

УДК 544

# ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ И ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФУЛЛЕРЕНОЛА

*В. Н. Быков, Н. Г. Венгерович, О. П. Ломов, М. А. Тюнин, О. В. Цветков*

Проведены исследования антидотных свойств фуллеренола при воздействии на организм лабораторных животных высокотоксичных веществ (цианида калия, фторида натрия, карбофоса). Определены среднелетальные дозы<sup>1</sup> токсикантов и рассчитаны индексы защиты<sup>2</sup>. Установлено, что при воздействии высокотоксичных веществ фуллеренол проявляет хорошо выраженные антидотные свойства: индекс защиты составил 1,45–1,50.

**Ключевые слова:** фуллеренол, антидот, интоксикация, летальные дозы, индекс защиты.  
**Keywords:** fullerene, antidote, poisoning, lethal dose, protection index.

## Введение

В последние годы в целях создания высокотехнологичных медицинских материалов и лекарственных препаратов активно проводятся исследования биологических свойств углеродных наночастиц, среди которых особое внимание привлекают фуллерены [1, 2].

Приведенные рядом авторов данные позволяют утверждать, что в связи с уникальными химическими и физическими свойствами производные фуллерена  $C_{60}$  являются перспективным материалом для создания высокотехнологичных медицинских материалов и лекарственных препаратов [2]. Установлено, что производные фуллерена  $C_{60}$  проявляют антиоксидантную, мембранотропную, иммунотропную, противовирусную, фотодинамическую активность, способны инактивировать ферменты [3, 4]. Большие перспективы связывают с использованием фуллеренов в качестве основы для создания систем адресной доставки и новых комплексобразующих препаратов, связывающих свободные радикалы и токсичные вещества [5, 6].

Однако неспособность фуллеренов растворяться в полярных растворителях [7, 8] затрудняет исследование их биологических свойств и создание на их основе современных эффективных лекарственных препаратов. Остаются неизученными токсикологические свойства производных фуллерена  $C_{60}$ . Рядом авторов отмечено отсутствие выраженного острого и хронического токсического действия фуллеренов на организм при различных

способах введения [9]. Другие авторы, наоборот, в своих работах указывают на высокие токсические свойства, связанные с цитотоксичностью фуллеренов [10, 11].

Не менее важными являются сообщения о накоплении фуллеренов в тканях печени и селезенки при парентеральном введении [12]. Несмотря на то что авторы этих исследований отрицают возможность включения фуллеренов в процессы метаболизма, последствия депонирования их во внутренних органах требуют дополнительного изучения.

С учетом указанных обстоятельств целью настоящей работы стали исследование антидотных свойств фуллеренола по отношению к токсичным веществам различных классов и оценка его острой токсичности.

## Материалы и методы

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах с начальной массой 180–220 г, полученных из питомника РАН «Рапполово» (Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе в свободном доступе к воде. Все животные до начала экспериментов находились на карантине 14 суток.

Исследование проведено в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [1]. Фуллеренол вводили в различных дозах в виде водного раствора, который готовили исходя из расчета 1,0 мл раствора на 1 кг массы животных. Антидотные свойства фуллеренола исследовали при профилактическом введении его в дозе 100 мг/кг на моделях отравлений цианидом калия, фторидом натрия и карбофосом. Фуллеренол вводили внутривенно за 2 ч до введения токсикантов. Антидотные свойства фуллеренола оценивали по изменению среднелетальных доз токсикантов и по индексу защиты (ИЗ). Острую

<sup>1</sup> Летальная доза (LD) — минимальное количество химического вещества, попадание которого в организм приводит к его смерти в 100 % случаев. Например: LD<sub>50</sub> — средняя доза вещества, вызывающая гибель 50% испытуемой группы.

<sup>2</sup> Индекс защиты (ИЗ) — показатель эффективности (защиты) препарата от токсического воздействия. ИЗ определяется в эксперименте соотношением LD от исследуемого токсиканта и LD в совокупности с антидотом [1].

