

8. Traganos F., Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Meth. in Cell Biol.* 1994; 41: 185—94.
9. Rothe G., Kellermann W., Valet G. Flow cytometric parameters of neutrophil function as early indicators of sepsis or trauma-related pulmonary or cardiovascular organ failure. *J. Lab. Clin. Med.* 1990; 115(1): 52—61.
10. Kravtsov A.L., Naumov A.V., Korovkin S.A., Adamova G.V., Shvedun G.P., Ledvanov M. et al. The use of two-color flow cytometry for the rapid detection and quantification of functional leukocyte activity changes during immunogenesis in plague. In: [*Mikrobiologiya, biokhimiya i spetsificheskaya profilaktika karantinnykh infektsiy*]. Saratov; 1990: 66—74. (in Russian)
11. Kireev M.N., Kravtsov A.L., Taranenko T.M., Khramchenkova T.A., Klyueva S.N., Guseva N.P., Shmel'kova T.P. Comparative assessment by flow cytometry of immunophagocytic system cell activation degree in mice immunized with the different *Yersinia pestis* capsular antigen preparations. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2007; 94(2): 61—4. (in Russian)
12. Khaydukov S.V., Zurochka A.V. (ed.) *Questions of Modern Flow Cytometry. Clinical Application.* Chelyabinsk; 2008. (in Russian)
13. Kravtsov A.L. Flow cytofluorometric assay of phagocyte bactericidal granules in blood of animals with different species sensitivity to experimental plague. *Zhurn. mikrobiol.* 2015; (1): 23—31. (in Russian)
14. Skowera A., de Jong E., Schuitemaker J., Allen J.S., Wessely S.C., Griffiths G. et al. Analysis of anthrax and plague bio warfare vaccine interactions with human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2005; 175: 7235—43.
15. Houghton A.M., Hartrel W.O., Robbins C., Gomis-Rath X.G., Shapiro S.D. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature.* 2009; 460: 637—41.
16. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhltmann Y., Weiss D.S. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303: 1532—5.
17. Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D., Weiss J., Zychlinsky A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* 2002; 417: 91—4.
18. Pham C.T. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008; 40(6—7): 1317—33.
19. Kravtsov A.L., Shvedun G.P., Ledvanov M. About the effect of the *Y. pestis* plasmid products on the guinea pig blood leukocytes during immunogenesis in plague according to flow cytometric analysis. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 1993; 73(3): 135—46. (in Russian)
20. Philipovskiy A., Smiley S. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 T cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection. *Infect. and Immun.* 2007; 75(2): 878—85.
21. Nazarova L.S., Isupov I.V., Surikov N.N., Pavlova L.P., Taranenko T.M., Seroglazov V.V. et al. A study of certain functional characteristics of mice thymocytes during plague immunogenesis. In: [*Profilaktika osobo opasnykh infektsiy*]. Saratov, 1988: 13—22. (in Russian)
22. Nazarova L.S., Piontkovskiy S.A., Isupov I.V., Surikov N.N., Golubeva I.I. Experimental study of certain types of cells with lytic potential in the initial stages anti-immunity. In: [*Mikrobiologiya, biokhimiya i spetsificheskaya profilaktika karantinnykh infektsiy*]. Saratov, 1990: 90—5. (in Russian)
23. Kiseleva A.K., Vasil'eva G.I. Effect of immunization by live plague vaccine on the number of lysosomes in organspecific macrophages. *Tsitologiya.* 1990; 32(5): 504—8. (in Russian)

Поступила 13.06.16

Принята в печать 16.08.16

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.31:547.913.5].07

Шершакова Н.Н., Барабошкина Е.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Смирнов В.В., Камышников О.Ю., Хаитов М.Р.

ОТСУТСТВИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ У ВОДНОГО РАСТВОРА ФУЛЛЕРЕНА C₆₀

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, г. Москва

Фуллерен C₆₀ — один из самых мощных нейтрализаторов активных форм кислорода и свободных радикалов, что связано с его высоким сродством к электрону. Именно это свойство делает его привлекательным веществом для изготовления лекарственных препаратов с целью лечения острых и хронических заболеваний. Однако вопрос его токсикологии требует детальных исследований. В частности, он связан с методами получения водных растворов C₆₀, которые непосредственно влияют на агрегатное состояние наночастиц, их размер и химию поверхности. Недавно мы разработали новый диализный метод получения водного раствора фуллерена C₆₀ (dnC₆₀) без использования токсических компонентов, потенциально пригодный для биомедицинского применения. В настоящем исследовании изучены токсические эффекты dnC₆₀ в мышинной модели в зависимости от дозы и способов его введения (внутрибрюшинный, интрагастральный и внутривенный). Показано, что dnC₆₀ токсическим эффектом не обладает при любом способе введения. При использовании же небольших доз у мышей наблюдали более активный набор веса по сравнению с контрольной группой. Гистологический анализ не выявил каких-либо патологических изменений внутренних органов, характерных для токсического поражения.

Ключевые слова: фуллерен C₆₀; острая токсичность; мыши.

Для цитирования: Шершакова Н.Н., Барабошкина Е.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Смирнов В.В., Камышников О.Ю., Хаитов М.Р. Отсутствие острой токсичности у водного раствора фуллерена C₆₀. *Иммунология.* 2016; 37(6): 325-329. DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-6-325-329

Shershakova N.N., Baraboshkina E.N., Andreev S.M., Shabanova D.D., Smirnov V.V., Kamishnikov O. Yu., Khaitov M.R.

FULLERENE C60 AQUEOUS SOLUTION DOES NOT SHOW ACUTE TOXICITY

NRC Institute of Immunology FMBA, 115478, Moscow

Для корреспонденции: Шершакова Надежда Николаевна, E-mail: nsh18.81@mail.ru

Fullerene C60 is one of the most potent neutralizers of reactive oxygen species and free radicals, due to the high electron affinity. This property makes it an attractive agent for medicines, for example, for the treatment of acute and chronic diseases. However, the question of its toxicology requires detailed research. In particular, it relates to methods for preparing aqueous solutions of C₆₀, which directly affect the aggregation state of nanoparticles, their size and surface chemistry. Recently, we have developed a new approach to obtain a water-soluble form of C₆₀ without the use of aggressive conditions based on dialysis principle (dnC60), potentially useful for biomedical applications. In the present study, we explored the toxic effects of dnC60 in mouse model depending on the dose and administration routes (intraperitoneal, intragastrical and intravenous). It was shown that the dnC60 had no toxic effects by any route of administration. Furthermore, we observed more active weight gain of mice when small doses of dnC60 were administered compared with the control group. Histological analysis also did not reveal any pathological changes in the internal organs, characteristic for toxic damage.

Key words: fullerene of C60; acute toxicity; mice.

For citation: Шершакова Н.Н., Барабошкина Е.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Смирнов В.В., Камышников О.Ю., Хаитов М.Р. Отсутствие острой токсичности у водного раствора фуллерена C₆₀. *Immunologiya*. 2016; 37(6): 325-329. DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-6-325-329

For correspondence: Shershakova Nadezhda Nikolaevna, E-mail: nsh18.81@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The work is executed at financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation, within the Federal program «Research and development on priority directions of development of scientific-technological complex of Russia for 2014—2020» (agreement No. 14.604.21.0059 of June 27, 2014, a unique identifier of applied research (project) RFMEFI60414X0059).

