

В. В. Черепанов, А. І. Сененко, Ю. І. Прилуцький,
член-кореспондент НАН України **О. А. Марченко,**
академік НАН України **А. Г. Наумовець**

Структура плівок немодифікованих фулеренів C_{60} , адсорбованих з фізіологічних розчинів на поверхні слюди і золота

За допомогою атомно-силової і сканувальної тунельної мікроскопії досліджено структуру плівок немодифікованих фулеренів C_{60} , адсорбованих з фізіологічних розчинів 0,9% NaCl та Рінгера на поверхні слюди і золота, що є важливим для з'ясування механізмів їх специфічної біологічної дії та подальшого застосування у нанобіотехнологіях. Показано, що фулерени C_{60} утворюють щільноупаковані острівці товщиною в один моношар, а присутність молекул C_{60} у розчинах істотно впливає на процеси росту кристалів солі на заданих поверхнях.

Актуальною проблемою розвитку сучасних нанобіотехнологій є цілеспрямоване застосування біосумісних низькотоксичних об'єктів нанометрового розміру для лікування найпоширеніших хвороб. Так, в онкології, завдяки об'єднаним зусиллям дослідників у галузях фізики, хімії, біології, матеріалознавства, інформаційних технологій і медицини сформувався новий науковий напрям, спрямований на розроблення методів молекулярної діагностики і терапії онкологічних захворювань з використанням наночастинок. Передбачається, що за допомогою нанотехнологій можуть бути вирішені проблеми ранньої діагностики і визначення локалізації злоякісних новоутворень, реалізована адресна доставка лікарських препаратів у пухлину, а також розроблені нові методи селективної терапії. Серед можливих ефективних протипухлинних агентів значна увага приділяється новітнім вуглецевим наноструктурам [1, 2], зокрема фулеренам C_{60} [3], які викликають підвищений інтерес у біомедичних дослідженнях завдяки їхній високій хімічній стабільності та притаманним їм унікальним фотофізичним властивостям [4, 5].

За хімічними властивостями фулерени C_{60} є гідрофобними, тобто нерозчинними у полярних розчинниках, що обмежує їх біодоступність [6]. З метою підвищення гідрофільності фулеренів C_{60} їх піддають хімічній функціоналізації [7]. Врешті-решт, для отримання водного розчину немодифікованих фулеренів C_{60} була запропонована методика, що базується на переведенні молекул C_{60} з толуолу у воду під дією ультразвуку [8]. Виявилося, що цей розчин є типовою колоїдною системою, яка при температурі зберігання 4 °С залишається стабільною протягом 18 місяців. Теоретичні розрахунки засвідчили [9], що водний розчин немодифікованих фулеренів C_{60} містить як поодинокі гідратовані молекули C_{60} , так і сферичні гідратовані кластери діаметром до 3 нм. Було знайдено також [8], що найбільш енергетично вигідною структурою в такому водному розчині є клатрат $C_{60}(H_2O)_{60}$.

Таким чином, запропоновані методи переведення фулеренів C_{60} у біодоступну водорозчинну форму відкривають перспективу цілеспрямованого застосування цих молекул у медичних нанотехнологіях. Однак подальше вивчення біоактивності водорозчинних немодифікованих фулеренів C_{60} загалом, і зокрема їх протипухлинної активності *in vivo* [10, 11],

потребує точного визначення дози введення, а це у свою чергу вимагає попереднього переведення фулеренів C_{60} у різні фізіологічні розчини. Дуже важливим є дослідження стану фулеренів C_{60} у таких розчинниках, оскільки ця інформація є необхідною для з'ясування механізмів специфічної біологічної дії (мембранотропної, радіопротекторної, імуномодуючої і т. ін.) наночастинок.

Метою цієї роботи було дослідити структуру плівок немодифікованих фулеренів C_{60} , адсорбованих з фізіологічних розчинів 0,9% NaCl та Рінгера на поверхні слюди і золота за допомогою атомно-силової (АСМ) і сканувальної тунельної (СТМ) мікроскопії.

