

Вплив водного колоїдного розчину фулерену C₆₀ на гематологічні і біохімічні показники крові щурів

О.О. Власов^{1,2}, Г.О. Ковальов¹, І.В. Белочкіна¹, І.А. Єфімова³ **Б.П. Сандомирський¹**

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;

²Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна;

³Харківська обласна клінічна травматологічна лікарня; e-mail: vlasovmd@gmail.com

Досліджено вплив водного колоїдного розчину немодифікованого фулерену C₆₀ (ВРФС₆₀) при його внутрішньоочеревинному введенні в дозі 1 мг/кг, який було використано в різних концентраціях, на гематологічні показники, в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів і біохімічні параметри сироватки крові щурів. Встановлено, що ВРФС₆₀ при введенні в концентраціях 34,7 та 173 мкмоль/л викликав помірний анізоцитоз: збільшувалося стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом на 15 і 12 % на 1-шу добу та на 13 і 18 % на 5-ту добу відповідно. Крім того, підвищувалася чутливість еритроцитів до гіпотонії. Так, на 1-шу добу рівень гемолізу збільшився на 30 і 60 % в 70 ммоль/л розчині NaCl та на 46 і 60 % в 60 ммоль/л розчині NaCl відповідно для розведень 34,7 та 173 мкмоль/л. Введення ВРФС₆₀ в концентрації 173 мкмоль/л на 5-ту добу експерименту викликало помірний гемоліз (вміст гемоглобіну в крові знижувався на 11 %, а абсолютна кількість еритроцитів – на 18 %). Застосування ВРФС₆₀ в концентрації 34,7 мкмоль/л на 1-шу добу експерименту супроводжувалося транзиторним лейкоцитозом (36%) з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів на 60 % та зростанням активності аспаратамінотрансферази і аланінамінотрансферази на 91,7 і 97,5 % відповідно. Таким чином, введення ВРФС₆₀ мало мінімальну токсичність незалежно від концентрації.

Ключові слова: водний колоїдний розчин немодифікованого фулерену C₆₀ (ВРФС₆₀); гематологічні показники; в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів; біохімічні показники сироватки крові; щури.

ВСТУП

Наразі застосування наноматеріалів, а саме фулерену – алотропної форми вуглецю, удосконалює методи діагностики та лікування різних патологій [1-6]. Відомо, що молекула фулерену характеризується високою ліпофільністю, яка зумовлює її здатність взаємодіяти з біологічними мембранами, впливаючи на їх структуру, механічні характеристики і змінюючи каталітичну активність мембранних ферментів [7]. Фулерен може виступати високоактивним антиоксидантом [1-3], проте, при опроміненні фотонами він проявляє властивості окисника, що знайшло застосування в фотодинамічній терапії [1,4]. У воді він здатний утворювати колоїдні роз-

чини, в яких окремі молекули об'єднуються в досить великі, негативно заряджені гідратовані агрегати [8]. Варто зазначити, що від розміру останніх змінюється їх біологічна активність, що цілком імовірно пояснюється особливими властивостями водних сферичних оболонок цих сполук [9]. В експериментах *in vitro* показано, що водний колоїдний розчин немодифікованого фулерену C₆₀ (ВРФС₆₀), взаємодіючи зі штучною ліпідною мембраною, збільшує провідність, утворюючи в ній локальні дефекти (пори або канали). Крім того, фулерен C₆₀ може впливати на функціонування внутрішньоклітинних ферментів. Так, наприклад, було показано, що ВРФС₆₀ збільшує активність Mg²⁺, Ca²⁺- та K⁺- АТФ-аз і реакцію суперпреципітації

© О.О. Власов, Г.О. Ковальов, І.В. Белочкіна, І.А. Єфімова, **Б.П. Сандомирський**

актоміозину скелетних м'язів кроля [10]. Проте дані досліджень, щодо біологічної безпеки фулерену та його похідних досить суперечливі [9,11,12]. Було відмічено [13], що при інгаляційному введенні у концентрації 0,12 мг/м³ впродовж 4 тиж його частинки виявляються в альвеолярних макрофагах та епітеліальних клітинах, а також підвищується рівень експресії генів, пов'язаних з розвитком запалення, оксидативним стресом, апоптозом та активністю металоендопептидаз. За даними інших авторів [14] у легенях щурів, яким інтратрахеально вводили водну суспензію фулерену C₆₀ у дозі 0,2-3,0 мг/кг, спостерігаються запальні процеси, що мають тимчасовий характер. В роботі Белочкіна і співавт. [15], колоїдні розчини суміші фулеренів C₆₀ і C70 не виявляють помітної цитотоксичної та проліферативної дії. Проте у концентрації 10-5 моль/л фулерен C₆₀ зменшує стійкість еритроцитів до гемолізу. За іншими даними [16] фулерен C₆₀ та композит C₆₀-ArA не впливають на життєздатність тимоцитів, клітин пухлини Ерліха і лейкемічних клітин L1210, але за наявності C₆₀-AntrIpA їх життєздатність має негативну тенденцію.

