

**ШИПЕЛИН ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ИЗУЧЕНИЕ ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФУЛЛЕРЕНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ  
И ИХ ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

**14.02.01 — гигиена**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Москва - 2014**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт питания» Российской академии медицинских наук.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук

**Гмошинский Иван Всеволодович**

**Официальные оппоненты:** **Авалиани Симон Леванович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой коммунальной гигиены факультета профилактической медицины и организации здравоохранения, Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская медицинская академия последипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ткачева Татьяна Анатольевна**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией токсикологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицины труда» Российской академии медицинских наук.

**Ведущая организация:**

Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды имени А.Н. Сысина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «16» июня 2014 г. в 14 ч на заседании Диссертационного Совета Д 001.002.01 ФГБУ «НИИ питания» РАМН по адресу: 109240, Москва, Устьинский проезд, д. 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ питания» РАМН и на сайте <http://www.ion.ru>.

Автореферат разослан «15» мая 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

*Коденцова*

Коденцова Вера Митрофановна

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 1.1 Актуальность темы

Характеристика потенциального риска наночастиц и наноматериалов, полученных искусственным путём, для здоровья человека и состояния окружающей среды обитания является обязательной (Онищенко Г.Г., Тутельян В.А., 2007; Хотимченко С.А., Гмошинский И.В., Тутельян В.А., 2009). Важность оценки потенциальных рисков наноматериалов для здоровья человека отмечается в приказе Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 340 от 30.11.2007 г. За рубежом, безопасности нанотехнологий и наноматериалов уделяется большое внимание в рамках исследований, проводимых под эгидой Европейской комиссии, US FDA, OECD, ФАО-ВОЗ, ILSI и других правительственных и международных органов (Gmoshinski I.V., Khotimchenko S.A., Popov V.O. et al., 2013).

Среди разнообразных видов продукции наноиндустрии особое место занимают фуллерены, представляющие собой новую аллотропическую форму углерода (Пиотровский Л.Б., Киселёв О.И., 2006). Области практического применения фуллеренов постоянно расширяются и включают химический синтез и катализ, электронику, оптику, полиграфическую, лакокрасочную промышленность, фармакологию, производство парфюмерно-косметической продукции, биосенсоров, упаковочных материалов, средств защиты растений и т.д. (Michalitsch R., Kallinger C., Verbandt Y. et al., 2008). Поиск среди производных фуллеренов новых биологически-активных соединений, обладающих антиоксидантным, гепатопротекторным, радиопротекторным и другими видами защитного действия на организм человека привёл к разработке водорастворимых форм фуллеренов, одним из представителей которых является фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$ . Результатом расширения производства фуллеренов и продукции, их содержащей, становится превращение фуллеренов в значимые контаминанты окружающей среды и возрастание рисков экспозиции человека фуллеренами при различных путях их поступления (кожном, пероральном, ингаляционном) на этапах их производства, использования и утилизации образующихся отходов. Актуальным на сегодняшний день является вопрос экотоксичности фуллеренов и возможности их переноса по трофическим цепям в биосфере (Navarro D.A., Kookana R.S., Kirby J.K., 2013; Yue F.N., Luo S.M., Zhang C.D., 2013). К сожалению, все эти опасения до настоящего времени не сопровождаются нигде в мире какими-либо попытками регуляции фуллеренов; в частности, полностью отсутствует их гигиеническое нормирование в продукции и объектах окружающей среды.

Оценка безопасности новых наноматериалов в Российской Федерации осуществляется по единому плану в соответствии с утверждёнными Роспотребнадзором нормативно-

методическими документами. При этом ни один из представителей семейства фуллеренов до настоящего времени не был протестирован в достаточном объеме. Наибольшую значимость и актуальность в свете возможных сценариев воздействия фуллеренов на организм человека имеет их токсиколого-гигиеническая оценка при естественных путях поступления в организм, то есть, в первую очередь, через желудочно-кишечный тракт, а также при ингаляции и эпикутанном воздействии.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБУ «НИИ питания» РАМН в рамках тем №108 «Оценка безопасности различных видов наноматериалов, предлагаемых для использования в пищевой промышленности (наночастицы металлического серебра, оксидов железа, кремния, цинка и другие)» и №140 «Разработка критериев и определение биомаркеров воздействия искусственных наночастиц на организм при пероральном пути поступления».

**Целью настоящей работы** являлась оценка возможных воздействий важнейших представителей семейства фуллеренов – немодифицированного фуллерена  $C_{60}$  и его водорастворимого производного фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$ , на показатели состояния организма лабораторных животных при поступлении через желудочно-кишечный тракт.

### **1.2 Задачи исследования**

1. Разработка методов введения фуллерена животным в составе коллоидных систем, стабилизированных биологически совместимыми полимерами и поверхностно-активными веществами.

2. Адаптация метода количественного определения фуллерена  $C_{60}$  в составе биологических образцов с использованием ВЭЖХ.

3. Изучение поступления фуллерена  $C_{60}$  во внутреннюю среду организма через пищеварительный тракт, биораспределение и бионакопление в условиях острых и подострых экспериментов.

4. Изучение в подостром эксперименте на лабораторных животных продолжительностью от 1 до 3 месяцев возможного токсического действия фуллерена  $C_{60}$  и фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$ , в том числе на интегральные показатели организма, состояние защитного барьера желудочно-кишечного тракта, некоторые биохимические и гематологические показатели.

5. Изучение в модельных экспериментах возможности биodeградации и биотрансформации фуллерена  $C_{60}$ , под действием ферментных систем организма лабораторных животных.

### **1.3 Научная новизна**

Впервые проведена систематическая токсиколого-гигиеническая оценка фуллерена C<sub>60</sub> в подостром 28- и 92-дневном эксперименте на лабораторных животных с определением показателей, характеризующих возможное общетоксическое действие данного соединения, включая интегральные, физиологические, биохимические, гематологические и иммунологические показатели. Впервые показано, что при пероральном введении наноразмерной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub> в дозе от 0,1 до 10 мг/кг массы тела в течение 28 и 92 дней данное соединение обладает общетоксическим действием на организм животных, что проявляется в частности в дозозависимом повышении проницаемости стенки тонкой кишки для макромолекул белка, увеличении числа CD106+ гранулярных клеток в паренхиме печени. На основании полученных данных определена максимальная недействующая доза фуллерена C<sub>60</sub> при подостром пероральном поступлении, находящаяся в интервале от 1 до 10 мг/кг массы тела/сут. В подостром эксперименте продолжительностью 28 дней впервые в нанотоксикологии проведена токсиколого-гигиеническая оценка перорально вводимого фуллеренола C<sub>60</sub>(ОН)<sub>24</sub> с определением показателей, характеризующих предполагаемое общетоксическое действие этого соединения. На основании полученных результатов исследований фуллерена C<sub>60</sub> и фуллеренола C<sub>60</sub>(ОН)<sub>24</sub> впервые определена величина максимальной недействующей дозы этого вещества при многократном поступлении через желудочно-кишечный тракт, находящаяся в интервале от 0,1 до 1 мг/кг массы тела/сут. В модельных экспериментах *in vitro*, воспроизводящих условия биотрансформации и биodeградации фуллерена C<sub>60</sub> в организме, впервые установлена быстрая деградация этого вещества под действием ферментных систем организма с образованием недетектируемых при хроматографическом анализе производных. С использованием этих данных объяснены причины противоречий в имеющихся данных литературы относительно процессов бионакопления, биотрансформации и физиологического действия фуллеренов в организме.

### **1.4 Практическая значимость**

С использованием результатов проведенных исследований были разработаны, утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации и внедрены в работу учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, следующие нормативно-методические документы:

- МУ 1.2.2876-11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в растениях»;
- МР 1.2.0048-11 «Порядок и методы определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных»;
- МР 1.2.0052-11 «Оценка воздействия наноматериалов на функцию иммунитета»;

- МР 1.2.0054-11 «Порядок и методы оценки воздействия искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие химических веществ»;
- МР 1.2.0053-11 «Оценка воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы в тестах на лабораторных животных».

### ***1.5 Апробация работы***

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на XII Всероссийском Конгрессе диетологов и нутрициологов «Питание и здоровье» (Москва, 2010); XIII Всероссийском Конгрессе диетологов и нутрициологов «Питание и здоровье» с международным участием (Москва, 2011); XIV Всероссийском Конгрессе диетологов и нутрициологов «Питание и здоровье» с международным участием (Москва, 2012); IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире» с международным участием (Москва, 2012); Пленуме по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации «Научно-методологические и законодательные основы совершенствования нормативно-правовой базы профилактического здравоохранения: проблемы и пути их решения» (Москва, 2012); X научно-практической конференции с международным участием «Экспертиза, оценка качества, подлинности и безопасности пищевых продуктов» на базе ГОУ ВПО МГУПП (Москва, 2012); IX научно-практической конференции «Нанотехнологии производству» (Фрязино, 2013); 4 съезде токсикологов России (Москва, 2013).

