

ПОЛУЧЕНИЕ ДЛИННОМЕРНЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ОБРАЗОВАНИЙ УГЛЕРОДА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БИОСОВМЕСТИМОСТИ

И. В. Гурин¹
Б. П. Введенский²
В. А. Гурин¹
А. Н. Буколов¹
С. Г. Фурсов¹
И. В. Белочкина²
Г. А. Ковалев²
О. П. Сынчикова²
Л. Н. Тыныныка²
Б. П. Сандомирский²

¹Национальный научный центр
«Харьковский физико-технический институт»
НАН Украины, Харьков

²Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Предложен новый подход для получения многослойных углеродных нанотрубок и нановолокон с использованием шахтной печи с ламинарным потоком углеводородного газа. Исследование реакционной способности различных солей железа (FeS, FeCl₃, FeSO₄, карбонильного железа и т. д.) показало, что применение хлорного железа обеспечивает получение каталитических образований углерода наибольшей длины и с минимальным количеством сажеподобных включений. Чистота каталитических образований углерода после высокотемпературной рафинации в вакууме при температуре 2 500 °С составляла 99,97%.

Изучение биосовместимости полученных каталитических образований углерода при контакте с культурой клеток и после имплантации лабораторным животным не выявило существенного токсического воздействия.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, токсичность наноструктур, биоинженерия.

Открытие в 1985 г. фуллеренов и присуждение трем из пяти авторам этого открытия Нобелевской премии (1996 г.) вызвало большой интерес к ним и другим нанометрическим структурам углерода, в том числе к углеродным нанотрубкам [1–3]. Сегодня для получения фуллеренов, наночастиц и нанотрубок применяют ряд методов: электродуговой и лазерный синтез, испарение резистивным нагревом, электронными и ионными пучками, солнечным светом, каталитический пиролиз углеводородов, органических соединений и СО, разложение карбидов, синтез в пламени при сжигании углеводородов в воздухе, электролиз расплавленных солей угольными электродами. Наиболее производительным признан метод каталитического пиролиза углеводородов [1–5].

В ННЦ ХФТИ образование углеродных нанотрубок и вискероов наблюдали еще в 1982–1985 гг. В дальнейшем разработка методов получения каталитических образо-

ваний углерода выполнялась в рамках международных проектов УНТЦ (проекты 0293, 1870, 4913). Были разработаны методы получения каталитических осадков путем каталитического пиролиза природного газа с применением шахтной печи с перфорированным нагревателем, принудительной фильтрацией углеводородного газа при пониженном, атмосферном и повышенном давлении. С использованием шахтной печи получены длинномерные каталитические образования углерода длиной до 300 мкм и толщиной несколько микрон.

В настоящее время наноструктурные образования углерода — перспективные и многообещающие объекты нанобиотехнологий. Однако исследования этих материалов и их свойств находятся лишь на начальной стадии, и до применения их в медицинской практике следует детально изучить влияние на живые организмы, механизмы взаимодействия с клеткой и отдельными ее компартаментами [6, 7].

Целью работы явилась разработка методов получения чистых длинномерных каталитических образований углерода (КОУ), исследование их структуры, а также оценка биосовместимости *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Получали КОУ методом пиролиза природного газа на катализаторах подгруппы железа (Fe, Ni, Co) при температуре ~1 100 °С при избыточном давлении 300–500 мм водяного столба. Эксперименты проводили с использованием газофазных установок пиролиза НИЦ ХФТИ типов АГАТ-1,6, АГАТ-2,0 и АГАТ-3,2. Контроль температурных режимов осуществляли, вводя в реакционный объем ХА-термопару в кварцевом чехле, и визуально, при помощи оптических пирометров «Промінь».

Структуру КОУ исследовали с использованием методов электронной микроскопии на микроскопе JSM-6700F.

Чистоту материала определяли методом измерения зольности путем сжигания навесок каталитических осадков в фарфоровых чашках на воздухе при температуре 750–760 °С до постоянного веса.