Можливо, настільки суперечливі повідомлення про ефекти фулеренів пов'язані як з відмінностями у постановці і умовах проведених дослідів (вид біооб'єкта, концентрація і спосіб введення, умови зберігання), так і в інтерпретації результатів, котрі буває важко порівнювати через наявність несумісних та важкоконтрольованих факторів: розмірів часток у дисперсії фулерену, типи носіїв, що застосовуються (поверхнево-активні речовини, рослинні масла, полісахариди, розчинники з власним токсичним ефектом). Дослідження токсичності фулеренів C₆₀ та їх похідних ускладнюється тим, що системна відповідь організму загалом на їх дію може значно відрізнитися від даних, отриманих у дослідах на ізольованих клітинах [17].

Метою нашої роботи було дослідження впливу ВРФС₆₀ на гематологічні показники, в'язко-еластичні властивості мембрани ери-

троцитів і біохімічні параметри сироватки крові щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на безпородних білих щурах-самцях 6-місячного віку (n=84). Всі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схваленими VI Національним конгресом з біоетики (Київ, 2016) і узгодженими з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), а також норм Комісії з біоетики ІПКіК НАН України. Тварини знаходилися в стандартних умовах віварію ІПКіК НАН України на звичайному харчовому раціоні і природному світловому режимі «день-ніч». За 7 діб до початку експерименту (період акліматизації) тварин розподілили на 4 групи. До I групи ввійшли інтактні щури без будь-яких втручань (інтактний контроль, n=14); до II групи (n=28) і III (n=28) – тварини, яким вводили ВРФС₆₀ в концентраціях 34,7 і 173 мкмоль/л відповідно; до IV групи – тварини контрольної групи, яким вводили 10 мл води для ін'єкцій (n=14). Групи I і IV у свою чергу поділили на дві підгрупи, а групи II і III – на 4 підгрупи, по 7 тварин у кожній підгрупі спостереження. Всі розчини тваринам вводили внутрішньоочеревинно, одноразово. Доза введеного фулерену становила 1 мг/кг маси. ВРФС₆₀ готували за методикою, яка ґрунтується на переведенні молекул C₆₀ з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком [18]. Відомо, що отриманий таким чином розчин є типовою колоїдною системою, яка містить як поодинокі молекули C₆₀, так і сферичні агрегати діаметром 2-50 нм. Через 1 і 5 діб після введення розчинів проводився забір зразків крові з абдомінальної аорти за допомогою одноразових трикомпонентних шприців («BD Micro-Fine Plus», США), після чого тварин виводили з експерименту.

Гематологічні дослідження. На автоматичному гематологічному аналізаторі «Mindray BC-3600» («Mindray», КНР) у цільній крові визначали: абсолютний вміст лейкоцитів (WBC), абсолютний вміст еритроцитів (RBC), концентрацію гемоглобіну (HbC), гематокрит (HCT), абсолютний вміст тромбоцитів (PLT), середній об'єм еритроцита (MCV), середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH), середню концентрацію гемоглобіну в еритроцитарній масі (MCHC), стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом (RDW-SD), коефіцієнт варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом (RDW-CV) та лейкоцитарну формулу.

Біохімічні дослідження. У сироватці крові визначали на напівавтоматичному аналізаторі RT-9200 («Rayto», КНР) з використанням наборів реагентів «Bio Systems» (Іспанія): вміст загального білка, креатиніну, сечовини, активність аспартатамінотрансферази (АСТ), аланінамінотрансферази (АЛТ) і лужної фосфатази (ЛФ).

