

**ФУЛЛЕРЕНЫ НЕ ОПАСНЕЙ ОБЫЧНОГО ПЕСКА ИЛИ
К ВОПРОСУ О ПРИЧИНАХ НАУЧНЫХ ЗАБЛУЖДЕНИЙ, СВЯЗАННЫХ С
ИЗУЧЕНИЕМ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ФУЛЛЕРЕНОВ.**

Уважаемый Владимир Тарабара (Vladimir Tarabara),

Пишет Вам Андриевский Григорий Владимирович, с которым, если помните, Вы общались в сентябре 2005 по поводу исследований и прикладного применения водных дисперсий фуллеренов и, в частности, свойств фуллеренов гидратированных (ГФ). Тогда я предложил нашу помощь в Ваших текущих и планируемых исследованиях фуллеренов для того, чтобы совместно разбираться в истинном положении вещей, связанных с физ.-хим. и биологическими свойствами водных растворов фуллеренов.

Возобновить контакт с Вами меня вынудила Ваша статья в Environ Sci Technol., 2006; 40(23):7394-401. Stable colloidal dispersions of C₆₀ fullerenes in water: evidence for genotoxicity. Dhawan A, Taurozzi JS, Pandey AK, Shan W, Miller SM, Hashsham SA, Tarabara VV.,

а также сообщение в интернете (<http://nanotechweb.org/articles/news/6/4/13?alert=1>) со ссылкой на очередной шум по поводу генотоксичности фуллеренов, который поднимают из-за работы Sara E. Pacheco, Hamid Mashayekhi, Wei Jiang, Baoshan Xing, Kathleen F. Arcaro. (University of Massachusetts, Amherst, MA) "DNA damaging effects of nanoparticles in breast cancer cells"(2007 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 14-18, 2007, Los Angeles, CA, Abstr #3477) (см . Приложение в конце письма).

И в Вашей работе, и в работе группы из University of Massachusetts для доказательства генотоксических эффектов наночастиц , в т . ч . фуллереновых , использовался the Single-Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet assay with Olive tail moments (OTM) observation).

Подробный анализ двух вышеупомянутых работ говорит о неприменимости подобного метода анализа для выявления генотоксических свойств, по крайней мере, для водных дисперсий наночастиц фуллеренов и оксидов кремния (напр., силикагеля - основного компонента обычного пляжного песка).

Артефакты, которые Вы получили, обусловлены тем, что Вы не учли того, что наночастицы, имеющие на своей поверхности ионногенные группы, под воздействием электрофоретического поля (в условиях электрофореза) становятся сильно заряженными, и как следствие, во время проведения анализа, активно связываются с поверхностью ядерной мембраны, "разжижают" ее и, движимые электрическим полем, нарушают ее целостность, вызывая ее разрывы, что, в конце концов, приводит к выбросу из клеточного ядра нуклеотидного содержимого.

На самом деле тест " Comet assay " предполагает, что поврежденный нуклеотидный материал (ДНК) выбрасывается через неповрежденную мембрану клеточного ядра, через ее поры, под действием электрофоретического поля. А по

особенностям выброса нуклеотидного содержимого судят о нарушениях генетического аппарата клетки.

Причины, выявленных Вами артефактов, я поясню позже, но, прежде всего, я хочу остановиться на главном недостатке многих исследований, в которых изучаются токсические свойства водных дисперсий фуллеренов.

Главный недостаток состоит в том, что, или по неведению, или из-за распространенных заблуждений о высокой гидрофобности и химической инертности фуллеренов, игнорируется тщательное и всестороннее изучение химического состава наночастиц в водных дисперсиях фуллеренов, получаемых разными методами, и как следствие такого после возникает неправильное представление о их физ.-хим. свойствах с последующими неверными трактовками выявляемых биологических эффектов (см. [статью](#) или <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=18488>).

