кислоты в ответ на введение тетрахлорметана. В крысах, которым вводили тетрахлорметан без фуллерена концентрация аскорбиновой кислоты возрастала в 8 раз по сравнению с нормой, в то время как в крысах, получавших дисперсию фуллерена, её уровень оставался почти неизменным.

Одним из значимых эффектов фуллерена была способность подавлять воспаление в модели ревматоидного артрита *in vitro* на синовиальных

фибробластах и макрофагах человека и *in vivo* на крысиной модели коллаген-индуцированного аутоиммунного артрита [34]. В исследовании *in vitro* синовиальные фибробласты с макрофагами были отобраны у пациентов с ревматоидным артритом и стимулированы фактором некроза опухоли α, после чего у клеток определяли экспрессию провоспалительных цитокинов. Как и в исследовании совместного применения фуллерена и иринотекана, инкубация биоптата суставов с фуллереном C_{60} показала значительное снижение экспрессии интерлейкина 1β. В исследовании *in vivo* на крысах интраартикулярное введение дисперсии фуллерена показало значительное улучшение патоморфологической картины, снижение синовиальной гиперплазии и уменьшение инфильтрации провоспалительными клетками. Схожие результаты были ранее показаны на модели остеоартрита в кроликах [35]. В этом исследовании, однако, терапевтический эффект связывают не с воздействием на клетки иммунной системы, а с усилением катаболической активности самих хондроцитов.

Одним из ранних исследований, в значительной степени обозначившим интерес научного сообщества к использованию фуллеренов в биологии и медицине было изучение влияния перорального введения масляного раствора фуллерена C_{60} на продолжительность жизни у крыс [36]. Данное исследование включало в себя определение фармакокинетических параметров и изучение влияния на системы окислительно-восстановительного гомеостаза. Как и с описанных выше исследованиях авторы отмечают необычную для такой крупной молекулы способность фуллерена проникать в мозг через гематоэнцефалический барьер и снижение стресса на глутатионовую систему гомеостаза. Помимо этого, исследователи заявляют о важных новых данных, в частности, способности фуллерена всасываться в системный кровоток при пероральном введении. Однако, данный вывод нельзя распространять на дисперсии в полярных средах, т. к. физико-химические характеристики истинных и коллоидных растворов фуллерена могут значительно различаться. Вторым важным наблюдением

было значительное (примерно в два раза) увеличение продолжительности жизни крыс, получавших раствор фуллерена, по сравнению с крысами из контрольной группы. Авторы отмечают, что более продолжительный период введения раствора фуллерена в теории мог бы привести к большему увеличению продолжительности жизни, однако введение препарата было прекращено после смерти крыс из контрольной группы, поскольку изначальный дизайн эксперимента предполагал исключительно оценку токсических свойств препарата.

Стоит также упомянуть нейропротективное действие фуллерена. В мышиной модели болезни Альцгеймера, создаваемой путём введения бета-амилоида в гиппокампус мыши, введение водной дисперсии фуллерена позволяло значительно снизить выраженность признаков дегенерации нейронов [37]. Окислительный стресс играет важную роль в нарушении протеинового синтеза в развитии болезни Альцгеймера [38], однако восстановление функции рибосом не вполне объясняет отсутствие амилоидных бляшек в месте введения, отмеченное в исследовании. В литературе описана способность фуллерена препятствовать агрегации бета-амилоидов [39]. Среди производных с нейропротективным действием следует отметить карбоксифуллерены. В исследовании на культуре кортикальных нейронов карбоксифуллерены значительно снижали гибель клеток под воздействием агонистов NMDA-рецепторов: N-метил-D-аспартата и α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолепропионовой кислоты [40]. Причём активность карбоксифуллеренов в данном исследовании значительно превышала активность других скавенджеров, использованных для подавления нейротоксичности изучаемых агонистов.

1.1.5 Токсичность фуллерена и его производных

Поскольку описанный в предыдущей части потенциал использования фуллеренов и его производных в медицине крайне высок, оценка их токсичности представляется важной задачей для оценки реальных

перспектив создания препаратов для медицинского применения на их основе. В данной части будут рассмотрены результаты исследования токсичности фуллерена на различных моделях и при различных формах введения. Следует подчеркнуть, что необходимо различать токсичность, связанную непосредственно с фуллереновым ядром и токсичность, опосредованную модификацией этой молекулы. Функционализация C60 с целью повышения его гидрофильности и снижения токсичности существенно влияет на характер его взаимодействия с организмом [41]. Введение функциональных групп может нивелировать антиоксидантную активность фуллерена, т. е. резко изменить его характерные свойства.

Химическая модификация фуллерена оказывает значимое влияние на токсичность. Например, величина LD50 фуллерола при внутрибрюшинном введении мышам составляла 1,2 г/кг [42]. В одной из первых работ по фармакокинетике изучались эффекты внутривенного введения крысам препарата фуллерена бис(2-аминоэтил)-дифенилфуллерена, обладающего анти-ВИЧ активностью (ингибитор ВИЧ-протеазы). При введении 15 мг/кг среднее время персистенции препарата в плазме составляло ~7 часов, причем более чем на 99 % он был связан с белками плазмы. При этой дозе вещество хорошо переносилось животными, но при 25 мг/кг у них наблюдалось учащенное дыхание, резкие движения и гибель через 5 мин. Интересно, что токсические эффекты не наблюдалась, когда тот же самый препарат вводили мышам внутрибрюшинно (в/б) в дозе 50 мг/кг в течение 6 дней [43]. Между тем, изучение токсичности водорастворимого полиалкилсульфонилфуллерена показало, что оно нетоксично при пероральном введении, а при в/б введении его LD50 составляло 600 мг/кг (выводится вещество через почки) [44].

Обычно при внутривенном введении производные фуллерена очень быстро выводятся из кровотока и накапливаются в печени и других органах, при этом практически не удается обнаружить их следы в моче и фекалиях.

При пероральном введении, напротив, лишь следы обнаруживаются в печени через 6 ч., в то время как около 90 % экскретируется, а в моче обнаруживаются лишь следы. Например, сукцинильное производное фуллерена введенное крысам внутривенно, быстро распределялось по всем органам. При этом оно удерживалось в тканях около недели без серьезных токсических эффектов. При пероральном же введении наблюдалась его быстрая элиминация с экскрементами [45]. Испытания гидроксилированного фуллерена, фуллерола, показали, что при его внутрибрюшинном введении мышам и крысам LD50 составляло 0,5–2,4 г/кг [46]. При этом показано (in vivo), что фуллеролы могут снижать уровень микросомальных ферментов и уменьшать активность P450-зависимой монооксигеназы.

Биологические эффекты водорастворимых форм фуллерена зависят от различных факторов: метода получения, получаемой структуры, степени агрегации его молекул в процессе хранения, формы введения. Поэтому, нельзя обсуждать токсичность фуллерена как вообще некоего вещества, необходимо учитывать вышеуказанные факторы, и принять, что его различные модификации/формы являются различными препаратами.

Несмотря на то, что фуллерены используются уже 20 лет, ни в одной из стран мира они не были изучены на безопасность в полном объеме. В то же время имеется масса публикаций, связанных с анализом отдельных проявлений их биологической активности в экспериментах in vitro и in vivo, из большинства которых следует, что серьезных токсических эффектов у фуллерена C60 обнаружено не было. Первые работы по исследованию токсичности фуллерена появились уже в 1995-96 гг. [47, 48], и в них было показано, что при введении мышам фуллерена в дозе 2,5 г/кг, он не вызывал гибели мышей и побочных эффектов у животных при наблюдении в течение 8 недель. Отмечалось, что при внесении фуллерена в среду с культурой человеческих кератиноцитов или фибробластов наблюдается его довольно быстрое поглощение при отсутствии влияния на пролиферацию [49]. В то же

время имеется достаточно много противоречивых данных — их сложно унифицировать из-за разнообразия использованных препаратов C60 и примененных методов анализа. Так в 2004 г. неожиданно нашли токсическое воздействие водных наносуспензий фуллерена C60 (nC60; 0,5 мг/мл) на дафний и на мальков большеротого окуня, проявляющегося в форме окислительного стресса (образование продуктов перекисного окисления липидов) [50]. Однако позже выяснилось, что сама суспензия готовилась с применением органического растворителя тетрагидрофурана (ТГФ), который захватывался фуллереном, и токсичность препарата была связана именно с ним [51-52]. Например, LD50 для суспензии C60 (без ТГФ) в испытаниях на американском карпе (Pimephales promelas) достичь не удалось. Правда, в других тестах, на эмбрионах рыбки «полосатый данио» суспензия nC60 (1,5 мг/л) через четверо суток вызывала нарушение сердечного ритма и отек перикарда, а также замедляла развитие молоди. Токсичность снижалась при добавлении антиоксиданта глутатиона, т. е. данный образец фуллерена повел себя как окислитель. Использование в том же тесте гидроксилированной формы фуллерена (C60(OH)16–18) при 50 мг/л не вызывало никаких эффектов [53]. В других экспериментах, на дафниях, LD50 не удалось достичь даже при максимально возможной концентрации для nC60 — 35 мг/л в чистой воде и 22,5 мг/л в морской [50]. Многие дальнейшие исследования показали, что C60 не обладает острой токсичностью, а токсические эффекты, которые иногда наблюдаются, связаны с токсическими органическими растворителями, используемыми для приготовления растворов C60 [31].

Введение внутрибрюшинно мышам суспензии фуллерена в дозе 100 мг/кг не влияло на их поведенческие реакции (тест Irwin) по сравнению с контролем. Также, при изучении острой пероральной токсичности на крысах для смеси фуллеренов C60 и C70 (фуллерит) в дозе 2000 мг/кг за весь период наблюдения не наблюдалось никаких отрицательных эффектов [54]. Воздействие фуллерена на кожу изучали на мышах, вводя образец внутрикожно в дозе 200 мкг. Через 72 часа не было выявлено никакого

влияния ни на синтез ДНК, ни на индукцию орнитиндекарбоксилазы в эпидермисе. После подкожного введения образца фуллерена в дозе 100 мг/кг в течение 24 недель развитие опухолей (в отличие от группы мышей, которым вводили тетрадеканоилфорболацетат) не наблюдалось [55].

В общем, несмотря на большое количество биомедицинских исследований фуллерена, существует еще неопределенность относительно оценки его острой и, особенно, хронической токсичности, что в большой мере обусловлено разнообразием применяемых методик различными группами исследователей. Однако все больше данных свидетельствуют о безвредности немодифицированной формы фуллерена. Длительный эксперимент (5,5 лет) был проведен на крысах, в диету которых добавляли фуллерен в виде раствора в оливковом масле (C60-Olive), в качестве контроля использовали диеты с добавлением просто оливкового масла и воды. Оказалось, что фуллерен почти в два раза увеличивал продолжительность жизни крыс, а динамика изменения веса животных говорила об отсутствии явных токсических эффектов. Анализ механизмов действия с использованием экспериментальной модели интоксикации крыс четыреххлористым углеродом, показал, что влияние фуллерена на продолжительность жизни связано, по-видимому, с подавлением окислительного стресса [36]. Самые последние эксперименты, проведенные на крысах, показали, что водная дисперсия C60, стабилизованная крахмалом, не проявляет хронической токсичности при интрагастральном введении крысам, не обнаружено значимых различий в гематологических и биохимических показателях по сравнению с контролем [56].

В целом, для немодифицированного фуллерена не отмечается токсических эффектов для млекопитающих, что делает их привлекательными кандидатами для разработки лекарственных средств. От его производных его выгодно отличает отсутствие различий в токсических проявлениях, которые могут быть связаны со способом получения: токсичность производных

фуллерена с одинаковыми заместителями может отличаться в несколько раз в зависимости от их пространственного расположения [57]. Исключением можно считать комплексы фуллерена с полиэтиленгликолями и поливинилпирролидоном, проявляющие фототоксическое действие на иммортализованных клеточных линиях [27], однако те же исследования демонстрируют селективность этого действия и безопасность для здоровых клеток организма.

Тем не менее, данная глава наглядно демонстрирует, что токсичность фуллереновых препаратов может различаться в зависимости от структуры и способа получения. Поскольку цель проведения стандартизации – обеспечение эффективности и биологической безопасности лекарственных средств, для созданного стандартного раствора фуллерена требуется экспериментальное определение токсичности, что составляет одну из задач данного исследования.

1.2 Получение водорастворимых форм фуллерена

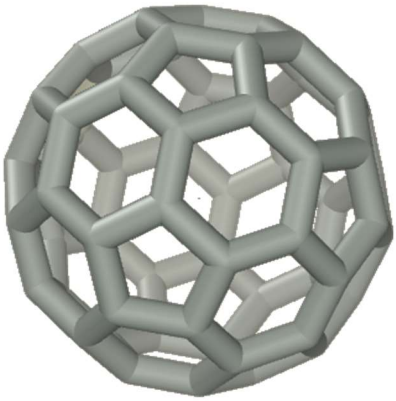


Рисунок 1. Структурная формула фуллерена C_{60}.

Фуллерен C_{60} (структурная формула приведена на рисунке 1) без дополнительной обработки практически нерастворим в воде [58, 59]. Исследованиями показана возможность химической модификации фуллеренов с получением водорастворимых продуктов, однако данный подход имеет ряд недостатков, подробно описанных выше: токсичность подобных производных как правило оказывается выше, а биологическая

активность, связанная с химической активностью sp^3-гибридизованных атомов углерода, снижается. Однако, фуллерены способны образовывать в воде крайне устойчивые коллоидные растворы (ранее упоминаемые как водные дисперсии или нанодисперсии фуллерена) с размером частиц измеряемым десятками или сотнями нанометров [60]. Данный подход активно использовался для получения водных дисперсий для биологических испытаний. В данной главе описаны некоторые подходы к созданию водных растворов фуллерена.

1.2.1 Химическая модификация

Основным типом химических превращений фуллеренов являются реакции по двойной связи – реакции нуклеофильного и радикального присоединения, циклоприсоединения. Такие реакции очень удобны для получения производных фуллерена, большинство образующихся в результате этих процессов аддуктов имеют достаточную стабильность, и это позволяет применять дальнейшие химические модификации для создания новых биологически активных веществ. Функционализированные фуллерены делятся на два класса: экзоэдральные - с заместителями на внешней поверхности и эндоэдральные – с захваченными молекулами внутри полости фуллерена. Экзоэдральные соединения являются доминирующим классом. Двойные связи С60 легко присоединяют различные нуклеофилы и радикалы. Этот тип присоединения был обнаружен самым первым среди различных химических превращений С60. Часто используемые реакции присоединения аминов протекают достаточно сложно и неоднозначно. Факты свидетельствует о том, что реакция идет по радикальному механизму, и в присутствии кислорода происходит окисление фуллерена. Основными методами функционализации являются именные реакции Прато – 1,3-диполярное присоединение [61] и реакция Бингеля – циклопропанирование до метанофуллерена [62]. Позже появились данные о возможности прямого аминирования фуллеренов [63] и проведения реакции Фриделя-Крафтса для

их функционализации [64]. Достижения последнего десятилетия в химии фуллеренов сводятся к вариантам этих реакций, объяснению механизмов и применению их для получения различных соединений. В последние годы были получены ценные данные, касающиеся механизма протекания этих реакций [65], в частности, эти данные позволяют предсказывать региоселективность реакции. Преимущество реакции Прато заключается в образовании химически-активного центра, подходящего для конъюгации с органическими кислотами. Возможность использования продукта этой реакции для конъюгации с аминокислотами, выступающими в роли линкера для создания более сложных молекул, уже была продемонстрирована экспериментально [29]. Реакция Бингеля и реакция Фриделя-Крафтса являются реакциями нуклеофильного присоединения. Таким способом получали ряд противовирусных производных фуллерена [66]. Гликозилирование с помощью реакции Фриделя-Крафтса в фуллереновой химии уже считается сравнительно рутинной процедурой, для производных, полученных этим образом зафиксирована значительная противовирусная активность [67]. Возможно также прямое присоединение аминокислот и циклических аминов к фуллерену С60 в гомогенной органической среде [63]. Существенное количество публикаций посвящено способам получения гидроксилированного фуллерена, или фуллеренола. Один из наиболее ранних способов получения фуллеренола заключался в нитровании фуллерена раствором нитрита натрия в концентрированной азотной кислоте – характерная для ароматических соединений реакция – с последующим гидролизом в щелочной среде [68]. С помощью этого метода можно получить фуллеренол, гидроксилированный по 16 положениям. Получение фуллеренов с более высокой степенью гидроксиллированности также возможно: для этого фуллеренол, замещённый по 12 положениям посредством полициклосульфонирования с последующим гидролизом [69] подвергают дальнейшему окислению пероксидом водорода в течение длительного времени (до двух суток) [70]. Данные реакции, однако, обладают низкой

региоселективностью и воспроизводимостью, что делает их менее желательными для получения препаратов для медицинского применения.

1.2.2 Получение водных дисперсий и водорастворимых комплексов

Как было упомянуто ранее, фуллерен в воде способен образовывать устойчивые дисперсии с низким размером частиц и высокой агрегационной стабильностью. Последняя в литературе как правило объясняется сильным отрицательным поверхностным зарядом частиц фуллерена в водных дисперсиях [71]. Теории о происхождении этого заряда, однако, различаются. Некоторые исследователи выдвигают гипотезы об окислении поверхностного слоя частиц фуллерена с образованием гидроксифуллеренов [72] или эпоксидов фуллерена [73]. Некоторые авторы также говорят о способности фуллеренов образовывать анионы – фуллериды [74]. Хотя единого мнения о природе коллоидной стабильности фуллереновых дисперсий до сих пор нет, в литературе описан ряд способов их получения, как и способы их применения в биологии и медицине.

Наиболее технологически простым способом является прямое диспергирование порошка фуллерена в воде под действием ультразвука или механического воздействия [75-77]. Следует отметить, что данный способ является достаточно низкотехнологичным, отнимая существенное время для приготовления и давая низкие выходы и итоговые концентрации фуллерена в водной фазе (порядка 10 мкг/мл), и используется чаще всего для моделирования распределения фуллеренов в природных водоёмах для экологических исследований. Последние, в частности, позволили установить повышение коллоидной стабильности дисперсий фуллеренов под воздействием присутствующих в норме в почве гуминовых веществ [52, 78], однако их использование для солюбилизации фуллерена вне исследовательской лабораторной практики затрудняется отсутствием стандартизованного способа их получения.

Один из наиболее распространённых способов получения водных дисперсий фуллерена – перерастворение из органических растворителей, для которых показана хорошая растворимость фуллерена, в водную фазу под воздействием ультразвука. Оригинальная методика предполагала растворение в толуоле и озвучивание в течение суток (иногда более) [79]. В процессе озвучивания фуллерен переходит в водную фазу в виде коллоидов, а толуол удаляется из-за нагревания системы путём испарения. Стоит отметить, что метод обладает целым рядом существенных недостатков: во-первых, получение водных дисперсий таким способом крайне продолжительно и даёт малые выходы (порядка 50% фуллерена переходит в водную фазу). Во-вторых, он предполагает использование летучего и легковоспламеняющегося толуола при нагревании в системе, предполагающей контакт с воздухом рабочих помещений, что создаёт существенные трудности в организации безопасности рабочего места. Наконец, вместе с фуллереном в водную фазу переходит значительное количество толуола, который удерживается в составе частиц фуллерена за счёт стекинговых взаимодействий. Хотя процесс впоследствии был усовершенствован для увеличения выхода фуллерена в водную среду [80], другие недостатки метода всё ещё предстоит решить. Наиболее фундаментальной проблемой использования ультразвука для перевода фуллерена в полярную фазу является низкая воспроизводимость результатов, т. к. процесс озвучивания очень плохо поддаётся стандартизации. Поскольку свойства растворов фуллерена зависят от методики их получения [81], использование подобных методик для получения средств для медицинского применения является нежелательным. Однако оригинальная методика оказала значительное влияние на направление дальнейших исследований: во-первых, она предоставила удобный способ получения образцов для биологических исследований, во-вторых, обозначила перерастворение из органических растворов как один из ведущих методов в методиках получения дисперсий фуллерена, предложенных впоследствии. В частности,

на этой методике основано получение водорастворимых комплексов фуллерена с поливинилпирролидоном: при добавлении на стадии озвучивания в водный раствор избытка ПВП (порядка 350-кратного избытка по массе), образуется дисперсия, способная после высушивания перерастворяться в воде. Однако, биологическая активность полученной таким способом дисперсии снижается из-за наличия в растворе мицелл поверхностно-активных веществ [82]. Предложенный позже способ получения водных дисперсий фуллерена, также основанный на смене растворителей предполагал растворение в тетрагидрофуране, смешивании полученного раствора с водой и удалении тетрагидрофурана из полученной дисперсии путём пропускания азота [83].

Наиболее пригодным для получения водных дисперсий для медицинского применения является растворение фуллерена в 1-метил-2-пирролидоне с последующим смешиванием с водой и удалением исходного растворителя посредством диализа через полупроницаемую мембрану [84]. Данный метод обладает рядом преимуществ перед аналогами: он исключает использование низковоспроизводимого ультразвука, использует значительно менее токсичный исходный растворитель [85], что позволяет увеличить показатель допустимых примесей. Помимо этого, растворитель удаляется из дисперсии без перевода в газовую фазу, что позволяет значительно упростить масштабирование технологического процесса: очистка сточных вод от растворителя значительно легче, чем очистка воздуха. К недостаткам метода можно отнести низкую скорость процесса (в отличие от обратного осмоса, удаление растворителя диализом требует времени для установления трансмембранного Доннановского равновесия), низкие выходные концентрации (порядка 300 мкг/мл) и большой раствор выступающей в качестве диализной среды дистиллированной воды. Последнее, хотя и менее значимо на этапах лабораторной разработки, может значительно увеличить издержки производства при масштабировании.