Вивчення в'язко-еластичних властивостей еритроцитів (тест гіпотонічного лізису). Осмотичну крихкість еритроцитів досліджували в ізотонічному (150 ммоль/л) і гіпотонічних (40-100 ммоль/л) розчинах хлориду натрію (NaCl). Для цього еритроцити відмивали від плазми крові центрифугуванням (3000 об/хв, 3 хв) у 10-кратному об'ємі фізіологічного середовища (150 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л фосфатного буфера, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше ніж 4 год при 0°C. Для отримання вихідної суспензії еритроцитів 50 мкл осаду клітин переносили в 0,5 мл фізіологічного середовища (150 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л фосфатного буфера, рН 7,4). Гіпотонічний лізис еритроцитів здійснювали внесенням аліквоти вихідної суспензії клітин (10 мкл) у 2,0 мл розчину NaCl з концентраціями в діапазоні 40-100 ммоль/л при 20°C. Динаміку гіпотонічного гемолізу еритроцитів

вивчали на спектрофотометрі СФ-4А (АТ «ЛОМО», Росія). Рівень гемолізу еритроцитів визначали за змінами оптичної щільності суспензії еритроцитів (довжина хвилі 720 нм) і розраховували за формулою:

$$\text{гемоліз} = (1 - A/A_0) \cdot 100\%,$$

де А – оптична щільність досліджуваного зразка після завершення гемолізу; А₀ – оптична щільність контрольного зразка (яка відповідає 0 %-му рівню гемолізу).

Статистичний аналіз. Статистичну обробку отриманих результатів виконували з використанням програми Statistika 8 («StatSoft», США). Середні значення показників в групах порівнювали, використовуючи непараметричний U-критерій Манна-Уїтні. Вірогідними вважали значення при P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив ВРФС₆₀ in vivo на гематологічні та біохімічні показники крові щурів. Встановлено, що у тварин ІV групи значущих змін гематологічних та біохімічних показників порівняно з І групою не спостерігалось (табл. 1).

Застосування ВРФС₆₀ у концентраціях 34,7 та 173 мкмоль/л супроводжувалося розвитком незначного анізоцитозу щодо значень у інтактних тварин. Так, RDW-SD збільшувалося на 15 і 12 % на 1-шу добу та на 13 і 18 % на 5-ту добу у групах ІІ і ІІІ відповідно. При цьому MCV залишався на рівні інтактного контролю, за винятком ІІ групи, у котрій на 5-ту добу цей показник збільшився на 14 % щодо значень І групи. Крім того, в групі ІІ на 1-шу добу експерименту спостерігався лейкоцитоз з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів на 64 % щодо інтактних тварин. У ІІІ групі на 5-ту добу знижувалися показники HbC (на 11 %) і RBC (на 18 %) відносно значень І групи. Це можна пояснити помірним гемолізом еритроцитів, оскільки значення HCT, MCH та MCHC між цими групами істотно не розрізнялися. Таким чином, введення ВРФС₆₀ в концентраціях 34,7 та

Таблиця 1. Гематологічні показники тварин після введення водних колоїдних розчинів флуеренів S_{60} (ВРФС₆₀) у різних концентраціях (М±σ, n=7)

Показник	Інтактний контроль	Контроль (введення фізіологічного розчину)	ВРФС ₆₀ , 34,7 мкмоль/л		ВРФС ₆₀ , 173 мкмоль/л	
			1-ша доба	5-та доба	1-ша доба	5-та доба
Абсолютний вміст лейкоцитів, $\times 10^9$ /л	11,83±1,67	11,93±2,28	16,06±1,66**, **	13,66±3,41	11,71±1,20	11,57±2,71
Концентрація гемоглобіну в цільній крові, г/л	140,29±8,14	135,57±3,64	132,43±4,54	130,14±7,54	135,43±4,04	125,86±3,39**, **
Абсолютний вміст еритроцитів, $\times 10^{12}$ /л	7,63±0,38	7,46±0,25	6,80±0,25	6,44±0,43	7,46±0,47	6,64±0,34**, **
Гематокрит, %	43,52±3,37	41,41±3,44	42,07±1,80	41,66±2,36	44,97±1,36	38,51±1,39
Середній об'єм еритроцита, фл	57,06±3,17	57,63±1,02	61,79±1,61	64,84±1,05**, **	60,70±2,37	58,26±3,36
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	18,30±0,54	18,33±0,31	18,76±0,94	18,94±1,36	17,83±1,04	18,94±0,85
Середня концентрація гемоглобіну в еритроцитарній масі, г/л	321,71±11,00	317,71±5,50	314,86±3,76	315,00±8,68	304,86±6,12	325,57±6,21
Коефіцієнт варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом, %	13,64±1,00	13,29±0,67	14,20±0,48	14,79±0,61	14,01±0,91	16,03±0,60**, **
Стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом, фл	26,93±0,80	27,4±0,88	31,01±0,49**, **	33,71±1,28**, **	30,23±1,15**, **	31,70±2,89**, **
Абсолютний вміст тромбоцитів, $\times 10^9$ /л	374,00±46,37	414,29±70,93	436,14±48,25	481,57±91,72	449,43±47,36	460,43±61,06
Лейкоцитарна формула						
Паличкоядерні нейтрофіли, %	1,29±0,49	1,29±0,49	1,43±0,53	1,14±0,38	1,14±0,38	1,43±0,79
Сегментоядерні нейтрофіли, %	17,57±2,99	16,57±3,05	28,86±7,38**, **	19,57±4,20	16,29±6,32	18,29±3,90
Еозинофіли, %	6,86±2,12	7,14±5,49	6,43±3,51	4,57±3,10	8,57±3,64	7,29±3,04
Лімфоцити, %	70,29±5,74	71,57±6,60	60,43±7,68	72,86±3,63	71,00±11,17	69,57±3,74
Моноцити, %	1,71±0,95	3,43±1,81	2,86±1,68	1,86±1,35	3,00±3,06	3,43±2,07