Вот и Вашей работе, не учитывая печальный опыт групп V. Colovin and E. Oberdorster, Вы полностью игнорируете тот факт, что интенсивная ультразвуковая обработка этанол-водных дисперсий C_{60} (Вы обозначили, как " EtOH / C_{60} "), как и долгое и интенсивное перемешивание порошка C_{60} в воде, на свету, в присутствии кислорода воздуха (Вы обозначили, как " aqi / nC_{60} ") приводит к серьезной химической модификации, окислению поверхности нанокластеров C_{60} , с образованием на их поверхности различных кислород-содержащих, ионогенных гидрофильных групп: -ОН, -СОН, -СООН и т.п. (см. [приложенный файл "Again about \$C_{60}\$ pseudotoxicity.pdf"](#)) и которые обуславливают, как Вы знаете, отрицательный заряд поверхности Ваших частиц.

Подобная гидрофилизация поверхности наночастиц C_{60} приводит к тому, что они не могут быть после или же растворены, будучи в сухом состоянии, или же экстрагированы из водной дисперсии неполярным толуолом. Такие свойства, приобретенные C_{60} наночастицами, не могли позволить Вам выяснить спектрофотометрическим методом истинную концентрацию фуллеренов, как "чистых", так и "окисленных", в Ваших дисперсиях.

Также укажу, что подобные полиокисленные фуллереновые молекулы и их наночастицы вполне способны к последующим химическим превращениям, дегградации и полимеризации, и что, ввиду термической нестабильности таких продуктов, не позволяет их корректно анализировать и детектировать Вашим Хромато-Масс-Спектрометрическим методом (LC - MS, жидкостной хроматографией с использованием неполярных сольвентов и МС с химической ионизацией при нагреве источника ионизации до 550 °С). А, искать $C_{60}O$ в Ваших водных дисперсиях не стоило изначально, т.к. такое соединение не растворимо в воде, но, в условиях Вашего синтеза дисперсий, легко подвергается гидролизу и полимеризации.

Да, какую-то долю немодифицированных C_{60} в Ваших " EtOH / C_{60} " и " aqi / nC_{60} " Вы обнаруживаете, но при этом ничего не можете сказать (т.к. и не пытались по понятным причинам) об окисленных, химически модифицированных фуллеренах.

А, почему было бы не попробовать сделать ИК-анализ Ваших наночастиц, который легко выявляет химически модифицированные C_{60} ? Неоднократно я об этом напоминал и V. Colovin, и E. Oberdorster, и др. Не хотят делать, или скрывают, что делали, но результаты таких анализов, мягко говоря, не соответствуют их

"генеральной линии", чтобы доказать любым способом токсичность чистых фуллеренов, о которых они по неосторожности на шумели ранее в 2004-2005. А, вот исследователи из University of Belgrade, вняли нашим замечаниям и, поначалу вторя работам V. Colovin and E. Oberdorster и сделав неверные выводы, после нашли смелость и смогли перепроверить свои же результаты, и убедились в нашей правоте (*Isakovic A , et al . Distinct Cytotoxic Mechanisms of Pristine Versus Hydroxylated Fullerene. Toxicol Sci 91 (2006) 173. and Isakovic A, et al. Inactivation of nanocrystalline C₆₀ cytotoxicity by g -irradiation. Biomaterials 27 (2006) 5049*). За что им большое спасибо !

Еще есть большие замечания по поводу детектируемых Вами размеров фуллереновых частиц в Ваших " EtOH / C₆₀" и " aqu / nC₆₀".

Как я Вам сообщал ранее, имеющиеся методы динамического светорассеяния (DLS , с использованием стандартных приборов, например ZetaPALS BI Corp ., с лазерными источниками с λ от 450 до 660 нм), и применяемые для анализа размеров фуллереновых наночастиц в их водных дисперсиях, дают некорректные, сильно завышенные результаты, причем фуллереновые частицы с размерами менее 50-60 нм этим методом достоверно зарегистрировать невозможно (см. напр. *D . Y . Lyon , L . K . Adams , J . C . Falkner , P . J . J . Alvarez . Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size. Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 4360-4366 and Belousov VP, Belousova IM, Kris'ko AV, et al. Aqueous micellar solution C₆₀ : Preparation, properties, and capability for generation of singlet oxygen. RUSSIAN J. GENERAL CHEM. 2006, 76 (2): 251-257 or pp . 265-272 in Russ version*).