Матеріали і методи. Водний колоїдний розчин немодифікованих фулеренів C_{60} (чистота 99,95%) з максимальною концентрацією 1 мг/мл був приготовлений за методикою [8]. Однорідність консистенції препарату “фулерени C_{60} у фізрозчині” була забезпечена шляхом змішування в однакових об'ємах водного колоїдного розчину немодифікованих фулеренів C_{60} та відповідного фізіологічного розчину з подальшим застосуванням ультразвукової бані (ВК-9050, ФРН; потужність — 50 Вт, частота — 40 кГц, час перемішування — 3 год).

В експериментах був використаний звичайний фізіологічний розчин (0,9% NaCl) та розчин Рінгера (у 1 л розчину міститься: натрію хлориду 8,60 г, кальцію хлориду 0,33 г, калію хлориду 0,30 г. Допоміжні речовини — гідроксид натрію, хлористоводнева кислота, що відповідає: Na^+ — 147,00, K^+ — 4,00 ммоль, Ca^{2+} — 2,25, Cl^- — 155,60 ммоль).

Для оцінки структурного стану фулеренів C_{60} у фізіологічних розчинах було проведено дослідження структури адсорбованих плівок фулеренів на поверхнях слюди і золота методами СТМ і АСМ. Для цього краплю розчину наносили на атомно-гладку поверхню підкладки. Вимірювання проводили на сухих шарах після повного випаровування розчинників. У СТМ дослідженнях підкладкою слугувала поверхня Au (111) (вакуумно напорошена плівка Au на слюді, виробництво SPI Supplies), відпалена в полум'ї газового пальника (пропан). Після відпалювання підкладка виявляла лінії реконструкції на повітрі. Режим, який забезпечує отримання реконструйованих поверхонь, підбирався експериментально. Для виготовлення вістер використовували платиново-іридієвий дріт (Pt-Ir, 80% : 20%, діаметр 250 мкм). Типові значення тунельного струму і напруги знаходилися у межах 0,01–0,1 нА та 0,1–0,8 В, відповідно. В АСМ дослідженнях використовували свіжосколоту поверхню слюди (V-1 Grade, SPI Supplies). АСМ візуалізація зразків відбувалась у напівконтактному режимі з використанням АСМ зондів типу NSG10 (NT-MDT). Вимірювання проводили на комерційних системах “Solver Pro” і “Solver Pro M” виробництва NT-MDT, Росія.

Результати та їх обговорення. Процеси випаровування води з крапель фізіологічного розчину (0,9% NaCl) за присутності та відсутності в ньому фулеренів C_{60} були досліджені з використанням оптичного мікроскопу. В обох випадках спостерігали утворення кристалів солі на поверхні слюди. Для проведення АСМ і СТМ досліджень обиралися відносно гладкі ділянки поверхні, що не були покриті видимими кристалами солі. На цих ділянках методом АСМ виявлено острівці з характерним латеральним розміром ~ 1 мкм (сірі ділянки на рис. 1). Висота всіх острівців однакова і становить $0,8 \pm 0,2$ нм, що добре узгоджується з діаметром молекули C_{60} . Це свідчить, що фулерени C_{60} групуються на поверхні слюди у щільнопаковані моношарові кластери. Якісно подібні результати отримані і при дослідженні розчину Рінгера (зображення кластерів фулеренів див. на рис. 2). Окрім острівців фулеренів виявлено голкоподібні кристали висотою ~ 10 нм і довжиною до 1 мкм, що формуються із залишків солі після випаровування фізрозчинів (білі структури на рис. 1).

З метою встановлення конформаційного впливу іонів солі на молекули C_{60} спочатку були проведені АСМ дослідження структури шарів фулеренів C_{60} , осаджених з водного розчину.