Received 01.08.16

Accepted 16.08.16

Введение

Стремительное развитие технологии наноструктурированных материалов и масштабирование их производства приводит к тому, что человек, животные и другие биологические объекты оказываются с ними в тесном контакте. Поэтому очень важна оценка потенциальных рисков при проникновении данных веществ в организм. По классификации наноматериалов к основным их типам относят углеродные структуры: фуллерены, нанотрубки, графен, нанодIAMазы и др. Их в настоящее время активно используют в научных и технологических целях. Открытие в 1990 г. простого эффективного способа препаративного синтеза фуллерена C₆₀ [1] послужило толчком к лавинообразному росту исследований его биологической активности и синтеза многочисленных производных, многие из которых показывали антивирусную, антибактериальную, нейропротекторную, противовоспалительную и противоопухолевую активность. Сам по себе фуллерен нерастворим в водных средах, и основные пути повышения его гидрофильности связаны с его функционализацией путем присоединения гидрофильных аддендов или формированием коллоидных растворов. В водных средах всегда происходит агрегация (кластерообразование) гидрофобных фуллереновых молекул, а стабилизация формируемых кластеров осуществляется за счет приобретения поверхностного отрицательного заряда. Ковалентно модифицированный фуллерен, по сути, уже не остается собственно фуллереном, и данные по токсичности его производных некорректно применять к немодифицированному фуллерену. Последнее замечание связано с тем, что в литературе часто обобщают понятия «фуллерен» и «функционализированный фуллерен», хотя это разные вещества. Более того, введение функциональных групп может нивелировать специфическую электроноакцепторную активность фуллерена и таким образом резко изменить его характерные свойства и взаимодействие с биологической системой.

Несмотря на то что фуллерен C₆₀ используют уже более 20 лет, ни в одной из стран мира он не был изучен на безопасность в полном объеме. В то же время имеется масса публикаций, связанных с анализом отдельных биологических эффектов фуллерена и его производных в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, из большинства которых следует, что серьезных токсических эффектов у немодифицированного фуллерена C₆₀ обнаружено не было. Первые работы по исследованию токсичности фуллерена

появились уже в 1995—1996 гг. [2, 3]. Было показано, что при введении мышам фуллерена в дозе 2,5 г/кг он не вызывал гибели мышей и побочных эффектов у животных при наблюдении в течение 8 нед. Отмечали, что при внесении фуллерена в среду с культурой человеческих кератиноцитов или фибробластов наблюдают его довольно быстрое поглощение при отсутствии влияния на пролиферацию. В то же время имеется достаточно много противоречивых данных по токсикологии, которые сложно унифицировать из-за разнообразия использованных препаратов C₆₀ и примененных методов анализа. В 2004 г. неожиданно обнаружили токсическое воздействие водных наносуспензий фуллерена C₆₀ на дафний и на мальков большеротого окуня, которое проявлялось в форме окислительного стресса [4]. Однако позже выяснилось, что саму суспензию готовили с применением органического растворителя тетрагидрофурана (ТГФ), который захватывал фуллерен, и токсичность препарата была связана именно с ТГФ [5—7].

Введение внутривентриально мышам суспензии фуллерена в дозе 100 мг/кг не влияло на их поведенческие реакции (тест Irwin) по сравнению с контролем [8]. При изучении острой пероральной токсичности на крысах для смеси фуллеренов C₆₀ и C₇₀ (фуллерит) в дозе 2000 мг/кг за весь период наблюдения также не выявлено никаких отрицательных эффектов [9]. Воздействие фуллерена на кожу изучали на мышах, вводя образец внутривенно в дозе 200 мг/кг. Через 72 ч не было выявлено никакого влияния ни на синтез ДНК, ни на индукцию орнитиндекарбоксилазы в эпидермисе. После подкожного введения образца фуллерена в дозе 100 мг/кг в течение 24 нед развитие опухолей (в отличие от группы мышей, которым вводили тетрадеканойлфорболацетат) не наблюдалось [10].

Цель данной работы — изучение острой токсичности водного раствора (дисперсии) фуллерена C₆₀ (dnC₆₀), изготовленного недавно разработанным диализным методом, позволяющим получать с высоким выходом водные растворы фуллерена в очень мягких условиях, без использования токсичных ароматических растворителей и ультразвука [11].