Как следствие, последующий анализ с помощью электронно-просветной микроскопии (TEM) фуллереновых дисперсий проводится без обращения внимания на присутствие в них частиц с размерами от 2 до 50 нм, но которых статистически может быть намного больше, чем крупных, т.е. с размерами от 60 нм и выше. Часто такое невнимание происходит или вследствие больших сложностей с визуализацией малых углеродных наноструктур методом TEM, или же в угоду тому, чтобы показать, что два вышеуказанных метода оценки размеров частиц вроде бы дают сходные результаты.

А, почему Вас не смущает тот факт, что две Ваши дисперсии различаются по содержанию "чистых" фуллеренов в 20 раз, но результаты их биологических ОТМ -тестов практически идентичны? Да и другие показатели теста Comet assay являются сходными и почему-то не зависят от концентрации "чистого" C₆₀. Не потому ли так получается, что реальные биологические эффекты Вы видите не вследствие присутствия "чистых" C₆₀ фуллеренов, а из-за того, что, после всех процедур довольно таки жесткого "растворения" кристаллов C₆₀ , в воду перешли не "чистые" фуллерены, а преимущественно что-то совсем другое?

В общем, после подробнейшего анализа результатов Вашей работы и того, как определялись концентрации C₆₀ , можно утверждать, что все биологические эффекты, обнаруженные в Вашей работе, обусловлены поли-окисленными формами и фуллеренов, и их небольших кластеров (нанокристаллитов).

Здесь же укажу, что и поли-окисленные, и наши единичные гидратированные фуллерены (ГФ, НуFn), как Вы их обозначаете C₆₀· { H₂O }_m , все, будучи высоко гидрофильными, не способны самопроизвольно проникать через гидрофоб-

ный барьер клеточных мембран (*Andrievsky G , et al . Is C₆₀ Fullerene Molecule Toxic?! Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures 13 (2005) 363 -376* и *T . A. Spurlin and A. A. Gewirth. Effect of C₆₀ on Solid Supported Lipid Bilayers. Nano Letter, 2007, 2(7), 531-535*). Именно поэтому Ваши тесты на жизнеспособность лимфоцитов показали отсутствие какого-либо вредного влияния гидрофильных частиц из " EtOH / C₆₀" и " aq / nC₆₀". (Здесь, для сравнения, укажу, что размеры задетектированных Вами частиц составили порядка 120-180 нм, при том, что толщина клеточной мембраны является раз в 10-20 меньше, т.е. около 10 нм).

Но, как же тогда Ваши частицы (и которых приходилось от 100 до 10 000 на одну клетку), не проникая через клеточную мембрану, добрались до ее клеточного ядра? А, все просто! Методика теста Comet assay изначально предполагает разрушение, искусственный лизис клеточной мембраны в щелочных условиях (при pH 10) для того, чтобы после выделить и наблюдать изолированные ядра клеток. И что же тогда далее происходит?

Поли-окисленные и фуллерены, и фуллереновые наночастицы в такой щелочной среде являются стабильными, причем их "растворимость" в этих условиях существенно повышается (*G . V. Andrievsky , V . K . Klochkov , A . Bordyuh , G . I . Dovbeshko . Comparative Analysis Of Two Aqueous-Colloidal Solutions Of C₆₀ Fullerene With Help Of Ft-Ir Reflectance And Uv-Vis Spectroscopy. Chem. Phys. Letters, 364 (2002) 8-17* and *K . L. Chen and M. Elimelech. Aggregation and Deposition Kinetics of Fullerene (C₆₀) Nanoparticles. Langmuir 2006, 22, 10994-11001*). Поэтому , после инкубации клеток лимфоцитов с Вашими фуллереновыми дисперсиями , их частицы , после лизиса клеточной мембраны в щелочных условиях , могут беспрепятственно достигать высвобожденных клеточных ядер . Далее, фуллереновые частицы, имея на своей поверхности ионогенные группы (см. выше), под воздействием электрофоретического поля, ионизируются и приобретают способность к облегченной кислотно-основной диссоциации.