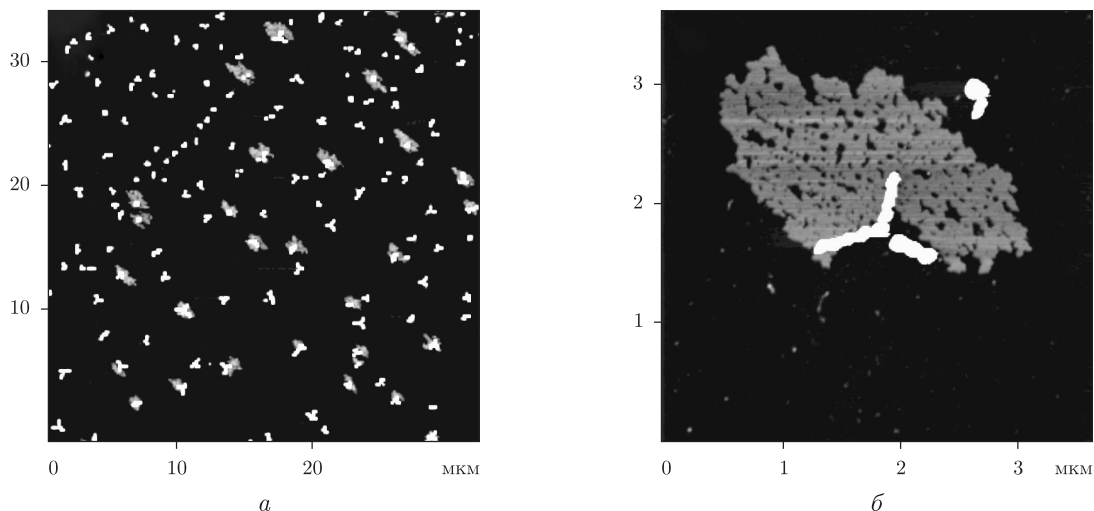


Рис. 1. АСМ зображення моношарових кластерів фулеренів C_{60} (сірі острівці) і кристалів $NaCl$ (білі структури), що утворюються на поверхні слюди при нанесенні фізіологічного розчину (0,9% $NaCl$) з немодифікованими фулеренами C_{60} у концентрації 0,5 мг/мл (а); деталізоване зображення кластера фулеренів і кристала солі (б)

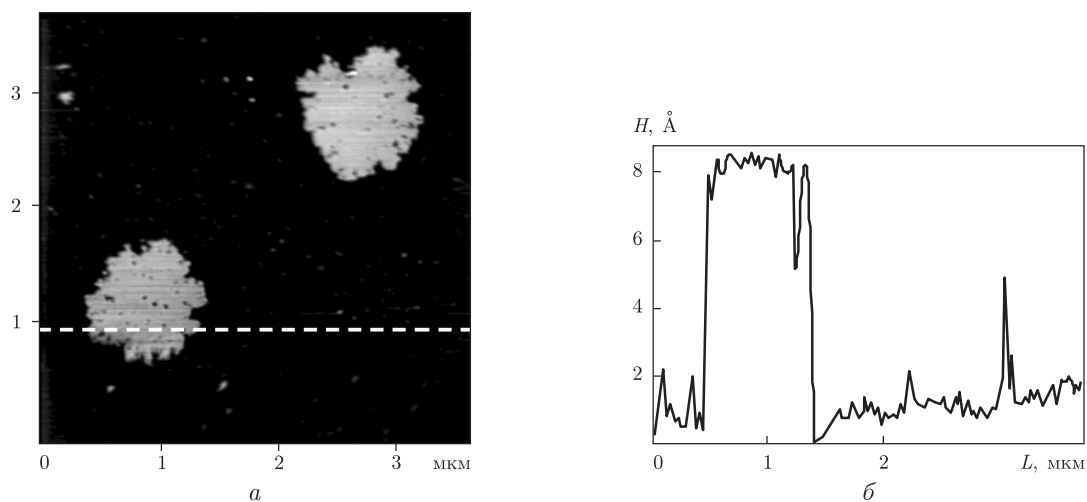


Рис. 2. АСМ зображення моношарових кластерів фулеренів C_{60} , що утворюються на поверхні слюди при нанесенні розчину Рінгера з немодифікованими фулеренами C_{60} у концентрації 0,5 мг/мл (а); Z-переріз зображення уздовж лінії, позначеної на рис. 2, а (б)

Як видно (рис. 3, а), на поверхні слюди присутні хаотично розташовані окремі молекули фулерену C_{60} та їх об'ємні кластери висотою 1,5–10 нм. Аналогічні результати отримані і в СТМ дослідженнях при нанесенні молекул C_{60} з водного розчину на поверхню $Au(111)$ (рис. 3, б). Важливо, що при дослідженні водних розчинів немодифікованих фулеренів C_{60} утворення моношарових острівців жодного разу не виявлено. Отже, можна припустити, що формування щільноупакованих острівців фулеренів C_{60} , показаних на рис. 1 і 2, зумовлено саме присутністю у розчинах іонів $NaCl$.

