

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОБИОКОМПОЗИТОВ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀

*Венгерович Н.Г., Тюнин М.А., Антоненкова Е.В., Коньшаков Ю.О., Болехан А.В.,
Зайцева О.Б., Стуков А.Н., Бояркин М.Н., Попов В.А.*

*Кафедра патологической физиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова,
г. Санкт-Петербург*

+7 (812) 2923223 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева 37

nickolai@vengerovich.ru

Резюме. Исследована биологическая активность различных нанобиокомпозигов фуллерена C₆₀ и её зависимость от использованного растворителя (ПВП, Tween 80, липоидол). Выявлена антирадикальная и репаративная активность комплексов фуллерена C₆₀/Tween 80 и C₆₀/ПВП, иммуностропная активность комплекса C₆₀/Tween 80. Определены степень антибластомного действия комплекса фуллерена C₆₀/липоидол на локальную и абдоминальную форму рака Эрлиха. Установлено отсутствие острой токсичности комплексов фуллерена C₆₀/Tween 80 при внутрибрюшинном введении. Патологическим обосновано применение нанобиокомпозигов, содержащих фуллерен C₆₀, при раневом процессе.

Ключевые слова: фуллерен, нанобиокомпозит, иммуностропный препарат, антиоксидант.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF FULLERENE C₆₀ NANOBIOCOMPOSITES

*Vengerovich N.G., Tuynin M.A., Antonenkova E.V., Konshakov Y.O., Bolehan A.V.,
Zaytceva O.B., Stukov A.V., Boyarkin M.N., Popov V.A.*

Summary. Biological activity of different fullerene C₆₀ nanobiocomposites was studied along with its dependence on dissolvent (PVP, Tween 80, lipoidol) in use. Antiradical and repair activity of fullerene C₆₀/Tween 80 and C₆₀/PVP composites and immunotropic activity of C₆₀/Tween 80 composite was determined. Antitumoral effect of fullerene C₆₀/Lipoidol composite on local and abdominal form of Ehrlich cancer was estimated. Fullerene C₆₀/Tween 80 composites were found not to be toxic when injected intraperitoneally. Fullerene C₆₀-based nanobiocomposites application for wound process was pathophysiologically justified.

Key words: fullerene, nanobiocomposite, immunotropic preparation, antioxidant.

Введение. В настоящее время уделяется много внимания развитию и внедрению объектов и частиц, величина которых находится в пределах приблизительно от 1 до 100 нанометров. Материалы, созданные на основе наночастиц, могут найти и уже находят применение в различных областях научного знания, в том числе и в медицине [2, 13, 15]. Использование нанотехнологий в биологических системах, прежде всего, предполагает создание новых биосовместимых материалов и комплексное исследование их биологических свойств. Существенное значение при этом имеют природа наночастиц, а также реализованные механизмы их стабилизации. Использование природных полимеров в качестве наностабилизирующих матриц привело к созданию раздела материаловедения – нанобиокомпозитам [10]. Изучение их биологических свойств является одной из приоритетных задач современной медицинской науки. В литературе описано множество биологически активных эффектов различных нанопрепаратов: антибактериальный [6, 8], иммуномодулирующий [7, 26], антиоксидантный [11] и другие.

О высоком потенциале использования фуллеренов в медицине и биологии ученые заговорили практически с момента их открытия в 1985 году Н. Kroto (Англия), S. O'Brien, R. Curl, R. Smalley (США) [23]. Фуллерены представляют собой новую форму углерода, отличающуюся от известного алмаза графита и карбина. Это семейство индивидуальных полиэдрических молекул, которые содержат фрагменты с пятикратной симметрией (пентагоны), не характерные для неорганических соединений. В отдельных публикациях сообщается, что фуллерены, обладая антиоксидантной [36], нейропротективной [10, 20], мембранотропной [3, 22], противовирусной [7, 26, 31], антибластомной [38], антимикробной [34] и фотодинамической активностью [21, 35], являются перспективным материалом для создания новых высокотехнологичных медицинских материалов и лекарственных препаратов [9].

Однако неспособность фуллеренов растворяться в полярных растворителях [14, 18, 32] затрудняет исследование их биологически активных свойств. Кроме того, остается открытым вопрос токсичности производных фуллерена C_{60} . Ряд авторов отмечают отсутствие как острого, так и хронического токсического действия фуллеренов на организм при различных способах введения [27, 28, 30]. Другие, наоборот, в своих работах указывают на выраженные токсические эффекты фуллеренов на клетки кожи человека и головного мозга рыб [29, 33]. Не менее важными являются сообщения о возможности накопления фуллеренов в тканях печени и селезенки при внутривенном введении [17]. Несмотря на то, что авторы этих исследований отрицают возможность

включения фуллеренов в процессы метаболизма, последствия депонирования их во внутренних органах требуют дополнительных исследований.

Отмеченные обстоятельства определили необходимость комплексного исследования биологических свойств водорастворимых нанобиоконпозитов (комплексов) фуллерена C₆₀ с N-поливинилпирролидоном (ПВП), полисорбатом 80 (Tween 80) и липоидолом, а именно, изучение их антиоксидантных свойств, иммуностропной активности, токсичности, общерезорбтивных свойств, влияния на опухолевый рост и течение раневого процесса.