Биосовместимость полученных КОУ оценивали в условиях *in vitro* — при контакте с культурой клеток хрящевой ткани, а также *in vivo* — после имплантации лабораторным животным. Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2004) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, Франция, 1986) [8]. Клетки выделяли коллагеназным методом из хрящей крупных суставов новорожденных кроликов. Метаболическую активность клеток в условиях монослойной культуры и в 3-мерной структуре на КОУ трубчатой структуры оценивали по тесту с редокс-индикатором Alamar Blue [9]. Способность клеток к синтезу гликозаминогликанов в присутствии КОУ определяли по окрашиванию культур альциановым синим [10]. Имплантацию КОУ выполняли в мышечную ткань, под капсулу мышцы, под капсулу почки белых беспородных крыс. Материал для гистологического исследования фиксировали в 10%-м нейтральном растворе формалина, после чего препараты промывали, обезживали в батарее спиртов восходящей концент-

рации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм готовили по общепринятому методу. Препараты печени окрашивали гематоксилином и эозином [10].

Результаты и обсуждение

Анализируя ранее полученные результаты (проекты УНТЦ 0293, 1870), установили, что при использовании шахтной печи и принудительной фильтрации углеводородного газа через ее реакционный объем преимущественный рост длинномерных КОУ наблюдался в зонах, в которых поток углеводородного газа, вероятно был ламинарным. На основании этого было сделано предположение, что ламинарность потока газа существенно влияет на форму и чистоту КОУ.

Для реализации этого условия применяли новый подход — использование шахтной печи с ламинарным потоком углеводородного газа, в основу которого положен принцип естественной циркуляции газа в нагретой трубе. С этой целью был изготовлен специальный газоплотный углерод-углеродный нагреватель (рис. 1).

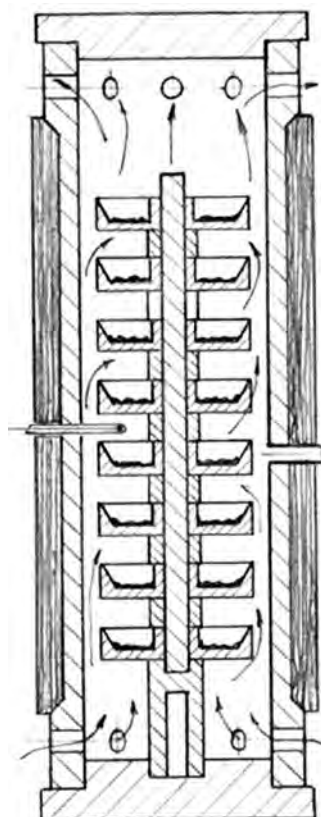


Рис. 1. Эскиз оснастки шахтной печи для получения каталитических образований углерода с использованием ламинарного потока углеводородного газа

Как видно из представленного рисунка, шахтная печь оснащена трубчатым нагревателем, в нижней и верхней частях которого предусмотрены отверстия для входа и выхода газа. Реакционный газ через отверстия в нижней части нагревателя попадает в рабочий объем реактора, нагревается до рабочей температуры (~1 100 °С), за счет естественной конвекции поднимается в верхнюю часть реактора и удаляется из реакционного объема через верхние отверстия нагревателя. Таким образом реализуется естественное регулирование баланса и обеспечивается ламинарный поток газа через объем реактора. Для предотвращения скопления в отверстиях сажевых частиц в этих зонах нагреватель имеет большее сечение, и температура в зоне отверстий не превышает 500–600 °С.

Для выбора наиболее эффективного катализатора была проведена серия экспериментов с использованием металлических Fe, Ni, Co и их солей. Эффективность катализаторов определяли по количеству и форме полученных КОУ. При использовании в качестве катализаторов железа, никеля и кобальта наблюдали повышение эффективности катализаторов в этом ряду, однако рост чистых и длинномерных КОУ был отмечен преимущественно при использовании в качестве катализатора железа. Это обусловило его выбор как основного катализатора для дальнейших экспериментов. Для повышения эффективности катализатора применяли методику его введения в виде солей, которые во время процесса восстанавливались до чистого железа или его карбидов. Кроме того, для стимулирования роста длинномерных КОУ вводили серу (соотношение катализатор–сера составляло 1:1 по массе). В таких реакциях сера выступает «промоутером» каталитических реакций или, иными словами, катализатором для катализатора [11].

Исследование реакционной способности смесей различных солей железа (FeS, FeCl₃, FeSO₄, карбонильного железа и т. д.) и серы продемонстрировало, что применение хлорного железа обеспечивает получение заметного количества КОУ наибольшей длины и с минимальным содержанием сажеподобных включений.