токсичность фуллеренола исследовали при внутрибрюшинном введении.

Эксперименты проводили в два этапа. На первом этапе исследовали острую токсичность фуллеренола при однократном внутрибрюшинном введении. На втором — оценивали изменения лабораторных показателей крови и мочи при внутрибрюшинном введении фуллеренола в дозе LD<sub>16</sub>.

Анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе Mythic 18 (Orphee, Польша) с оценкой следующих показателей: общее количество лейкоцитов, процент и количество лимфоцитов, процент и количество моноцитов, процент и количество гранулоцитов, общее количество эритроцитов, гемоглобин, гематокрит, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, ширина распределения эритроцитов, общее количество тромбоцитов, средний объем тромбоцитов, ширина распределения тромбоцитов, тромбокрит. Биохимическое исследование плазмы крови включало определение содержания холестерина, глюкозы, аспарат аминотрансферазы, билирубина, лактатдегидрогиназы, альбумина, триглицеридов, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, аланина аминотрансферазы.

Общий анализ мочи проводили через сутки после начала введения препаратов. Мочу собирали с помощью метаболических камер (TSE, Германия) и исследовали

с использованием тест-полосок URS-10 (Teco Diagnostics, USA). Оценивали общее количество мочи, ее удельный вес и кислотность, содержание нитритов, белка, глюкозы, кетонов, уробилиногена, билирубина, лейкоцитов и клеток.

Статистическую обработку результатов исследования проводили при использовании пакетов программ Microsoft Excel 2010 и Statistica+ 2005 для ПК. Средние значения сравнивали с помощью стандартных параметрических критериев Стьюдента и непараметрических критериев Манна—Уитни (Mann—Whitney) и Уилкоксона (Wilcoxon). Качественные параметры сравнивали с помощью критерия Фишера (Fisher).

### Результаты и их обсуждение

Результаты исследования антидотных свойств фуллеренола представлены в табл. 1.

При введении цианида калия в дозе 7,9 мг/кг и более у животных в течение 5 мин регистрировали развитие первых признаков интоксикации в виде замирания, гиподинамии и диспноэ. В дальнейшем симптоматика отравления быстро нарастала, и в течение 10 мин у всех животных последовательно развивались судороги. Гибель животных отмечали только при введении цианида калия в дозах 12,6 и 15,8 мг/кг. По полученным данным

<b>Таблица 1</b> Острая токсичность модельных токсикантов при внутримышечном введении у крыс-самцов без и после профилактического внутривенного введения фуллеренола в дозе 100 мг/кг ( $M \pm m, n = 4$ )						
Токсикант	Доза, мг/кг	Гибель***		LD <sub>50</sub> , мг/кг		Индекс защиты
		без введения фуллеренола	с введением фуллеренола	без введения фуллеренола	с введением фуллеренола	
Цианид калия	6,3	0/4	0/4	7,95±1,12	11,5±0,85*	1,45±0,31
	7,9	2/4	0/4			
	10,0	3/4	0/4			
	12,6	4/4	3/4			
	15,8	4/4	4/4			
Фторид натрия	39,8	0/4	0/4	45,7±7,90	68,7±5,06**	1,50±0,37
	50,1	3/4	0/4			
	63,1	2/4	1/4			
	79,4	4/4	4/4			
	100	4/4	4/4			
Карбофос	398	0/4	0/4	550±50,8	655±54,6	1,19±0,21
	500	1/4	0/4			
	631	4/4	2/4			
	794	4/4	3/4			
	1000	4/4	4/4			

\* Различия достоверны с группой без введения фуллеренола при  $p < 0,05$ . \*\* Различия достоверны с группой без введения фуллеренола при  $p < 0,001$ . \*\*\* В числителе указано количество погибших животных, в знаменателе — общее количество животных в группе.

рассчитана среднелетальная доза цианида калия на фоне профилактического введения фуллеренола, которая составила  $11,6 \pm 1,80$  мг/кг, индекс защиты составил  $1,45 \pm 0,31$ .