Материал и методы

Экспериментальные животные. В работе использовали самок мышей линии BALB/c весом 18—20 г, в возрасте 8—10 нед, из питомника ГУНЦБМТ РАМН. Токсические свойства dnC₆₀ изучали путем введения препарата внутривенно (в/в), внутривентриально (в/б) и интрагастрально (и/г).

Получение dnC_{60} . Водный раствор фуллерена, dnC_{60} , был получен диализным методом, как описано ранее [28]. Этот метод обеспечивает почти количественный выход фуллерена C_{60} из кристаллического состояния в раствор, при этом гидродинамический размер частиц, определенный методом динамического светорассеяния, составляет 80—100 нм. Его УФ-Вид спектр поглощения показывает характерные максимумы при 220, 265, 344 и слабую полосу с центром 450 нм. Полученный dnC_{60} можно стерилизовать, что становится важным пунктом при проведении биомедицинских исследований. В настоящей работе максимальная концентрация C_{60} составляла 320 мкг/мл. Дозы рассчитывали с учетом весового содержания C_{60} , определенного по оптической плотности при 340 нм (коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{340\text{ нм}} = 50\,200$).

Изучение острой токсичности dnC_{60} . Острую токсичность изучали путем в/в, в/б и и/г введения препарата в различных дозах.

Изучали токсические свойства dnC_{60} при в/в введении по следующей схеме. Мышей разделили на 5 групп по 6 особей в каждой. Первой — четвертой группам фуллерен C_{60} вводили в дозах 2, 8, 40 и 200 мкг соответственно, в объеме 200 мкл. Пятая группа служила контрольной, в ней мыши получали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в том же объеме. Наблюдение за поведением животных и оценку их веса проводили в течение 7 дней после введения препарата.

В эксперименте по изучению токсичности dnC_{60} при в/б введении мышей разделили на 9 групп по 6 особей в каждой. Мышам вводили препарат в расчете на фуллерен в дозах 40, 80, 160, 200, 320, 500, 1000 и 2700 мкг (1—8-я группы соответственно) в объеме 500 мкл. Раствор, содержащий 500 мкг фуллерена и более, представлял собой суспензию с видимыми частицами препарата. Животные 9-й группы получали ФСБ. Наблюдение за поведением животных и оценку их веса проводили в течение 7 дней после введения фуллерена C_{60} .

Для изучения токсического эффекта при и/г введении препарат был взят в дозе 1 мг в объеме 300 мкл, содержащей как растворимую форму C_{60} , так и нерастворимые частицы C_{60} . Контрольным животным вводили воду в том же объеме. После введения в течение 16 сут проводили наблюдение за животными, которое включало в себя ежедневный клинический осмотр, динамическое измерение массы тела. Процедура клинического осмотра состояла из внешнего осмотра и оценки состояния кожного покрова, полости носа и наружного слухового прохода, состояния периаанальной, периорбитальной и периорбитальной областей. Оценивали также наличие и характер дефекации и мочеиспускания. Через 16 сут от момента введения суспензии фуллерена проводили наркотизирование мышей в CO_2 -камере с последующим обескровливанием через вскрытие грудной полости и рассечение аорты. Процедура некропсии была проведена с каждым животным, при этом отмечали состояние внутренних полостей тела и органов, а также забирали кусочки органов и тканей на гистологическое исследование. Для контроля наличия фуллерена C_{60} в крови через час после и/г введения у мышей брали кровь на анализ. Затем для гистологического исследования извлекали желудочно-кишечный тракт, печень, поджелудочную железу, почки, матку, яичники.

Некропсия и гистологическое исследование. Через 14 сут от момента введения суспензии фуллеренов проводили наркотизирование мышей в CO_2 -камере с последующим обескровливанием через вскрытие грудной полости и рассечение аорты. Процедура некропсии была проведена с каждым животным, при этом отмечали состояние внутренних полостей тела и органов, а также забирали кусочки органов и тканей на гистологическое исследование.