С учетом полученных результатов была разработана опытно-промышленная методика получения каталитических осадков. Дно каждой тарелки выкладывали одним слоем углеродной ткани, на поверхности которой равномерно размещали каталитическую смесь хлорида железа и серы. Выход на рабочую температуру (1 100 °С) осуществляли

с высокой скоростью (40–60 мин). Длительность процесса составляла 8–12 часов. Поток газа через реакционный объем поддерживали на уровне 300–400 л/мин. Использование углеродной ткани дает возможность существенно упростить выгрузку КОУ.

Такая методика позволяет реализовывать эффективные и повторяемые процессы получения КОУ с равномерным заполнением тарелок волокнами примерно одинакового размера с минимальным загрязнением сажеподобными частицами (рис. 2).



Рис. 2. Внешний вид КОУ, полученных в шахтной печи с ламинарным потоком углеводородного газа

Результаты исследования структуры полученных длинномерных КОУ методами сканирующей электронной микроскопии представлены на рис. 3. Методами рентгеноструктурного анализа была подтверждена совершенная кристаллическая структура этих КОУ [5]. Полученные результаты соответствуют данным литературы [3, 4], что позволяет рассматривать длинномерные КОУ как многослойные нанотрубки и нановолокна либо их конгломераты.

При оценке чистоты материала определяли зольность остатка. Каталитические осадки окислялись на воздухе до CO₂ и переходили в газообразное состояние, а остатки катализатора образовывали зольный остаток в виде оксидов железа характерного красноватого цвета. Проведенные эксперименты показали, что зольность КОУ составляет 0,38%, т. е. чистота полученных каталитических осадков составляет 99,62%.

Результаты исследования зольности КОУ после проведения высокотемпературной рафинации в форвакууме при 2 500 °С свидетельствуют, что такая обработка позво-

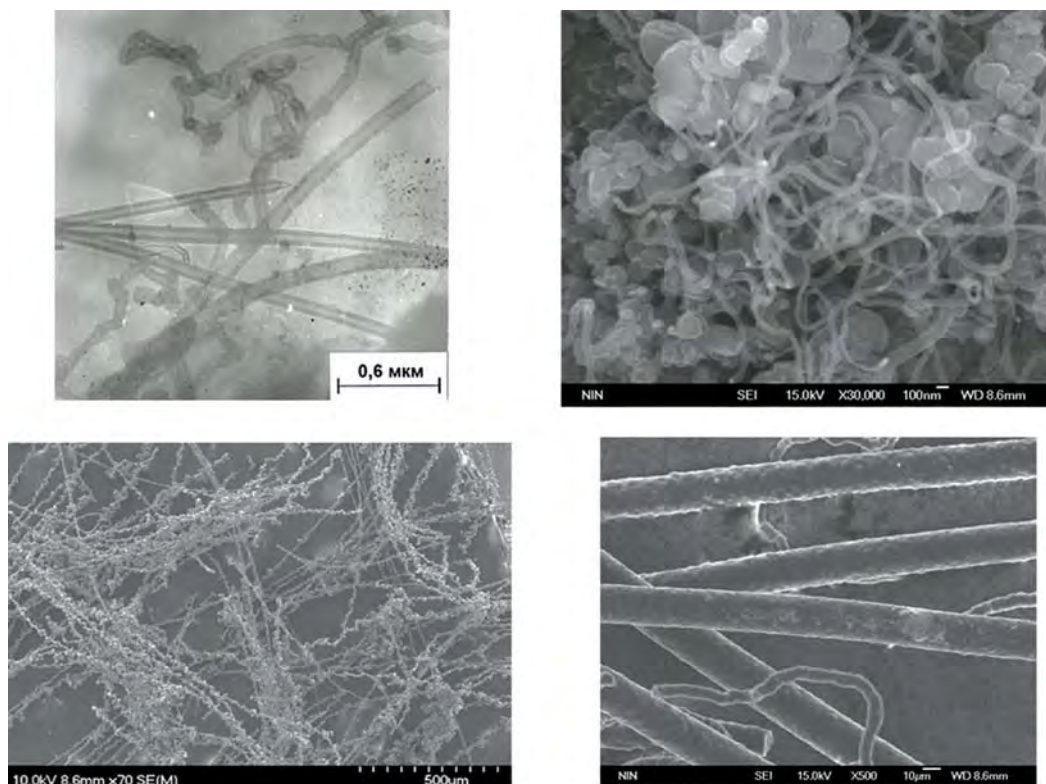


Рис. 3. Морфологическая структура каталитических осадков углерода

ляет получать материалы с зольностью 0,027% (чистота 99,97%), что находится на уровне ошибки измерения.