На модели отравления фторидом натрия установлено, что профилактическое введение фуллеренола также способствовало снижению токсичности яда. Так, при введении фторида натрия в дозе 50,1 мг/кг животные не погибали, в то время как при изолированном введении токсиканта в этой же дозе показатель летальности составил 75 %. При введении фторида в дозе 63,1 мг/кг на фоне профилактического применения фуллеренола также отмечали снижение показателя летальности с 50 до 25 %. Введение более высоких доз приводило к гибели всех животных в экспериментальных группах, однако при введении токсиканта в дозе 79,4 мг/кг гибель наступала только через 1–2 суток. На основании полученных данных была рассчитана  $LD_{50}$  фторида натрия при условии профилактического введения фуллеренола, которая составила  $68,7 \pm 5,06$  мг/кг, что соответствовало индексу защиты =  $1,50 \pm 0,37$ .

Профилактическое введение фуллеренола не изменяло течения интоксикации карбофосом, однако снижало частоту гибели животных при введении яда в дозе 500 и 631 мг/кг до 0 и 50 % соответственно. Расчетная среднелетальная доза карбофоса на фоне профилактического введения фуллеренола увеличилась с  $550 \pm 50,9$  до  $655 \pm 54,7$  мг/кг. Индекс защиты составил  $1,19 \pm 0,21$ . Профилактическое введение фуллеренола способствовало также увеличению продолжительности жизни крыс после введения карбофоса в дозах, превышающих  $LD_{50}$  (631 и 794 мг/кг). Гибель большинства животных при изолированном введении карбофоса отмечалась в течение 2 ч, в то время как на фоне фуллерена – через 12–30 ч.

Результаты исследования острой токсичности фуллеренола представлены в табл. 2.

Введение фуллеренола в дозах 250–1000 мг/кг сопровождалось развитием признаков местного раздражающего действия. В течение первых 30 мин после введения фуллеренола у животных фиксировали агрессивное поведение. Через сутки после введения фуллеренола в дозе 250 мг/кг ярко выраженной клинической картины интоксикации не отмечалось. При введении фуллере-

нола в дозе 398 мг/кг и более в течение первых 6 ч наблюдения отмечали взъерошенный шерстяной покров, снижение двигательной активности и чувствительности к звуковым раздражителям. У некоторых животных фиксировали диспноэ.

Начиная с первых суток наблюдения, в зависимости от вводимой дозы фуллеренола, фиксировали гибель животных. Гибель животных при введении фуллеренола в дозе 398 мг/кг была отсроченной: наблюдали гибель 17 % животных на 3-и сутки после введения. При введении фуллеренола в дозах 501 и 634 мг/кг гибель животных отмечали на 1–3-и сутки наблюдения. Общая частота гибели после введения этих доз составила 17 и 33 % соответственно. Введение фуллеренола в дозах 794 и 1000 мг/кг приводило к гибели большинства животных: 83 и 100 % соответственно. На основании полученных данных рассчитана среднелетальная доза фуллеренола, которая составила  $649,61 \pm 75,1$  мг/кг, а  $LD_{16}$  — 418,2 мг/кг.

При исследовании лабораторных показателей крови и мочи после введения производных фуллеренола в дозе  $LD_{16}$  был выявлен ряд характерных изменений (табл. 3). Отмечалась тенденция к увеличению общего количества лейкоцитов на фоне статистически значимых изменений в лейкоцитарной формуле в результате роста гранулоцитов. По данным биохимического анализа крови у крыс фиксировали снижение содержания общего белка, альбумина, щелочной фосфатазы, триглицеридов. Установлена тенденция к повышению аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), увеличение общего билирубина до  $0,7 \pm 0,06$  мг/дл и снижение холестерина до  $75,8 \pm 5,25$  мг/дл.