Материалы и методы. Антиоксидантные свойства раствора комплексов фуллерена C₆₀/Твин 80, C₆₀/ПВП исследовали путем определения антирадикальной активности с использованием 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФНГ). Определена активность водных растворов комплекса фуллерена C₆₀/Tween 80 с 0,01–0,05% концентрацией фуллерена C₆₀ в сравнении с аналогичными концентрациями комплекса фуллерена C₆₀/ПВП. Также изучена супероксидпродуцирующая способность тканевых макрофагов методом спонтанной хемилюминесценции (ХЛсп) при исследовании водных растворов комплекса фуллерена C₆₀/Tween 80 и C₆₀/ПВП с содержанием C₆₀ в концентрации 0,02, 0,05, 0,1%.

На модели асцитной и подкожной формы опухоли Эрлиха исследовали влияние комплексов фуллерена C₆₀/ПВП и C₆₀/липоидол на течение неопластических процессов у 70 мышей-самцов весом 35-40 грамм. В исследовании использовали водный раствор комплекса C₆₀/ПВП (с содержанием фуллеренов 0,1% и ПВП 20%) и комплекса C₆₀/липоидол с содержанием фуллерена 0,15%.

Для воспроизведения модели асцитной формы опухоли животным вводили внутрибрюшинно 5×10⁶ клеток асцитной опухоли Эрлиха в 0,2 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Животные были разделены на 3 группы (по 10 мышей в каждой). На вторые сутки после прививки опухоли животным 1-й контрольной группы внутрибрюшинно было введено по 0,2 мл 0,9% раствора NaCl, животным 2-й контрольной группы по 0,2 мл 20% раствора ПВП (препарат «Энтеродез»), и животным 3-й группы по 0,2 мл водного раствора комплекса C₆₀/ПВП. На 11 сутки после начала опыта у всех животных определяли объем асцита в брюшной полости и содержание в нем живых и мертвых опухолевых клеток.

Для воспроизведения модели солидной формы опухоли животным было введено по 0,2 мл асцита с клетками Эрлиха, разведенного в 10 раз, подкожно в область бедра. Животные были разделены на 2 группы: контрольная и опытная (по 10 мышей в каждой группе). На 7 сутки животным контрольных групп в окрестность опухоли подкожно было введено: 0,2 мл 0,25% раствора новокаина. Животным опытной группы в подкожную

клетчатку вблизи опухоли введено по 0,2 мл комплекса C_{60} /липоидол. В динамике производили определение размеров опухолей в течение 21 суток.

Исследование иммуноотторпной активности комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80 проводили у 40 крыс линии Wistar. Определены нормальные показатели иммунитета (контроль): реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с митогенами – клеточное звено иммунитета, показатели фагоцитоза (фагоцитарный показатель – ФП, фагоцитарное число – ФЧ, показатель завершенности фагоцитоза – ПЗФ), лизосомально-катионный тест, тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), – отражающие состояние неспецифической защиты организма. После моделирования обширных (10% поверхности) глубоких термических ожогов на спине крыс определяли аналогичные показатели на третьи сутки. Для воспроизведения ожогов в качестве обжигающей поверхности использовали медную пластину размером 1,0×1,0 см или 2,0×2,0 см с температурой нагрева 180°C. Ожог наносили контактным способом под эфирным наркозом в течение 10 с.

Общерезорбтивное действие комплекса фуллерена C_{60} /ПВП при внутрибрюшинном введении исследовано в опытах на 70 крысах линии Wistar весом 180–200 грамм. Животные были разделены на 4 групп. Крысы 1-й группы являлись интактными и служили контролем. Крысам 2, 3 и 4 групп внутрибрюшинно вводили по 1 мл 10% водного раствора ПВП, 10% водного раствора комплекса C_{60} /ПВП и 25% водного раствора комплекса C_{60} /ПВП соответственно. Животных 2–4 групп выводили из опыта на 3 и 7 суток после введения препаратов. При исследовании общерезорбтивных свойств комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80 (внутрибрюшинное введение 40 крысам) животные были разделены на 4 группы по 10 каждая. Животным 1 и 2 опытных групп внутрибрюшинно введено по 0,25 и по 0,5 мл 10% раствора кластера C_{60} /Tween 80 соответственно, 3 и 4 по 0,25 и по 0,5 мл 10% раствора Tween 80.

Оценивалась морфологическая картина тканей внутренних органов (лёгкие, сердце, печень, селезёнка, почки, тонкая кишка с брыжейкой). Для исследования гистоморфологической картины внутренних органов забор материала в динамике проводили в различных участках. Морфологический материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах, заключали в парафин, серийные срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Препараты изучали методом световой микроскопии.

Общерезорбтивные свойства водорастворимого комплекса C_{60} /ПВП были исследованы путем оценки гистоморфологической картины внутренних органов и основных биохимических показателей плазмы крови после его внутривенного введения.