Для исследования биосовместимости *in vitro* и *in vivo* использовали КОУ без дополнительной высокотемпературной рафинации материала.

Присутствие КОУ в среде при монослойном культивировании хондробластов в течение 10 сут приводило к снижению активности восстановления Alamar Blue на 20% по сравнению с контролем в соответствующие сроки наблюдения (3, 7, 10 сут), однако не тормозило пролиферативную активность клеток (рис. 4). Это подтверждалось при фазово-контрастной микроскопии культур, а также увеличением степени восстановления Alamar Blue в динамике культивирования. При культивировании с КОУ хондробласты не теряли способности к синтезу гликозаминогликанов (рис. 5). После заселения образцов КОУ хондробластами (на 5 мг КОУ около 1 млн. клеток) и последующем культивировании таких структур в течение 7 сут наблюдали активное восстановление Alamar Blue, что свидетельствовало о сохранении уровня метаболической активности клеток, который повышался к концу срока наблюдения (рис. 6).

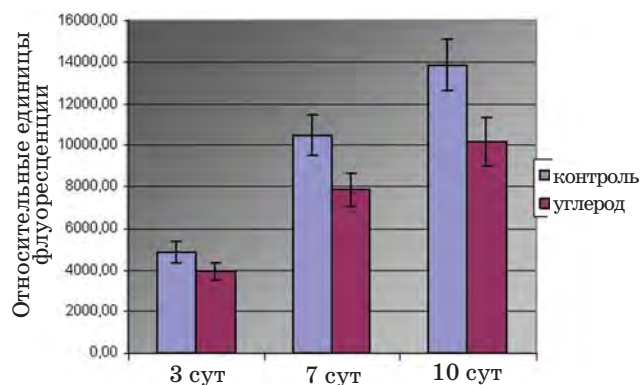


Рис. 4. Метаболическая активность клеток хрящевой ткани в течение 10 сут сокультивирования с КОУ

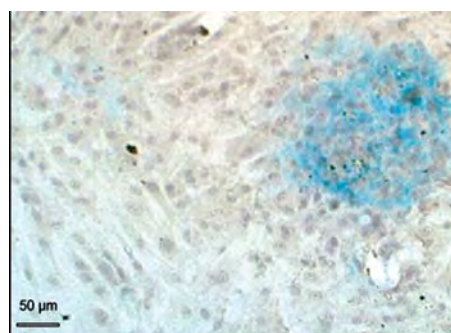


Рис. 5. Гликозаминогликаны в 10-суточной культуре клеток хряща (сокультивирование с КОУ) Окрашивание альциановым синим и гематоксилином

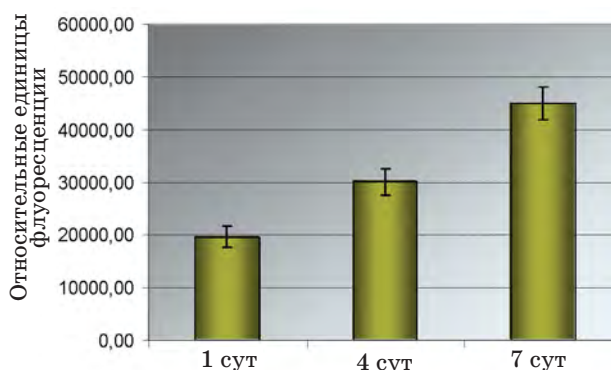


Рис. 6. Динамика метаболической активности клеток в трехмерной структуре на КОУ в течение 7 сут культивирования

Световая микроскопия зоны имплантации КОУ под фасцию мышцы, в мышечный карман или под капсулу почки на 4-е сут после операции позволила обнаружить умеренное полнокровие сосудов, а также кровоизлияния различной степени выраженности. Имплантированный материал располагался в виде скоплений различной формы и размеров, окружающие его ткани выглядели несколько отечными (рис. 7).