Образцы органов фиксировали в 10% буферным раствором формалина (рН 6,8—7,2). Обезживание, проводку образцов и пропитывание парафином производили в гистопроцессоре автоматического типа SLEE MAINZ (Германия), заливку

в парафин — с использованием заливочной станции SLEE MAINZ (Германия). Микротомирование парафиновых блоков для получения срезов толщиной 4 мкм осуществляли с помощью автоматизированного ротационного микротомы Finesse E+ (Финляндия), окрашенные по общепринятой методике гематоксилином и эозином гистологические срезы заключали в монтирующую среду под покровные стекла для получения постоянных микропрепаратов. Микроскопический анализ гистологических препаратов кожи мышей разных групп проводили на микроскопе Leica DM2000 (Германия).

Статистический анализ. При сравнении групп результаты статистически обрабатывали с использованием программы Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., США), причем статистическую значимость устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения $p \leq 0,05$ принимали как статистически значимые.

Результаты и обсуждение

Оценка изменения массы тела и поведения мышей. Токсическое действие препарата C_{60} изучено при однократном в/в, в/б и и/г введении. В течение 7 дней после его введения проводили мониторинг массы тела и поведенческих реакций мышей.

После однократного в/в введения различных доз препарата падежа мышей зафиксировано не было. Кроме того, за все время наблюдения никаких изменений в поведении мышей не выявлено.

Потери массы тела у мышей после введения фуллерена C_{60} в целом не наблюдается. Однако при дозе 200 мкг происходит недостоверная потеря массы примерно на 1,5%, что составляет около 0,3 г. Такое изменение массы, на наш взгляд, находится в допустимом диапазоне неспецифических колебаний. Например, на 4—6-й дни наблюдений у животных контрольной группы отмечено подобное неспецифическое колебание массы тела. При введении небольших доз фуллерена (2 и 40 мкг) наблюдают тенденцию к лучшему набору массы тела у мышей.

Таким образом, при в/в введении фуллерена токсических проявлений и изменения поведения животных выявлено не было. Потери массы тела у мышей тоже не наблюдали.

Затем было изучено токсическое действие различных доз dnC_{60} при введении в/б. Показано, что однократное в/б введение не приводит к падежу животных, а также не влияет на поведенческие реакции мышей в течение 7 дней наблюдения. Введение больших доз фуллерена C_{60} (500; 1000 и 2700 мкг) приводит к достоверному снижению массы тела животных. Важно, что уже на 6-й день наблюдений разница в весе опытных и контрольных животных перестает быть достоверной. На 7-й день мониторинга масса животных, получавших 500 мкг фуллерена C_{60} и не получавших препарат, выравнивается. При введении небольших доз фуллерена C_{60} (до 500 мкг) достоверной разницы между массой тела опытных и контрольных животных выявлено не было. Однако после 5-го дня наблюдений отмечено достоверное увеличение массы тела животных, получивших 80 мкг фуллерена C_{60} .

Для изучения токсического эффекта dnC_{60} при и/г введении препарат вводили в дозе 1000 мкг. Показано, что при однократном введении и/г фуллерена C_{60} гибели животных не происходило. Поведенческие реакции у животных контрольной и опытной групп не отличались. В процессе внешнего клинического осмотра не обнаружено никаких патологических изменений шерсти и кожи мышей, не наблюдали процессы экссудации, кровоизлияний, пролиферативные процессы; дефекация и мочеиспускание были регулярными и без патологических особенностей, кал и моча обычного цвета. Через час после введения фуллерена C_{60} у мышей была взята кровь на анализ содержания в ней введенного препарата. Анализ показал, что содержание фуллерена C_{60} в крови составляло более 100 нг/мл.

Средняя масса тела мышей в опытной группе статистически не отличалась от средней массы в контрольной группе. Ни у одного животного не выявили снижения массы тела относительно исходных значений. Кроме того, набор тела у животных, получивших фуллерен C_{60} , происходил несколько лучше, чем в контрольной группе. На 9-й и 12-й дни наблюдений разница становилась даже достоверной. Однако в целом введение фуллерена C_{60} не повлияло на набор животными массы тела.