Проще говоря, в условиях электрофореза , происходит отрыв от наночастиц катионов (H⁺ , Me⁺ и т.п.) и уход последних в объем среды по направлению к катоду. При этом сами наночастицы обедняются в своем катионном составе и приобретают выраженный отрицательный заряд (в Вашем случае все частицы имеют отрицательный z -потенциал ~30 mV). Подобные частицы, с выраженным отрицательным зарядом поверхности, способны к сильным взаимодействиям с положительно заряженными центрами полярных головок фосфолипидов - основным компонентом поверхности клеточных мембран.

При этом, чем больше такая наночастица, тем больше отрицательных центров на ее поверхности находится и поэтому она способна установить большее число прочных связей с положительными центрами полярных головок фосфолипидов, находящихся на поверхности мембраны (в Вашем случае, мембраны клеточного ядра).

Образование подобных прочных ассоциатов поли-окисленных наночастиц фуллеренов с поверхностью мембраны приведет к локальной дестабилизации ее структуры, с возможностью, под воздействием приложенного электрофоретического поля, отрыва участка мембраны с "прилипшей" к ней наночастицей. Как следствие, в мембране ядра клетки будут образовываться большие бреши (дырки), с размерами сравнимыми с размерами "прилипших" наночастиц. Далее, через образовавшиеся в мембране дырки, но, опять-таки, под действием прилагаемого

электрического поля, нуклеотидное содержимое ядра начнет легко выходить и двигаться по направлению к аноду, что Вы в общем и наблюдаете!

В целом же, полученные Вами результаты являются артефактами, обусловленными взаимодействием поли-окисленных частиц фуллеренов с мембраной ядра клетки в условиях их совместного электрофореза. И поэтому Ваши утверждения о генотоксичности коллоидных фуллереновых дисперсий является поспешными и полностью ошибочными.

Также Ваши чисто умозрительные попытки связать наблюдаемые эффекты с наличием в Ваших дисперсиях единичных гидратированных C_{60} фуллеренов, $C_{60} \cdot \{ H_2O \}_m$, являются полностью безосновательными, поскольку невозможно получить их в водном растворе, используя два Ваших метода, в чем неоднократно убедились в своих исследованиях группы E. Oberdorster, V. Colvin, M. Wiesner and other. А, вот то, что интенсивное (ультразвуком) или длительное (неделями, месяцами) перемешивание кристаллического C_{60} в воде дает кластеры (наноаггрегаты) C_{60} с окисленной поверхностью, так никто из этих авторов уже не сомневается.

И еще, я ранее пересылал Вам черновик нашей статьи (Andrievsky G, et al. Is C_{60} Fullerene Molecule Toxic?! Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures 13 (2005) 363-376), в которой опровергается какое-либо негативное действие гидратированных C_{60} фуллеренов, $C_{60} \cdot \{ H_2O \}_m$, на живые организмы и, наоборот, приводятся факты их удивительной, положительной биологической активности. Но, Вы, видимо, решили такое проигнорировать, если не в угоду дешевым сенсациям, так в угоду ничем не обоснованным, не подкрепленным никакими экспериментальными фактами, умозрительным и полностью абстрактным компьютерным расчетам взаимодействия C_{60} с ДНК (мою развернутую критику этого см. Г.В. Андриевский, В.К. Клочков, Л.И. Деревянченко. МНОГО ШУМА ИЗ НИЧЕГО ИЛИ СНОВА К ВОПРОСУ О ПСЕВДОТОКСИЧНОСТИ ФУЛЛЕРЕНОВ (10 п.с, критические комментарии по поводу статьи X. Zhao, A. Striolo, P. T. Cummings "C₆₀ Binds to and Deforms Nucleotides" (Biophysical Journal, 89 (2005) 3856). 11.01.2006 05:24 ; <http://elementy.ru/news?discuss=165039>)

Кстати, чтобы не быть голословными и подтвердить нашу правоту, мы всегда готовы предоставить наши растворы (**C60 FWS**), действительно состоящие только из гидратированных C_{60} фуллеренов (**C60 HyFn**), чтобы Вы смогли сами убедиться, что "чистые" C_{60} , попав в воду и став гидратированными, не способны принести живому какой-либо вред!!! Была бы только в этом Ваша заинтересованность!