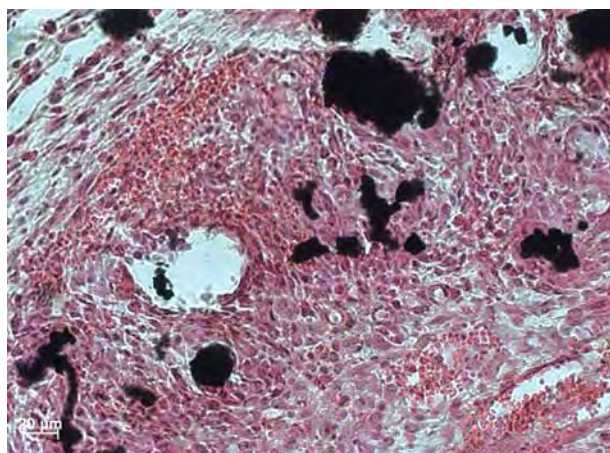


Рис. 7. Четвертые сутки после имплантации КОУ под капсулу мышцы:

определяется умеренное полнокровие сосудов, кровоизлияния различной степени выраженности. Соединительная ткань, окружающая имплантированный материал, выглядит несколько отечной. Признаков гибели или выраженного повреждения клеток, клеточных элементов воспалительного процесса нет. Окраска гематоксилином и эозином

Такая морфологическая картина, вероятно, объясняется механической травмой, которой сопровождался процесс внедрения волокон углерода. Большинство клеточных элементов соединительной ткани вблизи имплантов окрашивались более ярко, часто содержали укрупненные ядра, что свидетельствует

об их высокой активности. Отдельные клетки слабо воспринимали краситель, были несколько уменьшены в размерах, содержали уплотненные или сморщенные ядра. Это позволяет характеризовать их как клетки в состоянии дистрофии различной степени выраженности. Следует отметить, что такие измененные клеточные элементы встречались на всей площади препаратов, без какой-либо преимущественной локализации. Проявлений значительного дистрофически-атрофического процесса ни в одном из наблюдений зафиксировано не было. Отмечалось отсутствие какой-либо клеточной инфильтрации как в непосредственной близости от имплантированного материала, так и в других полях зрения.

На 14-е и 28-е сут признаки кровоизлияний, полнокровия сосудов и отека тканей отсутствовали (рис. 8).

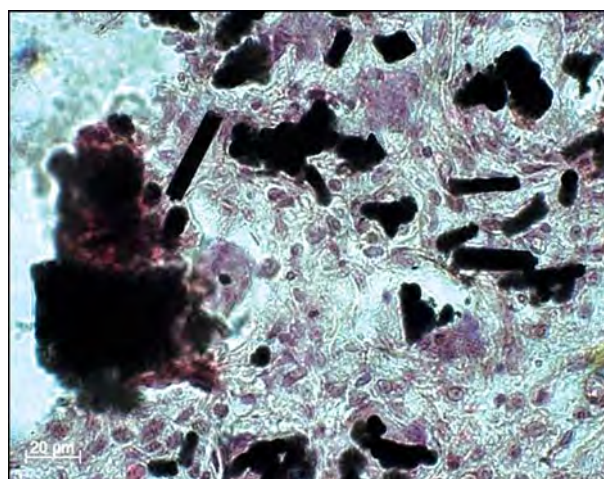


Рис. 8. Четырнадцатые сутки после имплантации КОУ под капсулу почки: импланты имеют вид вкраплений различной формы и размеров, реакция со стороны окружающих тканевых элементов не прослеживается. Признаков дегенерации или деструкции клеток, контактирующих с КОУ, инфильтратов или иных признаков воспаления нет. Окраска гематоксилином и эозином

Пучки мышечных волокон, как лежащие вблизи, так и непосредственно контактирующие с КОУ при их внедрении в мышцу, имели вид упорядоченных, хорошо отграниченных структур с четкой поперечной исчерченностью (рис. 9).

На периферии волокон, под сарколеммой, хорошо визуализировались ядра миосимпласта и миосателлитоцитов. Последние выглядели более яркими и были несколько укрупнены на 4-е сут после внутримышечной имплантации КОУ.