1.3 Подходы к стандартизации водных дисперсий фуллерена

1.3.1 Определение качественного и количественного содержания фуллерена

Фуллерен обладает характерным спектром поглощения в ближней ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Причём спектр поглощения в видимой области позволяет различать коллоидное состояние раствора от истинного: в коллоидном состоянии присутствует выраженный максимум при длине волны порядка 340 нм [86, 87]. Причём эта длина волны является характеристической, т. е. светопоглощение при ней подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера с широкими пределами линейности, что делает спектрофотометрические измерения пригодными не только для количественного, но и для качественного определения содержания фуллерена в растворе [75]. Стоит отметить, что спектры фуллерена в полярных растворителях подвержены определённым изменениям: в литературе описаны сольватохромные сдвиги спектров фуллерена, приводящие к вырождению пиков и сглаживанию спектров [88]. Предположительно, данные изменения в показаниях спектроскопии соответствуют образованиям донорно-акцепторных связей между фуллереном и метилпирролидоном; причём изменение электронной структуры может оказывать влияние на биологические свойства раствора. Таким образом, создание образца, пригодного для получения «стандартных» спектров для сравнения является актуальной задачей данного исследования.

Помимо этого, идентификация фуллерена ИК спектроскопией в ближней области спектра также возможна [84, 86]. В ближней области спектра наблюдают характерный дублет узких полос поглощения при длине волны порядка 510-520 см$^{-1}$. Очевидным недостатком такого подхода является невозможность проведения анализа в водной среде. Таким образом, анализ этим методом требует дополнительной пробоподготовки в виде высушивания образца. Тем не менее, поскольку метод БИК-спектроскопии с

преобразованием Фурье является распространённой техникой фармацевтического анализа, оценка его применимости для анализа водного раствора фуллерена является важной задачей данной работы.

Стоит отдельно упомянуть, что часто используемый для исследования первичных стандартных образцов метод ядерно-магнитного резонанса является очень ограниченно применимым к исследованию фуллерена. В его структуре отсутствуют атом водорода, что делает неэффективным использование протонно-магнитного резонанса, даже при условии использования дейтерированных растворителей. В исследовательских целях находит применение вариант ^{13}C-ядерно-магнитного резонанса, где фуллерен даёт выраженный пик со сдвигом 142.8 ppm относительно тетраметилсилана. Метод широко применим для исследования современных углеродных материалов, однако требует использования ^{13}C-обогащённых фуллеренов. Помимо этого, при получении водных растворов фуллерена посредством конденсации из органических растворов, значительные примеси растворителей препятствуют эффективной идентификации.

Наконец, одним из наиболее эффективных методов фармацевтического анализа остаётся высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). К его преимуществам относится возможность одновременного количественного и качественного анализа, а также определение примесей в пределах одного анализа. Хроматография фуллеренов, однако, связана с определённой спецификой. Изначально предложенная методика, используемая для очистки и контроля качества фуллеренов при синтезе, предполагает применение необычной комбинации полярной подвижной и неподвижной фазы: смесь толуола с ацетонитрилом 70:30 и октадецилсиликагель соответственно [89]. В качестве детектора предлагается использовать спектрофотометрический детектор при длине волны 280 нм. Спектрофотометрические детекторы являются достаточно распространёнными и дешёвыми, что делает возможность их использования

преимуществом данной аналитической методики, однако сочетание подвижной фазы, типичной для нормальнофазной хроматографии, с стационарной фазой для обращённофазной хроматографии создаёт технические трудности: необходимость использования менее резистентных к перепадам давления металлических капилляров и инжекторных петель, необходимость тщательной промывки хроматографической системы перед проведением обращённофазной хроматографии в классическом варианте, а также риски, связанные с использованием токсичных и легковоспламеняющихся растворителей. В результате актуальности вопроса хроматографии фуллерена и его производных были разработаны специализированные сорбенты, обеспечивающие высокое разрешение пиков при препаративном и аналитическом разделения [90, 91]. Впрочем, подобные колонки скорее актуальны для инженерных производств, так как исходная субстанция фуллерена C_{60}, используемая для приготовления водных растворов, является в достаточной степени очищенной от возможных побочных продуктов (высших фуллеренов, фуллерена C_{70}, графена и т. д.), чтобы исключить присутствие примесей других углеродных материалов. Разделение же фуллерена и возможных продуктов окисления возможно с использованием октадецилсиликагеля. При этом, определение фуллерена в полярных растворителях, где он присутствует в виде коллоидных частиц, сопряжено с необходимостью дополнительного проведения пробоподготовки для его извлечения в органическую фазу. Подобные методики используются для определения содержания фуллерена в виде загрязнителя при экомониторинге почвы и природных водоёмов [92, 93], и включают в себя многократную экстракцию органическими растворителями, либо экстракцию, проводимую под воздействием ультразвука. Помимо необходимости пробоподготовки, являющейся очевидным недостатком из-за затрат времени и материалов, данная техника не позволяет охарактеризовать коллоидное состояние раствора, так как частицы фуллерена разрушаются при переходе в неполярную фазу. Однако, в современной литературе не

охарактеризовано хроматографическое поведение фуллерена в коллоидном состоянии. Задачей данного исследования, в том числе, является изучение взаимодействия фуллерена в его водных дисперсиях с распространёнными хроматографическими неподвижными и подвижными фазами.

1.3.2 Нанодисперсные системы в практике фармацевтического анализа

Современные тенденции в медицине и фармации часто предполагают использование жидких дисперсных систем, не являющихся истинными растворами. В этом контексте особое значение принимает анализ размера частиц, в первую очередь из-за способности крупных частиц вызывать эмболию при попадании в системный кровоток [94]. При этом наиболее изученными на данный момент ультрамикрогетерогенными системами для использования в медицине являются липосомальные препараты, многие из которых являются разрешёнными для медицинского применения [95-97]. Помимо соображений безопасности, размер частиц приобретает значение в анализе лекарственных средств из-за возможных изменений в фармакологической активности препаратов [98, 99]. Таким образом, при разработке протокола стандартизации водных дисперсий фуллерена следует рассмотреть физико-химические методы анализа, позволяющие оценить их дисперсионные свойства.

В целом, такие методы разделяют на две большие группы: имаджинговые методы, позволяющие получить данные, поддающиеся визуальной оценке, и неимаджинговые, в которых полученные данные обрабатываются при помощи расчётов с использованием математических моделей [100]. Первые обладают преимуществом возможной одновременной оценки размера и формы частиц и в целом более информативны, однако интерпретация данных в таких методах осуществляется человеком, что может увеличить погрешности и в определённой степени лишает полученные результаты объективности. Отчасти этот эффект сглаживается использованием современного программного обеспечения для обработки

результатов, однако стандартом всё ещё остаётся визуальная оценка данных квалифицированным сотрудником [101]. К имаджинговым методам относят растровую и просвечивающую электронную микроскопию, а также атомно-силовую микроскопию. Помимо трудности в обработке результатов испытания, к недостаткам данного метода следует отнести пробоподготовку: поскольку все подобные измерения производятся в условиях глубокого вакуума, получение изображений с жидких образцов невозможно. Процедура получения изображения включает в себя нанесение на подходящую матрицу, высушивание и непосредственно микроскопию. Стоит отметить, однако, что фуллерены, будучи углеродными материалами, достаточно хорошо подходят к исследованию методами электронной микроскопии, поскольку не требуют дополнительного напыления проводящего материала, в отличие от сложных биологических макромолекул, способных ионизоваться под воздействием направленного пучка электронов. Одной из задач данного исследования является оценка применимости электронной микроскопии для контроля качества дисперсий фуллерена.

К неимаджинговым техникам относят динамическое светорассеяние (называемое также «фотокорреляционной спектроскопией» по названию основного метода расчёта результатов), малоугловое рассеяние нейтронов и малоугловое рентгеновское рассеяние. Данные способы позволяют получить данные о размере частиц. Помимо этого, проведение светорассеяния в магнитном поле позволяет получить данные о поверхностном заряде частиц, в то время как использование методов малоуглового рассеяния позволяет, помимо данных о размере частиц, получить сведения об их структуре. Разработка протокола стандартизации водного раствора фуллерена с использованием способов исследования размера частиц является актуальной задачей данного исследования.

Выводы к главе 1

В связи с изложенным, хотя в литературе описано множество способов получения водных растворов фуллерена, ни один из них в полной мере не удовлетворяет требованиям, предъявляемым к производству стандартизованных лекарственных препаратов. Таким образом, разработка новой методики, позволяющей стандартизацию конечного продукта, является актуальной задачей, решаемой в данном исследовании.

Приведённый выше анализ современной литературы позволяет сделать выводы о перспективности разработки лекарственных препаратов на основе водной дисперсии фуллерена C_{60}. Помимо этого, обзор литературы указывает на спектральные методы в качестве основного метода качественного и количественного анализа, а также демонстрирует необходимость определения размера частиц при проведении контроля качества водного раствора фуллерена. Поскольку физико-химические и фармакодинамические свойства фуллерена различаются для субстанции фуллерена и фуллерена в водных дисперсиях, требуется составление нормативной документации для раствора.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1 Спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области

Измерение спектров поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях производилось с использованием спектрофотометра Agilent Cary 100 UV-Vis. В опытах использовались кварцевые кюветы с длиной светопоглощающего слоя 10 мм. Визуализация и обработка данных осуществлялась с использованием пакета программного обеспечения Cary WinUV.

Для составления калибровочного графика 10 мг фуллерена C_{60} (99,9%, неотек продакт) растворяли в 100 мл 1-метил-2-пирролидона (99,9%, Panreac Applichem), после чего готовили разведения в воде деионизованной с концентрациями фуллерена 0,01; 0,0075; 0,005; 0,0025 и 0,001 мг/мл. Для растворов определяли светопоглощение при длине волны 340 нм, по полученным данным строили калибровочный график.

2.2 Спектроскопия в ближней инфракрасной области

Спектры в ближней ИК-области исследовали с использованием ИК-спектрофотометра Bruker Alpha IR, измеряющего спектры полного аттенуированного отражения с фурье-преобразованием (ATR FTIR spectroscopy). Для измерения БИК-спектров образцы подвергали заморозке при -20°C и лиофильному высушиванию при давлении 50 мТорр.

2.3 Анализ элементного состава

Для проведения элементного анализа определённый объём водной дисперсии фуллерена замораживали в токе жидкого азота и подвергали лиофильному высушиванию в глубоком вакууме при давлении 40-50 мТорр. Полученный сухой порошок подвергали исследованию на элементном анализаторе Perkin Elmer 2400 series II.

2.4 Масс-спектрометрия

Масс-спектры были получены методом матричной лазерной-десорбционной масс-спектрометрии (MALDI-TOF, MicroflexTM LT MALDI-TOF, Bruker Daltonics).

2.5 Изучение кинетики растворения фуллерена в 1-метил-2-пирролидоне

20 мг фуллерена C_{60} («неотек продакт») растворяли при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в 25 мл 1-метил-2-пирролидона («sigma-aldrich»). Через установленные промежутки времени производили спектроскопию в видимой и ближней УФ-области, результаты которой представлены ниже. Для проведения спектроскопии пробу объёмом 0,1 мл прибавляли к 1,9 мл 1-метил-2-пирролидона, в качестве раствора сравнения использовали чистый 1-метил-2-пирролидон. Во время всех операций доступ света к раствору был ограничен. Количественное определение фуллерена проводили посредством составления калибровочного графика.

2.6 Тупиковая ультрафильтрация

Для оценки взаимодействия частиц фуллерена с материалами мембран была использована установка для тупиковой ультрафильтрации. Была использована ячейка amicon 8200, рабочий газ – аргон, избыточное давление – 1 кПа, использованные мембраны: amicon PM 10 (MWCO 10 кДа), amicon PM 30 (MWCO 30 кДа), amicon XM 10 (MWCO 10 кДа), amicon XM 50 (MWCO 50 кДа), Millipore ultracel 30 кДа и Millipore ultracel 100 кДа. 50 мл стокового раствора фуллерена C_{60} в 1-метил-2-пирролидоне с концентрацией 0,8 мг/мл смешивали с 100 мл воды деионизованной, вносили в ячейку и создавали избыточное давление аргона 10-15 кПа в условиях непрерывного перемешивания на магнитной мешалке. При снижении объёма раствора в ячейке до 50 мл, процесс приостанавливали и восполняли объём водой деионизованной до 50 мл. Процесс продолжали до прекращения

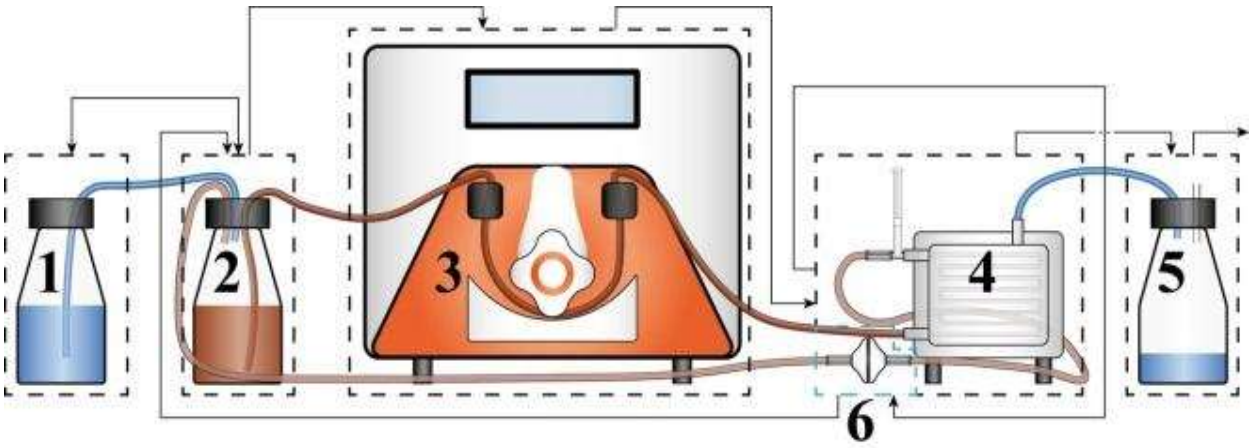
детектирования в токе пермеата максимума светопоглощения при длине волны 193 нм (характеристический максимум НМП), либо до снижения объёмной скорости тока пермеата ниже 0,1 мл/мин из-за сорбции фуллерена на поверхности мембраны. Результаты процесса оценивали по выходу фуллерена в итоговый раствор и визуально по степени сорбции фуллерена на мембране.

2.7 Тангенциальная ультрафильтрация

Для опытов по тангенциальной ультрафильтрации (ТУФ) были использованы следующие варианты методики: 80 мг порошка фуллерена C_{60} (неотек продакт, 99,9%) растворяли в 100 мл 1-метил-2-пирролидона (sigma Aldrich, 99,5%) посредством перемешивания на магнитной мешалке в течение как минимум 2 часов (хотя кинетика растворения фуллерена была описана в литературе [87], для подтверждения этих данных в рамках данного исследования был проведён соответствующий опыт). Полученный раствор фиолетового цвета фильтровали через стекловолоконных фильтр (sigma aldrich, 2,6 μm) и смешивали со 100 мл вытесняющего раствора. В качестве вытесняющего раствора использовали воду деионизованную (получали с использованием системы для очистки воды thermo fisher barndtead), 0,4% растворы твин 20, твин 80, полоксамера 188, полоксамера 407 (sigma Aldrich) и 0,1% раствор полоксамера 407. После добавления вытесняющего раствора наблюдается изменение окраски раствора до коричневого и опалесценция (изменение спектральных свойств раствора фуллерена при переходе в коллоидное состояние описано в предыдущей главе). Для осуществления ТУФ были использованы ячейки amicon CEC-1 и sartorius vivaflow 50, с использованием мембран из полисульфона (amicon PM 10 и amicon PM 30, вес отсечения 10 и 30 кДа соответственно), полиакрилнитрила (amicon XM 10 и amicon XM 50, вес отсечения 10 и 50 кДа соответственно), регенерированной целлюлозы (Millipore ultracel 30 кДа и Millipore ultracel 100 кДа) и гидросарта (sartorius MWCO 30 кДа и sartorius MWCO 100 кДа). Ток

ретентата в ячейке обеспечивался перистальтическим насосом Spectrumlabs KrosFlo research 1 и составлял порядка 60 мл/мин для ячейки CEC-1 и порядка 200 мл/мин. Избыточное гидростатическое давление не превышало 0,5 кПа в обоих случаях. Потери в объёме ретентата возмещались за счёт подачи вытесняющего раствора в ёмкость с ретентатом. Оценка процесса производилась по скорости пермеирующего тока и потерям фуллерена на мембране (выходу процесса). Для получения более крупных объёмов водной дисперсии фуллерена (более 100 мл) между ТУФ ячейкой и ёмкостью с ретентатом вставляли стекловолоконный фильтр, для предотвращения попадания преципитировавших частиц фуллерена, способных выступать центрами кристаллизации, обратно в раствор. Схема установки для ультрафильтрации представлена на рисунке 2.

Рисунок 2. Схема прибора для ультрафильтрации: 1 – ёмкость с



вытесняющей жидкостью, 2 – ёмкость с ретентатом, 3 – перистальтический насос, 4 – ультрафильтрационная ячейка, 5 – слив пермеата, 6 – держатель со стекловолоконным фильтром

2.8 Получение водных дисперсий фуллерена способом смены растворителей посредством обработки ультразвуком

Для сравнения спектральных характеристик фуллерена получали раствор по описанной в литературе методике [80]. Навеску фуллерена C_{60} (неотек продакт 99,5%) 50,2 мг растворяли в 50 мл толуола (panreac 99,9%), при перемешивании на магнитной мешалке в течение часа. Полученный раствор фиолетового цвета перенесли в коническую колбу объёмом 1000 мл,

добавили 500 мл воды дистиллированной, поместили колбу в ультразвуковую баню («сапфир» 9,5) и озвучивали при частоте ультразвуковых волн 35 кГц, с мощностью 0,2 кВт. Наблюдалось образование эмульсии и помутнение водного слоя. Озвучивание проводили в течение 5 дней по 8 часов в день. Режим озвучивания не предусматривал термостатирования, температура находилась в пределах 20-60°C. После окончания озвучивания раствор кипятили при перемешивании на магнитной мешалке в течение 15 минут. Раствор фильтровали через стеклянный фильтр с диаметром пор 100 мкм. Снимали спектр раствора. Концентрация раствора составила 0,122 мг/мл, объём – 370 мл, выход составил 90,3%.

2.9 Исследование коллоидных свойств дисперсий

Исследование размера и заряда частиц производилось методом динамического светорассеяния с использованием анализатора размера частиц photocor compact-z. Для исследования использовались дисперсии, полученные способом ультрафильтрации, стабилизированные полоксамерами 188, 407 и твином 20 и 80. Дисперсии разбавляли до концентрации 0,1 мг/мл водой дистиллированной, измерения светорассеяния производили 5 раз в течение 10 секунд, обработку полученных данных производили с помощью пакета программного обеспечения dyna-LS. Для дальнейших испытаний был отобран раствор фуллерена, стабилизированный 0,01 мг/мл раствором полоксамера 407. Полученные данные динамического светорассеяния были подтверждены с использованием анализатора Malver zeta-sizer nano ZS. Структура частиц была исследована на электронном просвечивающем микроскопе MAIA3 Tescan после нанесения на матрицу SPI. Для углублённого изучения структуры частиц было проведено исследование методом малоуглового рассеяния нейтронов с использованием малоуглового дифрактометра ЮМО. В качестве источника нейтронов использовался импульсный реактор ИБР-2. Обработка результатов

проводилась с использованием набора программного обеспечения SAS. Образцы вносили в кварцевые кюветы с длиной слоя жидкости 1 мм.

2.10 Хроматография в тонком слое сорбента

Для оценки хроматографического поведения водных дисперсий фуллерена были использованы системы с полярным и неполярным сорбентом.

Стандарт фуллерена C_{60}, растворённый в толуоле, и образец водного раствора фуллерена наносили на пластинки пластинки whatman DC-kieselgel 60, whatman SC-5 Multi-K K5F KC18F и whatman diphenyl reversed phase. Исследованные подвижные фазы включали смеси толуола и ацетонитрила 1:1, 6:4 и 7:3, смесь этилацетата, этанола и ледяной уксусной кислоты 49,5:49,5:1, 59,5:39,5:1 и смесь этилацетата, этанола и 25% водного раствора аммиака 49,5:49,5:1, 59,5:39,5:1. Обнаружение пятен проводили визуально. Расстояние от линии старта до линии финиша составляло 10 см.

2.11 Исследование хронической токсичности

Для исследования были использованы самки мышей линии BALB/c массой 19-21 г в возрасте 6-8 недель на начало исследования. Экспериментальная и контрольная группы получали ежедневные интраперитониальные инъекции 500 мкл водной дисперсии фуллерена с концентрацией 400 мкг/мл (экспериментальная группа) или фосфатно-солевого буфера (PBS) (контрольная группа), в течение 30 дней, после чего осуществляли забор крови из орбитальной вены. Затем производилось некропсия мышей с забором сердца, тимуса, лёгких, селезёнки, толстого и тонкого кишечника, поджелудочной железы, почек, надпочечников, матки, яичников и лимфатических узлов. Кровь подвергали общему анализу для установления содержания форменных элементов, органы были взвешены, зафиксированы в парафине, препарированы микротомом и окрашены по

Гимзе (гематоксилин-эозин). Полученные препараты микроскопировали в иммерсионной системе при увеличении в 100, 200 и 400 раз.