Если все такие мои доводы могут показаться Вам не очень убедительными, то предлагаю сейчас обратиться к результатам, полученным группой из University of Massachusetts (см. ниже Приложении).

Как я упоминал выше, параллельно с фуллереновыми дисперсиями, эта группа исследовала таким же методом, как и у Вас, Comet assay, коллоидные дисперсии оксида кремния, предварительно обработанные щелочью. По результатам ОТМ - теста была обнаружена "генотоксичность" коллоидных частиц n (SiO_2) такая же, как и у наночастиц фуллереновых нанодисперсий!!!??

Тут же возникает вопрос, если вспомнить, что SiO_2 и его коллоидные частицы являются основным компонентом песка, например речных, морских пляжей, то что же все те, кто любит отдыхать, загорать на пляжах, и контактирует с песчаной пылью, должны получить генетические поломки или болеть генетическими заболеваниями, приобретенными под действием песка?! Что посещать песчаные пляжи, дышать воздухом, в который порывом ветра подняло микропылинки кремнезема, чрезвычайно опасно для здоровья?

Видимо, подобный вывод группа из University of Massachusetts должна была бы сделать. Но не сделала, поскольку такое звучало бы для всех совершенно абсурдно!

Тем более, что сейчас в мире выпускается достаточно много лекарственных препаратов для внутреннего употребления, и которые в своем составе содержат диспергированный до нано размеров, оксид кремния. Другими словами наночастицы оксида кремния уже проверены фармакологами на безопасность и разрешены к применению людьми.

Так что же за "открытие" сделали ученые из University of Massachusetts, исследуя "генотоксичность" n (SiO_2)?

Давайте смотреть, по сути! А суть, и то, что объединяет Ваши или "их" фуллереновые дисперсии с дисперсиями коллоидных частиц n (SiO_2), проста. Из школьного курса химии известно, что коллоидные частицы n (SiO_2) в водной среде образуют на своей поверхности т.н. кислотные силанольные группы: Si-O-H , чьи протоны, в присутствии NaOH , легко замещаются ионами Na^+ с образованием натриевой соли кремниевой кислоты. Гидролиз такой соли в условиях электрофореза приведет к разделению этой соли на "самостоятельные" отрицательно заряженные силикат анионы и несущие положительный заряд катионы натрия.

В отношении же коллоидных частиц n (SiO_2), то в щелочной среде и в условиях проведения the Single-Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet assay with Olive Tail Moments observation), они приобретут выраженный отрицательный заряд и, по аналогии с поли-окисленными нанокристаллитами фуллеренов (см. выше), будут соединяться с мембраной клеточного ядра, разрывая ее под действием электрического поля, способствуя выходу нуклеотидного содержимого. Обнаружив такое, неопытный исследователь, по аналогии с действием типичных мутагенов (EMS, этилметансульфоната и бензо[а]пирена), естественно, поспешит сделать далеко идущие выводы о "генотоксичности" тех или иных испытываемых наночастиц. Но, обманется и, к сожалению, может обмануть других!

Но, как следствие вышесказанного, необходимо сказать большое спасибо группе из University of Massachusetts, которая, м/б сама того не осознав, подтвердила, что фуллереновые водные дисперсии не более токсичны (не более генотоксичны), чем коллоиды оксида кремния (кремнезема), т.е. того, из чего в основном состоит то, с чем мы каждый день волей-неволей контактируем.