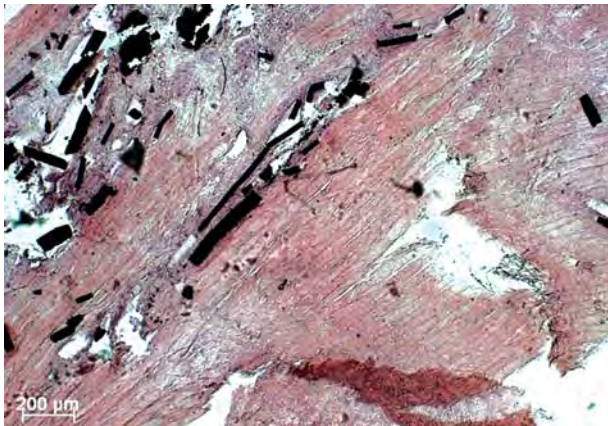


Рис. 9. Чотирнадцять тижнів після імплантації КОУ в м'язову тканину: лежачі поблизу імплантів пучки м'язових волокон, мають вигляд упорядкованих добре обмежених структур. Признаків реакції со сторони оточуючих тканин, клітинних елементів запального процесу немає. Фарбування гематоксилином і еозином

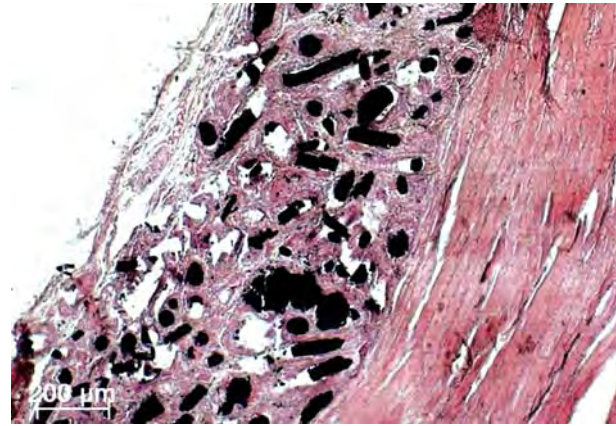


Рис. 10. Двадцять вісім тижнів після імплантації КОУ під фасцію м'язів: імплантати розташовані в формі скоплень різної форми і розмірів. Признаків реакції со сторони оточуючих тканин, клітинних елементів запального процесу немає. Пучки м'язових волокон, розташовані поблизу зони імплантації, не змінені. Фарбування гематоксилином і еозином

Явлень клітинної інфільтрації в ендо- або перимізії не спостерігалося ні в одному з термінів. В цілому, к 28 сут спостережень морфологічна картина виглядала більш однорідною, мала місце однорідність клітинних елементів, деяке зменшення їх кількості на одиницю площі (рис. 10).

Отримані дані дозволяють утвердити, що імплантація досліджуваних КОУ не супроводжувалася значущим негативним впливом на оточуючі тканини, описана морфологічна картина, на наш погляд, адекватна процесам репаративної регенерації в відповідь на операційну травму.

Таким чином, нам вдалося розробити ефективний метод отримання чистих довгомерних наноструктурних образів вуглецю (конгломератів багаторівневих вуглецевих нанотрубок і нановолокон), які не мали суттєвого токсичного впливу як *in vivo*, так і *in vitro*, і можуть розглядатися як перспективні для застосування в біологічних системах різних рівнів організації. Представлена методика отримання КОУ апробована на середніх по розмірам газозначних установках (АГАТ-3.2) і дає можливість отримувати матеріали в експериментально-промислових кількостях.

Робота виконана при підтримці гранта УНТЦ № 4913.