Исследования были проведены на 15 кроликах самцах породы Шиншилла, весом 3–4 кг. Животным, разделенным на 3 группы (5 в каждой), осуществляли внутривенное введение соответственно 1 мл 5, 12,5 и 25% водного раствора C_{60} /ПВП. На 3, 7 и 14 сутки производили забор крови для исследования основных биохимических показателей сыворотки крови (креатинин, глюкоза, общий белок, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, гамма-глутаматтранспептидаза). На 15 сутки животных выводили из опыта, производили вскрытие, макроскопически оценивали состояние внутренних органов и для гистоморфологических исследований осуществляли забор тканей головного мозга, легких, сердца, печени, селезенки и почек.

На модели кожно-плоскостных условно асептических ран размером 2,0×2,0 см проведено исследование влияния фуллерена C_{60} на течение раневого процесса. В эксперименте использовали 20 крыс-самок линии Wistar весом 180–200 г. Животные были разделены на 2 группы по 10 в каждой. 1-ая группа являлась опытной. Животным данной группы на раны проводили аппликацию мелкодисперсного порошка комплекса C_{60} /ПВП с содержанием C_{60} 0,5%. 2-ая группа являлась контрольной, раны у крыс покрывали мелкодисперсным порошком ПВП (препарат «Энтеродез»). В обеих группах перевязки осуществляли через день. После осмотра и оценки состояния ран, процесса заживления, раны обрабатывали антисептиком – 0,25% водным раствором хлоргексидина, наносили исследуемые препараты и накладывали контурные асептические повязки. Критериями оценки служили скорость заживления, сроки полного заживления и гистоморфологическая картина ран на 7, 10, 14 и 21 сутки. Скорость заживления ран оценивали планиметрическим методом.

Все количественные результаты исследований были подвергнуты статистической обработке. Статистическую значимость различий в сравниваемых выборках оценивали при помощи t-критерия Стьюдента, статистически достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. Накопление базы данных и её информационно-аналитическую переработку, вычислительные операции и графическое изображение результатов исследований осуществляли на компьютере с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2010 для Windows 7.

Результаты и их обсуждение. Известно, что фуллерен C_{60} проявляет антиоксидантную активность, которая обуславливает его нейропротективные, гепатопротективные и радиопротективные свойства [9, 16, 25]. Выраженность перечисленных свойств у различных производных фуллерена C_{60} может варьировать в широком диапазоне или вообще отсутствовать. Данная особенность связана с формой

водорастворимого производного фуллерена C_{60} . В стабильных коллоидных растворах уменьшение активности происходит за счет агрегации молекул фуллерена. Растворение фуллерена с помощью образования нековалентных комплексов с гидрофильными органическими молекулами позволяет молекуле остаться неизменной, что определяет возможность исследования свойств именно самих фуллеренов.

При исследовании антирадикальной активности фуллерена в ходе эксперимента (по показателю оптической плотности оценивали уровень радикалов) было установлено, что оба комплекса фуллерена C_{60} (с ПВП и Tween 80) обладает антиоксидантной активностью, возрастающей пропорционально увеличению их концентрации в растворе (таблица 1). Установлено, что антирадикальная активность значительно выше у комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80 в сравнении с C_{60} /ПВП и контролем.

Следующим этапом исследования антиоксидантных свойств комплексов фуллерена C_{60} /Tween 80 и C_{60} /ПВП стало изучение их влияния на супероксидпродуцирующую активность тканевых макрофагов. Метод позволяет определить *in vitro* влияние исследуемого препарата на процесс образования супероксида (O_2^-) макрофагами, который в условиях первой стадии раневого процесса наряду с нарастающим протеолизом и местным ацидозом вызывает вторичное повреждение тканей в зоне воспаления (таблица 2).

Таблица 1 – Антирадикальная активность комплексов фуллерена C_{60} с Tween 80 и ПВП

Антиоксидант	Антирадикальная активность выраженная в оптической плотности растворов в зависимости от молярной концентрации антиоксиданта					Контроль (вода)
	0,01%	0,02%	0,03%	0,04%	0,05%	
C_{60} /Tween 80	0,493 $\pm 0,038$	0,467 $\pm 0,016^*$	0,396 $\pm 0,019^*$	0,192 $\pm 0,030^{**}$	0,107 $\pm 0,012^{**}$	0,550 $\pm 0,05$
C_{60} /ПВП	0,416 $\pm 0,013^*$	0,343 $\pm 0,017^*$	0,189 $\pm 0,031^{**}$	0,074 $\pm 0,016^{**}$	0,043 $\pm 0,005^{**}$	

Примечание: * – различия с показателем соответствующего раствора достоверны при $p \leq 0,05$, по сравнению с контролем; ** – различия с показателем соответствующего раствора достоверны при $p \leq 0,005$, по сравнению с контролем.

Таблица 2 – Влияние комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80 на спонтанную хемилюминесценцию (ХЛ_{сп}) перитонеальных макрофагов

Концентрация растворов C ₆₀ /Tween 80	ХЛ _{сп} перитонеальных макрофагов S (% от контроля)		ХЛ _{сп} альвеолярных макрофагов S (% от контроля)	
	C ₆₀ /Tween 80	C ₆₀ /ПВП	C ₆₀ /Tween 80	C ₆₀ /ПВП
0,1%	26,44±1,92*	19,9±0,2*	58,36±4,34*	11,9±0,2*
0,05%	29,11±2,27*	76,4±0,8*	62,48±3,71*	166,5±0,8*
0,02%	88,50±6,45	290,2±0,6*	65,30±3,50	188,9±0,6*

Примечание: * – различия с показателем соответствующего раствора достоверны при $p \leq 0,05$, по сравнению с контролем.