После введения фуллеренола у лабораторных животных выявлено снижение суточного диуреза более чем в 2 раза. Цвет мочи был коричневым, что могло указывать на активное выведение соединения из организма через почки. Отмечались также статистически значимое увеличение плотности мочи и повышение белка до 0,3 г/л. После введения фуллеренола фиксировали статистически значимое увеличение глюкозы до 5 ммоль/л у более 50 % животных в группе при  $p < 0,05$  по точному критерию Фишера, а также повышение лей-

**Таблица 2** Характеристика клинической картины и динамика гибели крыс после введения фуллеренола в токсических дозах ( $n = 6$ )

Доза, мг/кг	Признаки интоксикации	Частота гибели, %				
		12 ч	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки
250	Выраженное местное раздражающее действие	0	0	0	0	0
398	Выраженное местное раздражающее действие, взъерошенность, гиподинамия, снижение чувствительности к звуковому воздействию	0	0	17	17	17
500		0	17	17	17	17
634		0	33	33	33	33
794		17	67	83	83	83
1000		50	100	100	100	100

<b>Таблица 3</b> <b>Лабораторные показатели крови и мочи у крыс через сутки после однократного внутрибрюшинного введения производных фуллерена C<sub>60</sub> в дозе LD<sub>16</sub></b>		
Показатель	Контроль растворителя (n = 12)	C <sub>60</sub> (OH) <sub>18</sub> (n = 11)
<i>Гематологические показатели</i>		
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	16,6±1,37	22,5±2,66
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	10,8±1,05	11,8±1,22
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	1±0,08	1,1±0,14
Гранулоциты, 10 <sup>9</sup> /л	4,8±0,38	9,6±1,53*
Лимфоциты, %	61,8±2,59	55,1±3,22
Моноциты, %	6,2±0,3	4,8±0,3**
Гранулоциты, %	16,6±1,37	40,2±3,32*
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	7,1±0,24	6,2±0,39
Гемоглобин, г/дл	13,1±0,49	11,4±0,69
Гематокрит, %	34,1±1,47	30,6±1,95
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	460,8±37,58	360,5±40,72
<i>Биохимические показатели</i>		
Мочевина, mmol/L	7,9±0,32	9,2±0,86
Креатинин, umol/L	43,3±4,39	46,2±4,2
Общий белок, g/l	84,7±0,98	74,5±2,06***
Альбумин, g/dL	1±0,07	0,8±0,06***
Мочевая кислота, umol/L	54,1±4,91	51,6±5,03
Холестерол, mg/dL	88,9±3,16	75,8±5,25*
Щелочная фосфатаза, U/L	321,8±26,49	217,5±27,72*
АСТ, U/L	178,3±6,33	217,5±53,16
АЛТ, U/L	78,8±1,93	129,3±36,34
Билирубин, мг/dL	0,4±0,01	0,7±0,06***
Триглицериды, mg/dL	69,8±11,54	50,1±5,69
Глюкоза, U/L	8,5±0,49	6,8±0,28
Лактатдегидрогеназа, mmol/L	922,6±104,9	1171,9±264,15
Суточный диурез, мл	9,5±0,94	3,1±0,54***
Лейкоциты, мкл	N	15 (3/11)
Нитриты	N	N
Уробилиноген, мкМ/л	3,2 (12/12)	3,2 (11/11)
Протеин, г/л	Следовой остаток (12/12)	0,3 (2/11)
pH	6,6±0,08	6,3±0,1
Кровь, клеток/мкл	10 (1/12)	≥ 10 (11/11)**
Плотность	1,025±0,0004	1,028±0,0008**
Кетоны, мМ/л	N	≥ 0,5 (2/11)
Билирубин	N	N
Глюкоза, мМ/л	5 (1/12)	5 (6/11)*

\* Различия с фоновыми значениями достоверны согласно критерию Манна—Уитни при p < 0,05. \*\* При p < 0,01. \*\*\* При p < 0,001.

коцитов до 15 клеток/мкл (у 3 из 11 животных) и кетонов до ≥0,5 мМ/л (у 2 из 11 животных).