### ***1.6 Публикации***

По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 методические указания и 4 методических рекомендаций.

### ***1.7 Личный вклад соискателя***

Планирование, организация, проведение экспериментов и исследований на лабораторных животных, работа с методами гравиметрии, спектрофотометрии, ВЭЖХ, ИФА, лазерной конфокальной флуоресцентной микроскопии, спектроакустического исследования, динамического рассеяния света, статистическая обработка полученных данных и их интерпретация. Все изложенные в диссертации материалы получены непосредственно самим соискателем, или при его участии.

### **1.8 Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, разделов материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов и выводов. Список литературы содержит 194 источника, из них 21 российских и 173 зарубежных источников. Объем работы составляет 138 страниц машинописного текста, содержит 22 рисунка и 25 таблиц.

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперименты проведены на 227 крысах самцах линии Вистар. Животные получали сбалансированный полусинтетический рацион на основе казеина в соответствии с МУ 1.2.2520-09. В качестве объектов токсиколого-гигиенической оценки использовали немодифицированный фуллерен  $C_{60}$  (чистоты не менее 99,8% по данным собственного анализа методом ВЭЖХ) и его водорастворимое производное – фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$  (чистоты около 98% по данным производителя), производства ЗАО «Фуллерен-Центр», г. Нижний Новгород (Россия). Для приготовления водной коллоидной дисперсии фуллерена  $C_{60}$  его размельчали в керамической ступке, добавляли дисперсионную среду (носитель), представляющую собой 2% раствор кукурузного крахмала пищевого в дистиллированной воде с 0,5% неионогенного поверхностно-активного вещества Твин 80 (пищевая добавка E433), перемешивали при 3000 об/мин 10 минут и обрабатывали в течение 3 мин на погружном ультразвуковом процессоре с водяным охлаждением, при мощности импульса 30 Вт/см<sup>3</sup> и частоте 20 кГц. Исследование размеров частиц в полученной дисперсии было проведено спектроакустическим методом<sup>1</sup> на анализаторе «DT-1202» («Dispersion technology Inc.», США). Средний размер частиц фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  и распределение по размерам измеряли методом динамического лазерного светорассеяния на приборе «Nanotracs Wave» (Microtracs Inc, США).

Дизайны токсикологических экспериментов были разработаны в соответствии с МУ 1.2.2520-09. На протяжении 3-х подострых экспериментов (28 – 92 дня) фуллерен  $C_{60}$  и фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$  ежедневно вводили животным внутрижелудочно через зонд в указанных ниже дозах. Объем вводимой дисперсии фуллерена  $C_{60}$  в носителе и фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  для всех животных опытных групп равнялся 1 мл раствора на каждые 100 г массы тела животного.

**В первом подостром токсикологическом эксперименте с фуллереном  $C_{60}$  продолжительностью 28 дней** исследование проводили на 60 крысах исходной массой тела  $111 \pm 2$  г ( $M \pm m$ ). Животные были разделены на 4 группы по 15 крыс в каждой. Группа 1

---

<sup>1</sup> Спектроакустическое исследование проведено под руководством ведущего эксперта Метрологического центра РОСНАНО А.А.Лошкарева

(контроль) получала дистиллированную воду. Животные группы 2 получали носитель. Крысам группы 3 вводили дисперсию фуллерена  $C_{60}$  в указанной дисперсионной среде в дозе 1 мг/кг массы тела в расчёте на  $C_{60}$ , а крысам группы 4 – в дозе 10 мг/кг массы тела.

**Во втором подостром токсикологическом эксперименте с фуллереном  $C_{60}$  продолжительностью 92 дня**, исследование проводили на 75 крысах исходной массой тела  $100 \pm 5$  г ( $M \pm m$ ). Животные были разделены на 5 групп по 15 крыс в каждой. Животные 1 группы (контроль) получали дистиллированную воду. Животные 2 опытной группы получали 1 мл раствора носителя фуллерена. Крысы 3, 4 и 5 опытных групп получали фуллерен  $C_{60}$  в виде дисперсии в носителе в дозе 0,1; 1,0 и 10,0 мг/кг массы соответственно.

**В третьем подостром токсикологическом эксперименте с фуллеренолом  $C_{60}(OH)_{24}$  продолжительностью 28 дней**, исследование проводили на 60 крысах исходной массой  $122 \pm 2$  г ( $M \pm m$ ). Животные были разделены на 4 группы по 15 крыс в каждой: 1-я группа животных (контрольная) получала деионизованную воду; группы со 2-ой по 4-ую – фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$ , растворенный в деионизованной воде, в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг массы тела крысы соответственно.

**В остром эксперименте по введению дисперсии фуллерена  $C_{60}$  в изолированную петлю тонкой кишки крысы<sup>2</sup>** использовали 20 крыс средней массой  $194 \pm 4$  г ( $M \pm m$ ). В исследовании применяли фуллерен  $C_{60}$ , в составе дисперсионной среды (конц. фуллерена  $C_{60}$  3 мг/мл), представленной 2% раствором крахмала в физиологическом растворе. Твин-80 из состава дисперсионной среды был исключен для предотвращения его возможного раздражающего действия в высокой концентрации на слизистую оболочку кишки. Под гексеналовой анестезией осторожно выделяли участок подвздошной кишки длиной 5-5,5 см, который изолировали путём наложения шелковых лигатур, и вводили дисперсию фуллерена в изолированную петлю кишки в объёме 1 см<sup>3</sup>, что соответствует дозе фуллерена 15 мг/кг массы тела. После зашивания брюшной полости, крыс выдерживали 3 часа, после чего под гексеналовой анестезией обескровливали из нижней полой вены. Содержание фуллерена  $C_{60}$  определяли методом ВЭЖХ в печени, селезенке и почках.

В ходе всех токсикологических экспериментов крыс всех групп взвешивали на электронных весах с точностью  $\pm 0,5$  и оценивали прирост массы тела.

Интегральные показатели (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстяного покрова, потребление корма) изучали на протяжении всего эксперимента. За 3 часа до окончания эксперимента 9 животным из каждой группы внутрижелудочно через зонд вводили по 2 г/кг массы тела крысы лиофилизированный белок

---

<sup>2</sup> Эксперимент выполнен под руководством проф. лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов ФГБУ «НИИ питания» РАМН, д.м.н. Л.С. Василевской



куриного яйца в виде 10% раствора в 0,15 М NaCl. Затем этих крыс обескровливали из нижней полой вены под эфирной анестезией. Всех остальных животных после окончания эксперимента умерщвляли путем декапитации под легким эфирным наркозом и подвергали патологоанатомическому вскрытию. На секции согласно методам забора в ходе эксперимента биологических образцов (согласно МУ 1.2.2745-10) отбирали кровь и внутренние органы (печень, почки, сердце, легкие, селезенку, надпочечники, семенники, тимус, головной мозг, внутрибрюшинную жировую клетчатку), оценивали абсолютную и относительную массу внутренних органов.

Концентрацию гемоглобина в крови определяли цианидным спектрофотометрическими методом.

Содержание небелковых тиолов печени (в пересчете на восстановленный глутатион) определяли спектрофотометрическим методом с реактивом Элмана. При построении стандартных графиков использовали восстановленный глутатион квалификации «Ч.Д.А.».

У животных, которые получали белок куриного яйца, кроме перечисленных выше показателей, изучали проницаемость тонкой кишки для макромолекул ОВА по его концентрации в сыворотке периферической крови, определяемой с помощью твёрдофазного двухвалентного иммуноферментного теста.

В эксперименте продолжительностью 92-дня в печени, головном мозге и крови микрофлуориметрическим методом определяли содержание селена<sup>3</sup>. Изменения в органах-мишенях (слизистая оболочка тонкой кишки и печень) изучали методом лазерной конфокальной флуоресцентной микроскопии<sup>4</sup> на конфокальном микроскопе «LSM 710» (фирмы «Zeiss», Германия) с использованием следующих флуоресцентных зондов: 1) DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) (производства фирмы Invitrogen, США); 2) фаллоидин, конъюгированный с флуорохромом CF568 (производства фирмы Biotium, Inc, США); 3) антитела к клаудину-1 и вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом DyLight™ 488; 4) антитела к CD106 (VCAM-1), конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor® 488; 5) антитела к CD31, меченные Alexa Fluor® 647 (все - производства фирмы BioLegend, США).