Примітка. Тут і в табл. 2 * P<0,05 порівняно з інтактними тваринами; ** P<0,05 порівняно з контролем.

173 мкмоль/л супроводжувалося помірним гемолізом, анізоцитозом і транзиторним лейкоцитозом.

Дослідження біохімічних показників сироватки крові показало, що в II групі на 1-шу добу експерименту активність АСТ і АЛТ зростала на 91,7 і 97,5 % відповідно порівняно з тваринами I групи, а ЛФ значуще не змінювалася (табл. 2). Через 5 діб ці показники були на рівні контролю. У разі застосування ВРФС60 в концентрації 173 мкмоль/л вони не відрізнялися від контролю протягом всього терміну спостереження. На нашу думку, це пояснюється меншим проникненням фулерену C₆₀ з більш концентрованого розчину в системний кровотік у результаті агрегації і випадання в осад, що підтверджувалося при візуальній оцінці місця введення під час аутопсії (рис. 1). Відомо, що вихід амінотрансфераз у кровотік відбувається при пошкодженні клітинних мембран, яке в свою чергу лежить в основі первинного механізму токсичності більшості з'єднань. Найбільш висока активність трансаміназ і, особливо АЛТ, визначається в печінці, менш виражена – в міокарді, скелетних м'язах, нирках та інших органах. Таким чином, підвищення активності АСТ і АЛТ, що спостерігається після внутрішньоочеревинного

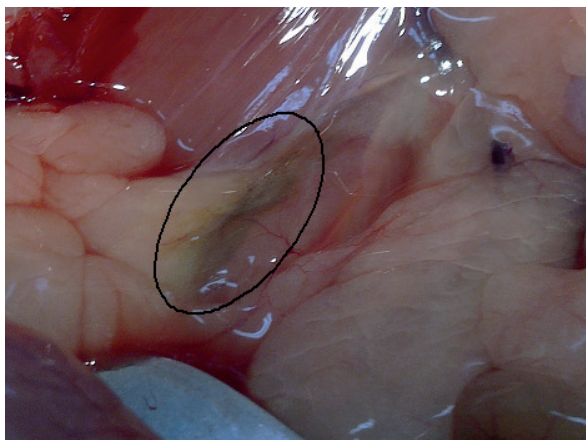


Рис. 1. Агрегація і осадження фулерену C₆₀ (обведено лінією) в місці ін'єкції концентрованого його розчину при аутопсії

Таблиця 2. Біохімічні показники тварин після введення водних колоїдних розчинів фулеренів С60 (ВРФС60) у різних концентраціях (М±σ, n=7)