2.12 Тест с нитротетразолием синим (NBT-тест)

В пластиковую пробирку объёмом 0,65 мл вносили 120 мкл смеси, содержащей 0,12 мг NBT в среде фосфатно-солевого буфера (pH=7,4) для положительной контрольной группы и 0,12 мг NBT и 0,06 мг фуллерена C60 в среде фосфатно-солевого буфера для экспериментальной группы. Для того, чтобы исключить получение ложноположительного результата, в эксперименте присутствовал отрицательный контроль. В пробирки этой группы вносили 120 мкл фосфатно-солевого буфера. К смеси прибавляли 200 мкл цельной венозной крови. Для экспериментов использовалась кровь здоровых добровольцев, собранная в вакутейнеры, содержащие 20 МЕ гепарина. Пробирки с кровью и реакционной смесью перемешивали и инкубировали 10 минут при температуре 37°C и 10 минут при комнатной температуре. После этого на предметное стекло наносили 20 мкл крови, готовили мазок, высушивали его на воздухе. На предметное стекло наносили 1 мл 0,3% красителя Романовского-Райта, выдерживали 15 секунд, после чего добавляли 1 мл воды дистиллированной и выдерживали ещё 30 секунд. После этого мазок промывали водой, давали высохнуть и изучали микроскопией в иммерсионной системе. Определяли количество нейтрофилов с формазановыми депозитами по отношению к общему числу нейтрофилов.

2.13 Анализ цитотоксичности с использованием MTT-теста

Анализ цитотоксичности проводили в соответствии с процедурой, описанной ранее в литературе [102]. Для анализа были использованы клетки линий A549 (базальные эпителиальные клетки человеческой альвеолярной аденокарциномы), HepG2 (клетки рака печени человека) и HeLa (клетки рака

шейки матки человека). Клетки 1,5 тыс. клеток засевали в 96-луночный планшет в объёме 100 мкл среды Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) и инкубировали в течение ночи при 37°C при 5% CO_2. Супернатант затем отбрасывали и прибавляли 100 мкл среды, содержащей 50, 16.6, 5.5, 1.9, 0.21, 0.069, 0.023, 0.008 и 0 (отрицательный контроль) мкг C_{60}, или дистиллированную воду (положительный контроль) с последующей инкубацией в течение 24 часов. После инкубации в лунки вносили 25 мкл 4 мг/мл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (MTT) с последующей инкубацией в течение 4 часов. Затем в лунки вносили лизирующий буфер, представляющий собой 20% раствор додецилсульфата натрия (SDS) в 0,2 Н серной кислоте, инкубацию продолжали в течение 24 часов. Затем проводили измерение светопоглощения при длинах волн 570 и 650 нм на ридере MultiscanGO (Thermo Scientific).

Выводы к главе 2

В главе описаны методики для получения водного раствора фуллерена и контроля его качества, произведён подбор оптимальных материалов и оборудования.

ГЛАВА 3. Разработка способа получения и методов фармацевтического анализа водного раствора фуллерена

3.1 Изучение кинетики растворения фуллерена в 1-метил-2-пирролидоне

В литературе регулярно встречаются описания использования спектрофотометрии в видимой области для количественного определения фуллерена, однако описанные показатели светопоглощения при характеристической длине волны ~340 нм варьируется в зависимости от источника от 18900 $М^{-1}см^{-1}$ до 68000 $М^{-1}см^{-1}$ [90, 92]. Использование именно этого максимума в качестве характеристического объясняется его независимостью от коллоидных свойств раствора, отличающей его от двух пиков с более низкой длиной волн [103]. Для дальнейших исследований был составлен калибровочный график (см. рисунок 21), молярный коэффициент экстинкции составил 50200 $М^{-1}см^{-1}$. Результаты измерений представлены на рисунке 3.

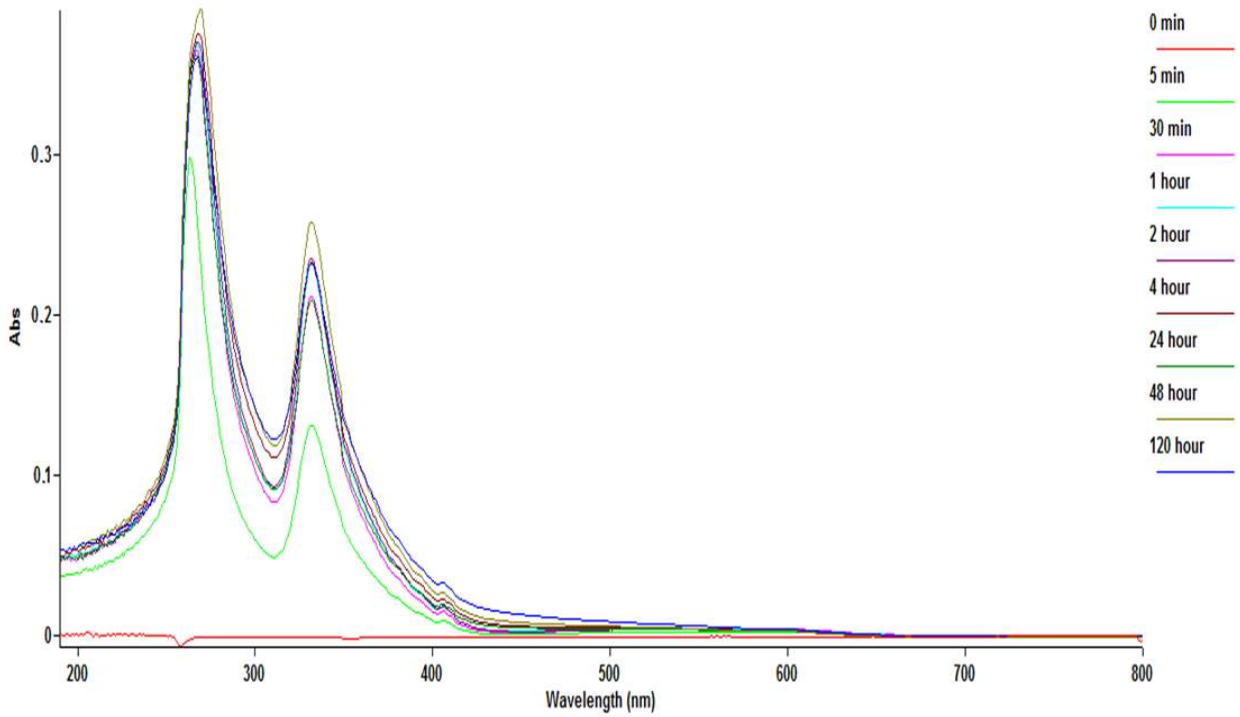


Рисунок 3. УФ-вид спектры поглощения фуллерена в НМП на разных стадиях растворения в области 190-800 нм

Результаты обработки полученных в результате 3 повторов данных обобщены в таблице 1. Приведены средние значения со среднеквадратичными отклонениями.

Таблица 1. изучение кинетики растворения фуллерена C_{60} в НМП

время, часы	светопоглощение при длине волны 340 нм	концентрация в растворе, мг/мл	% растворённого фуллерена
0,08	0,128 ± 0,014	0,37 ± 0,04	46,02 ± 5,10
0,5	0,215 ± 0,011	0,62 ± 0,03	77,09 ± 3,82
1	0,225 ± 0,010	0,64 ± 0,03	80,56 ± 3,51
2	0,233 ± 0,009	0,67 ± 0,03	83,43 ± 3,27
4	0,221 ± 0,002	0,63 ± 0,01	79,12 ± 0,64
24	0,224 ± 0,017	0,64 ± 0,05	80,44 ± 6,14
48	0,245 ± 0,008	0,70 ± 0,02	87,85 ± 2,87
120	0,232 ± 0,015	0,67 ± 0,04	83,31 ± 5,42

Данные из таблицы представлены графически на графике на рисунке 4.

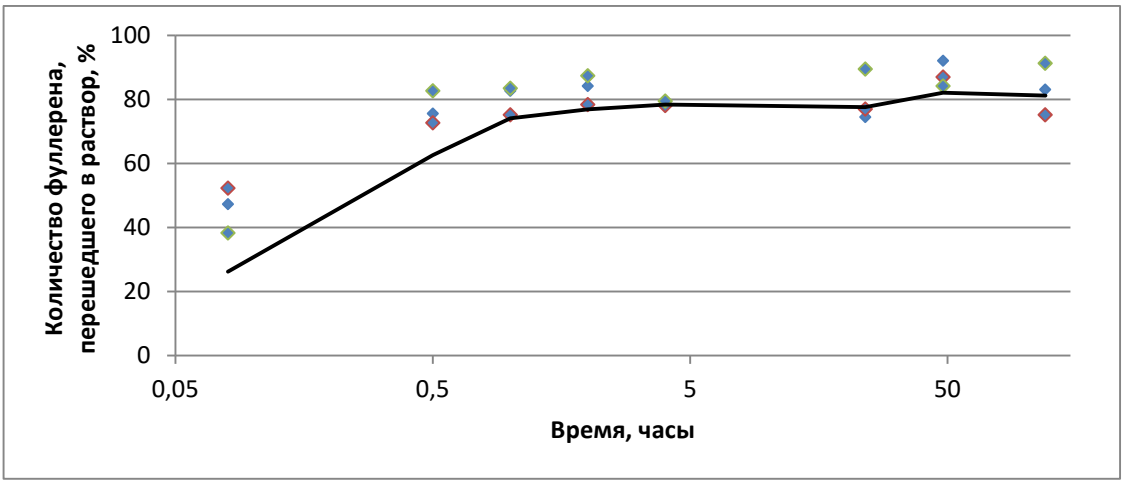


Рисунок 4. график зависимости процента перешедшего в раствор в НМП фуллерена от времени

Из этих данных видно, что пик концентрации при перемешивании достигается примерно после часа растворения, после чего концентрация в растворе не претерпевает существенных изменений. В целом, полученные данные схожи с результатами, описанными в литературе [87]. Полученные данные были учтены в дальнейшем при оптимизации метода получения водного раствора.

3.2 Тупиковая ультрафильтрация

В данном эксперименте была продемонстрирована тенденция фуллерена к образованию осадка на ультрафильтрационной мембране при использовании тупиковой ячейки. В случаях, когда опыт не прекращался на основании условий, описанных в предыдущей главе, выходы фуллерена в раствор не превышали 20%. Тем не менее, данные опыты позволили определить характер взаимодействия частиц фуллерена в смеси НМП-вода с различными материалами мембран. В целом, осадок, формирующийся на поверхности мембраны (т. н. кейк) разделяют на два вида: неплотный осадок, способный к ресуспендированию (floating cake), в структуре которого между частицами твёрдой фазы остаётся значительный объём растворителя, и плотный нересуспендируемый осадок (stagnant cake), твёрдые частицы в котором плотно упакованы и прилегают друг к другу [101]. Поскольку фуллерен окрашен, а также имеет различную окраску в твёрдом виде и в растворе, определение характера образующегося осадка возможно визуально: на представленных ниже фотографиях хорошо заметна разница между белым материалом мембраны, коричневым ресуспендируемым осадком и чёрным нересуспендируемым осадком.

Ниже представлено изображение осадка, образованного в ходе тупиковой ультрафильтрации на из полиалкилнитрила с диаметром отсечки 50 кДа (amicon xm50). Скорость пермеирующего тока варьировалась от 2 до 5 мл/мин, после 12-кратного восполнения объёма содержание фуллерена в растворе составило 16,4% от исходного (65,6 мкг/мл при объёме 100 мл).

Визуальный осмотр демонстрирует преобладание нересуспендируемого осадка (рисунок 5).

Рисунок 5. Нересуспендируемый осадок фуллерена C_{60} на поверхности полиалкилнитриловой мембраны amicon XM 50

Использование мембран из регенерированной целлюлозы позволяло добиться значительно более высокой производительности, со скоростью потока порядка 2-3 мл/мин. Образование нересуспендируемого осадка было минимальным и наблюдалось, в первую очередь, ближе к центру мембраны, где скорость перпендикулярного поверхности мембраны потока жидкости минимальна (см. рисунок 6). Подобное расположение осадка позволяет сделать вывод об эффективности увеличения подвижности прилегающего к мембране слоя жидкости для препятствования образования осадка и целесообразности использования тангенциальной ультрафильтрации для получения водного раствора фуллерена.

Рисунок 6. Осадок, образовывающийся при ультрафильтрации фуллерена на мембране из регенерированной целлюлозы Millipore ultracel 30 кДа

Для мембран из полисульфона зафиксированная пропускная способность оказалась значительно ниже, со скоростью пермеирующего тока варьирующейся в пределах 0,01-0,5 мл/мин. В целом, для них было характерно быстрое образование осадка со снижением скорости ультрафильтрации до 0,01 мл/мин ещё до первого восполнения растворителя. При этом, сорбция на поверхности мембраны оставалась незначительной, что может быть связано с низкой скоростью трансмембранного тока (см. рисунок 7)

Рисунок 7. Осадок фуллерена C_{60} на полисульфоновой мембране amicon PM 10

3.3 Тангенциальная ультрафильтрация

Как было указано в предыдущей главе, ультрафильтрацию проводят до тех пор, пока в пермеирующем токе не перестаёт детектироваться полоса поглощения НМП при 193 нм (см. рисунок 8). Спектр пермеата после израсходования примерно пятикратного по отношению к стоковому раствору объёма вытесняющего раствора имеет единственную полосу поглощения в области 210-190 нм.

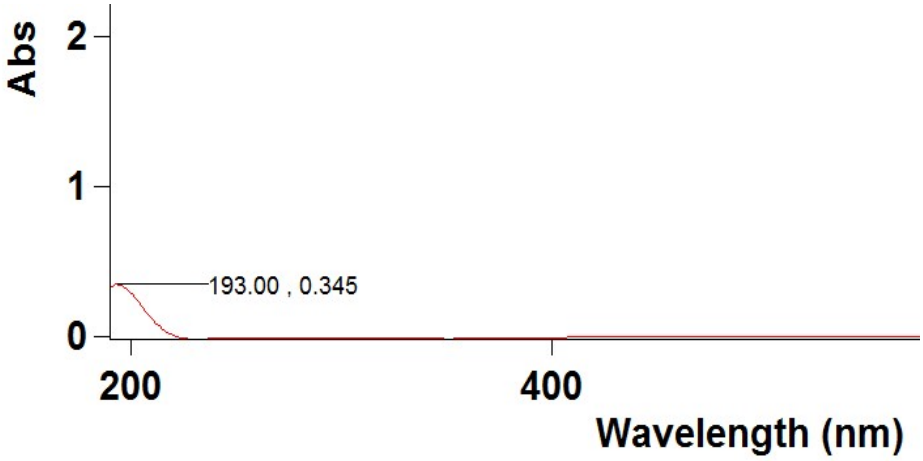


Рисунок 8. Спектр пермеирующего тока, содержащего примесь НМП

В спектре на рисунке 9 концентрация НМП была рассчитана, как 0,05 мг/мл. Дальнейшее проведение ультрафильтрации приводило к снижению содержания метилпирролидона ниже порога детектирования.

Взаимодействие фуллерена с мембранным материалом значительно различалось. Использование мембран из полиалкилнитрила вело к значительной сорбции фуллерена на поверхности мембраны (см. рисунок 8).

Рисунок 9. Осадок, образованный при тангенциальной ультрафильтрации фуллерена C_{60} на мембране из полиалкилнитрила

Ещё активнее осадок выпадал на мембранах из полисульфона. Внешний вид ультрафильтрационной мембраны изображён на рисунке 10.

Рисунок 10. Осадок, образованный при тангенциальной ультрафильтрации фуллерена С60 на мембране из полисульфона

Ультрафильтрация на мембранах из регенерированной целлюлозы оказалась наиболее эффективной среди изученных материалов. Визуально

сорбция на ней почти не наблюдалась (см. рисунок 11), выходы фуллерена были приближены к 80%.

Рисунок 11. Осадок, образованный при тангенциальной ультрафильтрации фуллерена С60 на мембране из регенерированной целлюлозы

Стоит отметить, что поскольку степень сорбции в первую очередь зависела от материала мембраны, а не от способа ультрафильтрации и трансмембранной разницы давления, есть основания полагать, что существует физико-химическая несовместимость между фуллеренами и некоторыми мембранами. Наиболее разумно предположить, что источником данной несовместимости является электростатическое взаимодействие между частицами фуллерена и материалом мембраны. Стандартные материалы мембран различаются по своему поверхностному заряду: мембраны из полиалкилнитрила обладают в нейтральной водной среде слабым положительным зарядом [105], мембраны из полисульфона электронейтральны, либо слабоотрицательны [106], мембраны из регенерированной целлюлозы обладают выраженным отрицательным поверхностным зарядом порядка -8,6 мВ [107]. Таким образом, существует выраженная зависимость между поверхностным зарядом мембраны и

наблюдаемой сорбцией фуллерена, что можно объяснить отрицательным зарядом частиц фуллерена в растворе. Эти данные позволяют предположить, что использование химически-модифицированных мембранных материалов с анионогенными группами может оказаться эффективным для сокращения потерь на мембранном материале. Для наработки растворов для дальнейших исследований коллоидных и спектральных свойств были использованы мембраны из регенерированной целлюлозы (merck ultracel MWCO и sartorius hydrosart).

3.4 Изучение коллоидных свойств водных дисперсий фуллерена

При подборе концентрации стабилизатора особое внимание уделялось тому, чтобы она оставалась ниже критической концентрации мицеллообразования. Во-первых, биологическая активность фуллерена в мицеллярных растворах снижается [79], во-вторых, наличие мицелл мешает удалению органического растворителя при ультрафильтрации [105]. Из-за этого были использованы неионогенные павы, менее склонные к образованию мицелл, а для характеризации дисперсий использовались методы, способные обнаружить их в водной фазе. На графиках светорассеяния, обобщённых на рисунке 12, видно наличие единственного пика, соответствующего частицам фуллерена.

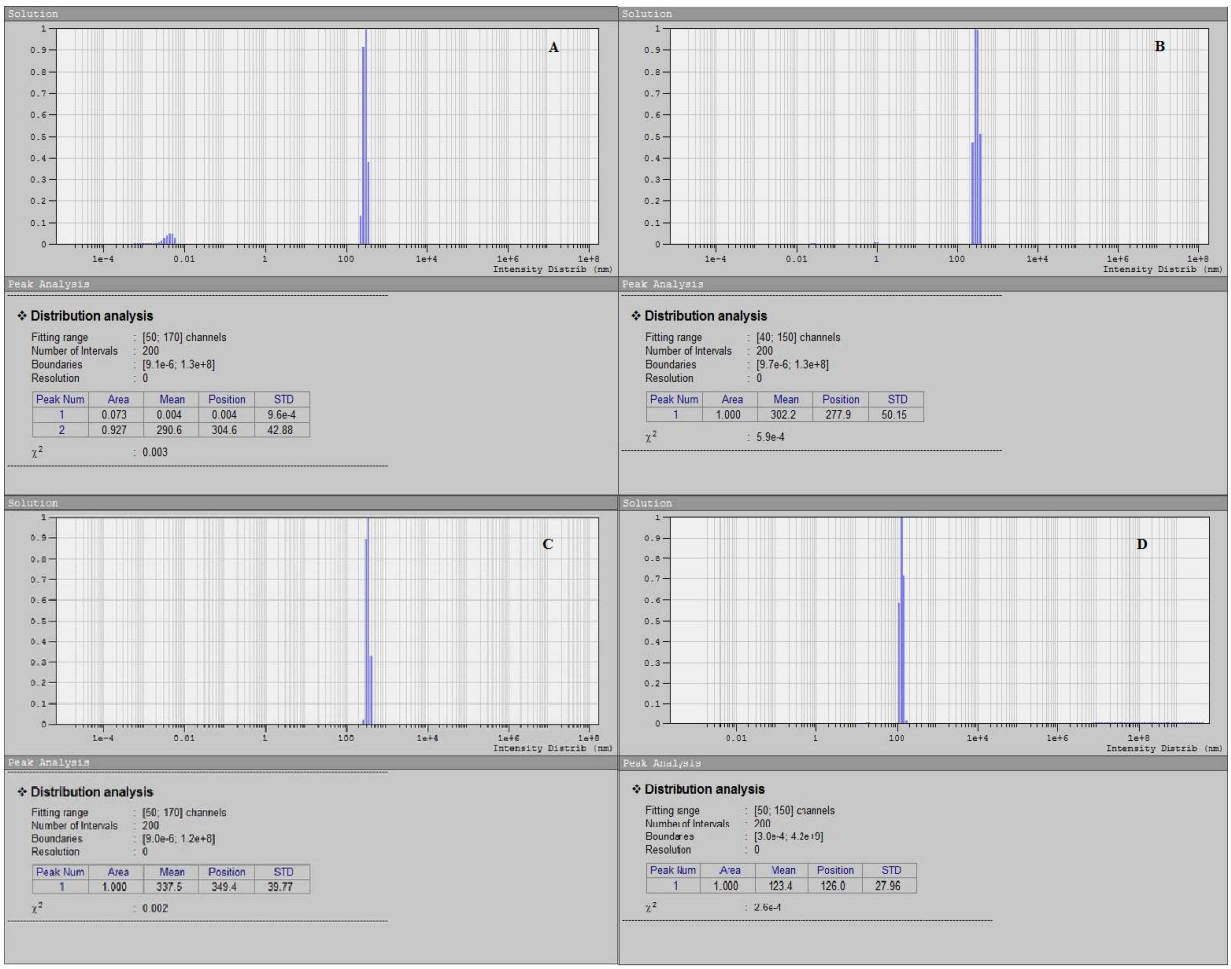


Рисунок 12. Спектры распределения размеров частиц в водных дисперсиях фуллерена C_{60}, стабилизированных твином 80 (A), полоксамером 188 (B), твином 20 (C) и полоксамером 407 (D).

На графиках видна выраженная зависимость размера частиц от использованного стабилизатора. Минимальный размер частиц был зафиксирован для полоксамера 407. Также этот растворы с этим стабилизатором показывали наименьшую полидисперсность. Стоит отметить, что все частицы со стабилизатором показывали значительно больший гидродинамический радиус, чем нестабилизированные частицы, показатели светорассеяния которого представлены на рисунке 13.