У літературі досліджено процеси агрегації фулеренів C_{60} в електролітах. Так, у роботі [12] методом спектроскопії поглинання в УФ та видимому діапазоні виявлено зміщення

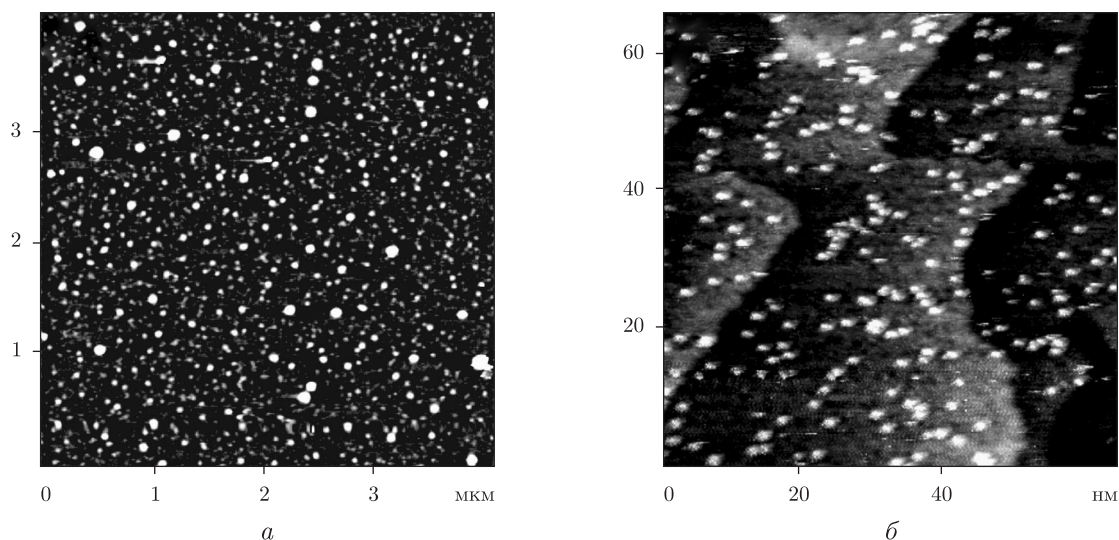


Рис. 3. АСМ зображення фулеренів C_{60} на поверхні слюди (а); СТМ зображення фулеренів C_{60} на поверхні Au (111), які осаджували з водного розчину концентрацією 1 мг/мл (б)

піку поглинання фулеренів C_{60} у червоний діапазон при додаванні хлориду натрію. Цей процес супроводжувався утворенням жовтуватого осаду, що свідчило про коагуляцію молекул C_{60} між собою, у той час як їх водний розчин демонстрував відносну стабільність. Крім того, методом електрофоретичного розсіювання світла встановлено, що у водному розчині кластери фулеренів C_{60} є негативно зарядженими (ζ -потенціал дорівнює -30 мВ). Завдяки цьому між молекулами C_{60} виникають сили електростатичного відштовхування, які сприяють стабільності дисперсійної системи загалом. З іншого боку, слабкі розчини електролітів (0,001 М) призводять до дестабілізації суспензій фулеренів C_{60} внаслідок ослаблення сил електростатичного відштовхування між ними або їх кластерами [13].

Об'єднання фулеренів C_{60} в острівці за присутності іонів солі можливе внаслідок зменшення сил електростатичного відштовхування. У цьому випадку Ван-дер-Ваальсівські сили притягання стають домінуючими, що призводить до утворення моношарів фулеренів C_{60} завдяки міграції молекул по поверхні під час випаровування розчинника.