Таким образом, результаты исследований показали наличие у фуллеренола антидотных свойств по отношению к высокотоксичным веществам, в частности к

фториду натрия и цианиду калия. Наиболее вероятным механизмом защитного эффекта фуллеренола на моделях отравлений этими ядами представляется повышение устойчивости организма к гипоксии. Известно, что производные фуллерена C<sub>60</sub> обладают выраженными

антиоксидантными свойствами и способны к нейтрализации целого ряда высокоактивных радикалов, в том числе супероксида аниона, гидроксильного радикала, синглетного кислорода. Если учесть, что современные антидоты при отравлении цианидами (антициан, амилнитрит, тиосульфат натрия) обеспечивают защиту от 3 до 10 среднелетальных доз, а фуллеренол лишь от полутора, то с высокой вероятностью можно утверждать, что защитное действие фуллеренола не связано с прямым нейтрализующим взаимодействием с этими ядами. Кроме того, в структуре фуллеренола нет необходимых химических групп, способных к такому взаимодействию по отношению как к цианидам, так и к фторидам. В качестве другого возможного механизма можно рассматривать влияние фуллеренола на ферменты клеточного дыхания, которые являются биомишенями для цианидов и фторидов. К таким ферментам следует отнести цитохромоксидазу, АТФ-азу, холинэстеразу. Это предположение связано с тем, что в нескольких ранее опубликованных работах [13, 14] получены данные о том, что производные фуллерена  $C_{60}$  изменяют активность различных ферментных систем. Показано, что фуллеренол угнетает активность ферментов микросомальной системы печени, в частности цитохрома  $P_{450}$  и  $b_5$ , НАДФ-цитохром  $P_{450}$  редуктазы [13]. Также установлена способность различных производных фуллерена ингибировать активность сериновых и цистеиновых протеиназ [14].

Возможное влияние фуллеренола на ферментные системы, в частности на микросомальную систему печени, холинэстеразы подтверждается данными, полученными при исследовании защитного эффекта фуллеренола при отравлении карбофосом. Так, на фоне профилактического введения фуллеренола наблюдали тенденцию к снижению токсичности карбофоса, а также увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных до 1–2 суток. Выявленные изменения в течение интоксикации, скорее всего, связаны с замедлением печеночного метаболизма токсиканта. Учитывая то, что карбофос в организме подвергается «летальному синтезу», возможное влияние фуллеренола на процессы биотрансформации может быть ключевым в развитии его защитного эффекта. Следует обратить внимание, что рассматриваемое влияние фуллеренола на метаболизм токсикантов может играть как положительную, так и отрицательную роль. Если при отравлении ядами, которые подвергаются «летальному синтезу», фуллеренол будет иметь защитный эффект, то при воздействии токсикантов, которые в результате биотрансформации теряют свою активность, фуллеренол может значительно усиливать их токсичность.

По уровню среднелетальной дозы фуллеренол относится к 3-му классу опасности ( $LD_{50}$  649,61±75,1 мг/кг). Данные лабораторных исследований свидетельствуют о том, что в субтоксических дозах фуллеренол может иметь гепатотоксический (повышение АЛТ, АСТ и билирубина) или умеренный гемолитический эффект, что при появлении следов крови в моче представляет

ся весьма вероятным. Характер выявленных изменений в динамике показателей мочи может также указывать на нефротоксическое действие фуллеренола. Наиболее вероятным механизмом нефротоксичности представляется повреждение эпителия почечных канальцев в результате его активного выведения через почки. Предположение о преимущественном повреждении почечных канальцев подтверждается тем, что появление в моче эритроцитов и глюкозы не сопровождается увеличением белка, который является основным индикатором нарушения процессов почечной фильтрации.