Показник	Інтактний контроль	Контроль (введення фізіологічного розчину)	ВРФС ₆₀ , 34,7 мкмоль/л		ВРФС ₆₀ , 173 мкмоль/л	
			1-ша доба	5-та доба	1-ша доба	5-та доба
Загальний білок, г/л	63,16±2,52	65,35±1,22	64,018±3,63	64,11±2,67	61,78±5,33	62,73±3,8
Аланінамінотрансфераза, Од/л	37,39±3,68	36,17±3,08	73,83±22,99*,**	40,26±4,57	38,77±1,68	37,73±2,19
Аспаратамінотрансфераза, Од/л	106,14±13,88	117,19±27,53	203,44±66,67*,**	110,63±12,71	110,23±10,90	109,73±1,47
Лужна фосфатаза, Од/л	142,00±3,79	156,52±28,48	147,82±25,85	141,41±17,04	144,74±14,92	150,16±25,27
Сечовина, ммоль/л	3,56±0,28	3,10±0,44	3,92±0,80	3,27±0,33	3,44±0,51	3,65±0,39
Креатинін, мкмоль/л	75,40±9,48	72,27±10,46	73,31±15,12	75,27±12,56	67,54±12,42	80,66±9,71

введення ВРФС₆₀, є в першу чергу маркером пошкодження гепатоцитів, міоцитів серцевої та/або скелетної мускулатури. З цього можна зробити висновок, що він має короточасний токсичний вплив на клітини печінки та/або м'язової тканини та не пошкоджує нирки, про що свідчить відсутність змін вмісту креатиніну, сечовини та активності ЛФ в сироватці крові (див. табл. 2).

Отримані результати узгоджуються з раніше опублікованими даними про вплив немодифікованого фулерену С₆₀ на організм лабораторних тварин при його пероральному і інгаляційному шляхах введення. Так, Шипелін і співавт. [19] в експерименті на щурах показали, що щоденне застосування фулерену С₆₀ рег ос протягом 28 діб в дозах 1 і 10 мг/кг у вигляді дисперсії в речовинах, дозволених для використання в складі їжі, впливало на відносну масу печінки, активність ізоформи СУР 1А2 і глутатіонредуктази, кількість еозинофілів, нейтрофілів і лімфоцитів. Хоча будь-яких змін показників активності АЛТ і АСТ, ЛФ, концентрації загального білка, альбуміну, креатиніну, сечової кислоти, глюкози в сироватці крові авторами відзначено не було. У цій роботі так само описано зниження кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну в цільній крові, але оскільки відмінність показників у тварин, які отримували фулерен і його носій, була недостовірною, автори зробили висновок про відсутність специфічного впливу фулерену на ці показники.

Вакер і співавт. [23] відзначали вже статистично значуще мінімальне зниження вмісту еритроцитів, гемоглобіну і гематокриту у щурів після 10-добового інгаляційного введення наночасток фулерену С₆₀ в концентрації 2,22 мг/м³. Так само були виявлені мінімальні зміни в сироватці крові. В результаті автори дійшли висновку, що токсичні ефекти фулеренів можуть проявлятися при більш тривалому їх введенні.

Зіставивши отримані нами результати і дані літератури можна побачити, що подібно до перорального і інгаляційного шляхів, вну-

трішньоочеревинне введення ВРФС₆₀ щурам у дозі фулерену 1 мг/кг викликає мінімальний короточасний токсичний вплив незалежно від його концентрації в розчині, що проявляється помірним гемолізом, анізоцитозом, транзиторним лейкоцитозом, а також підвищенням активності АСТ і АЛТ у плазмі крові.

В'язко-еластичні властивості еритроцитів при введенні ВРФС₆₀. Завдяки нанорозмірам і ліпофільності фулерен С₆₀ здатний взаємодіяти з біомолекулами та проникати у мембрани клітин, змінюючи їх фізико-хімічні властивості [10, 18]. Він може легко проникати в модельні ліпідні мембрани, призводячи до збільшення впорядкованості мембранних ліпідів, стовщення мембрани і зниження її еластичності [20]. При дослідженні впливу водної дисперсії фулерену С₆₀ на еритроцити *in vitro* було встановлено, що він має гемолітичну активність, а ступінь гемолізу клітин залежить від його концентрації [21]. Беручи до уваги цей факт, ми дослідили вплив ВРФС₆₀ на в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів *in vivo*.

Нами показано, що у фізіологічному (150 ммоль/л) розчині NaCl у жодній групі гемолізу еритроцитів не відбувалося. Для дослідження прихованих змін в'язко-еластичних властивостей мембрани еритроцитів використовували гіпотонічні розчини NaCl, в умовах яких було виявлено, що після введення ВРФС₆₀ підвищувалася осмотична крихкість еритроцитів (рис. 2). Так, у II і III групах на 1-шу добу підвищувався рівень гемолізу еритроцитів на 30 і 60 % в 70 ммоль/л розчині NaCl і на 46 і 60 % в 60 ммоль/л розчині NaCl відповідно. На 5-ту добу в II групі він залишався високим у таких розчинах NaCl, тоді як в III групі спостерігали зниження цього показника відносно 1-ї доби на 20 % в 60 ммоль/л NaCl і до рівня інтактного контролю в 70 ммоль/л NaCl.