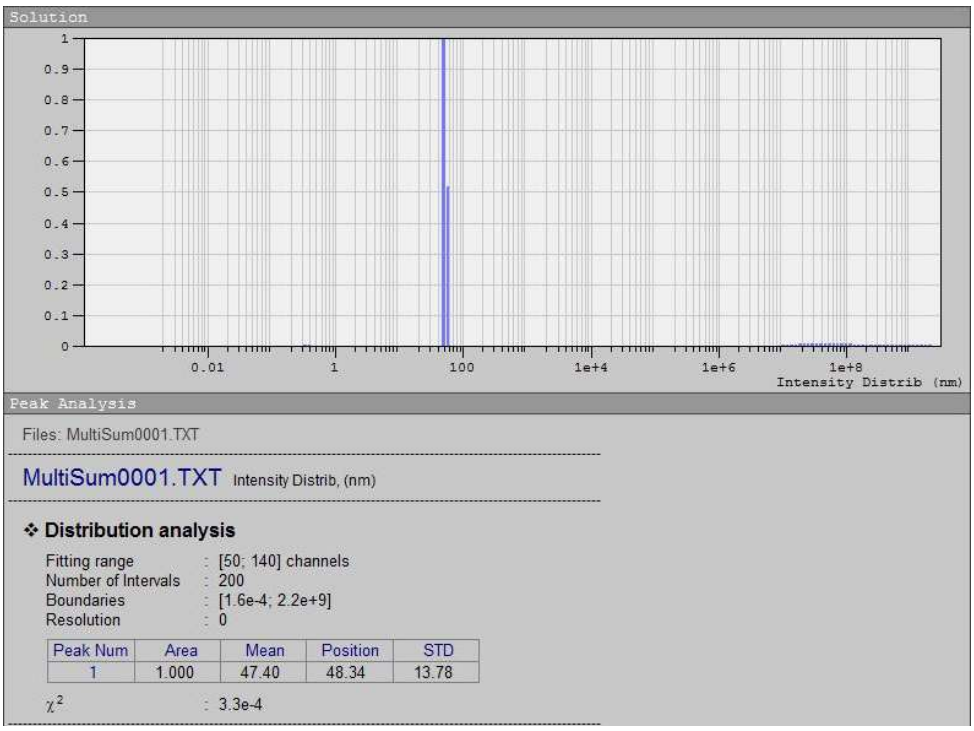


Рисунок 13. Спектр распределения размеров частиц в водном растворе фуллерена C_{60} без использования стабилизатора

Показатели ζ-потенциала составляли -15.23 ± 2.18 mV для раствора, стабилизированного полоксамером 407, -13.62 ± 1.45 mV для твина 20, -13.79 ± 2.02 mV для твина 80 and -14.03 ± 3.11 mV для полоксамера 188. Для сравнения, нестабилизированные дисперсии показывали значения -17.50 ± 1.74 mV. То есть, помимо наименьшего увеличения размера частиц, полоксамер 407 демонстрирует наименьшее увеличение поверхностного заряда. Полученные данные позволяют сделать вывод об оптимальности использования этого стабилизатора при получении водных дисперсий фуллерена.

Стоит отметить, что одним из существенных недостатков метода динамического светорассеяния является использование эмпирических вычислительных моделей, предполагающих наличие сведений о форме исследуемых частиц. Для предотвращения систематических ошибок при применении этого метода, форма частиц была изучена с использованием электронной трансмиссионной микроскопии.

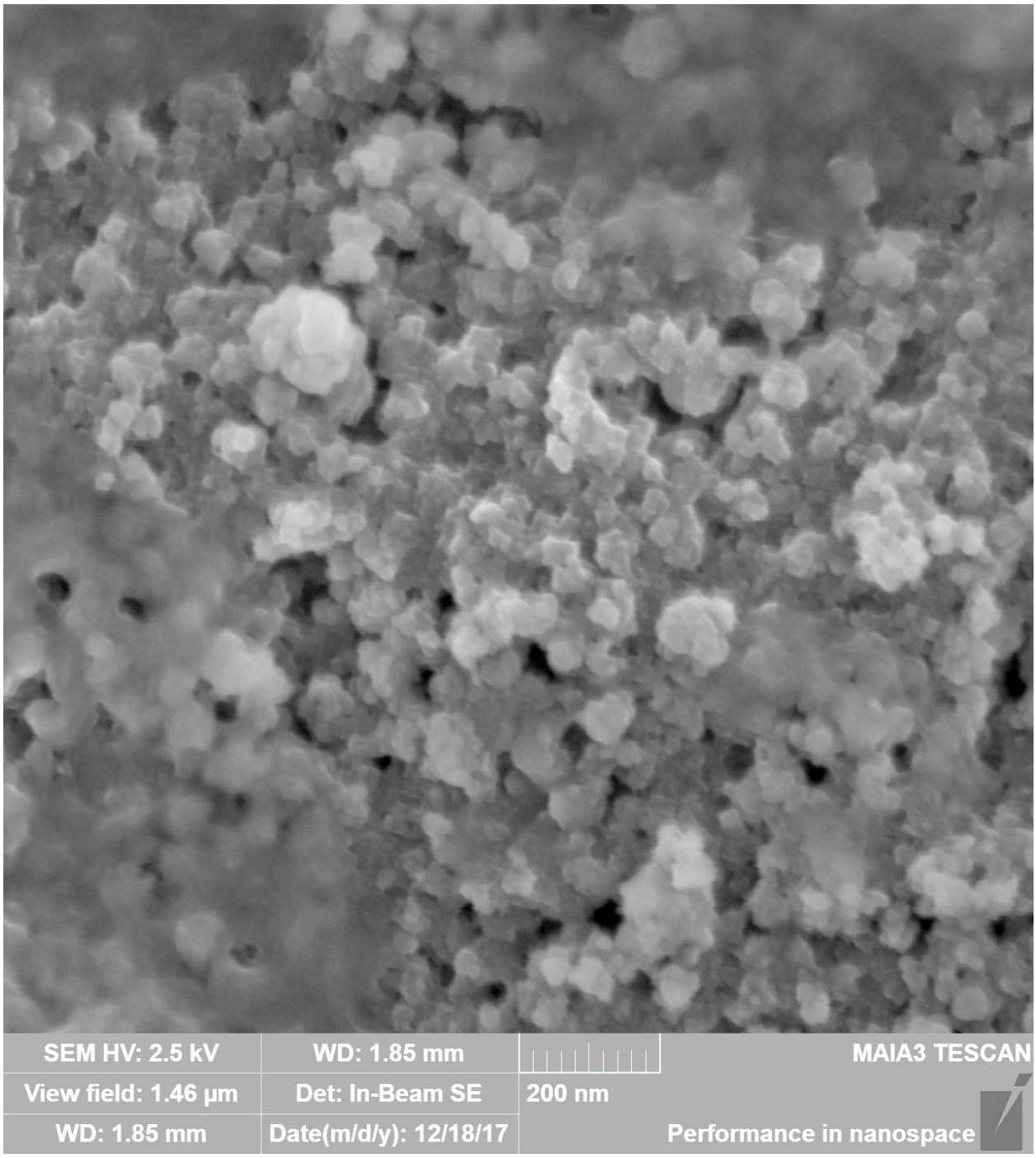


Рисунок 14. Микрофотография частиц фуллерена в водном растворе, полученная способом трансмиссионной электронной микроскопии

Полученное изображение (рисунок 15) позволяет получить представление о геометрии частиц в растворе. На рисунке можно наблюдать агломераты молекул диаметром 50-150 нм, состоящих из более мелких частиц. Существенным недостатком метода является невозможность провести анализ пространственной структуры, так как визуализации подвержен только поверхностный слой, а также невозможность проведения анализа в растворе, так как микроскопия проводится в условиях глубокого вакуума.

Для получения более подробных сведений о структуре частиц фуллерена в растворе было проведено исследование методом малоуглового рассеяния нейтронов и были получены следующие результаты. Наблюдалась двухуровневая агрегация, т.е. в этих системах молекулы фуллерена изначально собраны в плотные агрегаты с гладкой поверхностью, размером в несколько единиц нанометров. Наблюдаемый отчетливо закон Порода (см. рисунок 14) $I(q) \sim q^{-4}$ характерен для полидисперсных систем, в отличии от случая монодисперсных шаров, которые должны давать характерные пики. Пропорциональность $I(q) \sim q^{-4}$ говорит о гладкой поверхности плотноупакованных агрегатов. Эти первичные агрегаты далее собираются в неплотные (фрактальные) вторичные агрегаты с фрактальной размерностью $D = 2.15(5)$. Причем, судя по нашим данным, для систем C_{60}-$PluF_{127}$ подавляющее большинство первичных агрегатов берут участие во вторичной агрегации. Размер вторичных агрегатов находится за пределами чувствительности метода, т.е. превышает $\pi/q_{\min} \approx 50$нм. Излом между двумя степенными участками кривой рассеяния при $q = 0.4$ нм$^{-1}$ может быть описан с помощью приближения Гинье. Характерным размером первичных агрегатов в данном случае выступает радиус инерции R_g – взвешенное по массе среднеквадратическое отклонение от центра масс.

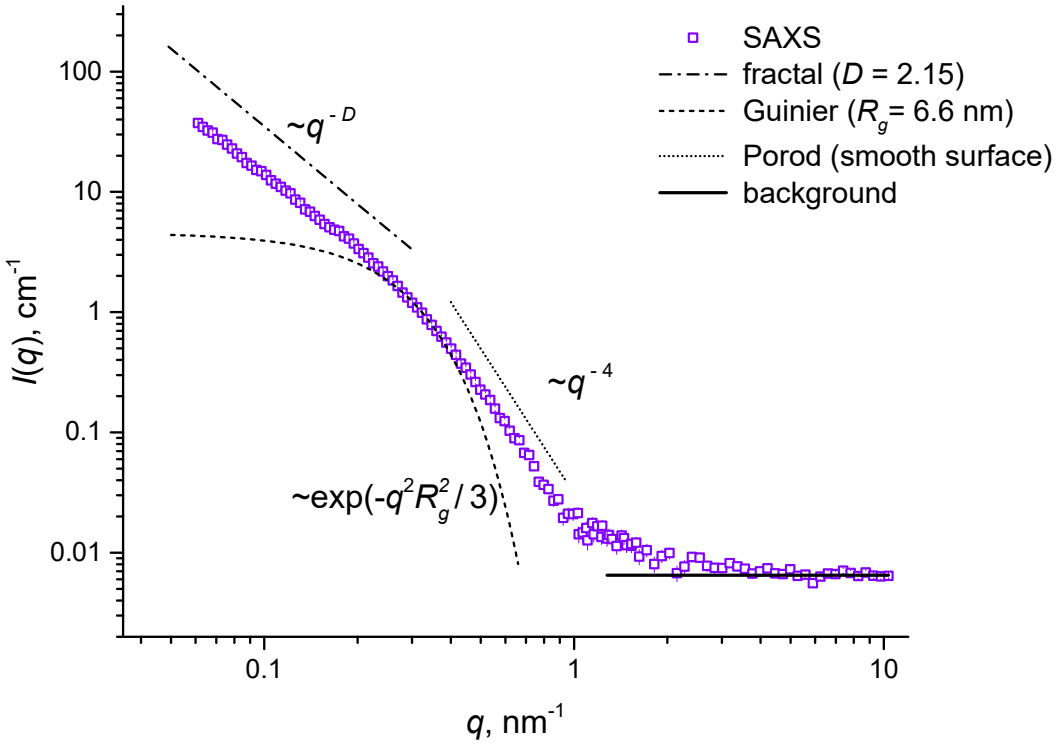


Рисунок 15. Данные малоуглового рассеяния нейтронов частиц фуллерена, стабилизированных полоксамером 407, с двумя отмеченными приближениями Порода

Стоит отметить, что на данный момент ни один из способов, подходящих для стандартизации нанодисперсных систем по размеру частиц, не является фармакопейным. Существующие методы определения частиц в мазях и суспензиях предполагают наличие частиц, которые возможно наблюдать в оптический микроскоп. Данные исследования, однако, позволяют считать метод динамического светорассеяния валидированной для применения в фармацевтическом анализе, поскольку результаты, полученные разными методами и на разных приборах, показали схожие результаты. Это нашло отражение при составлении лабораторного регламента получения водной дисперсии фуллерена. При появлении большего количества фармацевтических препаратов на основе нанодисперсных систем, данная методика может стать незаменимым инструментом в стандартизации новых лекарственных средств.

3.5 Спектральные данные

Поскольку основным способом идентификации и количественного определения остаётся спектрофотометрия в УФ и видимой области, были получены спектры поглощения растворов, получаемых различными способами. В первую очередь, был получен спектр раствора, полученного путём воспроизведения методики, предполагающей растворение в толуоле с последующим переведением в водную фазу под воздействием ультразвука с одновременным удалением толуола посредством испарения с поверхности. Был зафиксирован спектр поглощения, показанный на рисунке 16.

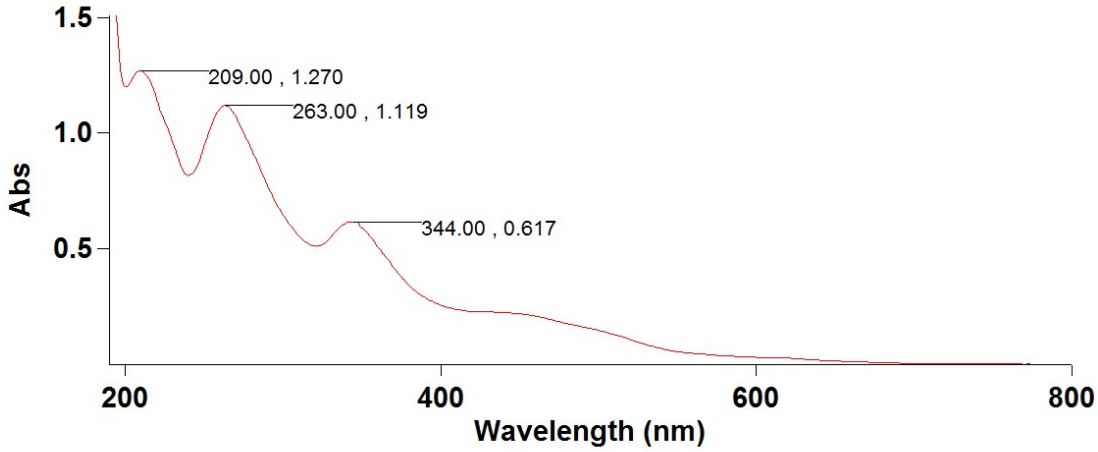


Рисунок 16. Спектр поглощения водного раствора фуллерена, полученного способом замены растворителя под воздействием ультразвука

Стоит отметить полосу поглощения в УФ области при длине волны >200 нм. Она может свидетельствовать либо о присутствии в растворе остаточного растворителя – толуола (неполное удаление которого может быть связано либо с его накоплением в фрактальной структуре кластеров фуллерена, либо с его удержанием на поверхности частиц за счёт стекинговых взаимодействий), либо с присутствием в водной среде большого количества растворённого углекислого газа (поскольку для удаления толуола обеспечивается прямой контакт смеси с воздухом при нагревании, CO_2 из

окружающей среды может переходить в раствор). Скорее всего на вид спектра в разной степени влияют оба фактора.

Раствор, полученный при помощи метода, тем не менее, является крайне характерным для дисперсий фуллерена в области 200-800 нм. В частности, в полученных таким способом дисперсиях хорошо различим максимум в области 340 нм, который периодически сглаживается при использовании НМП для изначального растворения фуллерена. При растворении фуллерена в НМП более 48 часов, спектры фуллерена после очистки от растворителя методом ультрафильтрации обладают сглаженными максимумами поглощений, как показано а спектре на рисунке 17.

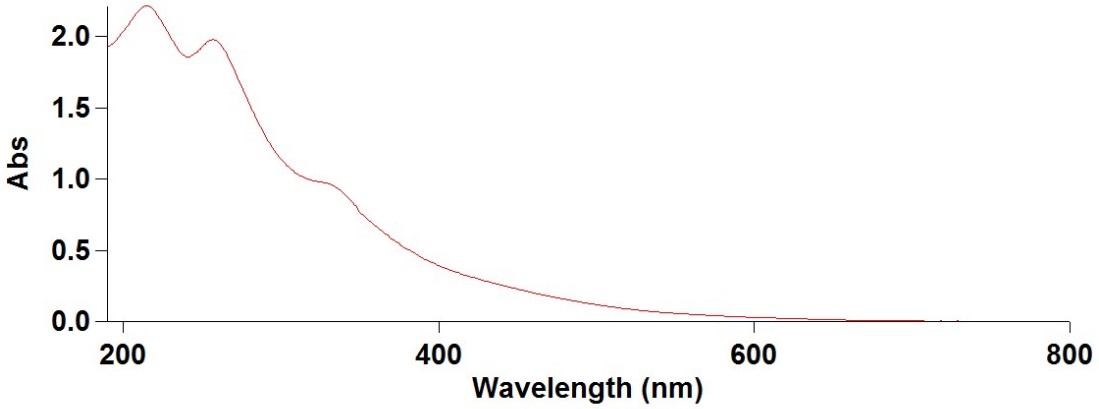


Рисунок 17. "Состаренные" путём увеличения времени растворения в НМП спектры поглощения водного раствора фуллерена

На данном спектре следует обратить внимание на сглаженность максимума при длине волны 340 нм, а также вырождение полосы поглощения в области 400-700 нм. При этом «старение» спектров наблюдается при увеличении времени растворения фуллерена в НМП, чем и были обоснованы опыты по изучению кинетики растворения. При реализации методики с учётом полученных данных (то есть, когда время растворения не превышало двух часов) для дисперсий, полученных без добавления стабилизатора, был зафиксирован следующий вид спектров.

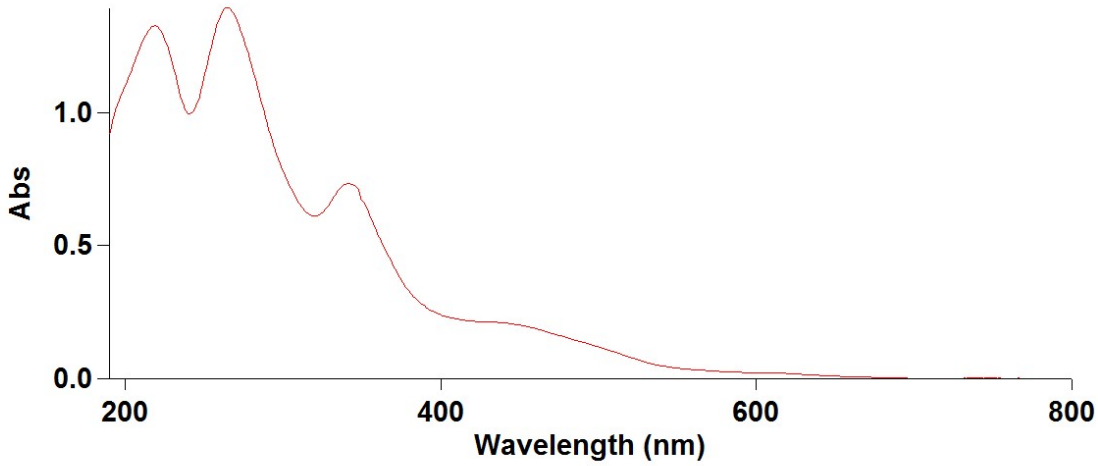


Рисунок 18. Спектр поглощения в УФ и видимой области нестабилизированной водной дисперсии фуллерена, полученной методом ТУФ

Стоит отметить, что соотношение максимумов в области 210 и 260 нм на представленном спектре отличается от спектров, получаемых способом смены растворителя посредством озвучивания, как и от спектров стабилизированных частиц. Хотя в литературе описано, что вариации в интенсивности этих максимумов зависят от коллоидного состояния этих растворов, существенных различий в размере частиц дисперсии, полученной ультрафильтрацией (рис. 13) и размером частиц в дисперсии, полученной озвучиванием (рис. 19) замечено не было. При этом важно обратить внимание на существенные различия в полидисперсности: разброс значений гидродинамического радиуса в дисперсиях, полученных способом озвучивания, значительно выше, чем в дисперсиях, полученных способом ультрафильтрации (ст. отклонение 17.56 и 13.78 соответственно).

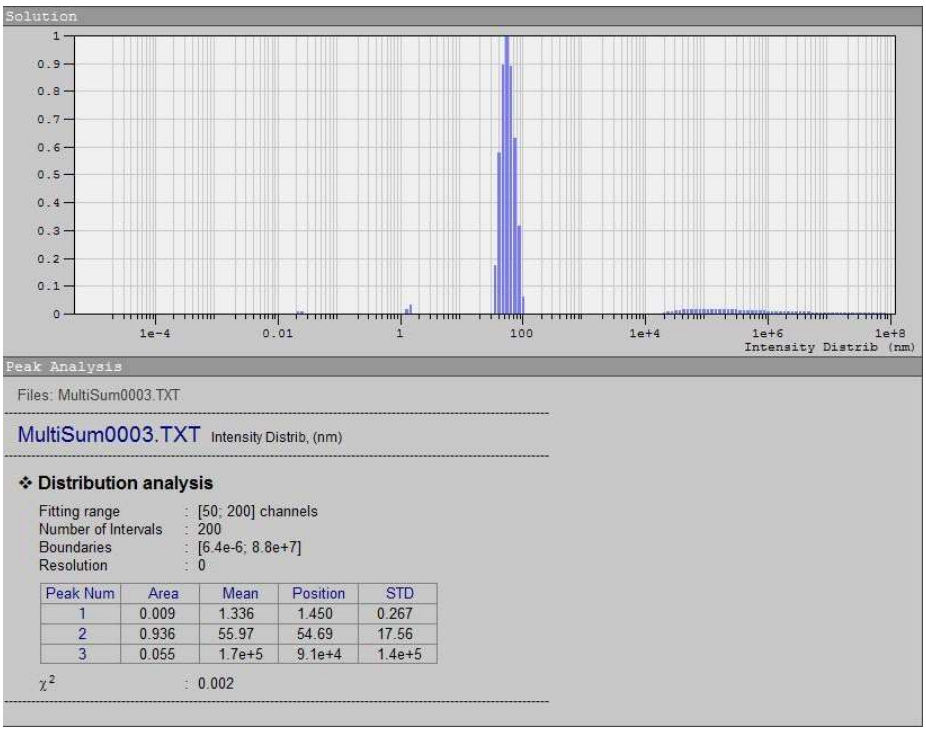


Рисунок 19. Спектр распределения размера частиц в дисперсии фуллерена, полученной методом смены растворителя с использованием УЗ

С технологической точки зрения, получение дисперсии без стабилизатора нецелесообразно: чрезмерная сорбция фуллерена на материале мембраны ведёт к снижению выхода технологического процесса и истощению ресурса мембраны. Спектр дисперсии, стабилизированной полоксамером 407 представлен на рисунке 20. Данный спектр предлагается в качестве стандартного для сравнения спектров получаемых в последствие дисперсий.