## Выводы

1. Профилактическое внутривенное введение фуллеренола  $C_{60}$  в дозе 100 мг/кг оказывает защитное действие при отравлении высокотоксичными веществами, а именно фторидом натрия и цианидом калия. На фоне профилактического применения фуллерена показатель  $LD_{50}$  фторида натрия достоверно ( $p < 0,001$ ) увеличивается с 45,7 до 68,7 мг/кг, что соответствует индексу защиты 1,50±0,37.  $LD_{50}$  цианида калия достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличивается с 7,95±1,12 до 11,54±0,85 мг/кг, а индекс защиты составляет 1,45±0,31.

2. Фуллеренол при профилактическом внутривенном введении увеличивает продолжительность жизни крыс и уменьшает частоту гибели при отравлении карбофосом в дозах 631 и 794 мг/кг. Увеличение среднесмертельной дозы карбофоса на фоне профилактического введения фуллеренола  $C_{60}$  не является статистически достоверным.

3. Среднелетальная доза фуллеренола  $C_{60}$  составляет 649,61±75,1 мг/кг. Фуллеренол при введении в токсических дозах обладает местным раздражающим действием. Острый токсический эффект фуллеренола в дозе  $LD_{16}$  через сутки после введения проявляется сдвигом лейкоцитарной формулы влево, повышением активности трансфераз (АЛТ, АСТ), увеличением содержания общего билирубина, снижением альбуминов, триглицеридов, холестерина, суточного диуреза, появлением в моче глюкозы и следов крови.

## Литература

1. **Руководство** по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / А. Н. Миронов [и др.]. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
2. **Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications** / S. Bosi [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. 2003. Vol. 38. P. 913–923.
3. **Jensen A. W., Wilson S. R., Schuste D. I.** Biological applications of fullerenes // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 1996. Vol. 4. P. 767–779.
4. **Satoh M., Takayanagi I.** Pharmacological Studies on Fullerene ( $C_{60}$ ), a Novel Carbon Allotrope, and Its Derivatives // Journ. Pharmacol. Sci. 2006. Vol. 100. P. 513–518.
5. **Beck M., Mandy G.** Solubility of  $C_{60}$  // Full. Sci. Technol. 1997. Vol. 5. P. 291–310.

6. **Molecular** design of carbohydrate-fullerene conjugate to neutralize shiga toxins / O. Tomoyki [et al.] // 51st SPSJ Annual Meeting, Polymer Preprints, Japan. 2004. P. 309.
7. **Piotrovsky L. B.** Biological activity of pristine fullerene C<sub>60</sub> // Carbon nanotechnology / L. Dai (ed.). Elsevier, 2006. P. 235–253.
8. **Deguchi S., Alargova G., Tsujitake K.** Dispersions of fullerenes, C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub>, in water // Preparation and characterization, Langmuir. 2001. Vol. 17. P. 6013–6017.
9. **Piotrovsky L. B.** Biological activity of pristine fullerene C<sub>60</sub> // Carbon Nanotechnology Elsevier. 2006. P. 235–253.
10. **Oberdörster E.** Manufactured nanomaterials (fullerenes, C<sub>60</sub>) induce oxidative stress in brain of juvenile largemouth bass // Environ. Health Perspect. 2004. Vol. 112. P. 1058–1062.
11. **The differential** cytotoxicity of water-soluble fullerenes / C. Sayes [et al.] // Nano Lett. 2004. Vol. 4. P. 1881–1887.
12. **Tissue** sites of uptake of <sup>14</sup>C-labeled C<sub>60</sub> / R. Bullard–Dillard [et al.] // Bioorg. Chem. 1996. Vol. 24. P. 376–385.
13. **Suppression** of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullerenol, a polyhydroxylated fullerene C<sub>60</sub> / T. H. Ueng, J. J. Kang, H. W. Wang [et al.] // Toxicol Lett. 1997. Vol. 93, N 1. P. 29–37.
14. **Jensen A. W., Wilson S. R., Schuster D. I.** Biological applications of fullerenes // Bioorg. Med. Chem. 1996. Vol. 4. P. 767–779.