Для дослідження структурної організації фулеренів C_{60} у моношарах на поверхні Au (111) були проведені їх СТМ дослідження. Однак після випаровування води з вихідного фізіологічного розчину 0,9% NaCl концентрація залишків солі була досить високою, що заважало тунелюванню електронів між вістрям та підкладкою. Стійке тунелювання стало можливим лише після розведення розчину у п'ять разів шляхом додавання бідистильованої води. У цьому випадку вдалося візуалізувати окремі молекули C_{60} . На деяких СТМ зображеннях спостерігалися також об'єкти висотою 3,5–4 нм, які можуть бути агрегатами (кластерами) з декількох молекул C_{60} , що добре узгоджується з теоретичними розрахунками [9]. З СТМ зображень випливає (рис. 4), що на поверхні присутні також хаотично розташовані об'єкти висотою 0,6–1 нм, що наймовірніше відповідають окремим молекулам C_{60} . Це узгоджується з результатами АСМ досліджень. Темні плями на СТМ зображеннях відповідають заглибленням з перепадом висоти $\approx 0,25$ нм відносно решти поверхні. Це можуть бути кластери вакансій (двовимірні пори) у першому (поверхневому) атомному шарі підкладки Au (111). Видимі дефекти на СТМ зображеннях спричинені механічним контак-

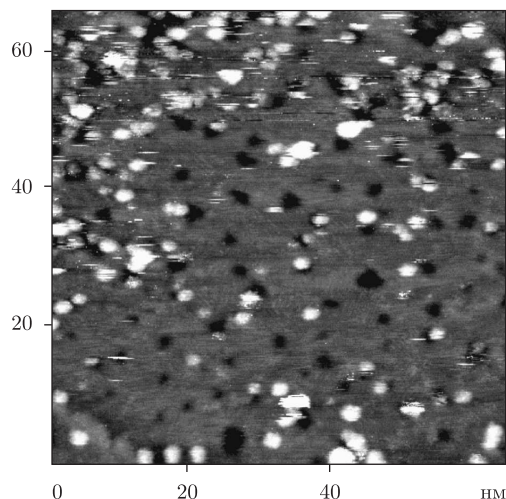


Рис. 4. СТМ зображення фулеренів C_{60} на поверхні Au (111), осаджених з фізрозчину 0,9% NaCl, розведеного бідистильованою водою у п'ять разів

том вістря із соляними залишками. Зі зниженням концентрації іонів електроліту утворення моношарових острівців фулеренів C_{60} не спостерігали.

Молекули C_{60} , у свою чергу, впливають на ріст кристалів солі. Так, на окремих ділянках поверхні замість голкоподібної форми спостерігали іншу форму кристалів NaCl, а саме трипроменевої “зірки” (рис. 1). Висота кристалів становила 8–30 нм, довжина променів ~ 1 мкм. Утворення подібних кристалів, очевидно, пов'язано зі зміною поверхневої вільної енергії кристалів NaCl у розчині під впливом оточення фулеренів C_{60} .

Таким чином, за допомогою методів сканувальної зондової мікроскопії в роботі досліджено структуру плівок фулеренів C_{60} , отриманих осадженням з фізіологічних розчинів (0,9% NaCl та розчину Рінгера) на поверхні слюди і грані (111) золота. Це стало можливим завдяки просторово роздільному формуванню агрегатів молекул C_{60} та кристалів солі. Фулерени C_{60} утворюють щільнопаковані кластери товщиною в один моношар. Ця структура істотно відрізняється від структури плівок молекул C_{60} , осаджених з водного розчину. Відмінність може бути зумовлена екрануванням або зменшенням величини негативного заряду на поверхні фулеренів C_{60} під впливом іонів солі. Присутність молекул C_{60} у розчині, у свою чергу, впливає на процеси росту кристалів солі, зокрема уможливує утворення кристалів NaCl голко- та зіркоподібної форми. Розведення вихідних фізіологічних розчинів водою дає змогу отримати СТМ зображення окремих молекул C_{60} .