Відомо, що гетерогенність популяції еритроцитів зумовлена різними віковими характеристиками клітин. У процесі старін-

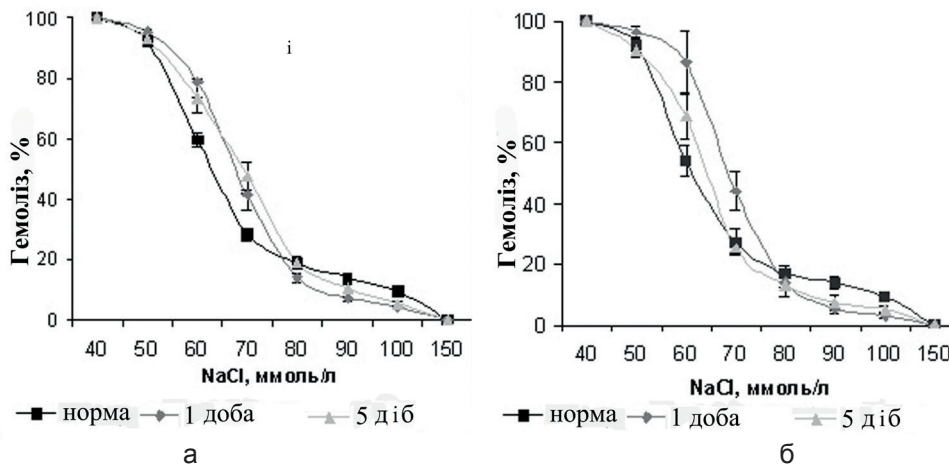


Рис. 2. Осмотична крихкість еритроцитів у гіпотонічних розчинах NaCl: а – після введення ВРФС₆₀ в концентрації 34,7 мкмоль/л; б – після введення ВРФС₆₀ в концентрації 173 мкмоль/л

ня еритроцитів в їх мембрані накопичується холестерин, фосфоліпіди з більш високим вмістом жирних кислот, виникає необоротна агрегація спектрину і гемоглобіну, що викликає порушення структури мембрани, форми еритроцитів (з дискоцитів вони перетворюються в сфероцити) і їх пластичності [22]. Фулерени, накопичуючись в мембрані, додатково змінюють її фізико-хімічні властивості, тим самим збільшуючи гетерогенність популяції клітин. В умовах *in vivo* це може призводити до зміни здатності еритроцитів до деформації та проходження по капілярах, розміри яких менше за діаметр клітини, в результаті чого еритроцити піддаються гемолізу [21]. Можливо саме з цим фактом і пов'язані виявлені нами зниження кількості еритроцитів і анізоцитоз після внутрішньоочеревинного введення ВРФС₆₀.

Таким чином, внутрішньоочеревинне введення ВРФС₆₀ щурам у дозі 1 мг/кг, що був застосований в концентраціях 34,7 та 173 мкмоль/л, супроводжувалося короткочасними транзиторними ефектами: гемолізом еритроцитів, анізоцитозом, лейкоцитозом, підвищенням активності АЛТ, АСТ. На 5-ту добу в обох експериментальних групах більшість показників гематологічного та біохімічного аналізів були на рівні контролю. ВРФС₆₀

впливає на в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів, збільшуючи їх чутливість до гіпотонії. Отримані результати вказують на перспективу подальшого дослідження оптимальних умов застосування терапевтичного потенціалу ВРФС₆₀.