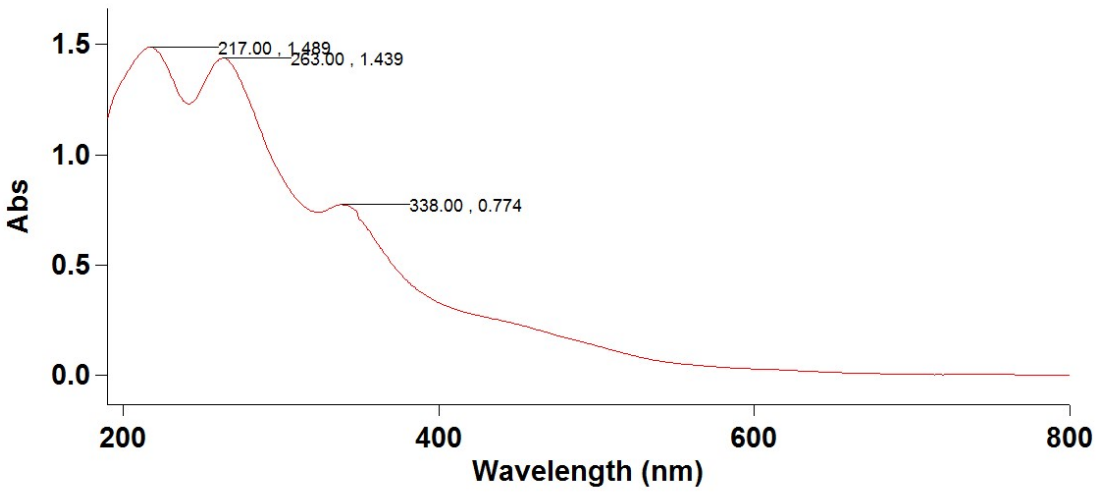


Рисунок 20. Спектр поглощения водной дисперсии фуллерена, стабилизированной 0,1% р-ром полоксамера 407, полученной методом ТУФ в УФ и видимой области

Критерии соответствия спектра образца стандартному спектру были определены следующим образом:

- наличие полосы поглощения в области 400-550 нм;

- Наличие выраженных максимумов поглощения при длинах волн 215, 260 и 340 нм, так, чтобы удовлетворялось условие $A_{215}>A_{260}>A_{340}$;

- Отсутствие точки перегиба в области 190-215 нм;

- Отсутствие максимумов и полос поглощения, не описанных в предыдущих пунктах.

Метод спектрофотометрии также предлагается как основной метод количественного определения. Для количественных расчётов был построен калибровочный график, отражающий зависимость светопоглощения слоя раствора при длине волны 340 нм от концентрации фуллерена C_{60} в растворе.

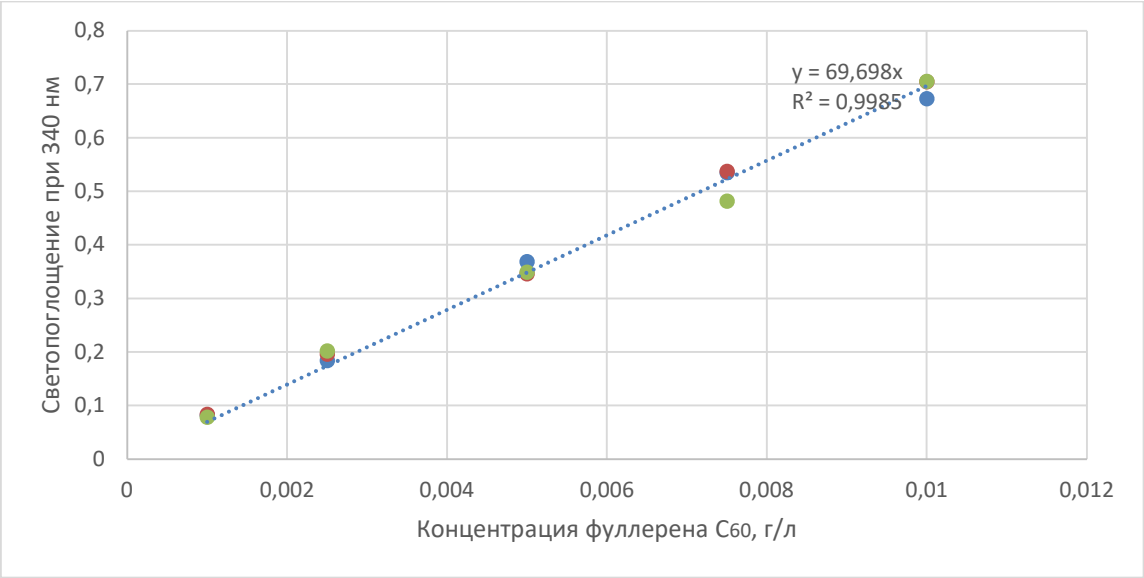


Рисунок 21. Калибровочный график для количественного определения фуллерена в растворе методом спектрофотометрии

Представленный калибровочный график (рисунок 21) был использован для расчёта удельного показателя светопоглощения. Таким образом, количественное содержание фуллерена в растворе рассчитывают с использованием следующей формулы:

$$C_{C60} = \frac{A_{340} \cdot V_1}{\varepsilon_{340} \cdot M_{C60} \cdot V_2}, \text{ где}$$

C_{C60} – концентрация фуллерена C_{60} в растворе, г/л;

A_{340} – светопоглощение при длине волны 340 нм;

V_1 – объём пробы до разведения, мл;

V_2 – объём пробы после разведения, мл;

ε_{340} – удельный показатель светопоглощения, 50200;

M_{C60} – молярная масса фуллерена C_{60}, 720 г/моль.

Как упоминалось ранее, некоторые теории стабилизации частиц фуллерена в водной среде связывают наблюдаемую коллоидную стабильность с окислением или гидроксилированием поверхностного слоя частиц. Данное объяснение, однако, нельзя назвать удовлетворительным с

позиции фармацевтического анализа, так как медицинское применение вещества предполагает наличие достоверных сведений о структуре вещества. Более того, отмечавшаяся в обзорной части диссертации высокая реакционная способность фуллеренов может вести к образованию побочных продуктов в процессе получения дисперсий. Для того, чтобы исключить данные предположения, водные дисперсии анализировали при помощи масс-спектрометрии, результаты которой представлены ниже.

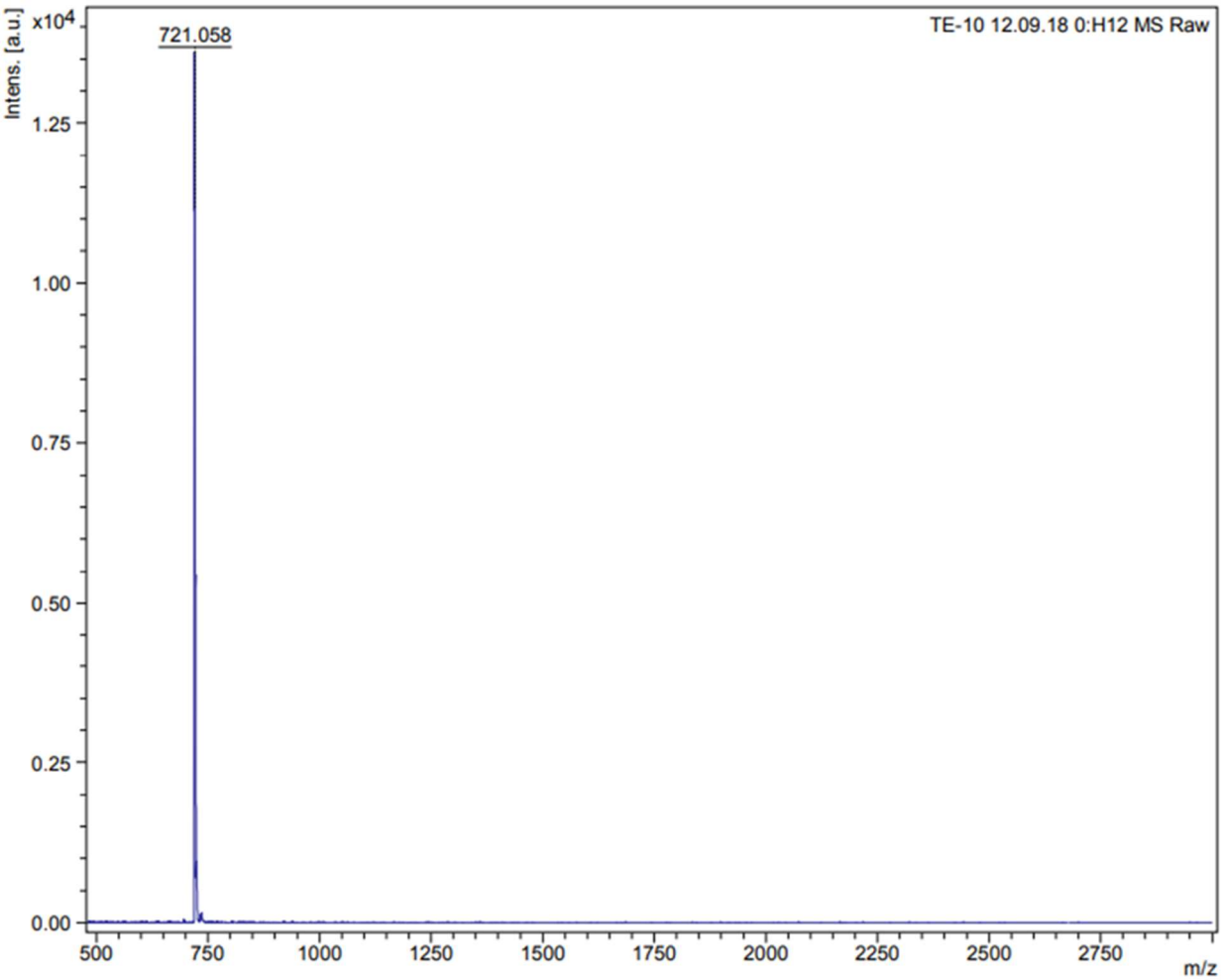


Рисунок 22. Масс-спектр, полученный при исследовании водной дисперсии фуллерена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии

На спектре (рисунок 22) видно наличие основного пика, соответствующего молекулярной массе фуллерена (720 г/моль). Хотя данный метод прекрасно подходит для качественного анализа действующего соединения, его применение для определения примесных соединений затруднительно: MALDI-TOF масс-спектрометрия не позволяет

идентифицировать соединения с молекулярной массой ниже 500 г/моль [109]. Таким образом, используя данный метод можно удостовериться в отсутствии гидроксидов и оксидов фуллерена, но невозможно с его помощью идентифицировать и количественно установить содержание примесей, в частности НМП.

С этой точки зрения, более информативным является способ ИК-спектрофотометрии. Несмотря на неудобство пробоподготовки, данный метод позволяет оценить наличие примесей в образце, поскольку, в отличие от спектров в УФ и видимой области, ИК спектр фуллерена представлен значительно более узкими и редкими полосами. Более того, из-за однородности структуры фуллерена, представленной исключительно углерод-углеродными связями с sp^2-гибридизацией, любые связи углерода с другими атомами отличаются по своему положению, что позволяет избежать наложения полос.

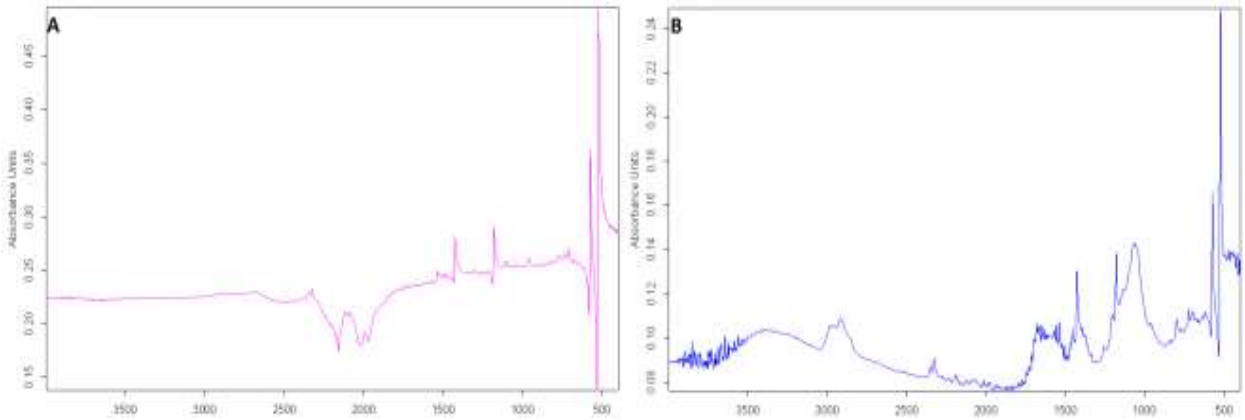


Рисунок 23. ИК-спектры поглощения субстанции фуллерена (А) и остатка после высушивания водной дисперсии фуллерена (В)

На спектрах, представленных на рисунке 23, следует обратить внимание на полосы поглощения фуллерена, соответствующие углеродному скелету фуллерена: дублет полос в области 1100-1500 см$^{-1}$ и две полосы с «отскоком» в области «отпечатков пальцев». На спектре высушенной дисперсии эти полосы сохраняются, что позволяет идентифицировать фуллерен в её составе, подтверждая результаты описанных ранее методов. Однако, присутствие полос в области 2700-3000 см$^{-1}$ и 1000-1200 см$^{-1}$ говорит

о наличие примесей. Учитывая способ получения, можно предположить, что данные полосы соответствуют остаточным растворителям: НМП и воде. Их присутствие, однако, сложно объяснить, поскольку пробоподготовка для этого метода включала лиофильное высушивание образца: образец находился под давлением 40-50 мТорр в течение более суток, что, как правило, позволяет удалить не только воду, но и самые труднолетучие растворители.

Для подтверждения этих выводов был проведён элементный анализ после высушивания дисперсии и были получены следующие результаты: содержание углерода – 78,62%, содержание азота – 2,28%, содержание водорода – 1,11%. В целом, эти данные позволяют сделать примерные расчёты о содержании остаточного НМП в дисперсии: при условии, что остаточный НМП является единственным источником азота в дисперсии, его содержание определяют как

$$m_{C5H9N} = \frac{m_N}{M_N \nu_N} M_{C5H9NO}$$

Где m_{C5H9NO} – масса НМП в 100 г дисперсии, г;

m_N – масса азота в 100 г дисперсии, г;

M_N – молярная масса азота, г/моль;

M_{C5H9NO} – молярная масса НМП, г/моль;

ν_N – количество атомов азота в молекуле НМП.

Используя эту формулу, содержание НМП определили как 16,12 г на 100 г высушенной дисперсии, т. е., на 100 г фуллерена в дисперсии приходится порядка 23,4 г НМП. При содержании фуллерена в растворе 1 мг/мл, содержание НМП становится равным 230 мкг/мл. При этом, в исследованиях на лабораторных животных отмечается сравнительно низкая токсичность НМП: при парентеральном введении 257 мг/кг тела у мышей не

наблюдается проявления отрицательных реакций [110], т. е., при его содержании в дисперсии в рассчитанной концентрации возможные дозы могут превышать 1000 л/кг тела – очевидно избыточное для парентерального пути введения количество. Тем не менее, само по себе присутствие его в образце не вполне понятно: и избыточная ультрафильтрация, и высушивание в глубоком вакууме почти всегда позволяют удалить любое количество остаточного растворителя. Из этого можно сделать вывод, что НМП не присутствует в растворе в свободном виде, а интегрирован в фрактальные структуры, идентифицированные методом малоуглового рассеяния нейтронов. Таким образом, несмотря на отсутствие химической связи, подтверждённое спектральными методами, можно заключить, что фуллерен связывает НМП посредством супрамолекулярной связи, похожей по структуре на клатраты, но в значительно более крупных масштабах. Из этого следуют два вывода: во-первых, частицы фуллерена возможно нагрузить низкомолекулярными действующими веществами для улучшения их фармакокинетических показателей; и во-вторых, полное удаление остаточного растворителя из дисперсии фуллерена невозможно. Это значит, что с позиции фармацевтической химии к НМП в водной дисперсии фуллерена следует относиться, как к нормируемой примеси, конкретные показатели содержания которой должны быть определены после идентификации путей введения и используемых доз. В данном исследовании предложен показатель содержания азота в твёрдой фазе не более 5% по массе: это сохранит безопасность препарата при парентеральном введении до приблизительно 500 мл раствора на кг массы тела – величина недостижимая в практических условиях. В качестве способа идентификации элементный анализ кажется оптимальным в данных условиях: он значительно менее трудоёмок по сравнению с методом Къельдаля, а идентификация хроматографическими методами требует предварительного разрушения супрамолекулярных комплексов, которые на данный момент отработаны недостаточно хорошо.

3.6 Исследование хроматографического поведения водных дисперсий фуллерена

При использовании сильно неполярной подвижной фазы – толуол и ацетонитрил в соотношениях 1:1 (рисунок 24), 6:4 (рисунок 25) и 7:3 (рисунок 26) оптимальное разрешение для стандарта фуллерена C_{60} было достигнуто только во втором случае при использовании ОДС в качестве неподвижной фазы, показатель R_f составил 0,9. Во всех трёх случаях нанесённый на пластинку образец водного раствора фуллерена оставался на линии старта.

Помимо смесей толуола и ацетонитрила, были опробованы более полярные системы растворителей: этилацетат:этанол:уксусная кислота 55:35:10 (рисунок 27), этилацетат:этанол:уксусная кислота 45:45:10 (рисунок 28), этилацетат:этанол:аммиак 55:35:10 (рисунок 29), этилацетат:этанол:аммиак 45:45:10 (рисунок 30).