Как видно из таблицы, показатели спонтанной хемилюминесценции в присутствии комплексов с фуллереном C₆₀ были ниже, по сравнению с контролем, что свидетельствует об уменьшении уровня супероксида в среде макрофагов. При этом выраженность антиоксидантного действия препарата имеет дозозависимый характер и в наибольшей мере проявляется при использовании 0,1 и 0,05% растворов комплекса фуллерена C₆₀.

Следующим этапом исследования стало изучение влияния комплексов фуллерена C₆₀/ПВП и C₆₀/липоидол на течение неопластических процессов. При оценке эффективности однократного внутрибрюшного введения 0,2 мл водного раствора комплекса C₆₀/ПВП с содержанием фуллерена 0,1% животным с экспериментальной асцитной формой рака Эрлиха на 11-е сутки выявлено незначительное снижение количества асцитной жидкости в брюшной полости, в среднем, на 7,5% у животных, которым вводили комплекс, по сравнению с животными контрольных групп.

У опытной группы выявлено снижение общего количества живых опухолевых клеток в асцитной жидкости, в среднем, на 32% и увеличение общего числа мертвых атипичных клеток более чем в 2,5 раза по сравнению с животными 1-й и 2-й контрольных групп. Необходимо отметить, что полученные результаты не имеют статистической достоверности ($p > 0,05$).

Результаты исследования влияния комплекса C₆₀/липоидол с содержанием фуллерена 0,15% на течение опухолевого процесса на бедре с выраженным инфильтративным ростом позволили установить его тормозящее действие на опухолевый рост. Так, на 16-е сутки снижение интенсивности роста опухоли у животных, которым был введен комплекс C₆₀/липоидол, составило 48%, а на 21-е сутки – 35% по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты также статистически не достоверны ($p > 0,05$).

У животных всех опытных групп отсутствовали признаки интоксикации в связи с введением фуллереновых комплексов и воспалительные явления в местах их введения.

Таким образом, фуллереновые комплексы C_{60} /ПВП и C_{60} /липоидол не проявляют воспалительного и острого токсического действия на организм экспериментальных животных. Внутривентриальное однократное введение комплекса C_{60} /ПВП животным с асцитной формой рака Эрлиха снижает число живых и повышает число мертвых опухолевых клеток в асцитической жидкости. Введение комплекса C_{60} /липоидол в ткани, окружающие подкожный опухолевый узел на бедре, задерживает рост опухоли.

В последнее время разработке и изучению специфических средств, стимулирующих или подавляющих иммунные реакции, придается очень большое значение [37]. Положительное действие многих лекарственных препаратов объясняется повышением общей сопротивляемости организма, его неспецифического иммунитета, а также активацией специфических иммунных реакций [1]. Иммуномодуляторы, иммуностимуляторы, иммуносупрессоры – вещества, модифицирующие иммунный ответ и воздействующие на иммунокомпетентные клетки. В опубликованных работах описаны иммунологические свойства фуллерена C_{60} , проявляющего некоторую иммунотропную активность. Однако, экспериментальных данных, подтверждающих это свойство, нами не найдено. Это обстоятельство определило необходимость изучения иммунологических показателей при моделировании обширных глубоких ожогов после внутривентриального введения комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80.

Для изучения изменений иммунологических показателей у крыс показатели здоровых животных сравнивали с аналогичными показателями на третьи сутки после моделирования глубоких обширных термических ожогов на спине крыс (таблица 3).

Таблица 3 – Изменение иммунологических показателей у крыс, при глубоком термическом ожоге

Показатели	Группа животных	
	Контроль	Термический ожог
РТМЛ с КонА, %	76,80±15,80	106,67±10,21*
РТМЛ с ФГА, %	74,60±12,62	95,75±13,24*
ФП, %	80,80±8,07	42,50±6,45*
ФЧ	9,67±3,15	13,63±3,87
ПЗФ, %	26,20±3,49	31,45±1,73*
ЛКТ, усл.ед.	0,156±0,05	0,265±0,03*
НСТ спонтанный, усл.ед.	0,85±0,09	0,66±0,06*
НСТ стимулированный, усл.ед.	1,49±0,3	1,49±0,01

Примечание: * – различия достоверны при $p \leq 0,05$, по сравнению с контролем.

Установлено, что активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов при глубоких ожогах у крыс повышалась на 70%. На фоне термического ожога выявлены увеличение фагоцитарного числа на 40% и показателя завершенности фагоцитоза – на 20% при снижении в 1,9 раза числа нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе. Наряду с этим, показатели спонтанного НСТ-теста снижались на 22%, а стимулированного – оставались без изменения.

Таким образом, термический ожог у крыс сопровождался достоверными изменениями в показателях иммунной системы животных. При этом отмечены признаки развития вторичного иммунодефицита, заключающиеся в снижении фагоцитарной активности нейтрофилов, снижении функциональной активности Т-лимфоцитов и активности кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов, что характерно для термических ожогов.