1. *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*. Ser. Carbon Materials: Chemistry and Physics. Cataldo F., Da Ros T. (Eds.), Vol. 1. – Berlin: Springer, 2008.
2. Прилуцька С. В., Ременяк О. В., Бурлака А. П., Прилуцький Ю. І. Перспективи використання вуглецевих нанотрубок у протираковій терапії // *Онкологія*. – 2010. – **12**. – С. 5–9.
3. Прилуцька С. В., Кічмаренко Ю. М., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. Фулерен C_{60} та його похідні як протипухлинні агенти: перспективи і проблеми // *Біотехнологія*. – 2012. – **5**, № 3. – С. 9–17.
4. Arbogast J. W., Foote Ch. S. Photophysical properties of C_{60} // *J. Am. Chem. Soc.* – 1991. – **113**. – P. 8886–8889.
5. Dresselhaus M. S., Dresselhaus G., Eklund P. C. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*. – New York: Academic Press, 1996. – P. 23–89.
6. Ruoff R. S., Tse D. S., Malhotra M., Lorents D. C. Solubility of fullerene C_{60} in a variety of solvents // *J. Phys. Chem.* – 1993. – **97**. – P. 3379–3383.

7. Hirsch A., Brettreich M. Fullerenes – Chemistry and Reactions. – New York: Wiley, 2005. – 437 p.
8. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L. et al. Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data. Carbon. – 2004. – **42**. – P. 1203–1206.
9. Bulavin L., Adamenko I., Prylutskyy Yu. et al. Structure of fullerene C₆₀ in aqueous solution // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2000. – **2**. – P. 1627–1629.
10. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutskyy Yu. I. et al. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis // Exp. Oncol. – 2011. – **33**. – P. 162–164.
11. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Klymenko P. P. et al. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy // Cancer Nanotechnol. – 2011. – **2**. – P. 105–110.
12. Deguchi S., Alargova R. G., Tsujii K. Stable dispersions of fullerenes, C₆₀ and C₇₀ in water. Preparation and characterization // Langmuir. – 2001. – **17**. – P. 6013–6017.
13. Brant J., Lecoanet H., Wiesner M. R. Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems // J. Nanopart. Res. – 2005. – **7**. – P. 545–553.

Інститут фізики НАН України, Київ
 Київський національний університет
 ім. Тараса Шевченка
 ННЦ “Інститут біології”, Київ

Надійшло до редакції 29.05.2012

В. В. Черепанов, А. І. Сененко, Ю. І. Прилуцький,
 член-корреспондент НАН України **А. А. Марченко,**
 академик НАН України **А. Г. Наумовец**

**Структура пленок немодифіцированих фуллеренов C₆₀,
 адсорбированих из физиологических растворов на поверхности
 слюды и золота**

С помощью атомно-силовой и сканирующей туннельной микроскопии исследована структура пленок немодифицированных фуллеренов C₆₀, адсорбированных из физиологических растворов 0,9% NaCl и Рингера на поверхности слюды и золота, что является важным для выяснения механизмов их специфического биологического действия и дальнейшего применения в нанобиотехнологиях. Показано, что фуллерены C₆₀ образуют плотноупакованные островки толщиной в один монослой, а присутствие молекул C₆₀ в растворах существенно влияет на процессы роста кристаллов соли на упомянутых поверхностях.

V. V. Cherepanov, A. I. Senenko, Yu. I. Prylutskyy,
 Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. A. Marchenko,**
 Academician of the NAS of Ukraine **A. G. Naumovets**

**Film structure of unmodified C₆₀ fullerenes adsorbed from physiological
 solutions on the surface of mica and gold**

With the help of atomic force and scanning tunneling microscopies, the film structure of unmodified C₆₀ fullerenes adsorbed from 0.9% NaCl and Ringer physiological solutions on the surface of mica and gold is studied. It is of importance for the clarification of the mechanisms of their specific biological activities and future applications in nanobiotechnology. It is shown that C₆₀ fullerenes form close-packed islands in the thickness of a monolayer, and the presence of C₆₀ molecules in solutions significantly affects the processes of growth of salt crystals on the surfaces mentioned.