Висловлюємо подяку доктору фіз.-мат. наук, професору Прилуцькому Ю.І. (Київський національний університет імені Тараса Шевченка) за надані зразки ВРФС₆₀.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

А.А. Власов, Г.А. Ковалев, И.В. Белочкина, И.А. Ефимова, Б.П. Сандомирский

ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КРЫС

Исследовано влияние водного коллоидного раствора немодифицированного фуллерена C₆₀ (ВРФС₆₀) при его внутрибрюшинном введении в дозе 1 мг/кг, который был

использован в различных концентрациях, на гематологические показатели, вязко-эластичные свойства мембраны эритроцитов и биохимические параметры сыворотки крови крыс. Установлено, что ВРФС₆₀ при введении в концентрациях 34,7 и 173 мкмоль/л вызвал умеренный анизоцитоз: увеличивалось стандартное отклонение относительной ширины распределения эритроцитов по объему на 15 и 12% в 1-е сутки и на 13 и 18% на 5-е сутки соответственно. Кроме того, повышалась чувствительность эритроцитов к гипотонии. Так, на 1-е сутки уровень гемолита увеличился на 30 и 60% в 70 ммоль/л растворе NaCl и на 46 и 60% в 60 ммоль/л растворе NaCl соответственно для разведений 34,7 и 173 мкмоль/л. Введение ВРФС₆₀ в концентрации 173 мкмоль/л на 5-е сутки эксперимента вызвало умеренный гемолиз (содержание гемоглобина в крови снижалось на 11%, а абсолютное количество эритроцитов – на 18%). Применение ВРФС₆₀ в концентрации 34,7 мкмоль/л на 1-е сутки эксперимента сопровождалось переходящим лейкоцитозом (36%) с повышением содержания сегментоядерных нейтрофилов на 60% и ростом активности аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы на 91,7 и 97,5% соответственно. Таким образом, введение ВРФС₆₀ мало минимальную токсичность независимо от концентрации.

Ключевые слова: водный коллоидный раствор немодифицированного фуллерена C₆₀ (ВРФС₆₀); гематологические показатели; вязко-эластичные свойства мембраны эритроцитов; биохимические показатели сыворотки крови; крысы.

О.О. Vlasov^{1,2}, G.A. Kovalov¹, I.V. Belochkina¹, I.A. Iefimova³, B.P. Sandomirsky¹

EFFECT OF AQUEOUS COLLOIDAL SOLUTION OF FULLERENE C₆₀ ON HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICES OF RAT BLOOD

The effect of unmodified fullerene C₆₀ aqueous colloidal solution (FASC₆₀) after intraperitoneal administration at a dose of 1 mg/kg, which was used in various concentrations, on hematological parameters, visco-elastic properties of the erythrocyte membrane and the biochemical parameters of blood serum of rats was studied. It was found that FASC₆₀ at concentrations of 34.7 and 173 μmol/l induced moderate anisocytosis: the standard deviation of the relative width of the red blood cell distribution by volume increased by 15 and 12% on day 1 and by 13 and 18% on day 5 respectively. In addition, the sensitivity of erythrocytes to hypotension increased. Thus, on day 1 the level of hemolysis increased by 30 and 60% in 70 mmol/l NaCl solution and by 46 and 60% in 60 mmol/l NaCl solution for dilutions of 34.7 and 173 μmol/l respectively. Administration of FASC₆₀ at a concentration of 173 μmol/l on day 5 caused moderate hemolysis (the hemoglobin content in the blood decreased by 11%, and the absolute amount of erythrocytes decreased by 18%). The use of FASC₆₀ at a concentration of

34.7 μmol/l on day 1 of the experiment was accompanied by transient leukocytosis (36%) with increasing in the content of segmented neutrophils by 60% and increasing in the activity of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase by 91.7 and 97.5% respectively. Thus, the administration of FASC₆₀ has little toxicity, regardless of concentration.

Key words: water colloidal solution of unmodified fullerene C₆₀ (FASC₆₀); hematological parameters; elastic properties of erythrocyte membrane; biochemical parameters of blood serum; rats.

¹ *Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkov;*

² *V.N. Karazin Kharkiv National University;*

³ *Kharkiv Regional Clinical Traumatological Hospital, Kharkov, Ukraine; e-mail: vlasovmd@gmail.com*