Иммунотропное действие комплекса фуллерена C₆₀/Tween 80 исследовали на 3 сутки после обширного (около 10% от площади кожи) глубокого термического ожога у животных, которым сразу после моделирования внутрибрюшинно вводили 0,5 мл 0,05% раствора фуллерена C₆₀). Контролем служили крысы с термическим ожогом, получавшие эквивалентный объем физиологического раствора. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние комплекса фуллерен C₆₀/Tween 80 фуллерена на иммунологические показатели у крыс при моделировании обширного глубокого термического ожога

Показатель	Группа животных	
	Термический ожог (контроль)	Термический ожог при введении C ₆₀ /Tween 80
РТМЛ с КонА, %	106,67±10,21	85,00±10,86*
РТМЛ с ФГА, %	95,75±13,24	82,0±7,58*
ФП, %	42,50±6,45	62,20±3,42*
ФЧ	13,63±3,87	10,60±2,37
ПЗФ, %	31,45±1,73	31,52±6,43
ЛКТ, усл.ед.	0,265±0,03	0,20±0,04*
НСТ спонтанный, усл.ед.	0,66±0,06	0,69±0,04
НСТ стимулированный, усл.ед.	1,49±0,01	1,46±0,02

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с группой без введения фуллерена C₆₀ при p≤0,05, по сравнению с контролем.

Внутрибрюшинное введение фуллерена крысам с термическим ожогом приводило к достоверному снижению показателей РТМЛ с Кон-А на 9% и с ФГА – на 13%, что

свидетельствовало о повышении лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов. Фагоцитарная активность нейтрофилов увеличивалась на 46%, при этом фагоцитарное число, равное среднему числу микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом, снижалось на 22%, показатель завершенности фагоцитоза оставался неизменным. Применение препарата сопровождалось изменением активности кислородзависимых антиинфекционных систем лимфоцитов, характеризующих степень активации гексозомонофосфатного шунта и связанное с этим образование свободных радикалов. В группе животных, получавших фуллерен, показатели спонтанного НСТ-теста повышались по сравнению с нелечеными термическими ожогами на 5%. Наряду с этим происходило снижение активности кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов на 23%.

Таким образом, парентеральное однократное введение в ранний срок при термическом ожоге у крыс комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80 оказывает выраженное иммуностропное действие, вследствие чего изучаемые иммунологические показатели приближаются к значениям, характерным для интактных животных. Результаты проведенных исследований явились дополнительным основанием целесообразности применения фуллеренов при раневом (воспалительном) процессе в составе комплексной патогенетически обоснованной терапии.

Исследование общерезорбтивных (общетоксических) свойств различных водорастворимых форм фуллерена C_{60} является важной задачей в изучении их влияния на биологические системы [9, 27, 31]. Это обусловлено, во-первых, недостаточным количеством данных литературы по данному вопросу и, во-вторых, противоречивостью опубликованных результатов. По нашему мнению, последнее обстоятельство может быть связано, в частности, с формой водорастворимого фуллерена, используемого в эксперименте, и непосредственно с технологией синтеза, так как при этом применяются достаточно токсичные вещества и при недостаточной очистке от них в опытах на животных возможно получение спорных результатов. В связи с этим нами с помощью морфологических и биохимических методов были изучены общерезорбтивные свойства комплексов фуллерена C_{60} /Tween 80 и C_{60} /ПВП.

Анализ исследования активности мембранных ферментов и динамики содержания общего белка в тканях тонкой кишки, печени и почек позволил выявить достоверное увеличение активности сахаразы и мальтазы в слизистой тонкой кишки, аминопептидазы и глицил-L-лейциндипептидазы в печени и почке при внутрибрюшинном введении 25% раствора C_{60} /ПВП. Выявленные изменения активности других ферментов оказались

незначительными и находились в диапазоне нормальных значений их активности, что соответствовало данным других авторов [12].

При вскрытии животных опытных и контрольных групп на 3-и и 7-е сутки отличий в макроскопической картине внутренних органов не обнаружено. В то же время на 7-е сутки у единичных животных в опытных группах в легких отмечены очаговые кровоизлияния, локализующиеся преимущественно в прикорневых зонах и в области верхушек. Относительная масса органов во всех группах достоверных различий не имела. Морфологическое исследование внутренних органов показало, что внутрибрюшинное введение 10% раствора ПВП, 10 и 25% раствора C_{60} /ПВП вызывало схожие изменения в тканях внутренних органов, которые характеризовались формированием дистрофических явлений, нарушением микроциркуляции в виде полнокровия капилляров, переваскулярного отека, диапедезных кровоизлияний, а также, реакцией со стороны тканевых макрофагов, выражавшейся в набухании клеток, усиленном формировании гигантских многоядерных клеток и в отдельных участках появлением гигантоклеточных гранул типа инородных тел. Наиболее выраженные изменения выявлены в селезенке, печени, миокарде, в головном мозге. Указанные изменения, по нашему мнению, связаны с действием ПВП, что подтверждается данными литературы [24]. Накопление ПВП тканевыми макрофагами и нарушение микроциркуляции вызывает усиленное образование активных форм кислорода и активацию процессов перекисного окисления липидов, которые лежат в основе патогенеза дистрофических и некротических изменений в тканях. Степень выраженности указанных изменений носит дозозависимый характер и обусловлена количеством ПВП, что подтверждается результатами исследования активности мембранных ферментов, значимые изменения которой отмечены при введении 25% раствора C_{60} /ПВП. Сравнительная оценка интенсивности морфологических изменений между экспериментальными группами показала, что фуллерен C_{60} в составе комплекса C_{60} /ПВП снижает негативные проявления ПВП. Снижение токсичности ПВП, вероятно, в связи с антиоксидантной активностью фуллерена C_{60} .