ЛИТЕРАТУРА

1. Керл Р. Ф. Истоки открытия фуллеренов: эксперимент и гипотеза // Усп. физ. наук. — 1998. — Т. 168, № 3. — С. 331–342.
2. Раков Э. Г. Методы получения углеродных нанотрубок // Усп. химии. — 2000. — Т. 69, № 1. — С. 41–59.
3. Раков Э. Г. Химия и применение углеродных нанотрубок // Там же. — 2001. — Т. 70, № 11. — С. 934–973.
4. Song Y., Zhai G., Shi J. et al. Carbon nanotube: carbon composites with matrix derived from oxidized mesophase pitch // Mater. Sci. — 2007. — V. 42. — P. 9498–9500.
5. Гуринов В. А., Габелков С. В., Полтавцев Н. С. и др. Кристаллическая структура пирографита и каталитически осажденного углерода // Вопр. атомн. науки и техники. — 2006. — № 4. — С. 195–199.
6. Fleischer T., Krug H. Risk potential of nanomaterials // Gynakol. Praxis. — 2009. — V. 33, N 2. — P. 389–398.
7. Jia G., Wang H., Yan L. et al. Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene // Environm. Sci. Technol. — 2005. — V. 39, N 5. — P. 1378–1383.

8. *European convention for the protection of vertebrate animals used experimental and other purpose: Council of Europe 10.03.1986. — Strasburg, 1986. — 52 p.*
9. *Petrenko Yu. A., Gorokhova N. A., Tkachova E. N., Petrenko A. Yu. The reduction of alamar blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria // Укр. біохім. журн. — 2005. — Т. 77, № 5. — С. 100–105.*
10. *Волкова О. В., Елецкий Ю. К. Основы гистологии с гистологической техникой. — М.: Медицина, 1982. — 304 с.*
11. *Харламов А. И., Кирилова Н. В. Новая модель формирования углеродных наноструктур // Сб. трудов 8-й междунар. конференции «Водородное материаловедение и химия углеродных наноматериалов», 14–20 сентября 2003 г., Судак, Крым. — С. 438–439.*

ОДЕРЖАННЯ ДОВГОМІРНИХ КАТАЛІТИЧНИХ УТВОРЕНЬ ВУГЛЕЦЮ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХНЬОЇ БІОСУМІСНОСТІ

I. V. Gurin¹
B. P. Vvedens'kiy²
V. A. Gurin¹
O. M. Bukolov¹
S. G. Fursov¹
I. V. Belochkina²
G. O. Koval'ov²
O. P. Synchykova²
L. N. Tynnyuka²
B. P. Sandomyrskiy²

¹Національний науковий центр
«Харківський фізико-технічний інститут»
НАН України, Харків

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Запропоновано новий підхід для одержання багатопарових вуглецевих нанотрубок і нановолокон з використанням шахтної печі з ламінарним потоком вуглеводневого газу. Дослідження реакційної здатності різних солей заліза (FeS, FeCl₃, FeSO₄, карбонільного заліза і т. д.) показало, що застосування хлорного заліза забезпечує одержання каталітичних утворень вуглецю найбільшої довжини та з мінімальною кількістю сажоподібних включень. Чистота каталітичних утворень вуглецю після високотемпературної рафінації у вакуумі при температурі 2 500 °C становила 99,97%. Вивчення біосумісності одержаних каталітичних утворень вуглецю під час контакту з культурою клітин та після імплантації лабораторним тваринам не виявило істотного токсичного впливу.

Ключові слова: вуглецеві нанотрубки, токсичність наноструктур, біоінженерія.

OBTAINING OF LONG-LENGTH CARBON CATALYTIC FORMATIONS AND INVESTIGATION OF THEIR BIOCOMPATIBILITY

I. V. Gurin¹
B. P. Vvedens'kiy²
V. A. Gurin¹
A. N. Bukolov¹
S. G. Fursov¹
I. V. Belochkina²
G. A. Koval'ov²
O. P. Synchykova²
L. N. Tynnyuka²
B. P. Sandomyrskiy²

¹National Science Center «Kharkov Institute of Physics and Technology», Kharkiv

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

The new approach to obtain multiwalled carbon nanotubes and nanofibers, using shaft furnace with laminar flow of hydrocarbon gas was proposed. The study of reaction ability of different iron salts (FeS, FeCl₃, FeSO₄, carbonyl iron etc) has shown that application of ferric chloride provides the obtaining of the longest carbon catalytic formations and with minimum amount of soot-like inclusions. The purity of catalytic formations of carbon treated with the method of high temperature refining on vacuum at 2 500 °C was 99.97%.

Investigation of biocompatibility of the resulted carbon catalytic formations during contact with cell culture and after implantation to laboratory animals did not show the significant toxic effect.

Key words: carbon nanotubes, toxicity of nanostructures, bioengineering.