REFERENCES

1. Castro E, Hernandez Garcia A, Zavala G, Echegoyen L. Fullerenes in Biology and Medicine. *J Mater Chem B*. 2017;5(32):6523-35.
2. Prylutskiy YI, Vereshchaka IV, Maznychenko AV et al. C₆₀ fullerene as promising therapeutic agent for correcting and preventing skeletal muscle fatigue. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):8.
3. Nozdrenko DM, Bogutska KI, Prylutskiy YI et al. Impact of C₆₀ fullerene on the dynamics of force-speed changes in soleus muscle of rat at ischemia-reperfusion injury. *Fiziol Zh*. 2015;61(2):48-59.
4. Franskevych DV, Grynyuk II, Prylutska SV et al. Photocytotoxic effect of C₆₀ fullerene against L1210 leukemic cells is accompanied by enhanced nitric oxide production and p38 MAPK activation. *Exp Oncol*. 2016 Jun;38(2):89-93.
5. Mamontova TV, Vesnina LE, Mikityuk MV et al. Fullerene C₆₀ inhibited free radical and destructive processes in connective tissue during adjuvant arthritis in rats. *Fiziol Zh*. 2015;61(2):80-6.
6. Volkova N, Yukhta M, Pavlovich O, Goltsev A. Application of cryopreserved fibroblast culture with au nanoparticles to treat burns. *Nanoscale Res Lett*. 2016; 11: 22.
7. Ha Ye, Katz L, Liljestrang H. Distribution of fullerene nanoparticles between water and solid supported lipid membranes: thermodynamics and effects of membrane composition on distribution environ. *Sci Technol*. 2015; 49(24): 14546-53.
8. Wang I, Tai L, Lee D. C₆₀ and water-soluble derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. *J Med Chem*. 1999; 42: 4614-20.
9. Piotrovskiy L, Yeropkin M, Yeropkina Y, Dumpis M, Kiselev I. Mechanisms of the biological action of fullerenes – dependence on the aggregate state. *Psikhofarmakol Biol Narkol*. 2007; 7(2); 1548-54.
10. Andreichenko KS, Prylutska SV, Medynska KO, Bogutska KI, Nurishchenko NE, Prylutskiy YI, et al. Effect of fullerene C₆₀ on ATPase activity and superprecipitation

- of skeletal muscle actomyosin. Ukr Biokhim Zh. 2013;85(2):20-6.
11. Prylutska SV, Kichmarenko YM, Bogutska KI, Prylutsky YI. Fullerene C₆₀ and its derivatives as anticancer agents: problems and prospects. Biotechnologia Acta. 2012; 5(3): 9-17.
 12. Nielsen G, Roursgaard M, Jensen K, Poulsen S, Larsen S. In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008, 103 (3):197-208.
 13. Fujita K, Morimoto Y, Ogami A, Myojo T, Tanaka I, Shimada M, et al. Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C₆₀ fullerene particles. Toxicology. 2009;258:47-55.
 14. Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB. Comparative pulmonary toxicity assessments of C₆₀ water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. Nano Lett. 2007; 7: 2399-2406.
 15. Belochkina IV, Ishchenko IO, Prylutska SV, Bogutska KI, Cherepanov VV, Sandomirskiy BP. Effect of C₆₀ fullerene on metabolic and proliferative activity of PKE cell line. The Ukrainian Biochem J. 2014; 86(2): 129-33.
 16. Prylutska SV, Matyshevska OP, Golub AA et al. Study of C₆₀ fullerenes and C₆₀-containing composites cytotoxicity in vitro. Mater Sci Engineer. C. 2007; 27: 1121-4.
 17. Prylutska SV, Rotko DM., Prylutsky YI, Rybalchenko VK. Toxicity of carbon nanostructures in systems in vitro and in vivo. Suchasni Problemy Toksykologiyi. 2012; 3-4; 49-57. [Russian].
 18. Ritter U, Prylutsky Yu, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov VV, Senenko AI, et al. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2014; 23: 530-4.
 19. Shipelin VA, Arianova EA, Trushina EN, Avrenyeva LI, Batishcheva SY, Cherkashin AV, et al. Toxicological and sanitary characterization of fullerene C₆₀ administered through the rat gastrointestinal tract. Hygiene and Sanitation. 2012; 2: 90-4. [Russian].
 20. Wong-Ekkabut J, Baoukina S, Triampo W, et al. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. Nat Nanotechnol. 2008; 3: 363-8.
 21. Shpakova NM, Nipot EE, Ishchenko IO, Prylutska SV, Bogutska KI, Cherepanov VV, et al. Effect of C₆₀ fullerene on viscoelastic properties of human erythrocytes membrane. Physiol J. 2014; 60(5): 82-8. [Ukrainian].
 22. Semenovich AA, Pereverzev VA, Zinchuk VA, Korotkevich TV. Normal physiology: a textbook. Part 1. Minsk: High School, 2013. [Russian].
 23. Baker GL, Gupta A, Clark ML, Valenzuela BR, Staska LM, Harbo SJ, et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C₆₀ fullerene nanoparticles and microparticles. Toxicol Sci. 2008; 101(1): 122-31.

Матеріал надійшов до редакції 10.10.2017