Кроме отмеченных исследований, проводили количественное определение фуллерена C<sub>60</sub> в органах и тканях крыс методом ВЭЖХ с жидкостной-жидкостной экстракцией. Экстракцию немодифицированного фуллерена C<sub>60</sub> проводили согласно (Pyske B.F. et al., 2011) с некоторыми модификациями.

---

<sup>3</sup> Исследования проведены под руководством старшего научного сотрудника лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУ «НИИ питания» РАМН, д.с.-х.н. Голубкиной Н.А.

<sup>4</sup> Исследования проведены под руководством научного сотрудника лаборатории спортивного питания с группой алиментарной патологии ФГБУ «НИИ питания» РАМН Смирновой Т.А.

Количественное определение фуллерена  $C_{60}$  проводили с использованием системы ВЭЖХ «Agilent 1200» («Agilent Technologies», США) на колонке «ZORBAX C18». Оптическую плотность регистрировали при длине волны 340 нм. Пик фуллерена идентифицировали по его УФ-спектру, количественное определение проводили по предварительно полученному стандартному графику. Использовали изократическую элюцию подвижной фазой с соотношением толуол:ацетонитрил – 55:45. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин. В таких условиях время удерживания немодифицированного фуллерена  $C_{60}$  составляет от 7,5 до 8,0 минут, при времени выхода растворителя от 1,8 до 2,0 мин. Точность калибровки проверяли как минимум по одному стандартному образцу перед каждым циклом измерений. Стандартные графики для высоких и низких концентраций фуллерена представлены на рисунках 1 и 2 соответственно. Согласно МР 1.2.2641–10, использованный в данной работе ВЭЖХ-метод анализа фуллерена  $C_{60}$  в биологических образцах характеризуется точностью определения  $\pm 16\%$ , полнота извлечения составляет не менее 80%. Минимальное определяемое количество составляет 0,001 мкг/мл биологического образца.

**Исследование стабильности фуллерена  $C_{60}$  в модельных системах *in vitro*** проводили с использованием 12 крыс массой около 300 г. Животных обескровливали из нижней полой вены под эфирной анестезией; в асептических условиях отбирали кровь в пробирки, содержащие Трилон Б из расчета 1,6 мг/мл крови и печень, которую немедленно взвешивали на весах с точностью  $\pm 0,1$  г и охлаждали до 0 °С. Все использованные растворы реактивов были стерилизованы пропусканием через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Печень перфузировали на холоде стерильным 0,154 М КСl на 0,05 М Трис-НСl буфере рН 7,4 и готовили гомогенат ткани в этом буфере в отношении 1:4 по массе в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком. В гомогенаты добавляли 1 таблетку ингибитора протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (производства фирмы Roche, Германия) на каждые 50 мл гомогената и хлороформ 1 мкл/мл гомогената для предотвращения бактериальной контаминации.

Количества фуллерена  $C_{60}$ , вносимые в биологические образцы, выбирали с учетом доз, использованных в подострых экспериментах доз 10, 1 и 0,1 мг/кг массы тела крысы. Рассчитанные в соответствии с вышеуказанными дозами объемы раствора фуллерена  $C_{60}$  концентрацией 1 мг/мл в толуоле вносили в пустые пробирки и оставляли при комнатной температуре до испарения растворителя. Введение фуллерена  $C_{60}$  в биологические образцы проводили, внося в эти пробирки по 2 мл гомогената печени. Содержимое пробирок перемешивали на вортексе при 3000 об/мин в течение 5 минут и обрабатывали в течение 30 минут в ультразвуковой ванне «Сапфир» мощностью 200 Вт, с рабочей частотой 35 кГц и

удельной звуковой мощностью 20 Вт•дм<sup>3</sup>. Для внесения фуллерена в образец крови ее предварительно центрифугировали при 3000 об/мин в центрифуге с охлаждением. Отбирали плазму и вносили в пробирки с рассчитанными концентрациями фуллерена C<sub>60</sub>, после чего обрабатывали аналогично пробам гомогената. Затем отмеренные количества плазмы с диспергированным фуллереном C<sub>60</sub> добавляли в пробирки с цельной кровью, аккуратно перемешивали и вносили по 1 мл в пробирки для инкубации.

Содержимое контрольных (без инкубации) пробирок подвергали экстракции немедленно сразу после добавления фуллерена C<sub>60</sub> к биологическим образцам. Остальные пробирки инкубировали в темноте при температуре +37 °С в воздушном термостате в течение 3, 6, 12 и 24 часов; после каждого временного промежутка часть образцов подвергали экстракции, с последующим количественным анализом фуллерена C<sub>60</sub> методом ВЭЖХ. Все образцы выполняли в 2-х повторях.

Статистический анализ данных выполняли с использованием компьютерной программы «SPSS 19,0» (Statistical Package for Social Sciences, США), согласно данным описательной статистики (M - среднее арифметическое, Me - медиана, Sd - стандартное отклонение, m – стандартная ошибка среднего), критерию ANOVA (в целях оценки однородности распределения показателей в группах) и критерию Крускала-Уоллиса (односторонний дисперсионный анализ, для проверки равенства медиан нескольких выборок), тесту Стьюдента и непараметрическому тесту Манна-Уитни, а также факторному анализу (проводилась проверка однородности распределения тестируемого показателя в группах по факторам а) наличия фуллерена, б) наличия носителя с помощью теста на остаточную дисперсию (ANOVA). Различия между группами животных признавали достоверными при уровне значимости P≤0,05.

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### ***3.1 Выбор формы и доз вводимых наноматериалов***

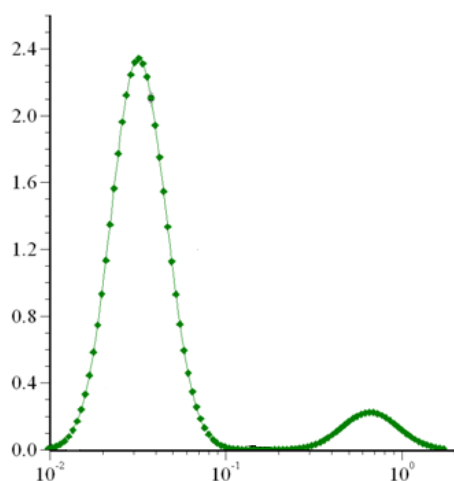
Первая проблема, которую следовало разрешить при проведении токсиколого-гигиенической оценки фуллерена C<sub>60</sub> и фуллеренола C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>, относилась к выбору доз и формы введения этих соединений экспериментальным животным. Как показал анализ данных литературы, различные методические подходы, основанные на получении дисперсий фуллерена с использованием систем вода-органические растворители, являются непригодными для целей настоящего исследования, поскольку не позволяют гарантировать отсутствие токсического воздействия носителя, содержащего практически неудаляемые примеси органического растворителя, на организм животных. Альтернативные подходы, стоящие в получении чисто водных «растворов» фуллерена с помощью длительного

перемешивания, растирания, ультразвуковой обработки были также признаны непригодными, поскольку не позволяли получить на практике дисперсии фуллерена достаточно высокой концентрации и в достаточно больших количествах, а также не исключали возможности неконтролируемого окисления и химической модификации обрабатываемого фуллерена. В результате был сделан выбор в пользу сравнительно простой, воспроизводимой и высокопроизводительной методики получения стабильных дисперсий фуллерена в растворе биополимера – кукурузного крахмала, являющегося пищевым веществом, и малотоксичного, разрешенного к применению в составе пищевых продуктов в качестве пищевой добавки (E433), неионогенного поверхностно-активного вещества Твин 80.

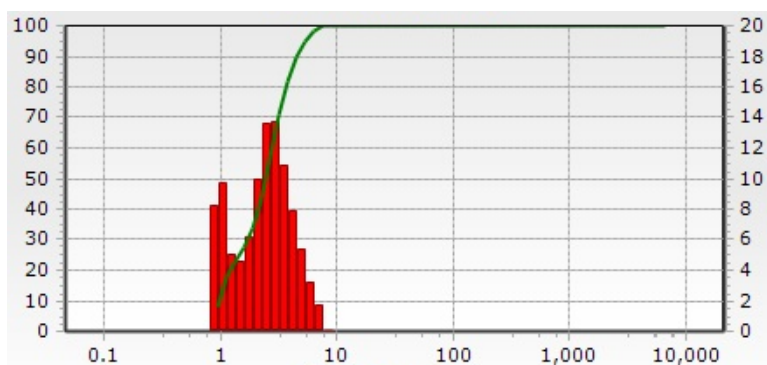
Доза фуллерена  $C_{60}$  и фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  в проведенных исследованиях составляла до 10 мг/кг массы тела лабораторного животного, что в пересчёте на массу тела человека соответствует приёму 0,7-0,9 г этих веществ в день и является значительной аггравацией в условиях реально возможных сценариев экспонирования человека этими веществами в составе пищевых продуктов или косметических средств.