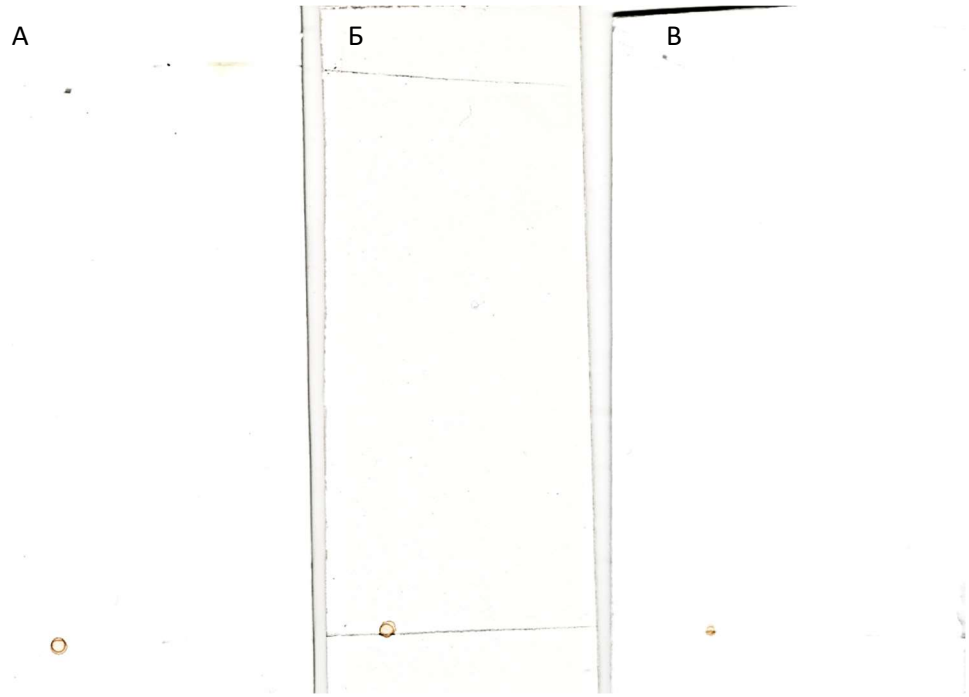


Рисунок 24. Результат ТСХ образцов раствора фуллерена в толуоле (справа), водного раствора фуллерена (слева) на неподвижной фазе (А) октадецилсиликагель, (Б) силикагель, (В) дифенилсиликагель. Подвижная фаза – толуол:ацетонитрил 1:1

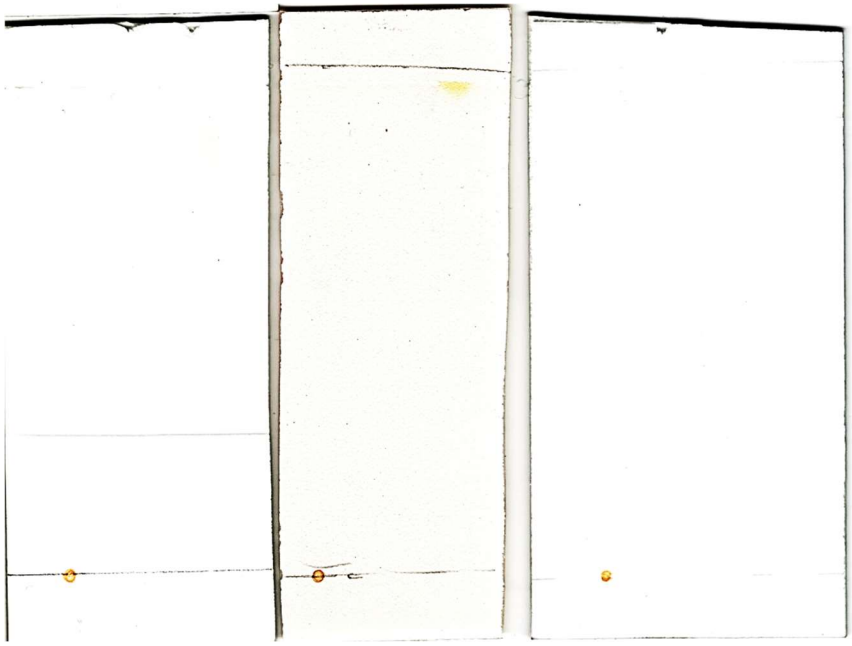


Рисунок 25. Результат ТСХ образцов раствора фуллерена в толуоле (справа), водного раствора фуллерена (слева) на неподвижной фазе (А) октадецилсиликагель, (Б) силикагель, (В) дифенилсиликагель. Подвижная фаза – толуол:ацетонитрил 6:4

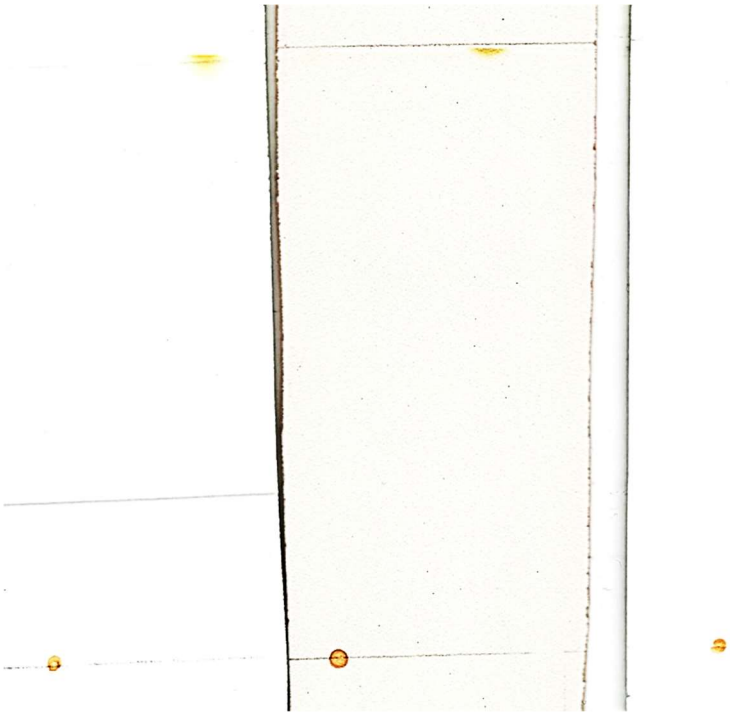


Рисунок 26. Результат ТСХ образцов раствора фуллерена в толуоле (справа), водного раствора фуллерена (слева) на неподвижной фазе (А) октадецилсиликагель, (Б) силикагель, (В) дифенилсиликагель. Подвижная фаза – толуол:ацетонитрил 7:3

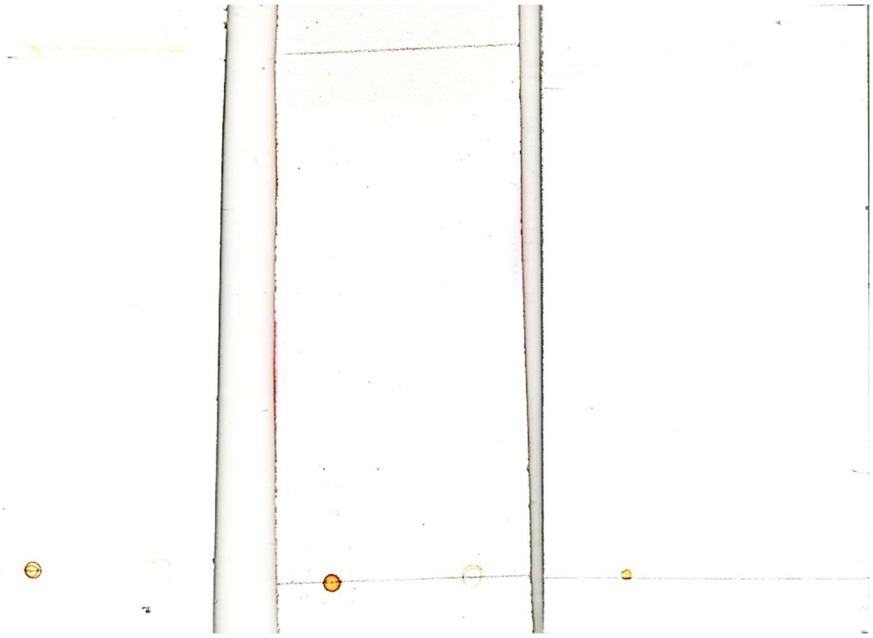


Рисунок 27. Результат ТСХ образцов раствора фуллерена в толуоле (справа), водного раствора фуллерена (слева) на неподвижной фазе (А) октадецилсиликагель, (Б) силикагель, (В) дифенилсиликагель. Подвижная фаза – этилацетат:этанол:уксусная кислота 55:35:10

Рисунок 28. Результат ТСХ образцов раствора фуллерена в толуоле (справа), водного раствора фуллерена (слева) на неподвижной фазе (А) октадецилсиликагель, (Б) силикагель, (В) дифенилсиликагель. Подвижная фаза – этилацетат:этанол:уксусная кислота 45:45:10

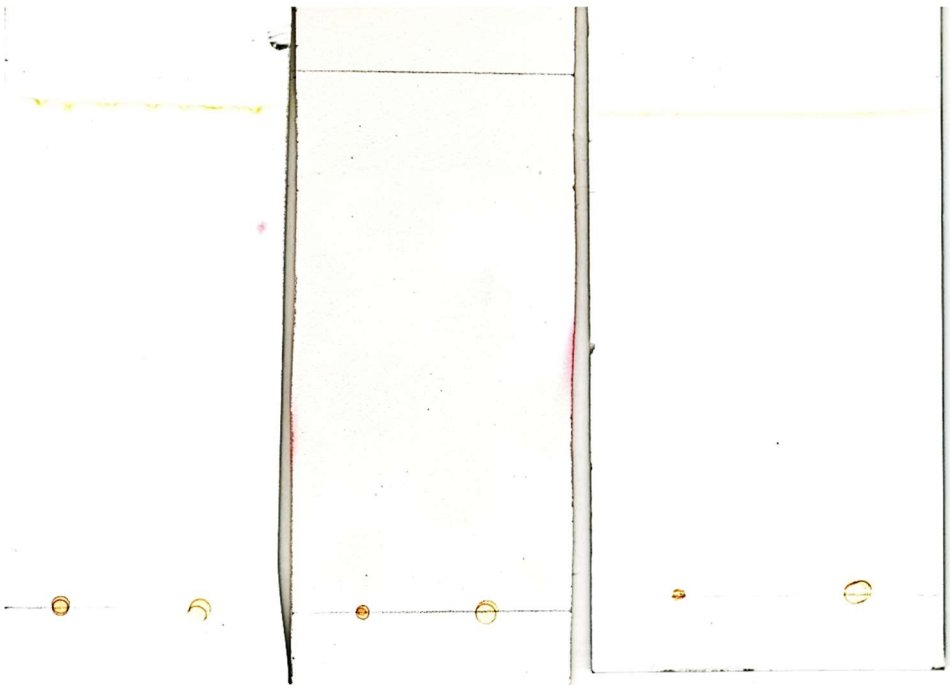


Рисунок 29. Результат ТСХ образцов раствора фуллерена в толуоле (справа), водного раствора фуллерена (слева) на неподвижной фазе (А) октадецилсиликагель, (Б) силикагель, (В) дифенилсиликагель**.** Подвижная фаза – этилацетат:этанол:аммиак 55:35:10

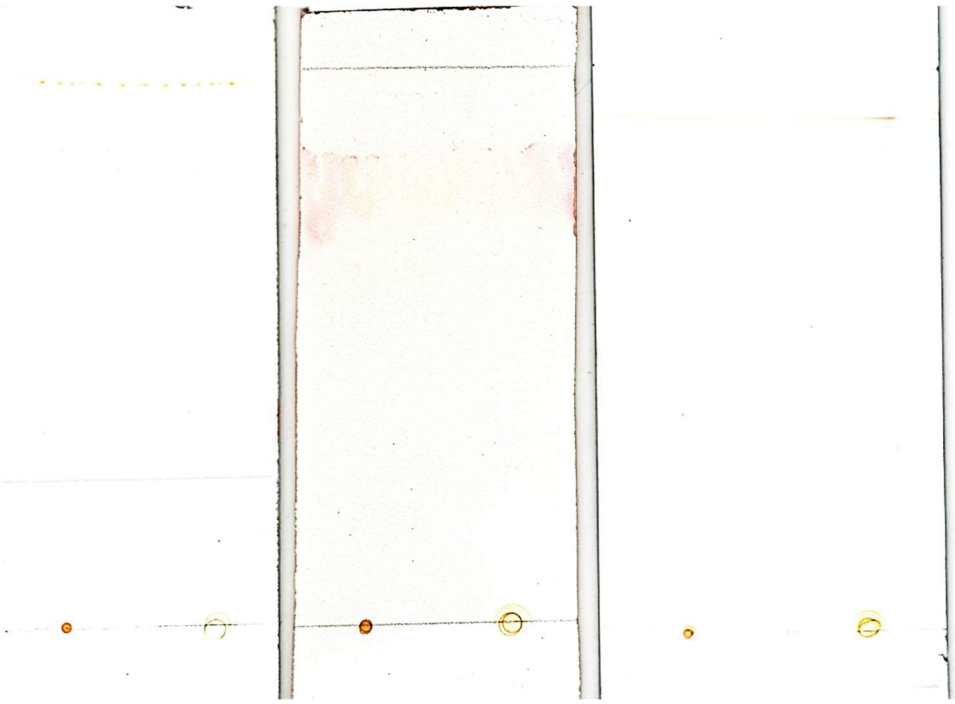


Рисунок 30. Результат ТСХ образцов раствора фуллерена в толуоле (справа), водного раствора фуллерена (слева) на неподвижной фазе (А) октадецилсиликагель, (Б) силикагель, (В) дифенилсиликагель. Подвижная фаза – этилацетат:этанол:аммиак 45:45:10

Важно отметить, что хроматографическое поведение наночастиц фуллерена в водных растворах отличается от поведения фуллерена в истиных растворах. Для всех исследованных растворов наблюдалась значительная сорбция на линии старта.

Таким образом, использование колоночной хроматографии без предварительной экстракции органическим растворителем не представляется целесообразным, поскольку использование наиболее распространённых сорбентов приводит к необратимой сорбции фуллерена, что не только не позволит получить при анализе осмысленные данные, но и приведёт к преждевременному израсходованию ресурса колонки и предколонки. Методики определения фуллерена C_{60} после экстракции из водной фазы в толуол описаны в литературе, однако не представляются информативными в контексте определения показателей качества водных дисперсий фуллерена, так как процесс экстракции приводит к нарушению супрамолекулярной структуры частиц фуллерена. Поскольку анализ не позволяет получить данных о примесях или качественном или количественном составе препарата, которые недоступны при анализе спектральными методами, использование хроматографических методов в контроле качества водного раствора фуллерена не представляется целесообразным.

3.7 Изучение токсичности водной дисперсии фуллерена

В таблице 2 представлены результаты общего анализа крови экспериментальных и контрольных мышей (среднее по двум группам)

Таблица 2. результаты общего анализа крови мышей контрольной и экспериментальной группы

	Результаты по группам ± среднеквадратичное отклонение	
Значение	**экспериментальная**	**контрольная**
эритроциты, $x10^{12}$/л	9,65 ± 1,3	10,44 ± 2,0
гемоглобин, г/л	161 ± 17	176 ± 14
Гематокрит, %	40,23 ± 4,9	48,18 ± 3,9
MCV, фл	42 ± 1,8	46 ± 3,6
MCH, пг	16,7 ± 1,0	16,8 ± 1,1
MCHC, г/л	401 ± 22	365 ± 19
Тромбоциты, $x10^9$/л	960 ± 180	981 ± 116
Лейкоциты, $x10^9$/л	7,26 ± 0,9	11,07 ± 1,1
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1 ± 0	2 ± 0
Палочкоядерные нейтрофилы, $x10^9$/л	0,073 ± 0,003	0,221 ± 0,011
Сегментоядерные нейтрофилы, %	41 ± 3	27 ± 2
Сегментоядерные нейтрофилы, $x10^9$/л	2,97 ± 0,36	2,99 ± 0,15
Эозинофилы, %	2 ± 0	4 ± 1
Эозинофилы, $x10^9$/л	0,145 ± 0,020	0,443 ± 0,110

Таблица 2 (продолжение)

	Результаты по группам ± среднеквадратичное отклонение	
Значение	**экспериментальная**	**контрольная**
Моноциты, %	3 ± 0	1 ± 0
Моноциты, $x10^9$/л	0,218 ± 0,034	0,111 ± 0,005
Лимфоциты, %	53 ± 5	66 ± 7
Лимфоциты, $x10^9$/л	3,85 ± 0,65	7,31 ± 2,05

Основываясь на данных общего анализа крови невозможно сделать выводов о токсичности фуллерена при хроническом введении у животных: все показатели находятся в пределах нормы. Тем не менее, стоит отметить не патологическое, но существенное снижение концентрации лимфоцитов. Взвешивание органов, за исключением селезёнки, не показало достоверных различий между контрольной и экспериментальной группой. Селезёнка у мышей экспериментальной группы была увеличена. Стоит отметить, что данное изменение стоит скорее относить к морфологическим, чем к патоморфологическим: признаков патологических воздействий на орган, таких как некроз, воспаление, компрессия прилежащих сосудов или кровоизлияния не наблюдалось, как и в случае с другими органами. Значительно более интересны и информативны данные об изменениях в гистологии органов под воздействием фуллерена. В некоторых тканях - альвеолах лёгких, брыжейке, жировой ткани, паратимическом лимфатическом узле – были обнаружены гранулёмоподобные образования, состоящие из повреждённых или разрушенных макрофагов с включениями

инородной окрашенной субстанции, которая была визуально идентифицирована как фуллерен (см. рисунок 31).

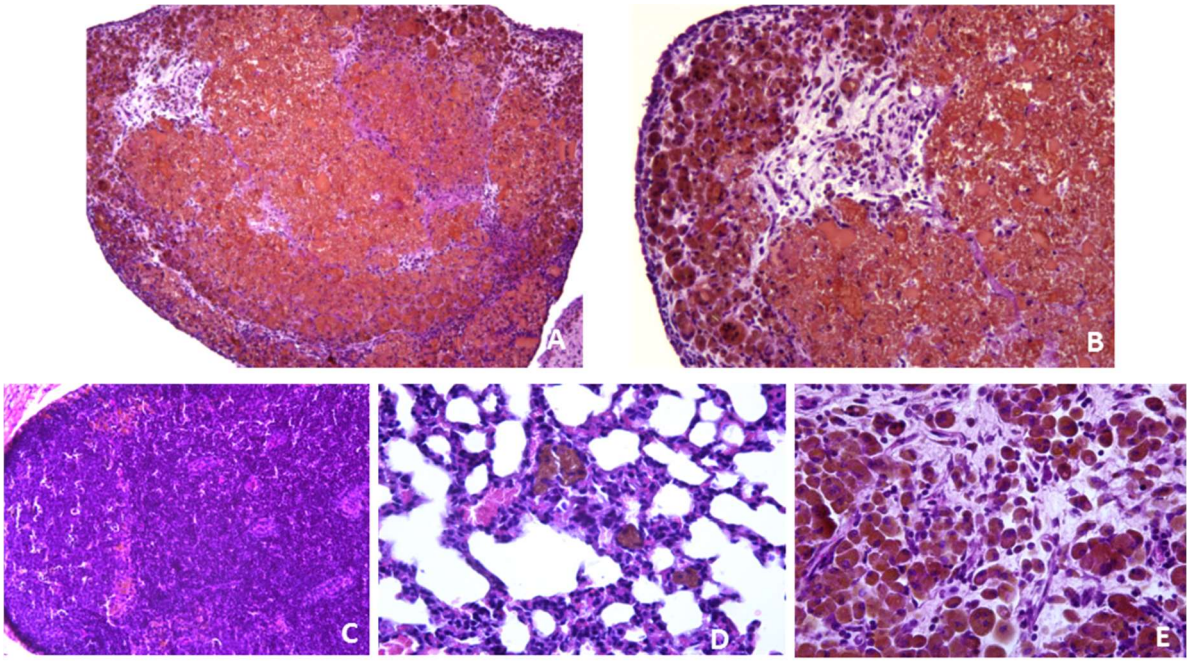


Рисунок 31. Микрофотографии тканей, окрашенных гематоксилин-эозином: A – гранулёмоподобные образования, содержащие внутри-и внеклеточные включения инородного вещества, x100; B – то же, что A, x200; C – отложения инородного вещества у гериманитавного цетра в паратимическом лимфатическом узле, x200; D – отложения ксенобиотика в макрофагах в альвеолах лёгких, x400; E – отложения ксенобиотика в макрофагах внутри соединительной ткани, x400.

Само по себе образование гранулём под воздействием ксенобиотика не совсем обычно. Гранулёмы возникают под воздействием агентов, стимулирующих фагоцитарную активность, но устойчивых к фагоцитозу. Их образование наблюдается при инфекционных процессах (туберкулёз, сифилис, лепра и некоторые вирусные инфекции), либо при наследственных дефектах ферментов, ответственных за фагоцитоз. Примером последних может служить хроническая гранулёматозная болезнь – заболевание, при котором из-за дефекта НАДФН-оксидазы нарушается продукция АФК при фагоцитозе. Стоит отметить, что в данном исследовании образование гранулём не вело к развитию некроза или склероза, что свидетельствует о невоспалительной природе процесса. В отношение биологического действия фуллерена на основании этих данных можно предположить, что крупные кластеры фуллерена поглощаются тканевыми макрофагами, однако

препятствуют дальнейшему развитию фагоцитоза за счёт «поглощения» образующихся АФК, что в целом подтверждается сведениями об их электрон-акцепторных свойствах и существующими теориями о биологической активности фуллерена. На основании этой гипотезы был предложен метод биологической стандартизации фуллерена, описанный ниже.

3.8 Тест с нитротетразолием синим (NBT-тест)

В разделе 1.1 данной работы упоминается, что биологические эффекты водных растворов фуллерена часто связывают со способностью подавлять выделение активных форм кислорода (АФК) и препятствовать развитию окислительного взрыва. Для того, чтобы количественно оценить этот эффект была подобрана методика, позволяющая оценить количество АФК, производимых иммунокомпетентными клетками, а именно NBT-тест [111, 112]. Помимо изучения биологического действия фуллерена, целью данного опыта было определить пригодность данного метода для биологической стандартизации водного раствора фуллерена.

На основании четырёх повторов были получены значения, обобщённые на рисунке 32. Результаты статистической обработки показали наличие достоверных различий между процентным содержанием нейтрофилов с формазановыми депозитами в экспериментальной и контрольной группах при $p<0,05$.

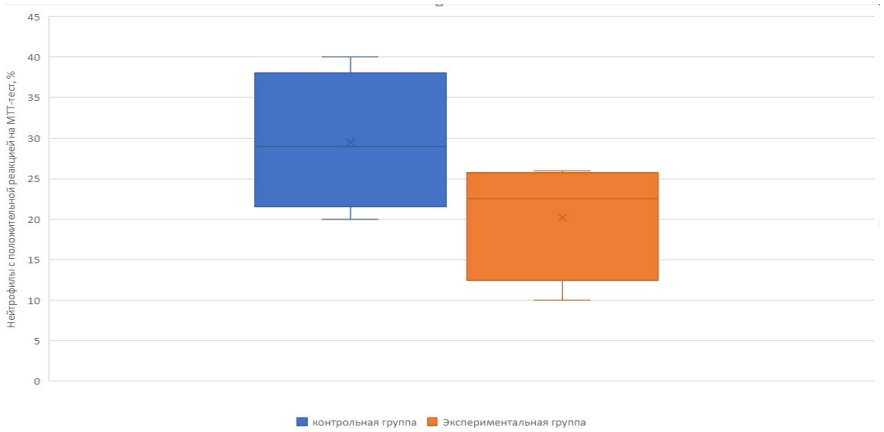


Рисунок 32. среднее процентное содержание нейтрофилов с формазановыми депозитами в контрольной и экспериментальной группах

Данный эксперимент демонстрирует эффект фуллерена на иммунокомпетентные клетки. Вероятно, подавление окислительного взрыва является основным механизмом противовоспалительного и слабого иммуносупрессорного действия, отмечаемого исследователями. Однако, трудоёмкость и длительность проведения данного метода делают его непригодными для рутинного фармацевтического анализа. При этом, полученные сведения позволяют заключить, что водный раствор фуллерена, полученный предложенным в работе способом будет эффективно подавлять воспалительные процессы инфекционной и аллергической этиологии.