При исследовании общерезорбтивных свойств комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80 изменений в макроскопической картине внутренних органов не обнаружено. Относительная масса органов во всех группах достоверных различий не имела. По результатам выполненного исследования при внутрибрюшинном введении 10% растворов комплекса C_{60} /Tween 80 и отдельно Tween 80 выявлены схожие изменения в тканях внутренних органов, которые характеризовались формированием незначительных дистрофических явлений, с редкими нарушениями кровоснабжения. Менее выраженные

изменения в лёгких при введении кластера фуллерена C_{60} /Tween 80 мы также связываем с антиоксидантной и иммуностропной активностью фуллерена C_{60} .

Результаты проведенного исследования общерезорбтивных свойств комплекса C_{60} /ПВП при внутривенном введении показали, что введение раствора C_{60} /ПВП к 14 суткам вызывает в тканях внутренних органов дистрофические изменения (зернистая, вакуольная дистрофия), нарушения микроциркуляции в виде полнокровия капилляров, переваскулярного отека, диапедезных кровоизлияний. Кроме того, в ткани печени отмечено формирование очагов лимфогистиоцитарной инфильтрации в перипортальных зонах, и набухание звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера), что, по данным литературы [4, 24], является признаком накопления ПВП. Данные изменения были наиболее выражены в печени, миокарде и селезенке. На фоне обнаруженных морфологических изменений основные биохимические показатели крови находились в пределах нормальных значений, что свидетельствует об отсутствии острого нарушения функции со стороны исследуемых органов.

Данные литературы о репаративных свойствах мазевых композиций фуллерена C_{60} на основе вазелина свидетельствуют о перспективности его использования при местном лечении ран [5]. Однако неспособность C_{60} растворяться в воде и других полярных растворителях затрудняет создание на его основе современных гидрофильных мазевых композиций и раневых покрытий. Осуществление данной задачи возможно только при использовании его водорастворимых производных. Вышеуказанные обстоятельства и результаты проведенного нами исследования антиоксидантных, иммуностропных и общерезорбтивных свойств комплексов фуллерена C_{60} определили целесообразность изучения его влияния на течение раневого процесса.

По результатам исследования установлено (рисунок 1), что срок полного заживления ран при местном применении комплекса C_{60} /ПВП оказался на 8 суток короче по сравнению с контрольной группой. Усиление репаративных процессов в ранний срок, по-видимому, связано с антиоксидантной активностью препарата, которая предотвращает повреждение клеток и тканей продуктами вторичной альтерации. При этом происходит интенсификация общего хода раневого процесса, что подтверждено данными морфологического исследования и проявлялось усилением пролиферации фибробластов, активацией синтеза коллагена и фибриллогенеза, образования и созревания грануляционной ткани, более быстрым рубцеванием и эпителизацией раны.

Динамика уменьшения площади раневого дефекта показана на рисунке 1.

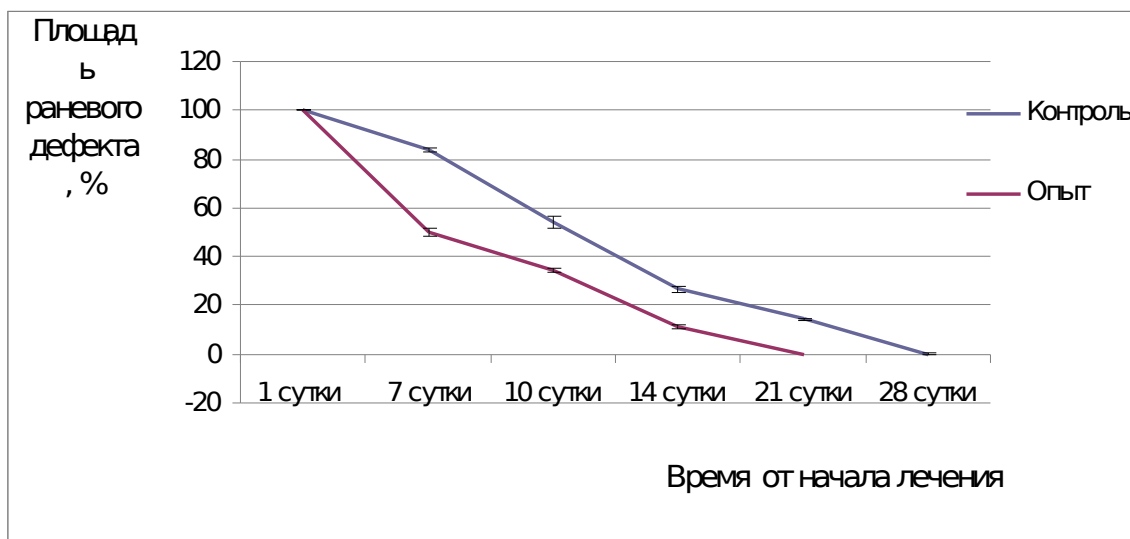


Рисунок 1 – Динамика уменьшения площади раневого дефекта глубоких ожогов на фоне применения комплекса фуллерена C_{60} /ПВП.