Анализ размеров частиц фуллерена  $C_{60}$ , получаемых путём его диспергирования в системе крахмал - Твин 80, был проведен методом спектроакустического исследования и показал, что основная часть частиц дисперсной фазы фуллерена представлена частицами в нанометровом диапазоне размеров средним диаметром около 31 нм (рис.1.) Следует отметить, что каждая такая частица состоит из значительного числа молекул фуллерена, средний диаметр каждой из которых составляет около 0,7 нм. Приблизительный подсчёт показывает, что число молекул фуллерена  $C_{60}$  в объёме одной частицы при условии их плотной сферической упаковки может составлять порядка  $(5-8) \times 10^4$ . Согласно данным литературы, полученным с использованием преимущественно радиоизотопных меток, биодоступность нанодисперсной (мицеллярной) формы фуллерена  $C_{60}$  составляет, по видимому, около 3% от однократно введённой дозы, что, тем не менее, является физиологически значимым, особенно с учётом липофильности этого соединения и возможности его кумуляции в различных органах и тканях (в первую очередь, в печени).

Что же касается фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$ , то это соединение было хорошо растворимо в воде, что не создавало проблем при его пероральном введении. Тем не менее, анализ его растворов методом динамического лазерного светорассеяния показал, что фуллеренол представлен в водной фазе не только свободными молекулами, но и мультимолекулярными ассоциатами (кластерами) в нанометровом диапазоне размеров, состоящими, оценочно, из 10-50 молекул (рис.2).



**Рис.1.** Распределение частиц фуллерена  $C_{60}$  по размерам по данным спектроакустического исследования. Бимодальная модель.  
Ось абсцисс – размер частиц, мкм.  
Ось ординат – доля частиц в интервале размеров, %.



**Рис.2.** Распределение по размерам частиц фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  по данным динамического лазерного светорассеяния.  
Ось абсцисс: размер частиц, нм.  
Ось ординат: слева - число частиц с размером не больше данного, % (график); справа - число частиц в интервале размеров, % (гистограмма).

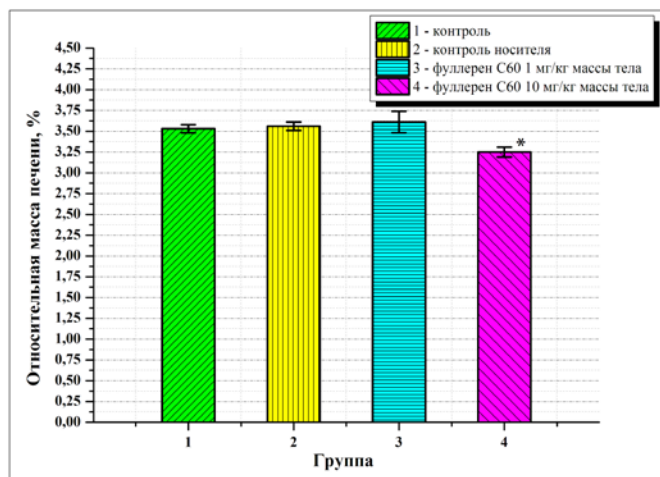
### 3.2 Токсиколого-гигиеническая характеристика фуллерена $C_{60}$

Согласно результатам проведённых исследований фуллерен  $C_{60}$  при внутрижелудочном введении крысам в условиях 28- и 92- дневного эксперимента оказывал воздействия на ряд показателей, характеризующих состояние организма животных, включая интегральные, биохимические, гематологические, а также отдельные морфологические показатели.

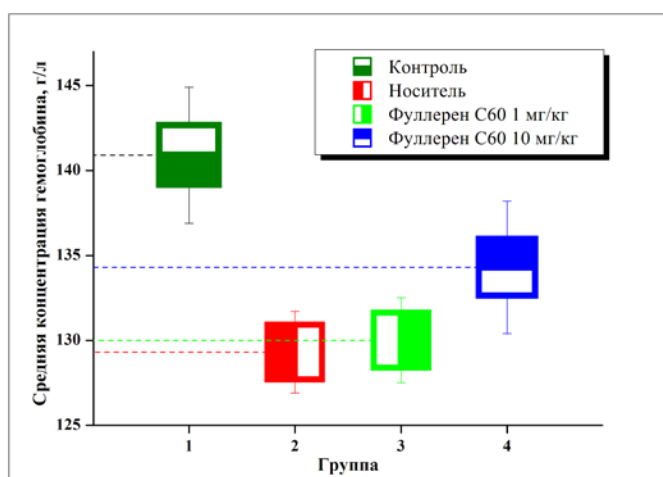
При 28-дневном введении фуллерена  $C_{60}$  отмечено дозозависимое снижение относительной массы печени (рис.3). Данный эффект, однако, был нестойким, поскольку отсутствовал у животных, получавших те же дозы фуллерена в течение более длительного времени (92 дня) и, поэтому, может рассматриваться как свидетельство подострого токсического действия, только при 28-ми дневном поступлении фуллерена  $C_{60}$ .

Среднее содержание гемоглобина цельной крови у животных групп 1-4 в эксперименте с введением фуллерена  $C_{60}$  в течение 28-ми дней, составило соответственно,  $140,9 \pm 4,0$ ;  $129,3 \pm 2,4$ ;  $130,0 \pm 2,5$  и  $134,3 \pm 3,9$  г/л и было достоверно ( $P < 0,05$ ) снижено в группах

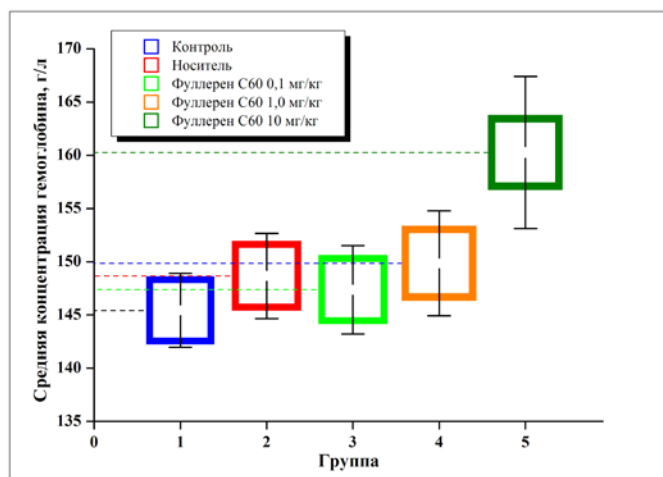
2 и 3 по сравнению с контролем. Однако, различия групп, получавших фуллерен C<sub>60</sub>, от контрольной группы 2 получавшей носитель, было недостоверно (рис.4). Аналогично, средняя концентрация гемоглобина у крыс, получавших фуллерен C<sub>60</sub> в дозе 10 мг/кг массы тела в течение 92-х дней, достоверно отличалась от значений контрольной группы 1, но, тем не менее, характер изменений был также специфически связан с действием раствора носителя (группа 2), т.к. различия с группой 5 были статистически недостоверны (Рис.5).



**Рис.3.** Относительная масса печени животных в эксперименте с внутрижелудочным введением фуллерена C<sub>60</sub> в течение 28 дней. Группы животных 1 – контроль, 2 – введение носителя, 3 – фуллерен C<sub>60</sub> 1 мг/кг массы тела, 4 – фуллерен C<sub>60</sub> 10 мг/кг массы тела. Ось ординат – масса печени, % от массы тела,  $M \pm m$ . \* – различие с группами 1 и 2 достоверно,  $P < 0,05$ .