3.9 МТТ-тест

МТТ-тест является распространённой методикой определения жизнеспособности клеток и цитотоксичности различных веществ. Он основан на измерении светопоглощения формазана, образующегося в клетках в результате метаболизма из МТТ. Высокое светопоглощение при длине волны 570 нм соответствует высокому содержанию формазана и указывает на высокую выживаемость клеток и низкую токсичность исследуемого соединения.

На рисунке 33 представлены результаты спектрофотометрического измерения для клеток линии А549. Стоит отметить, что показатели светопоглощения укладываются в пределы среднеквадратичных отклонений контрольной группы, т. е., выживаемость клеток статистически значимо не зависит от присутствия водной дисперсии фуллерена в клеточной среде в исследованных концентрациях. Более того, на графике видно отсутствие зависимости количества погибших клеток от концентрации вещества. Это значит, что токсическая концентрация в опыте не была достигнута, и рассчитать её по полученным данным не представляется возможным, из чего можно сделать вывод об отсутствии токсичности водной дисперсии фуллерена для клеток этой линии.

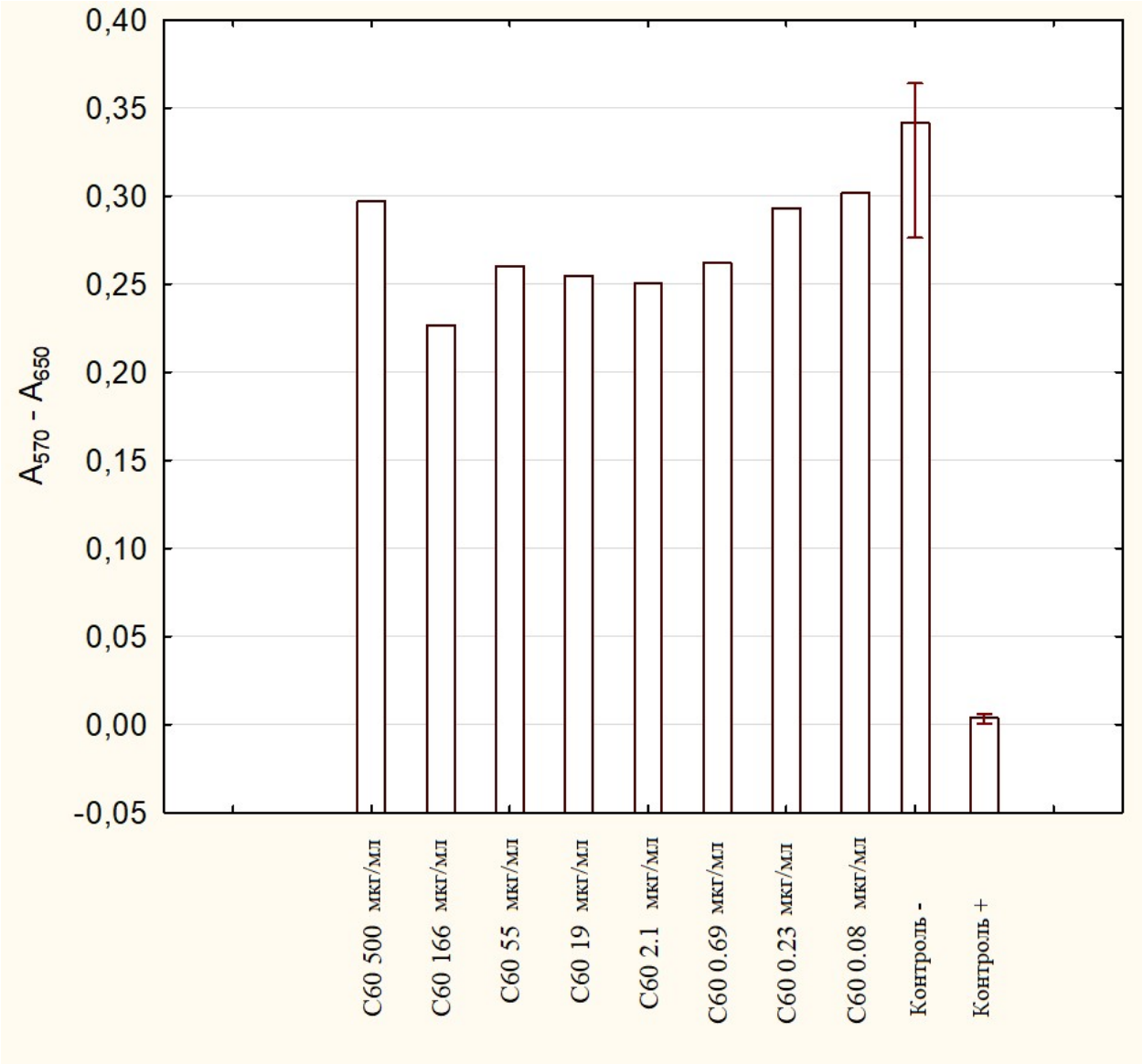


Рисунок 33. Результаты МТТ-теста в клетках линии А549

Похожим образом обстоит дело с клетками линии HeLa. Стоит отметить, что эти данные тем более ценны, что данная клеточная линия особенно часто используется для исследований цитотоксичности из-за простоты культивации и сравнительно высокой скорости деления, которая делает клетки этой линии особенно чувствительными к цитотоксичным веществам. Таким есть возможность сравнить результат, представленный на рисунке 34 с большим количеством экспериментальных данных для различных ксенобиотиков.

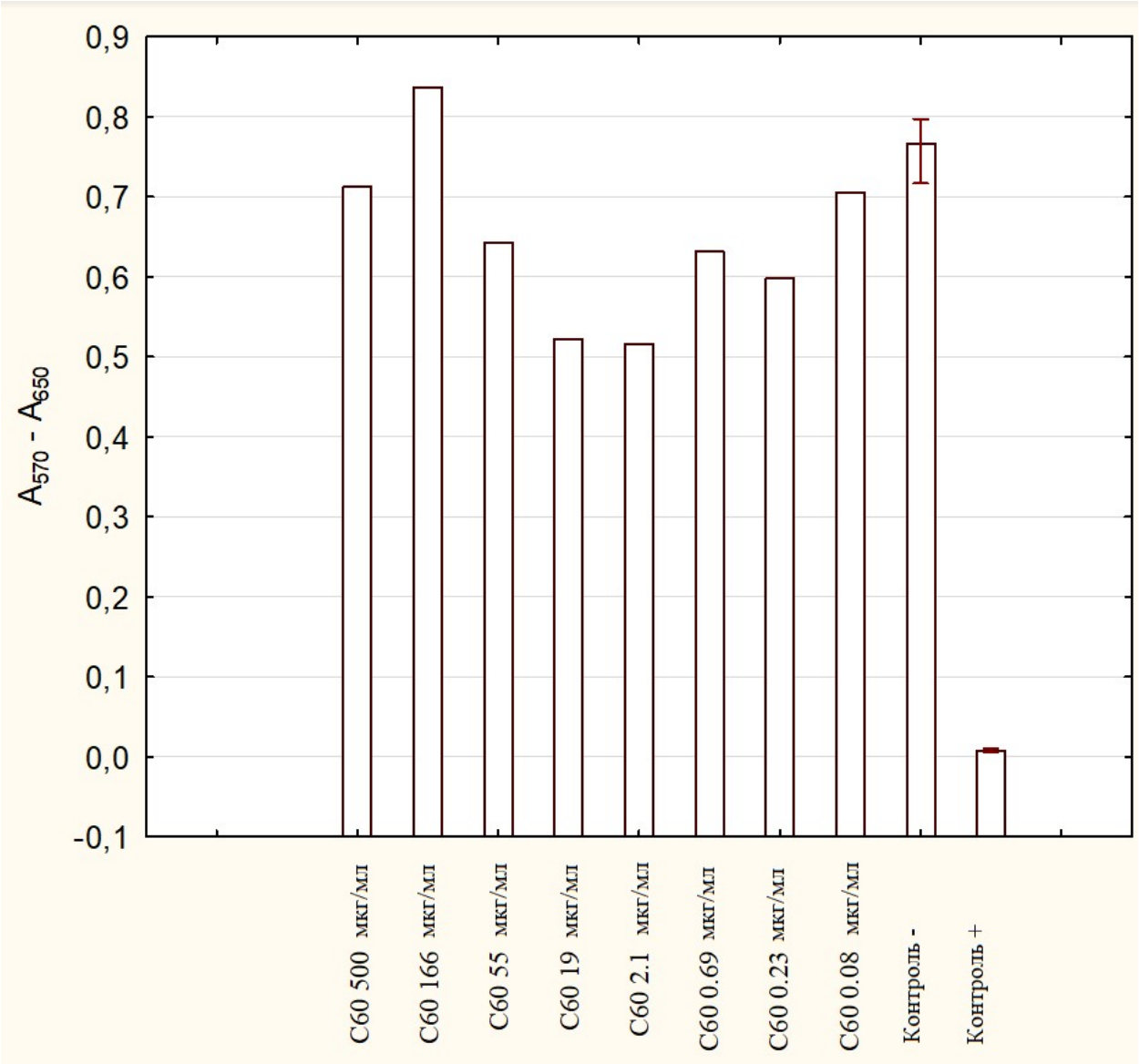


Рисунок 34. Результаты МТТ-теста в клетках линии HeLa

Как и в случае с клетками линии A549, анализ не выявил существенной токсичности. Хотя светопоглощение в экспериментальных группах в этом случае выходит за пределы стандартных отклонений, зафиксированных для контрольной группы, отсутствие зависимости количества выживших клеток от концентрации позволяет сделать вывод о том, что данные значения обусловлены скорее погрешностью метода, чем токсичностью изучаемого соединения. Количество клеток в максимальной изученной концентрации не выходит за пределы отклонений контрольной группы.

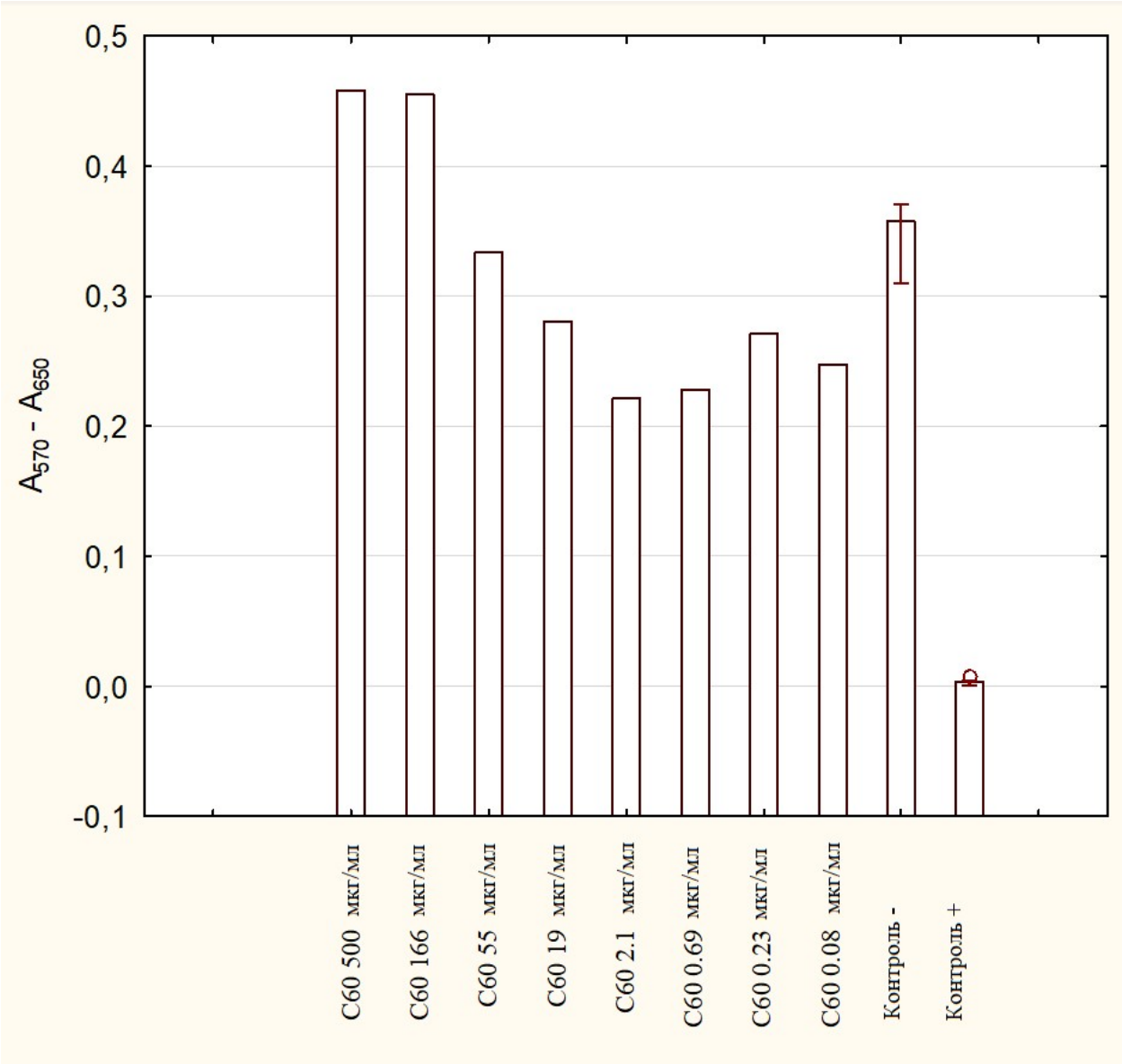


Рисунок 35. Результаты МТТ-теста в клетках линии HepG2

Картина несколько отличается при проведении теста на клетках опухоли печени линии HepG2 (рисунок 35). В максимальных изученных концентрациях (500 и 166 мкг/мл) наблюдается статистически достоверное повышение пролиферации гепатоцитов. Описанный в литературе гепатопротекторный эффект может быть связан именно с повышением скорости деления клеток печени.

Выводы к главе 3:

Описанные в главе результаты позволяют определить основные методы для контроля качества водного раствора фуллерена. Результаты тонкослойной хроматографии демонстрируют невозможность применения

хроматографических методов для контроля качества раствора фуллерена. Таким образом, для количественного определения фуллерена C_{60} в растворе целесообразно использовать метод спектрофотометрии.

ГЛАВА 4. Спецификация стандартного образца водного раствора фуллерена

В главе 3 данной работы описаны показатели качества для стандартизации водного раствора фуллерена, а также способ получения раствора сравнения для этих испытаний. В таблице 3, представленной ниже представлены показатели качества водного раствора фуллерена.

Таблица 3. Спецификация стандартного образца водного раствора фуллерена

Показатель качества	**Значение**			**Допустимые пределы значений**
	Серия I	**Серия II**	**Серия III**	
Описание	Соответствует			Прозрачная коричневая жидкость.
Подлиннсоть	1.При исследовании лиофилизата препарата методом ИК-спектроскопии наблюдают две полосы поглощения в области 1100-1500 см$^{-1}$ и две полосы поглощения в области 500-550 см$^{-1}$ 2.При исследовании раствора методом спектроскопии в УФ и видимой области наблюдают три полосы поглощения с максимумами при длинах волн 215, 260 и 340 нм 3.При исследовании методом масс-спектрометрии наблюдают одиночный пик, соответствующий 720 г/моль			1.ИК-спектр стандартного образца должен совпадать с ИК-спектром на прилагаемом рисунке. 2.Спектр поглощения стандартного образца в УФ и видимой области должен совпадать со спектром на прилагаемом рисунке. 3.При исследовании методом масс-спектрометрии должен обнаруживаться единичный пик, соответствующий 720 г/моль

Таблица 3 (продолжение)

Показатель качества	**Значение**			**Допустимые пределы значений**
	Серия I	**Серия II**	**Серия III**	
pH	6,81	6,92	7,07	6,5-7,5
Содержание специфичной примеси 1-метил-2-пирролидона, мкг/мл	230	190	210	Не более 0,5 мг/мл
Количественное содержание фуллерена, мг/мл	1,001	0,975	0,990	0,97-1,03 мг/мл
Размер частиц, нм	178±16	94±28	246±40	Не боле 300 нм
Хранение	В защищённом от света месте при температуре не выше 25°С в течение 2 лет			

Результаты исследований показывают, что предложенный в качестве стандартного образец водного раствора фуллерена соответствует показателям качества, установленным в главе 3.

Для установления сроков хранения изменения показателей качества наблюдали в течение двух лет при соблюдении условий хранения. В целом, изменения укладывались в пределы стандартных отклонений, за исключением размера частиц, который составлял 222,1 нм со среднеквадратичным отклонением 28,85 через год хранения и 238,6 нм со среднеквадратичным отклонением 25,11 через два года хранения. При этом оба значения укладываются в установленные пределы данного показателя качества, т. е. являлись менее 300 нм.

Заключение к главе 4

Полученный водный раствор фуллерена удовлетворяет установленным показателям качества и стабилен при хранении, что позволяет использовать его в качестве стандартного образца. Таким образом, была достигнута основная цель исследования, заключающаяся в создании стандартного образца водного раствора фуллерена.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучено современное состояние проблемы получения и стандартизации водных растворов фуллерена. На основании данных научной литературы сделан вывод о перспективности разработки способа получения водного раствора фуллерена для медицинского применения и обозначены основные подходы к его стандартизации.
2. Разработан способ получения водного раствора фуллерена, основанный на замене растворителя посредством ультрафильтрации. Концентрация фуллерена в полученных дисперсиях в 5-10 раз превышает концентрацию в дисперсиях, получаемых по описанным ранее методикам. Продемонстрирована низкая сорбция фуллерена на поверхности мембран из регенерированной целлюлозы, на основании данных о размере частиц в дисперсии полоксамер 407 был выбран в качестве оптимального стабилизатора.
3. Проведено исследование физико-химических свойств водного раствора фуллерена методами УФ-спектроскопии, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. Для контроля качества раствора установлены следующие значения: в УФ-спектре наблюдаются три полосы поглощения с максимумами при длинах волн 215, 260 и 340 нм. ИК-спектре лиофилизата присутствуют две полосы поглощения в области 1100-1500 см$^{-1}$ (максимумы при 1427 и 1181 см$^{-1}$) и две полосы поглощения в области 500-600 см$^{-1}$ (максимумы при 575 и 525 см$^{-1}$), В масс-спектре присутствует единичный пик, с m/z 721.
4. Изучены хроматографические характеристики водного раствора фуллерена методом тонкослойной хроматографии. Зафиксировано отсутствие подвижности фуллерена в водных дисперсиях в системах с полярным и неполярным сорбентом.
5. Проведено исследование размера и строения наночастиц в растворах для фармацевтического анализа водного раствора фуллерена. Предложено использование динамического светорассеяния в контроле

качества водного раствора фуллерена, результаты исследований этим способом подтверждены современными способами исследования наночастиц: малоугловым рассеянием нейтронов и электронной микроскопией. Размеры частиц в водной дисперсии фуллерена составили порядка 50 нм без использования стабилизатора и 100-350 нм с использованием неионогенных ПАВ в качестве стабилизатора.

6. Продемонстрирована биологическая безопасность водного раствора фуллерена при хроническом введении у мышей. Ежедневное внутрибрюшинное введение фуллерена в течение месяца не приводило к патоморфологическим изменениям в изученных органах. Изучена дифференциальная токсичность водного раствора фуллерена на на клетках линий A549, HeLa и HepG2. Увеличение гибели клеток после введения водного раствора фуллерена не наблюдали.
7. Контроль качества водного раствора фуллерена предложено проводить по следующим показателям: описание, подлинность, pH, содержание примеси 1-метил-2-пирролидона, количественное содержание фуллерена, размер частиц. Обозначен диапазон допустимых значений по этим показателям. Предложен проект нормативной документации для стандартного образца водного раствора фуллерена.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанный стандартный образец водного раствора фуллерена может быть использован в контроле качества лекарственных средств. Предложенный способ получения водного раствора фуллерена подходит для применения в производстве лекарственных средств. Предложенные методы анализа размера частиц в растворе могут быть использованы в контроле качества других нанодисперсных систем для медицинского применения.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанный способ получения водного раствора фуллерена открывает возможность проведения исследований его биологических

свойств. Изученные способы контроля качества препаратов на основе размеров и свойств наночастиц в растворах могут быть использованы для других нанодисперсных систем, в частности для систем транспортной доставки препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kroto H. W. C60: Buckminsterfullerene / Kroto H. W. [et al.] // Nature. – 1985.

2. Krtschmer W. Solid C60: a new form of carbon / Krtschmer W. [et al.] // Nature. – 1990. – Т. 347, № 6291. – С. 354--358.

3. Kyzima E. A. et. al. Structure and toxicity of aqueous fullerene C60 solutions // J. Synch. Investig. – 2015. –№ 9. – С. 1-5

4. Voronin D. et. al. Evidence of entropically driven C60 fullerene aggregation in aqueous solution // J. Chem. Phys. – 2014. - 140, 104909

5. Prilyutskiy Yu. et. al. C60fullerene aggregation in aqueous solution // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2013. – Т. 15, № 23. – С. 9351-9360.

6. Friedman S. H. Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification/ Friedman S. H. [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 1993.

7. Kornev A. B., Khakina E. A., Troyanov S. I., Kushch A. A., Peregudov A., Vasilchenko A., Deryabin D. G., Martynenko V. M., Troshin P. A. Facile preparation of amine and amino acid adducts of 60 fullerene using chlorofullerene C60Cl6 as a precursor // Chemical Communications. – 2012. – Т. 48, № 44. – С. 5461-5463.