Эффективность комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80 при раневом процессе выявлена нами при лечении гранулирующих ран после некрэктомии при глубоких термических ожогах при местном применении биоактивных раневых покрытий. Сравнительная оценка эффективности различных фуллерен-содержащих раневых покрытий (губчатое, трехслойное гидрогелевое, на основе бактериальной целлюлозы) позволило установить, что их применение предупреждает осложненное течение раневого процесса и сокращает сроки заживления ран, в среднем, на 17,5%. Использование биоактивных раневых покрытий с иммобилизацией на них комплекса C_{60} /Tween 80 перспективно также, с нашей точки зрения, при местном лечении инфицированных, в том числе гнойных, огнестрельных и длительно не заживающих ран, термических ожогов, трофических язв и пролежней.

Заключение. В результате комплексных исследований установлена антиоксидантная активность комплекса фуллерена C_{60} /ПВП и более выраженная у комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80. Под влиянием обоих комплексов фуллерена C_{60} существенно усиливается супероксидпродуцирующая активность тканевых макрофагов. Комплекс фуллерена C_{60} /Tween 80 оказывает выраженное иммуотропное действие при глубоких термических ожогах. Внутривентральное введение комплекса фуллерена C_{60} /ПВП приводит к незначительному снижению объема асцитической жидкости, количества живых опухолевых клеток и увеличению числа мертвых атипичных клеток при абдоминальной форме рака Эрлиха. Местная (короткая) блокада опухолевого процесса мягких тканей бедра животных снижает интенсивность роста опухоли. При

исследовании общерезорбтивного действия комплексов фуллерена C_{60} выраженные сосудистые и дистрофические изменения внутренних органов выявлены при парентеральном введении комплекса C_{60} /ПВП. В то же время комплекс фуллерена C_{60} /Tween 80 существенных изменений во внутренних органах не вызывает, что указывает на отсутствие его токсичности.

В целом, получены убедительные данные о выраженном противовоспалительном эффекте различных фуллереновых комплексов и целесообразности их местного применения при раневом (воспалительном) процессе. Использование нанобиокомпозита – комплекса фуллерена C_{60} /Tween 80 в составе различных по структуре раневых покрытий при лечении гранулирующих ран после некрэктомии при глубоких ожогах предупреждало осложненное течение раневого процесса и сокращало длительность заживления ран на 17,5%.

Список литературы

1. Аллергология и иммунология: национальное руководство / под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 656 с.
2. Алфимов, М. В. Доклад рабочей группы «Индустрия наносистем и материалов» / М. В. Алфимов, В. Ф. Разумов // Рос. нанотехнол. – 2007. – Т. 2, № 1-2. – С. 12–25.
3. Андреев, И.М. Аминокислотные производные фуллерена C_{60} ведут себя как липофильные ионы, проникающие через биологические мембраны / И.М. Андреев, В.С. Романова, А.О. Петрухина, С.М. Андреев // Физика твердого тела. – 2002. – Т. 44. – С. 658–660.
4. Галахин, К.А. К вопросу о побочном действии поливинилпирролидона / К.А.Галахин // Патология. – 2006. – Т. 3, № 1. – С. 89–90.
5. Крылова, Л.А. Репаративные свойства фуллерена C_{60} : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л.А. Крылова. – СПб, 2003. – 24 с.
6. Медведева, С.А. Арабиногалактан и его соединения / С.А. Медведева, Г.П. Александрова, Л.А. Грищенко, Н.А. Тюкавина // Журн.орг.химии. – 2002. – № 9. – С. 1569–1573.
7. Меджидова, М.Г. Противовирусная активность аминокислотных производных фуллерена при цитомегаловирусной инфекции *in vitro* / М.Г. Меджидова, М.В. Абдуллаева, Н.Е. Федорова, В.С. Романова, А.А. Куш // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49, № 8-9. – С. 13–20.