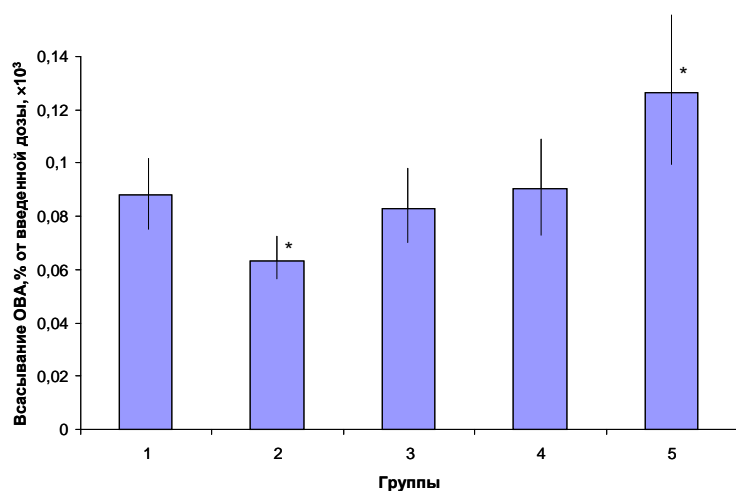
**Рис.4.** Средняя концентрация гемоглобина цельной крови у крыс в эксперименте с внутрижелудочным введением фуллерена C<sub>60</sub> в течение 28 дней. Группы животных 1 – контроль, 2 – введение носителя, 3 – фуллерен C<sub>60</sub> 1 мг/кг массы тела, 4 – фуллерен C<sub>60</sub> 10 мг/кг массы тела.



**Рис.5.** Средняя концентрация гемоглобина цельной крови у крыс в эксперименте с внутрижелудочным введением фуллерена C<sub>60</sub> в течение 92-х дней. Группы животных 1 – контроль, 2 – введение носителя, 3 – фуллерен C<sub>60</sub> 0,1 мг/кг массы тела, 4 – фуллерен C<sub>60</sub> 1 мг/кг массы тела, 5 – фуллерен C<sub>60</sub> 10 мг/кг массы тела.

Содержание в печени крыс небелковых тиолов, представленных, в основном, восстановленным глутатионом, как на протяжении 28-ми, так и 92-х дней, не имело различий между группами животных. Единственная тенденция, состоящая в некотором снижении этого показателя у животных получавших фуллерен  $C_{60}$  на протяжении 92-х дней в дозе 1 мг/кг массы тела, оказалась недостоверной ( $P > 0,05$ ), при сравнении с тем же показателем, который обнаруживается у животных групп 1 и 2 (данные не показаны). Таким образом, фуллерен  $C_{60}$ , по-видимому, не влияет при длительном приёме на этот важный показатель тканевого окислительно-восстановительного гомеостаза.

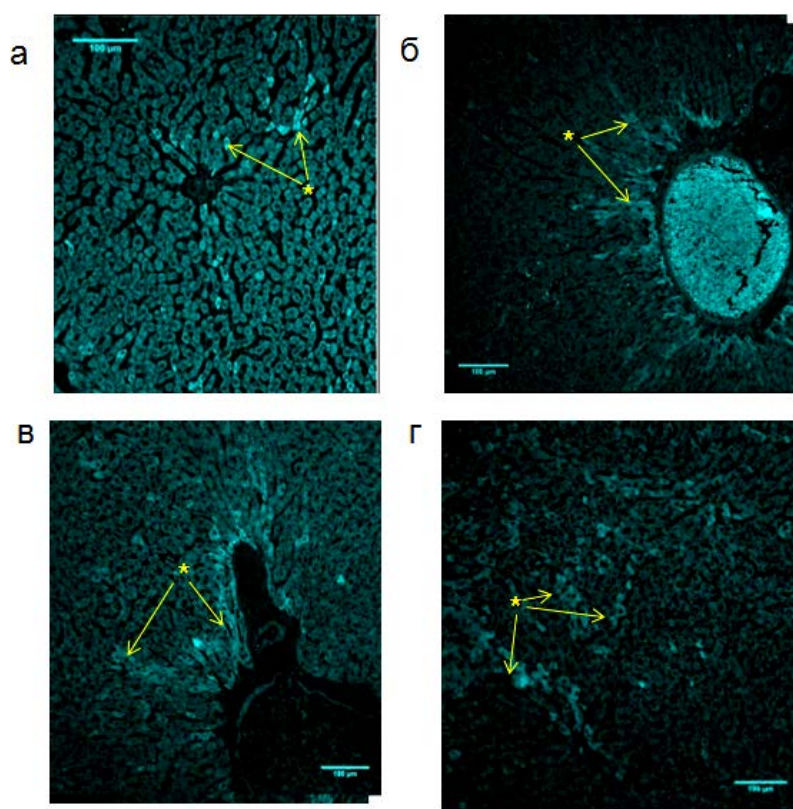
При 92-суточном введении фуллерена  $C_{60}$ , в отличие от месячного эксперимента, было отмечено достоверное, дозозависимое повышение проницаемости стенки тонкой кишки для макромолекул белка (ОВА), по сравнению с животными, получавшими носитель (рис.6.). Данный эффект следует рассматривать как безусловно неблагоприятный, т.к. ослабление барьерной функции тонкой кишки в отношении макромолекул способно привести к усилению транспорта во внутреннюю среду организма антигенов пищевых продуктов, токсинов микрофлоры белковой и липополисахаридной природы (Turner J.R., 2006; Мазо В.К. и др., 2008), что способно в дальнейшем привести к запуску каскада процессов, результатом которых может быть как аллергическая сенсibilизация, так и, в наиболее неблагоприятном случае - утрата барьерной функции в отношении кишечных микроорганизмов и развитие системного сепсиса. Доза фуллерена  $C_{60}$ , при которой достоверно фиксируется этот эффект, составляет 10 мг/кг массы тела, в условиях 92-суточного введения.



**Рис.6.** Всасывание в кишке антигенного ОВА у крыс, получавших фуллерен  $C_{60}$  и его носитель на протяжении 92 дней. Ось абсцисс - №№ групп; ось ординат - всасывание овальбумина в кровь через 3 часа, % от введенной дозы антигенного белка  $\times 10^3$ ,  $M \pm m$ . Численность групп – по 9 животных. Группы, отмеченные знаком \* различаются достоверно,  $P < 0,05$ .

Проведенное методом конфокальной микроскопии исследование морфологии предполагаемых органов-мишеней воздействия фуллерена  $C_{60}$  показало, что в дозе до 10 мг/кг массы тела в течение 3 месяцев какие-либо изменения в слизистой оболочке подвздошной кишки отсутствовали. Сохранялась нормальная морфология ворсинок,

признаков воспаления не было отмечено, повышения уровня нейтрофилов в ткани не наблюдалось, межклеточные контакты и система актиновых микрофиламентов энтероцитов, не были нарушены. Вместе с тем, по крайней мере, в наибольшей из использованных доз фуллерена  $C_{60}$ , 10 мг/кг массы тела, с использованием метода конфокальной микроскопии были выявлены изменения в печени, состоявшие в увеличении численности и изменении распределения  $CD106+$  клеток с накоплением гранул в цитоплазме (Рис.5), что свидетельствовало, по-видимому, об активации клеток, предположительно идентифицируемых как Купферовские макрофаги, в отсутствие видимого воспаления и зон некроза. Этот эффект может свидетельствовать о развитии ранних стадий токсической реакции и является, тем самым, чувствительным биоиндикатором повреждающего действия вводимого фуллерена  $C_{60}$  на ткань печени.



**Рис.7.** Конфокальная флуоресцентная микроскопия срезов печени в эксперименте с 92-суточным введением фуллерена  $C_{60}$ . Окраска антителами к  $CD106$ : а) крыса группы 2 (введение носителя); б-г) крысы групп 3-5, (введение фуллерена  $C_{60}$  в дозах 0,1; 1 и 10 мг/кг массы тела соответственно). Положение  $CD106+$  клеток, морфологически сходных с Купферовскими макрофагами, отмечено \*. Увеличение  $\times 400$

В таблице 1 приведены данные о содержании селена в крови и печени крыс, получавших фуллерен  $C_{60}$  на протяжении 92 дней. Они свидетельствуют о дозозависимом потенцировании накопления этого микроэлемента в печени крыс получавших фуллерен  $C_{60}$  в дозах 1 и 10 мг/кг массы тела, при сравнении со второй контрольной группой получавшей раствор носителя. Зависимость содержания селена от дозы фуллерена  $C_{60}$ , также наблюдается и в крови крыс, по крайней мере, для двух наибольших доз фуллерена  $C_{60}$ . Необходимо отметить, что выявленный эффект нет оснований интерпретировать как неблагоприятный (токсический) с учетом роли соединений селена, как антиоксидантов непрямого действия.