8. Piotrovsky L. B., Kiselev O. I. Fullerenes and viruses // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2005.

9. Kotel'nikova R. A., Faingol'd, II, Poletaeva D. A., Mishchenko D. V., Romanova V. S., Shtol'ko V. N., Bogdanov G. N., Rybkin A. Y., Frog E. S., Smolina A. V., Kushch A. A., Fedorova N. E., Kotel'nikova A. I. Antioxidant properties of water-soluble amino acid derivatives of fullerenes and their role in the inhibition of herpes virus infection // Russian Chemical Bulletin. – 2011. – Т. 60, № 6. – С. 1172-1176.

10. Munoz A., Sigwalt D., Illescas B. M., Luczkowiak J., Rodriguez-Perez L., Nierengarten I., Holler M., Remy J. S., Buffet K., Vincent S. P., Rojo J., Delgado R., Nierengarten J. F., Martin N. Synthesis of giant globular multivalent

glycofullerenes as potent inhibitors in a model of Ebola virus infection // Nature Chemistry. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 50-57.

11. Vidal S. Glycofullerenes: Sweet fullerenes vanquish viruses // Nature Chemistry. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 4--6.

12. Rodriguez-Perez L., Ramos-Soriano J., Perez-Sanchez A., Illescas B. M., Munoz A., Luczkowiak J., Lasala F., Rojo J., Delgado R., Martin N. Nanocarbon-Based Glycoconjugates as Multivalent Inhibitors of Ebola Virus Infection // Journal of the American Chemical Society. – 2018. – Т. 140, № 31. – С. 9891-9898.

13. Norlen L., Nicander I., Rozell B. L., Ollmar S., Forslind B. Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo // Journal of Investigative Dermatology. – 1999. – Т. 112, № 1. – С. 72-77.

14. Gupta R., Rai B. Molecular dynamics simulation study of translocation of fullerene C-60 through skin bilayer: effect of concentration on barrier properties // Nanoscale. – 2017. – Т. 9, № 12. – С. 4114-4127.

15. Chapple I. L. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. // Journal of clinical periodontology. – 1997. – Т. 24, № 5. – С. 287--296.

16. Waris G., Ahsan H. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions // Book Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions / Editor, 2006.

17. Guan W. Protective effect of a novel cystine C60 derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells / Guan W. [et al.] // Chemico-Biological Interactions. – 2007. – Т. 167, № 2. – С. 135--144.

18. Kato S. Defensive effects of fullerene-C60/liposome complex against UVA-induced intracellular reactive oxygen species generation and cell death in human skin keratinocytes HaCaT, associated with intracellular uptake and extracellular excretion of fullerene-C60/ Kato S. [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2010. – Т. 98, № 2. – С. 144--151.

19. Arifa R. D. N. The reduction of oxidative stress by nanocomposite Fullerol decreases mucositis severity and reverts leukopenia induced by Irinotecan / Arifa R. D. N. [et al.] // Pharmacological Research. – 2016. – T. 107. – C. 102--110.
20. Nakamura H., Nozaki Y., Koizumi Y., Watano S. Effect of number of hydroxyl groups of fullerenol C-60(OH)(n) on its interaction with cell membrane // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. – 2018. – T. 90. – C. 18-24.
21. Fujimoto T. Induction of different reactive oxygen species in the skin during various laser therapies and their inhibition by fullerene / Fujimoto T. [et al.] // Lasers in Surgery and Medicine. – 2012.
22. Inui S. Improvement of acne vulgaris by topical fullerene application: Unique impact on skin care / Inui S. [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2011. – T. 7, № 2. – C. 238--241.
23. Shershakova N. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. / Shershakova N. [et al.] // Journal of nanobiotechnology. – 2016. – T. 14. – C. 8.
24. Shershakova N., Bashkatova E., Purgina D., Makarova E., Andreev S., Khaitov M. Wound healing and anti-inflammatory effects of aqueous fullerene C-60 dispersion // Allergy. – 2016. – T. 71. – C. 315-315.
25. Aoshima H. Clinical Evaluation of Fullerene-C 60 Dissolved in Squalane for Anti-Wrinkle Cosmetics / Aoshima H. [et al.] // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2010. – T. 10, № 10. – C. 6769--6774.
26. Liao F. Anticancer Effects of Fullerene C 60 Included in Polyethylene Glycol Combined With Visible Light Irradiation Through ROS Generation and DNA Fragmentation on Fibrosarcoma Cells With Scarce Cytotoxicity to Normal Fibroblasts / Liao F. [et al.] // Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics. – 2011. – T. 19, № 5. – C. 203--216.
27. Miyata N., Yamakoshi Y., Nakanishi I. Reactive species responsible for biological actions of photoexcited fullerenes // Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. – 2000. – T. 120, № 10. – C. 1007-1016.

28. Zhang Q. Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C60 nanocrystal / Zhang Q. [et al.] // Autophagy. – 2009. – T. 5, № 8. – C. 1107--1117.

29. Kumar M. Lysine-Based C_{60}-Fullerene Nanoconjugates for Monomethyl Fumarate Delivery: A Novel Nanomedicine for Brain Cancer Cells / Kumar M. [et al.] // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2018.

30. Zabirnyk O., Yezhelyev M., Seleverstov O. Nanoparticles as a novel class of autophagy activators // Autophagy. – 2007. – T. 3, № 3. – C. 278-281.

31. Gharbi N. 60 Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity / Gharbi N. [et al.] // Nano Letters. – 2005. – T. 5, № 12. – C. 2578--2585.

32. Slater T. F., Cheeseman K. H., Ingold K. U. Carbon-tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver-injury // Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences. – 1985. – T. 311, № 1152. – C. 633-645.

33. Dimitrijevic N. M. Reaction of trichloromethyl and trichloromethylperoxyl radicals with c-60 - a pulse-radiolysis study // Chemical Physics Letters. – 1992. – T. 194, № 4-6. – C. 457-460.

34. Yudoh K. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis. / Yudoh K. [et al.] // International journal of nanomedicine. – 2009. – T. 4. – C. 217--225.

35. Yudoh K., Shishido K., Murayama H., Yano M., Matsubayashi K., Takada H., Nakamura H., Masuko K., Kato T., Nishioka K. Water-soluble c60 fullerene prevents degeneration of articular cartilage in Osteoarthritis via down-regulation of chondrocyte catabolic activity and inhibition of cartilage degeneration during disease development // Arthritis and Rheumatism. – 2007. – T. 56, № 10. – C. 3307-3318.

36. Baati T. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of 60 fullerene / Baati T. [et al.] // Biomaterials. – 2012. – T. 33, № 19. – C. 4936--4946.

37. Makarova E. G. Fullerene C_{60} Prevents Neurotoxicity Induced by Intrahippocampal Microinjection of Amyloid- beta Peptide / Makarova E. G. [et al.] // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2012.

38. Ding Q. X., Dimayuga E., Keller J. N. Oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease // Current Alzheimer Research. – 2007. – T. 4, № 1. – C. 73-79.

39. Kim J. E., Lee M. Fullerene inhibits beta-amyloid peptide aggregation // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2003. – T. 303, № 2. – C. 576-579.

40. Dugan L. L. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents / Dugan L. L. [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94, № 17. – C. 9434--9439.

41. Gao J., Wang H. L., Shreve A., Iyer R. Fullerene derivatives induce premature senescence: A new toxicity paradigm or novel biomedical applications // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2010. – T. 244, № 2. – C. 130-143.

42. Ueng T. H., Kang J. J., Wang H. W., Cheng Y. W., Chiang L. Y. Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullerenol, a polyhydroxylated fullerene C-60 // Toxicology Letters. – 1997. – T. 93, № 1. – C. 29-37.

43. Rajagopalan P., Wudl F., Schinazi R. F., Boudinot F. D. Pharmacokinetics of a water-soluble fullerene in rats // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1996. – T. 40, № 10. – C. 2262-2265.

44. Chen H. H. C., Yu C., Ueng T. H., Chen S. D., Chen B. J., Huang K. J., Chiang L. Y. Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C-60 in rats // Toxicologic Pathology. – 1998. – T. 26, № 1. – C. 143-151.

45. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S., Sueki K., Nakahara H., Enomoto S., Ambe F. In-vivo biological behavior of a water-miscible fullerene - c-14 labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity // Chemistry & Biology. – 1995. – T. 2, № 6. – C. 385-389.

46. Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Biological applications of fullerene derivatives: A brief overview // Croatica Chemica Acta. – 2001. – T. 74, № 4. – C. 743-755.

47. Moussa F., Chretien P., Dubois P., Chuniaud L., Dessante M., Trivin F., Sizaret P. Y., Agafonov V., Ceolin R., Szwarc H., Greugny V., Fabre C., Rassat A. THE INFLUENCE OF C-60 POWDERS ON CULTURED HUMAN-LEUKOCYTES // Fullerene Science and Technology. – 1995. – T. 3, № 3. – C. 333-342.

48. Moussa F., Trivin F., Ceolin R., Hadchouel M., Sizaret P. Y., Greugny V., Fabre C., Rassat A., Szwarc H. Early effects of C-60 administration in Swiss mice: A preliminary account for in vivo C-60 toxicity // Fullerene Science and Technology. – 1996. – T. 4, № 1. – C. 21-29.

49. Scrivens W. A., Rawlett A. M., Tour J. M. Preparative benchtop enrichment of C-60, C-70, and the higher fullerene allotropes using a brominated polystyrene stationary phase // Journal of Organic Chemistry. – 1997. – T. 62, № 8. – C. 2310-2311.

50. Oberdorster E., Zhu S. Q., Blickley T. M., McClellan-Green P., Haasch M. L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C-60) on aquatic organisms // Carbon. – 2006. – T. 44, № 6. – C. 1112-1120.

51. Oberdorster G., Stone V., Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective // Nanotoxicology. – 2007. – T. 1, № 1. – C. 2-25.

52. Klaine S. J., Alvarez P. J. J., Batley G. E., Fernandes T. F., Handy R. D., Lyon D. Y., Mahendra S., McLaughlin M. J., Lead J. R. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2008. – T. 27, № 9. – C. 1825-1851.

53. Andrievsky G., Klochkov V., Derevyanchenko L. Is the C-60 fullerene molecule toxic?! // Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2005. – T. 13, № 4. – C. 363-376.

54. Mori T., Takada H., Ito S., Matsubayashi K., Miwa N., Sawaguchi T. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis // Toxicology. – 2006. – Т. 225, № 1. – С. 48-54.

55. Nelson M. A., Domann F. E., Bowden G. T., Hooser S. B., Fernando Q., Carter D. E. Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin // Toxicology and Industrial Health. – 1993. – Т. 9, № 4. – С. 623-630.

56. Hendrickson O. D., Fedyunina N. S., Zherdev A. V., Solopova O. N., Sveshnikov P. G., Dzantiev B. B. Production of monoclonal antibodies against fullerene C-60 and development of a fullerene enzyme immunoassay // Analyst. – 2012. – Т. 137, № 1. – С. 98-105.

57. Sayes C. M. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes / Sayes C. M. [et al.] // Nano Letters. – 2004.

58. Marcus Y. Solubility of C60 Fullerene / Marcus Y. [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2001. – Т. 105, № 13. – С. 2499--2506.

59. Semenov K. N. Solubility of light fullerenes in organic solvents / Semenov K. N. [et al.] // Journal of Chemical and Engineering Data. – 2010. – Т. 55, № 1. – С. 13--36.

60. Choi J. I. Interaction of C60 with water: First-principles modeling and environmental implications / Choi J. I. [et al.] // Environmental Science and Technology. – 2015.

61. Maggini M. Addition of Azomethine Ylides to C60: Synthesis, Characterization, and Functionalization of Fullerene Pyrrolidines / Maggini M. [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 1993.

62. Bingel C. Cyclopropanierung von Fullerenen // Chem. Ber. – 1993.

61. Isobe H. One-step multiple addition of amine to 60 fullerene. Synthesis of tetra(amino)fullerene epoxide under photochemical aerobic conditions / Isobe H. [et al.] // Organic Letters. – 2000.

64. Iwashita A. AlCl3-mediated mono-, di-, and trihydroarylation of 60 fullerene / Iwashita A. [et al.] // Angewandte Chemie - International Edition. – 2007.

65. Pla P. Simple bond patterns predict the stability of Diels-Alder adducts of empty fullerenes/ Pla P. [et al.] // Chemical Communications. – 2018.
66. Schuster D. I. Evaluation of the anti-HIV Potency of a Water- Soluble Dendrimeric Fullerene / Schuster D. I. [et al.] // Proc Electrochem Soc. – 2000.
67. Yang X. Fullerene-biomolecule conjugates and their biomedicinal applications / Yang X. [et al.] // Book Fullerene-biomolecule conjugates and their biomedicinal applications / Editor, 2013.
68. Chiang L. Y. Efficient one-flask synthesis of water-soluble 60 fullerenols / Chiang L. Y. [et al.] // Tetrahedron. – 1996.
69. Chiang L. Y., Wang L. Y., Swirczewski J. W., Soled S., Cameron S. Efficient synthesis of polyhydroxylated fullerene derivatives via hydrolysis of polycyclosulfated precursors // Journal of Organic Chemistry. – 1994. – Т. 59, № 14. – С. 3960-3968.
70. Kokubo K. Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups / Kokubo K. [et al.] // ACS Nano. – 2008. – Т. 2, № 2. – С. 327--333.
71. Chen K. L, Menachem E. Relating colloidal stability of fullerene (C60) nanoparticles to nanoparticle charge and electrokinetic properties // Environmental Science and Technology. – 2009.
72. Labille J. Hydration and dispersion of C60 in aqueous systems: The nature of water-fullerene interactions / Labille J. [et al.] // Langmuir. – 2009.
73. Murdianti B. S. C_{60} oxide as a key component of aqueous C60 colloidal suspensions / Murdianti B. S. [et al.] // Environmental Science and Technology. – 2012. – Т. 46, № 14. – С. 7446--7453.
74. Reed C. A., Bolskar R. D. Discrete fulleride anions and fullerenium cations // Chemical Reviews. – 2000. – Т. 100, № 3. – С. 1075-1119.
75. Tervonen K. Analysis of fullerene-c60 and kinetic measurements for its accumulation and depuration in Daphnia magna / Tervonen K. [et al.] // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2010. – Т. 29, № 5. – С. 1072--1078.

76. Tong Z. Impact of Fullerene (C60) on a Soil Microbial Community / Tong Z. [et al.] // Environmental Science & Technology. – 2007. – Т. 41, № 8. – С. 2985--2991.

77. Deguchi S., Sada-atsu M. Top-down Preparation of Dispersions of C60 Nanoparticles in Organic Solvents // Chemistry Letters. – 2006. – Т. 35, № 4. – С. 396--397.

78. Chen K. L, Menachem E. Interaction of Fullerene (C_{60}) Nanoparticles with Humic Acid and Alginate Coated Silica Surfaces: Measurements, Mechanisms, and Environmental Implications // Environmental Science $\backslash$ \& Technology. – 2008. – Т. 42, № 20. – С. 7607--7614.

79. Andrievsky G. V. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes / Andrievsky G. V. [et al.] // Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. – 1995.

80. Mikheev I. V., Pirogova M. O., Bolotnik T. A., Volkov D. S., Korobov M. V., Proskurnin M. A. Optimization of the solvent-exchange process for high-yield synthesis of aqueous fullerene dispersions // Nanosystems-Physics Chemistry Mathematics. – 2018. – Т. 9, № 1. – С. 41-45.

81. Brant J. A., Labille J., Bottero J. Y., Wiesner M. R. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry // Langmuir. – 2006. – Т. 22, № 8. – С. 3878-3885.

82. Torres V. M. Solubilization of fullerene C60 in micellar solutions of different solubilizers / Torres V. M. [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2011. – Т. 82, № 1. – С. 46--53.

83. Deguchi S. Stable dispersions of fullerenes, C60 and C70, in water. Preparation and characterization / Deguchi S. [et al.] // Langmuir. – 2001. – Т. 17, № 19. – С. 6013--6017.

84. Andreev S. Study of Fullerene Aqueous Dispersion Prepared by Novel Dialysis Method: Simple Way to Fullerene Aqueous Solution / Andreev S. [et al.] // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2015. – Т. 23, № 9. – С. 792--800.

85. Jouyban A., Fakhree M. A. A., Shayanfar A. Review of Pharmaceutical Applications of N-Methyl-2-Pyrrolidone // Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2010. – T. 13, № 4. – C. 524-535.
86. Andrievsky G. V. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C 60 fullerene with help of FTIR re ectance and UV–Vis spectroscopy / Andrievsky G. V. [et al.] // Chemical Physics Letters. – 2002. – T. 364, № September. – C. 8--17.
87. Jargalan N. Investigation of the dissolution kinetics of fullerene C60 in solvents with different polarities by UV-Vis spectroscopy / Jargalan N. [et al.] // Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2015. – T. 9, № 1. – C. 12--16.
88. Jargalan N., Tropin T. V., Avdeev M. V., Aksenov V. L. Investigation and modeling of evolution of C-60/NMP solution UV-Vis spectra // Nanosystems-Physics Chemistry Mathematics. – 2016. – T. 7, № 1. – C. 99-103.
89. Armand X., Herlin N., Voicu I., Cauchetier M. Fullerene synthesis by laser pyrolysis of hydrocarbons // Journal of Physics and Chemistry of Solids. – 1997. – T. 58, № 11. – C. 1853-1859.
90. Xiao J., Meyerhoff M. E. High-performance liquid-chromatography of c-60, c-70, and higher fullerenes on tetraphenylporphyrin-silica stationary phases using strong mobile-phase solvents // Journal of Chromatography A. – 1995. – T. 715, № 1. – C. 19-29.
91. Lu J. P., Ding J. F., Alem S., Wakim S., Tse S. C., Tao Y., Stupak J., Li J. J. Synthesis of oligofluorene modified C-60 derivatives for organic solar cell applications // Journal of Materials Chemistry. – 2011. – T. 21, № 13. – C. 4953-4960.
92. Shareef A., Li G. H., Kookana R. S. Quantitative determination of fullerene (C-60) in soils by high performance liquid chromatography and accelerated solvent extraction technique // Environmental Chemistry. – 2010. – T. 7, № 3. – C. 292-297.

93. Perez R. A., Albero B., Miguel E., Tadeo J. L., Sanchez-Brunete C. A Rapid Procedure for the Determination of C60 and C70 Fullerenes in Soil and Sediments by Ultrasound-assisted Extraction and HPLC-UV // Analytical Sciences. – 2013. – T. 29, № 5. – C. 533-538.

94. Koster V. S. Particle size in parenteral fat emulsions, what are the true limitations? / Koster V. S. [et al.] // Book Particle size in parenteral fat emulsions, what are the true limitations? / Editor, 1996.

95. Akbarzadeh A. Liposome : classification , preparation , and applications / Akbarzadeh A. [et al.] //. – 2013. – C. 1--9.

96. Shim G. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids / Shim G. [et al.] // Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2013. – T. 8, № 2. – C. 120--128.

97. Singh R., Lillard J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery // Book Nanoparticle-based targeted drug delivery / Editor, 2009.

98. Almofti M. R. Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum. / Almofti M. R. [et al.] // Molecular membrane biology. – 2003. – T. 20. – C. 35--43.

99. Jindal A. B. The effect of particle shape on cellular interaction and drug delivery applications of micro-and nanoparticles // International Journal of Pharmaceutics. – 2017. – T. 532, № 1. – C. 450-465.

100. Peltonen L. Practical guidelines for the characterization and quality control of pure drug nanoparticles and nano-cocrystals in the pharmaceutical industry // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2018. – T. 131. – C. 101-115.

101. van Sebille M., van der Maaten L. J. P., Xie L., Jarolimek K., Santbergen R., van Swaaij R., Leifer K., Zeman M. Nanocrystal size distribution analysis from transmission electron microscopy images // Nanoscale. – 2015. – T. 7, № 48. – C. 20593-20606.

102. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays // Journal of Immunological Methods. – 1983. – T. 65, № 1-2. – C. 55-63.

103. Chang X. J., Vikesland P. J. Uncontrolled Variability in the Extinction Spectra of C-60 Nanoparticle Suspensions // Langmuir. – 2013. – T. 29, № 31. – C. 9685-9693.

104. Chen V. Particle deposition during membrane filtration of colloids: Transition between concentration polarization and cake formation / Chen V. [et al.] // Journal of Membrane Science. – 1997. – T. 125, № 1. – C. 109--122.

105. Teixeira M. R., Joo R. M., Nystrm M. The role of membrane charge on nanofiltration performance // Journal of Membrane Science. – 2005.

106. Ariza M. J., Benavente J. Streaming potential along the surface of polysulfone membranes: A comparative study between two different experimental systems and determination of electrokinetic and adsorption parameters // Journal of Membrane Science. – 2001.

107. Cho J., Gary M., Pellegrino J. Membrane filtration of natural organic matter: Factors and mechanisms affecting rejection and flux decline with charged ultrafiltration (UF) membrane // Journal of Membrane Science. – 2000.

108. Use of Micellar-Enhanced Ultrafiltration to Remove Dissolved Organics from Aqueous Streams Use of Micellar-Enhanced Ultrafiltration to Remove Dissolved Organics from Aqueous Streams (school of chemical engineering and mate) // Separation Science and Technology. – 1985.

109. Zhang S. A Novel Strategy for MALDI-TOF MS Analysis of Small Molecules / Zhang S. [et al.] // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2010.

110. Thackaberry E. A., Wang X. J., Schweiger M., Messick K., Valle N., Dean B., Sambrone A., Bowman T., Xie M. L. Solvent-based formulations for intravenous mouse pharmacokinetic studies: tolerability and recommended solvent dose limits // Xenobiotica. – 2014. – T. 44, № 3. – C. 235-241.

111. Park B. H., Fikrig. S. M., Smithwick E. M. Infection and Nitroblue-Tetrazolium Reduction by Neutrophils // The Lancet. – 1968. – T. 292, № 7567. – C. 532--534.

112. Berridge M. V. Herst P. M., Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction // Book Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction / Editor, 2005. – C. 127--152.