8. Пат. № 2278669 Российская Федерация. МПК⁷ А61К31/717 Средство, обладающее антимикробной активностью / Г.П. Александрова, Л.А. Грищенко, Т.В. Фадеева и др.; опубл. 27.06.2006, БИ № 18.
9. Пиотровский, Л.Б. Фуллерены в биологии / Л.Б. Пиотровский, О.И. Киселев. – СПб. : ООО Изд. «Росток», 2006. – 336 с.
10. Помогайло, А.Д. Нанобиоконпозиты / А.Д. Помогайло // Успехи химии. – 2000. – Т. 69. – С. 60–85.
11. Толстых, М.П. Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв / М.П. Толстых [и др.]. – М. : Изд. дом «Эко», 2002. – 239 с.
12. Уголев, А.М. Пищеварительные ферменты в желудочно–кишечном тракте, почке, печени и селезенке при различных функциональных состояниях / А.М. Уголев, Н.Н. Иезуитова, Н.М. Тимофеева // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 1992. – Т. 78, № 9. – С. 76–83.
13. Balshaw, D. M. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part III: Nanoscale Technologies for Assessing Risk and Improving Public Health / D.M. Balshaw, M. Philbert, W.A. Suk // Toxicol. Sci. – 2005. – Vol. 88, № 4. – P. 298–306.
14. Beck, M. Solubility of C₆₀ / M. Beck, G. Mandy // Full. Sci. Technol. – 1997. – Vol. 5. – P. 291–310.
15. Borm, P.J. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC / P.J. Borm [et al.] // Particle Fibre Toxic. – 2006. – Vol. 3. – P. 11–35.
16. Bosi, S. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications / S. Bosi [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2003. – Vol. 38. – P. 913–923.
17. Bullard–Dillard, R. Tissue sites of uptake of ¹⁴C–labeled C₆₀ / R. Bullard–Dillard [et al.] // Bioorg. Chem. – 1996. – Vol. 24. – P. 376–385.
18. Deguchi, S. Stable dispersions of fullerenes, C₆₀ and C₇₀, in water / S. Deguchi, R.G. Alargova, K. Tsujii // Preparation and characterization, Langmuir. – 2001. – Vol. 17. – P. 6013–6017.
19. Dugan, L.L. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents / L.L. Dugan [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 9434–9439.
20. Dugan, L.L. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders / L.L. Dugan [et al.] // Parkinsonism Relat. Disord. – 2001. – Vol. 35. – P. 243–246.
21. Kasermann, F. Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses / F. Kasermann, C. Kempf // Rev. Med. Virol. – 1998. – Vol. 8. – P. 143–151.

22. Kotelnikova, R.A. Membranotropic properties of the water-soluble amino acids and peptide derivatives of fullerene C₆₀ / R.A. Kotelnikova [et al.] // Mol. Mat. – 1998. – Vol. 11. – P. 111–116.
23. Kroto, H.W. C₆₀: Buckminsterfullerene /H.W. Kroto [et al.] / Nature. – 1985. – Vol. 318. – P. 162–163.
24. Kuo, T.T. Mucicarminophilic histiocytosis. A polyvinylpyrrolidone (PVP) storage disease simulated signet-ring cell carcinoma / T.T. Kuo, S. Hsueh // Am. J. Surg. Pathol. – 1984. – Vol. 63. – P. 419–428.
25. Lin, H.S. Fullerenes as a new class of radioprotectors / H.S. Lin [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. – 2001. – Vol. 77, № 2. – P. 235–239.
26. Lin, Y.L. Light-independent inactivation of dengue-2 virus by carboxyfullerene C₃ isomer / Y.L. Lin, H.Y. Lei, T.Y. Luh, C.K. Chou, H.S. Liu // Virology. – 2000. – Vol. 275. – P. 258–262.
27. Mori, T. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis / T. Mori [et al.] // Toxicology. – 2006. – Vol. 225. – P. 48–54.
28. Moussa, F. Fullerene is an in vivo Powerful Antioxidant With no Acute or Sub-acute Toxicity / F. Moussa [et al.] // Nano Letters. – 2005. – Vol. 5, № 12. – P. 2578–2585.
29. Oberdörster, E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in brain of juvenile largemouth bass / E. Oberdörster // Environ. Health Perspect. – 2004. – Vol. 112. – P. 1058–1062.
30. Piotrovsky, L.B. Biological activity of pristine fullerene C₆₀ / L.B. Piotrovsky // Carbon Nanotechnology / L. Dai (ed.). – Elsevier, 2006. – P. 235–253.
31. Piotrovsky, L.B. Fullerenes and viruses / L.B. Piotrovsky, O.I. Kiselev // Carbon Nanostruct. – 2004. – Vol. 12 – P. 397–403.
32. Ruoff, R.S. Solubility of fullerene C₆₀ in a variety of solvents / R.S. Ruoff [et al.] // J. Phys. Chem. – 1993. – Vol. 97. – P. 3379–3383.
33. Sayes, C.M. The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes / C.M. Sayes [et al.] // Nano. Lett. – 2004. – Vol. 4, № 10. – P. 1881–1887.
34. Tsao, N. In vitro action of carboxyfullerene / N. Tsao [et al.] // J. Antimicrobial Chemother. – 2002. – Vol. 49. – P. 641–649.
35. Vileno, B. In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C₆₀ / B. Vileno // Carbon. – 2004. – Vol. 42. – P. 1195–1198.

36. Wang, I.C. C₆₀ and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radicalinitiated lipid peroxidation / I.C. Wang [et al.] // J. Med. Chem. – 1999. – Vol. 42. – P. 4614–4620.
37. Wright S.D. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity / S.D. Wright // J. Exp. Med. – 1999. – Vol. 189 (4). – P. 605–609.
38. Yang, X.L. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C₆₀] fullerene derivatives and its mechanism / X.L. Yang, C.H. Fan, H.S. Zhu // Toxicology in vitro. – 2002. – Vol. 16. – P.41–46.