## Содержание селена в крови и печени крыс групп 1-5 на 92-ой день эксперимента

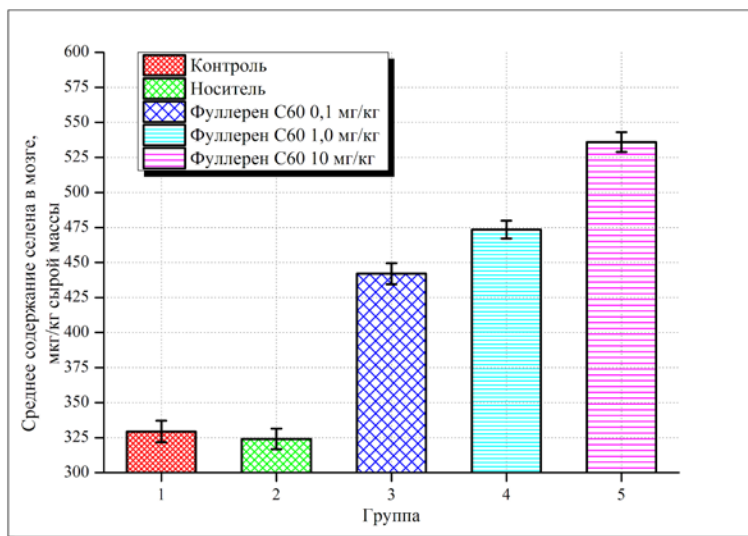
Группы	Количество крыс	Показатели (M±m), ед. изм.	
		Кровь, мкг/кг сырой массы	Печень, мкг/кг сырой массы
1. Контроль	10	130,8±6,3	1025,9±28,9
2. Контроль носителя	10	165,8±9,2	945,4±20,6
3. Фуллерен C <sub>60</sub> 0,1 мг/кг	9	165,0±9,0	975,7±14,5
4. Фуллерен C <sub>60</sub> 1,0 мг/кг	8	165,4±14,0	1084,0±26,8
5. Фуллерен C <sub>60</sub> 10,0 мг/кг	9	171,3±10,2	1113,6±23,2
Однородность распределения, группы 1-5, ANOVA, P		>0,05	<b>0,001</b>
Достоверность * различия при сравнении с группой 1, для групп №№	2	<b>0,021</b>	<b>0,028</b>
	3	<b>0,009</b>	>0,05
	4	>0,05	>0,05
	5	<b>0,017</b>	>0,05
Достоверность * различия при сравнении с группой 2, для групп №№	3	>0,05	>0,05
	4	>0,05	<b>0,003</b>
	5	>0,05	<b>&lt;0,001</b>
Факторный анализ	Фуллерен C <sub>60</sub>	>0,05	<b>0,009</b>
	Носитель	<b>0,003</b>	>0,05

Интересный эффект, характеризующий выраженное дозозависимое увеличение содержания селена в головном мозге животных получавших фуллерен C<sub>60</sub> (рис.8), по своей величине и направленности также не может однозначно рассматриваться, как признак неблагоприятного воздействия на организм. Связь между присутствием фуллерена C<sub>60</sub> в организме крыс и аккумулярованием селена в мозге, возможно, имеет сходство с теми механизмами, посредством которых эндодральные соединения, с помещенными во внутреннюю полость атомом или группой атомов, эффективно сохраняющих свою структуру, благодаря химической и биологической инертности, обеспечиваемой оболочкой фуллерена, используются для целенаправленной тканеспецифической доставки [Пиотровский Л.Б. и др., 2006]. Данная гипотеза говорит в пользу результатов, полученных в работе [Yamago S. et al., 1995], в которой было установлено присутствие меченых фуллеренов в головном мозге и выдвинуто предположение об их проникновении через гематоэнцефалический барьер.

В итоге, проведенная токсиколого-гигиеническая оценка фуллерена C<sub>60</sub> в подострых экспериментах показала, что, по крайней мере, в дозе 1 мг/кг массы тела или менее, в

\* - непараметрический критерий Манна-Уитни

организме животных отсутствуют какие-либо стойкие изменения неблагоприятной направленности, которые можно было бы соотнести с наличием токсического действия.



**Рис.8.** Среднее ( $M \pm m$ ) содержание селена в головном мозге крыс в эксперименте с внутривенным введением фуллерена  $C_{60}$  в течение 92 дней. Различия между опытными группами 3,4,5 и контрольными группами 1 и 2, достоверны,  $P < 0,05$ .

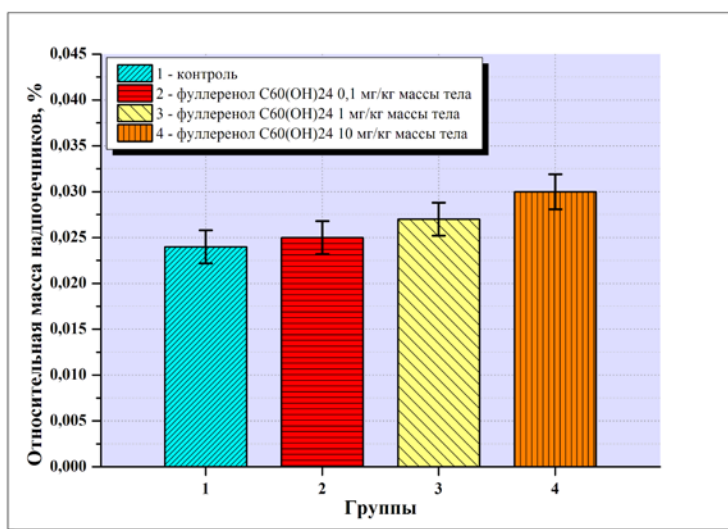
Однако, в дозе фуллерена  $C_{60}$  10 мг/кг массы тела такие эффекты наблюдаются, и это относится, в первую очередь, к обнаруженному увеличению проницаемости кишечной стенки для макромолекул и росту числа гранулярных клеток (предположительно Купферовских макрофагов), экспрессирующих маркер воспаления CD106, в печени. На основании анализа всей совокупности полученных данных можно заключить, что максимальная недействующая доза (МНД) фуллерена  $C_{60}$  при подостром пероральном поступлении находится в интервале от 1 и до 10 мг/кг массы тела/сут.

### 3.3 Токсиколого-гигиеническая характеристика фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$

В 28-дневном эксперименте с фуллеренолом  $C_{60}(OH)_{24}$  его ежедневное, пероральное поступление в дозе 0,1 мг/кг массы тела и более вызывало ряд достоверных изменений в показателях организма крыс. Обращает на себя внимание, в частности, достоверное увеличение массы надпочечников при дозе 10 мг/кг (группа 4) на 12,5% в сравнении с контролем (рис.9), что возможно связано с их повышенной секреторной активностью и свидетельствует о хроническом стрессе на структурном уровне [Перцов С.С. и др., 2010].

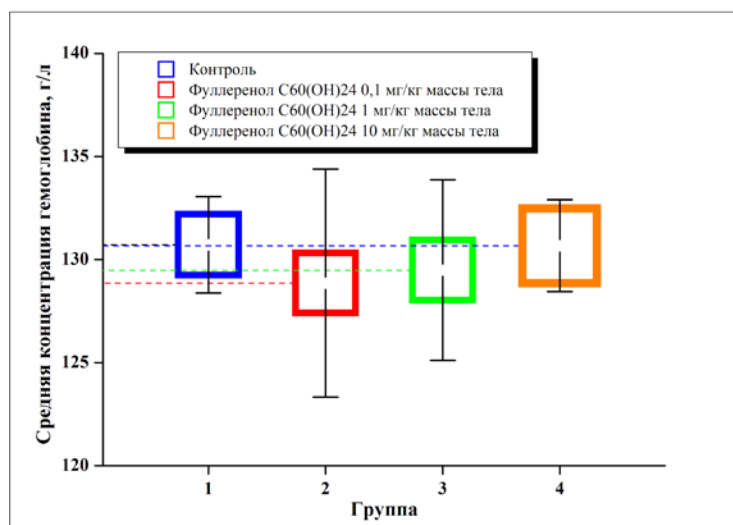
При изучении влияния фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  на кровь, отсутствовали различия средних концентраций гемоглобина цельной крови между опытной и контрольными группами 1-4 (рис.10). Ежедневное введение фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  крысам в дозах от 0,1 до 10 мг/кг, не оказывало негативного влияния на этот гематологический показатель, однако данные, полученные в лаборатории спортивного питания с группой алиментарной патологии ФГБУ «НИИ питания» РАМН старшим научным сотрудником, к.м.н. Трушиной Э.Н. и научным сотрудником, к.м.н. Мустафиной О.К., с другой стороны, свидетельствуют об изменениях в лейкоцитарной формуле крови, которые проявляются в достоверном

возрастании числа моноцитов при дозах фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  1 и 10 мг/кг (на 39% и 42% соответственно) и относительного содержания незрелых гранулоцитов (на 96% и 145%



**Рис.9.** Относительная масса надпочечников крыс контрольной группы (1) и групп 2–4, получавших фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$  в дозе 0,1-10 мг/кг массы тела, соответственно. Ось ординат – масса надпочечников, % от массы тела,  $M \pm m$ . \* – различие с группой 1 достоверно,  $P < 0,05$ .