Поэтому, изыскивая адекватные методы оценки биологической (экологической) опасности (безопасности) наночастиц, прежде всего следует четко и всесторонне понимать, какова химическая природа исследуемых наночастиц и какими физико-химическими свойствами обладает их поверхность. Познав такое, после, следует осознанно выбирать или уже имеющиеся методы биологического тестирования, или разрабатывать новые. Иначе впоследствии бесплодной и обманчивой суеты не избежать!!!

Вам же могу пожелать только одного, также как и другим набраться мужества и тщательно и осознанно перепроверить свои результаты. В этом, еще раз повторюсь, мы Вам готовы помочь!

А, в целом, как иные не пытаются доказать, все же чистые фуллерены не опаснее обычного песка!

Авторы Харьков , Украина

Июнь 2007

ПРИЛОЖЕНИЕ

2007 American Association for Cancer Research , Annual Meeting

April 14-18, 2007 , Los Angeles, CA

Abstract Number: 3477

Presentation Title: **DNA damaging effects of nanoparticles in breast cancer cells**

Presentation Start/End Time: Tuesday, Apr 17, 2007, 8:00 AM -12:00 PM

Location: Exhibit Hall, Los Angeles Convention Center

Poster Section: 5

Poster Board Number: 24

Author Block: **Sara E. Pacheco, Hamid Mashayekhi, Wei Jiang, Baoshan Xing, Kathleen F. Arcaro (karcaro@nre.umass.edu)** . University of Massachusetts, Amherst, Amherst, MA

Environmental nanoparticles (or colloids) include inorganic particles and biopolymers in the size range of 1-100 nm. Environmental colloids are small enough to al-

low them to behave in a similar manner to soluble compounds, but large enough to participate in additional processes such as the transport of inorganic and organic, vital or detrimental compounds in aquatic systems due to their numerous binding sites. Engineered nanoparticles are increasingly being used for commercial purposes such as fillers, catalysts, semiconductors, cosmetics, microelectronics and drug carriers. Some studies suggest that nanoparticles are not inherently benign and that they affect biological behaviors at the cellular, subcellular, and protein levels. Moreover, some nanoparticles readily travel throughout the body, deposit in target organs, penetrate cell membranes, lodge into mitochondria, and may trigger injurious responses. In the present research we examined the ability of two types of nanoparticle suspensions to cause DNA damage in the MCF-7 human breast cancer cell line. Stable aqueous suspensions of colloidal silica and C₆₀ fullerenes free of toxic organic solvents were prepared as follows. Fullerene water suspension was prepared by dissolving pure C₆₀ powder in benzene. Then DI water was added to this solution and the two phase mixture was sonicated at high power for several hours until all benzene was evaporated. The LUDOX CL colloidal silica suspension in water (Sigma Aldrich), was adjusted to a pH of 7 with 0.1 mol/L NaOH and diluted as needed. The genotoxicity of these suspensions was evaluated in breast cancer cells using the single-cell gel electrophoresis assay (Comet assay). The Comet assay demonstrated genotoxicity for both types of suspensions. The mean Olive tail moments (OTM) for the C₆₀ fullerene suspensions (.70 mg/L and 1.36 mg/L) were 6.17 and 8.23, respectively, which in comparison to the negative control OTM of 1.23 are statistically significant ($p < 0.05$). The median OTM for the C₆₀ fullerene suspensions were 4.9- and 7.9-fold greater than the negative control. The mean OTM for the colloidal silica suspensions (4 mg/L and 40 mg/L) were 4.87 and 5.26, respectively, which in comparison to the negative control OTM 1.23 are statistically significant ($p < 0.05$). The median for the colloidal silica suspensions were 3.7-fold greater than the negative control. Treatment with each of the suspensions resulted in a level of DNA damage similar to that caused by 1 μ M B[a]P. The experiments were replicated and similar results were obtained. Our results clearly demonstrate that the nanoparticle suspensions are genotoxic in human cells and suggest that caution should be taken before releasing nanoparticles into the environment. Studies are in progress to examine the activity of nanoparticles in mixtures with other common environmental pollutants.