Таким образом, по совокупности полученных данных по изменению массы тела мышей и их поведения при однократном введении фуллерена C_{60} можно сделать вывод о том, что независимо от пути введения препарат не обладает токсическим эффектом.

Гистологический анализ. Проведение некропсии показало отсутствие у животных опытной и контрольной групп патологических признаков воспаления, некроза, геморрагии, отека внутренних органов; внутренние полости тела не содержали свободной или осумкованной жидкости. Не отмечали раздражающего действия исследуемого вещества и растворителя на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта. Процедура некропсии и результаты исследования показали следующее. Ротовая полость свободна, зубы сохранены, язык свободно вытаскивается из ротовой полости, подвижен. Просвет пищевода свободен, кардиальный сфинктер сжат, слизистая пищевода гладкая, серовато-розового цвета. Полость желудка заполнена измельченной непереваренной пищей, желудочным соком и небольшим количеством слизи, пилорический сфинктер сжат, тело желудка достаточно четко подразделяется на кардиальную и фундальную части, слизистая оболочка желудка умеренно складчатая, сероватого цвета. Просвет двенадцатиперстной и тощей кишки заполнен химусом и желчью, слизистая оболочка тонкого отдела кишечника серовато-розового цвета, илеоцекальный клапан состоятелен. Просвет толстого отдела кишечника заполнен каловыми массами, слизистая оболочка серовато-розового цвета. На всем протяжении желудочно-кишечного тракта не обнаружено явлений непроходимости, стенка его была нормальной толщины, слизистая оболочка была обычного вида. Исследовали также и пищеварительные железы: печень и поджелудочную железу, в которых внешних патологических изменений не было обнаружено. Печень красно-коричневого цвета, мягкой консистенции, умеренно кровенаполнена, желчный пузырь обычной формы, немного наполнен желчью. Поджелудочная железа расположена диффузно в брыжейке тонкой кишки. Брыжейка тонкой и подвздошной кишки обычного вида, содержит небольшое количество жира, сосуды и комплекс брыжеечных лимфатических узлов. Почки расположены в брюшной полости, темно-коричневого цвета, на разрезе корково-медуллярная дифференцировка сохранена, лоханка почки не расширена, конкрементов не обнаружено. Матка обычного вида, состоит из шейки, тела и двух рогов, миометрий не утолщен, в полости матки не содержится макроскопически видимой жидкости. Яичники обычного вида, бугристые, кист и выраженных образований не обнаружено.

Проведено гистологическое исследование перечисленных органов и их фрагментов. При этом не выявлено никаких патологических изменений, свидетельствующих за воспалительные, некробиотические, гипопластические или гиперпластические процессы, дистрофии и атрофии, кровоизлияния и новообразования в органах и тканях мышей как в опытной, так и в контрольной группе. Пищевод в гистологических препаратах представлен полый гладкомышечной трубкой, выстланной изнутри многослойным плоским эпителием, снаружи пищевод покрыт адвентицией.

Стенка желудка состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоев. Эпителиальный слой представлен однослойным железистым эпителием. Его клетки характеризуются ярко выраженной полярной дифференциацией. Железы