соответственно). Можно предположить, что данный эффект обусловлен неспецифической активацией фагоцитарной системы животных в ответ на введение фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  по аналогии с тем, как это имеет место при бактериальном еписсе, воспалении, некрозе тканей или воздействии различных токсических факторов [Ali Ansari–Lari M. et al., 2003].



**Рис.10.** Средняя концентрация гемоглобина цельной крови у крыс групп 1-4, в эксперименте с введением фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  в течение 28-ми дней. Группы животных 1 – контроль, 2 – фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$  0,1 мг/кг массы тела, 3 – фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$  1 мг/кг массы тела, 4 – фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$  10 мг/кг массы тела.

Внутрижелудочное введение фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  на протяжении 28 дней, не оказывало негативного воздействия на барьерную функцию желудочно-кишечного тракта, которую изучали по степени всасывания макромолекул белка (ОВА). Величина небелковых тиолов печени у крыс не имела статистически достоверных различий, как животных получавших фуллеренол  $C_{60}(OH)_{24}$ , так и у контрольных животных, что свидетельствует об отсутствии влияния на состояние red/ox гомеостаза (данные не показаны).

В совокупности эти данные могут свидетельствовать о том, что негативное действие фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  на животных проявляется, начиная с дозы 1 мг/кг массы тела. Это

позволяет предположить, что МНД фуллеренола в месячном эксперименте составляет не менее чем 0,1 мг/кг и не более 1,0 мг/кг массы тела.

### 3.4 Характеристика биораспределения и бионакопления фуллерена C<sub>60</sub> в организме животных

При исследовании биораспределения и бионакопления фуллерена C<sub>60</sub> в органах и тканях его содержание анализировали методом ВЭЖХ с использованием в качестве стандартного образца немодифицированного фуллерена C<sub>60</sub>. При этом стандартный график, полученный в интервале концентраций фуллерена от 1 до 10 нг/10 мкл, характеризуется «изломом» в окрестности концентрации 5 нг/10 мкл (рис.11 а). Имеет место, таким образом, кажущееся отклонение от закона Ламберта-Бера, связанное, как можно предположить, с образованием при концентрации более 5 нг/10 мкл мультимолекулярных агрегатов (мицелл) фуллерена в подвижной фазе, имеющих меньший коэффициент экстинкции при выбранной длине волны, чем истинный (молекулярный) раствор фуллерена, стабильный при меньших концентрациях. Для высоких концентраций фуллерена C<sub>60</sub> (от 20 и до 1000 нг в образце) стандартный график является линейным, то есть закон Ламберта-Бера в точности соблюдается (рис.11 б).

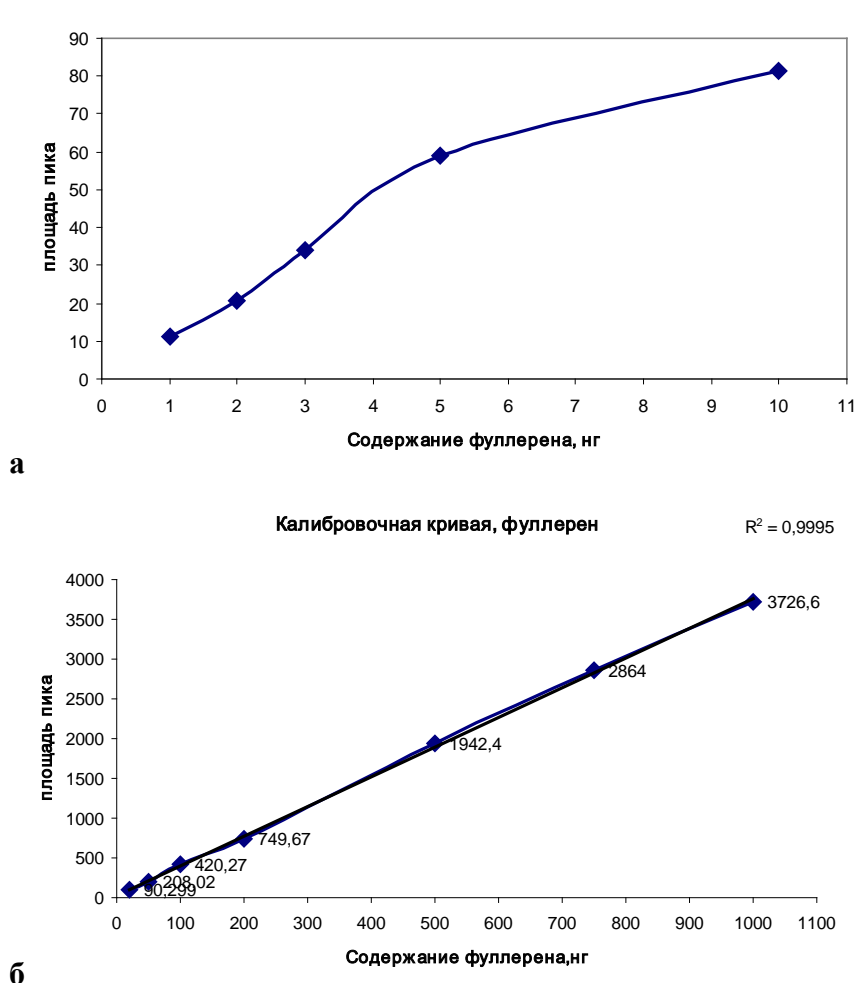


Рис.11. Калибровочные графики фуллерена C<sub>60</sub> в толуоле с концентрацией фуллерена от 1 до 10 нг/10 мкл (а) и от 20 до 1000 нг/10 мкл (б). Ось абсцисс – содержание фуллерена в пробе, нг; ось ординат – площадь пика оптической плотности при длине волны 340 нм, отн.ед.

Как показали результаты исследования, как при подостром введении фуллерена C<sub>60</sub> в течение 28 и 92 суток перорально, так и в остром опыте с его введением непосредственно в изолированную петлю тонкой кишки, материал, выходящий с колонки при времени удержания, характерном для неизмененного фуллерена C<sub>60</sub>, в пределах чувствительности анализа в проанализированных пробах, как правило, отсутствовал. Исключение составила одна случайная находка фуллерена в почке крысы, получавшей его на протяжении 28 дней; при этом содержание фуллерена в органе составило около 450 нг, что соответствует порядка 0,016% от ежедневно вводимой дозы для крысы средней массой около 270 г. В случае острого введения фуллерена в изолированную петлю кишки, с учётом чувствительности хроматографического метода анализа верхняя оценка его накопления в органе составила не более 35 нг, то есть менее 0,0015% от введённой дозы. Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали парадоксальный факт кажущегося отсутствия поступления фуллерена в органы и ткани крыс, в том числе в печень, являющуюся, как можно предположить по результатам собственных исследований и данным литературы, одним из основных органов-мишеней токсического воздействия этого вещества.

Для выяснения причин данного противоречия нами был поставлен эксперимент, в задачи которого входило исследование стабильности фуллерена C<sub>60</sub> с использованием модельных систем *in vitro*, воспроизводящих, с некоторой долей приближения, процессы, происходящие в организме после перорального введения этого соединения. Результаты исследования, представленные в табл. 2 и 3, показали, что происходит быстрая деградация фуллерена C<sub>60</sub> в биосубстратах на протяжении 24 часов инкубации с образованием метаболитов, не детектируемых методом ВЭЖХ. Ввиду этого выявить накопление неизменённого фуллерена C<sub>60</sub> в органах и тканях методом ВЭЖХ с толуольной экстракцией, как в подострых, так и в остром эксперименте не представляется возможным.