желудка не атрофированы. Собственная пластинка построена из рыхлой соединительной ткани. Мышечная оболочка состоит из гладкомышечных клеток. Серозная оболочка построена из рыхлой соединительной ткани и снаружи покрыта мезотелием. Тонкий кишечник представлен трубчатым мышечным органом, который состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоя. Эпителиальный внутренний слой образует множество выпячиваний — кишечных ворсинок. Мышечный слой состоит из гладкой мышечной ткани. Серозный слой — из соединительной ткани, которая переходит на него с брыжейки. Толстый кишечник также представлен трубчатым мышечным органом, который состоит из эпителиального, мышечного и серозного слоя. Но в отличие от тонкого отдела кишечника в толстом кишечные ворсинки отсутствуют. В слизистой оболочке тонкого и толстого отдела кишечника расположены кишечные железы. При микроскопическом исследовании печени отмечено сохранение балочно-радиарного расположения гепатоцитов, перипортальные и центрлобулярные зоны без патологических особенностей. Микроскопическое строение поджелудочной железы характеризует ее нормальное развитие и функционирование: ацинусы и протоки железы сохранены, островки Лангерганса обычного вида. Матка состоит из трех слоев: серозного, мышечного и эпителиального. Эпителий матки и маточные железы в неактивном состоянии. Яичники имеют фолликулы всех стадий созревания и единичные желтые тела. В почках клубочки, канальцы и собирательные трубочки без видимой патологии.

Таким образом, макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов и тканей у подопытных животных показало отсутствие токсического и раздражающего действия водного раствора фуллерена.

Заключение

Основная цель настоящего исследования — интегральная оценка возможного токсического эффекта водной дисперсии фуллерена C_{60} , полученной новым диализным методом [11, 12]. Тонкая структура наночастиц в такой дисперсии, по-видимому, отличается от дисперсий C_{60} , получаемых наиболее распространенным методом, включающим ультразвуковую обработку и применение толуола [13, 14]. Ранее мы показали, что dnC_{60} обладает противоаллергической активностью, а также способен снижать воспалительную реакцию в модели ГЗГ [15]. Анализ острой токсичности dnC_{60} — один из этапов оценки его биологической безопасности и перспективности применения как действующего начала терапевтического средства. В настоящей работе мы установили, что независимо от способа введения токсическим эффектом dnC_{60} не обладает. Более того, при введении его небольших доз у мышей наблюдали более активный набор массы тела по сравнению с контрольной группой. Гистологический анализ также не выявил каких-либо патологических изменений внутренних органов, характерных для токсического поражения. Полученные данные хорошо согласуются с ранними результатами других авторов. Так, длительный эксперимент по анализу токсичности фуллерена C_{60} , проведенный на крысах, показал, что фуллерен почти в два раза увеличивал продолжительность жизни крыс, а динамика изменения массы тела животных говорила об отсутствии явных токсических эффектов. Анализ механизмов действия с использованием экспериментальной модели интоксикации крыс четыреххлористым углеродом показал, что влияние фуллерена на продолжительность жизни связано, по-видимому, с подавлением окислительного стресса [16]. В другой недавней публикации [17] установлено, что водная дисперсия C_{60} , стабилизированная крахмалом, не проявляла хронической токсичности при и/г введении крысам, гематологические и биохимические показатели не отличались от контроля (нормы). Таким образом, все больше данных свидетельствует о биологической безопасности немодифицированной формы фуллерена.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014—2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0059 от 27 июня 2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0059).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

15. Башкатова Е.Н., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Изучение модулирующей активности производных фуллерена C₆₀ на реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Физиология и патология иммунной системы. 2012; 2: 17—27.

REFERENCES

1. Kratschmer W., Lamb L.D., Fostiropoulos K., Hoffman D.R. Solid C₆₀: a new form of carbon. *Nature*. 1990; 347: 354—6.
2. Moussa F., Chretien P., Dubois P., Chuniaud L., Dessante M., Trivin F., Sizaret P.Y., Agafonov V., Ceolin R., Szwarc H., Greugny V., Fabre C., Rassat A. The Influence of C-60 Powders on Cultured Human Leukocytes. *Fullerene Science and Technology*. 1995; 3(3): 333—42.
3. Moussa F., Trivin F., Ceolin R., Hadchouel M., Sizaret P.Y., Greugny V., Fabre C., Rassat A., Szwarc H. Early effects of C60 administration in Swiss mice: A preliminary account for in vivo C60 toxicity. *Full. Sci. Technol.* 1996; 4: 21—9.
4. Oberdörster E., Zhu S., Blickley T.M., McClellan-Green P., Haasch M.L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms. *Carbon*. 2006; 44: 1112—20.
5. Oberdörster E., Stone S., Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*. 2007; 1(1): 2—25.
6. Jøner E.J., Hartnik T., Amundsen C.E. *Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles*. Norwegian Pollution Control Authority. 2008. Report no. TA 2304/2007.
7. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson, S.R. and