Таблица 2

**Кинетика биodeградации фуллерена C<sub>60</sub> в образцах цельной крови в системе *in vitro***

Эквивалент дозы фуллерена C <sub>60</sub> , мг/кг массы тела	Время инкубации (ч)				
	0	3	6	12	24
	Измеренная концентрация фуллерена C <sub>60</sub> , мкг/проба				
10,0	179,1±19,1	7,22±0,12	0	0	0
1,0	11,8±1,1	0	0	0	0
0,1	0,57±0,83	0	0	0	0

**Кинетика биodeградации фуллерена в образцах гомогенатов печени в системе *in vitro***

Эквивалент дозы фуллерена C <sub>60</sub> , мг/кг массы тела	Время инкубации (ч)				
	0	3	6	12	24
	Измеренная концентрация фуллерена C <sub>60</sub> , мкг/проба				
10,0	10,11±0,99	5,44±2,97	5,09±0,69	4,36±0,27	0,46±0,16
1,0	0,59±0,14	0,12±0,17	0,017±0,023	0,014±0,020	0,011±0,016
0,1	0,075±0,008	0,029±0,001	0	0	0

**ВЫВОДЫ**

1. Впервые разработан способ биосовместимого внутрижелудочного введения наноразмерных мультимолекулярных частиц фуллерена C<sub>60</sub> лабораторным животным в токсикологическом эксперименте, состоящий в механическом и ультразвуковом диспергировании фуллерена C<sub>60</sub> в растворе пищевого вещества - 2% крахмала пищевого и 0,5% неионогенного поверхностно-активного вещества Твин-80 (E433). Спектроакустическим методом показано, что основная часть частиц фуллерена сосредоточена во фракции со средним размером 31 нм.
2. Адаптирован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке с неподвижной обращенной фазой C<sub>18</sub> и подвижной фазой толуол-ацетонитрил со спектрофотометрическим детектированием к определению фуллерена C<sub>60</sub> в биологических образцах, получаемых от лабораторных животных и в системах *in vitro*. Чувствительность метода составляет 1 нг фуллерена в пробе биологического материала, линейность стандартного графика сохранялась в интервале масс 5 – 1×10<sup>4</sup> нг фуллерена в пробе.
3. В результате внутрижелудочного введения крысам наноразмерной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub> в течение 28 и 92 дней в дозах от 0,1 до 10 мг/кг массы тела ежедневно выявлены изменения показателей, свидетельствующих о наличии у этого соединения общетоксического действия на организм животных, включая дозозависимое снижение относительной массы печени, повышение проницаемости стенки тонкой кишки для макромолекул белка на 100%, увеличение числа CD106+ гранулярных клеток в паренхиме печени. На основании анализа полученных данных максимальная недействующая доза фуллерена C<sub>60</sub> при подостром пероральном поступлении находится в интервале 1-10 мг/кг массы тела/сут.

4. В условиях подострого эксперимента продолжительностью 28 и 92 дня при дозе фуллерена  $C_{60}$  до 10 мг/кг массы тела и в остром эксперименте при введении этого соединения в изолированную петлю тонкой кишки крыс в дозе 15 мг/кг массы тела методом ВЭЖХ изучено поступление фуллерена  $C_{60}$  из желудочно-кишечного тракта во внутреннюю среду организма и его распределение по органам и тканям. В пределах чувствительности метода в подавляющем большинстве биологических образцов немодифицированный фуллерен  $C_{60}$  не был обнаружен.

5. В модельных системах *in vitro* (цельная кровь, гомогенат и микросомальная фракция печени интактных крыс) впервые изучена кинетика биodeградации фуллерена  $C_{60}$ . Показано, что это вещество в количествах, существенно аггравированных в сравнении с возможными сценариями пероральной экспозиции, полностью деградирует в цельной крови за 6 часов инкубации и в гомогенате печени на 95% за 24 часа с образованием недетектируемых при ВЭЖХ производных. С позиции этого результата объяснены безуспешные попытки количественного определения бионакопления фуллерена в органах и тканях животных при естественных путях поступления *in vivo*.

6. При внутрижелудочном введении крысам водного раствора фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  в течение 28 дней в дозах от 0,1 до 10 мг/кг массы тела ежедневно, установлены признаки общетоксического действия этого соединения на организм животных, на основании анализа которых максимальная недействующая доза фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  при подостром пероральном поступлении, находится в интервале 0,1 – 1,0 мг/кг массы тела/сут.

7. Результаты токсиколого-гигиенической оценки фуллерена  $C_{60}$  и фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$  свидетельствуют о наличии рисков, связанных с воздействием этих соединений на организм человека при пероральном пути поступления и указывают на необходимость гигиенического нормирования этих соединений в потребительской продукции (включая пищевые продукты) и объектах окружающей среды.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах, определенных ВАК*

1. **Шипелин В.А.**, Арианова Е.А., Трушина Э.Н., Авреньева Л.И., Батищева С.Ю., Черкашин А.В., Сото С.Х., Лашнева Н.В., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Токсиколого-гигиеническая характеристика фуллерена C60 при его введении в желудочно-кишечный тракт крыс // Гигиена и санитария. – 2012, №2. – С.90–94. (0,62 печ.л.)
2. **Шипелин В.А.**, Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Селифанов А.В., Сото С.Х., Мальцев Г.Ю., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Характеристика пероральной токсичности фуллерена C60 для крыс в 92-дневном эксперименте // Вопросы питания. – Т.81, №5, 2012. – С.20–27. (1,0 печ.л.)
3. **Шипелин В.А.**, Гмошинский И.В., Тутельян В.А. Исследование стабильности фуллерена C60 в биологических субстратах с использованием модельной системы *in vitro* // Российские нанотехнологии. – 2013. – Т.8, №11–12. – С.74–78. (*Shipelin V.A., Gmoshinski I.V., Tutel'yan V.A. Study of the fullerene C60 stability in biological substrates using in vitro model system // Nanotechnologies in Russia. – 2013. – Vol.8, N.11–12. – P.810–815.*) (0,625 печ.л.)
4. **Шипелин В.А.**, Трушина Э.Н., Авреньева Л.И., Сото С.Х., Батищева С.Ю., Мальцев Г.Ю., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Тутельян В.А. Токсиколого-гигиеническая характеристика фуллеренола (гидроксильированного фуллерена C60) в 28-дневном эксперименте *in vivo* // Российские нанотехнологии. – 2013. – Т.8, №11–12. – С.48–57. (*Shipelin V.A., Trushina E.N., Avren'eva L.I. et al. Toxicological and sanitary characteristics of fullerenol (hydroxylated fullerene C60) in 28-day in vivo experiment // Nanotechnologies in Russia. – 2013. – Vol.8, N.11–12. – P.799–809.*) (1,25 печ.л.)

### *Материалы научных конференций*

1. **Шипелин В.А.**, Арианова Е.А. Токсикологическая характеристика фуллерена C60 // Материалы XI Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов «Питание и здоровье» – М. – 2010. – С.96–97. (0,06 печ.л.)
2. **Шипелин В.А.**, Смирнова В.В. Биораспределение фуллерена C60 и его влияние на некоторые показатели организма крыс при его внутрижелудочном введении в подостром эксперименте // Материалы XI Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов «Питание и здоровье», Вопросы диетологии. – М. – 2011. – Т.1, №2. – С.99–100. (0,07 печ.л.)
3. **Шипелин В.А.** Установление безопасных уровней потребления фуллерена C60, как возможного контаминанта пищевой продукции // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и



здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире» с международным участием. – М. – 2012. – Т.3. – С.347–349. (0,11 печ.л.)

4. **Шипелин В.А.** Характеристика токсикологического действия фуллеренола в подостром 28-дневном эксперименте на крысах // Материалы XIV Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Алиментарно-зависимая патология: предиктивный подход». – М. – 2012. – С.95. (0,07 печ.л.)

5. **Шипелин В.А.** Токсиколого-гигиеническая характеристика фуллеренола в подостром эксперименте на крысах // Материалы Пленума по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации «Научно-методологические и законодательные основы совершенствования нормативно-правовой базы профилактического здравоохранения: проблемы и пути их решения» под редакцией академика РАМН Ю.А. Рахманина. – М. – 2012. – С.490–491. (0,07 печ.л.)

6. **Шипелин В.А.** Фуллерен C60 как возможный контаминант пищевой продукции // Материалы X научно-практической конференции с международным участием «Экспертиза, оценка качества, подлинности и безопасности пищевых продуктов» на базе МГУПП. – М. – 2012. – С.115-116. (0,11 печ.л.)

7. **Шипелин В.А.**, *Гмошинский И.В.* Характеристика биологического действия фуллерена C60 и фуллеренола C60(OH)24 на организм крыс в экспериментах *in vivo* // Тезисы докладов IX-й научно-практической конференции «Нанотехнологии производству» – Фрязино. 2013. – С.72–73. (0,11 печ.л.)

8. *Масютин А.Г., Смирнова А.В., Ерохина М.В., Шебанова А.С., Шипелин В.А., Е.А. Арианова, Е.А. Смирнова, И.В. Гмошинский, Г.Е. Онищенко.* Фуллерены C60 вызывают деструктивные изменения в клетках печени крысы // Сборник трудов 4 съезда токсикологов России. – М. – 2013. – С.309–310. (0,08 печ.л.)

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ИФА - иммуноферментный анализ

МНД - максимальная недействующая доза

МУ - методические указания

МР - методические рекомендации

ОВА - овальбумин куриного яйца