- Moussa F. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.* 2005; 5(12): 2578—85.
8. Satoh M., Takayanagi I. Pharmacological studies on fullerene (C₆₀), a novel carbon allotrope, and its derivatives. *J. Pharmacol. Sci.* 2006; 100(5): 513—8.
9. Mori T., Takada H., Ito S., Matsubayashi K., Miwa N., Sawaguchi T. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis. *Toxicology*. 2006; 225: 48—54.
10. Nelson M.A., Domann F.E., Bowden G.T., Hooser S.B., Fernando Q., Carter D.E. Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin. *Toxicol Ind Health*. 1993; 9(4): 623—30.
11. Andreev S.M., Purgina D.D., Bashkatova E.N., Garshev A.V., Maerle A.V., Khaitov M.R. Facile preparation of aqueous fullerene C₆₀ nano-dispersions. *Nanotechnologies in Russia*. 2014; 9(7—8): 369—79.
12. Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev A. et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method. Simple way to fullerene aqueous solution. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2015; 23(9): 792—800.
13. Mchedlov-Petrosyan N.O. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry. *Chem. Rev.* 2013; 113(7): 5149—93.
14. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashchenko L.A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *J. Chem. Soc.* 1995; 12: 1281—2.
15. Bashkatova E.N., Andreev S.M., Shershakova N.N., Babakhin A.A., Shilovsky I.P., Khaitov M.R. Study of modulating the activity of C₆₀ fullerene derivatives on delayed type hypersensitivity reaction. *Physiol. Pathol. immune system*. 2012; 2: 17—27. (in Russian)
16. Baati T., Bourasset F., Gharbi N., Njim L., Abderrabba M., Kerkeni A. et al. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene. *Biomaterials*. 2012; 33: 4936—46.
17. Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P., Dzantiev B. Production of monoclonal antibodies against fullerene C₆₀ and development of a fullerene enzyme immunoassay. *Analyst*. 2012; 137(1): 98—105.

Поступила 01.08.16

Принята в печать 16.08.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.31:547.913.5].07

Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Барабошкина Е.Н., Шабанова Д.Д., Макарова Э.А., Хаитов М.Р.

ПРОТИВОАЛЛЕРГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, Москва

Водорастворимая форма фуллерена C₆₀ (ВРФ), получаемая путем исчерпывающего диализа водно-органического раствора, — перспективное средство для противоаллергической терапии. Противовоспалительные эффекты ВРФ оценивали на мышах BALB/c с генерированной патологией атопического дерматита, индуцированной овальбумином. Значительное подавление IgE и цитокинов Th2-профиля и, наоборот, увеличение продукции цитокинов Th1-профиля наблюдали у мышей после эпидермальной аппликации ВРФ. Наблюдали также значительное увеличение уровней FOXP3+ регуляторных клеток и экспрессии мРНК филаггрина. Гистологическое исследование образцов кожи показало выраженное снижение эозинофильной и лейкоцитарной инфильтрации во взятых образцах. Используемый подход — хорошая альтернатива для лечения аллергических заболеваний.

Ключевые слова: водорастворимый фуллерен C₆₀; аллергия; цитокины; атопический дерматит.

Для цитирования: Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Барабошкина Е.Н., Шабанова Д.Д., Макарова Э.А., Хаитов М.Р. Противоаллергические свойства водорастворимой формы фуллерена C₆₀. *Иммунология*. 2016; 37(6): DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-6-329-331

Для корреспонденции: Андреев Сергей Михайлович, E-mail: sm.andreev@nrcii.ru