

УДК 546.26+615.849.1

Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии  
им. С.П. Григорьева Академии медицинских наук Украины»  
(ГУ ИМР АМНУ)

Лаборатория противорадиационных препаратов 61024, г. Харьков,  
ул. Пушкинская, 82; тел. (8-057) 704-10-65 факс (057) 7000-500;  
e-mail-imr@online.kharkiv.com



УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора по научной работе

ГУ ИМР АМНУ

Д-р биол. наук

Н. Митряева

## ОТЧЕТ

ИСПЫТАНИЯ ПРОТИВОЛУЧЕВОГО ВЛИЯНИЯ РАСТВОРА  
ФУЛЛЕРЕНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ

Зав. лаборатории  
противорадиационных  
препаратов, канд.биол.наук,  
ст. научн. сотр.

« 15 » ~ 06 / 2009 г. Е. Мамотюк

2009

Фуллерен является третьей аллотропной формой углерода (алмаз, графит). Молекула фуллерена в устойчивом виде состоит из 60 атомов углерода, замкнутых между собой в сферу [1]. В работе [2] показаны его биологическая активность, высокие антиоксидантные и антирадикальные свойства. В ряде работ выявлены выраженные радиозащитные свойства [3]. Перспективность применения фуллеренов в биологии возросла после разработки способа получения гидратированной формы фуллеренов, растворимых в воде [4]. Поскольку многие исследования на животных проводились с применением достаточно высоких суммарных доз фуллеренов (0,1–100 мг/кг), представляло интерес испытать его противолучевые свойства, когда фуллерен C<sub>60</sub> назначается длительно в сверхмалых дозах.

Таким образом, целью работы является проверка в эксперименте на крысах противолучевой активности водного раствора, содержащего гидратированный фуллерен C<sub>60</sub> в концентрации  $2 \times 10^{-3}$  мг/л.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У облученных белых беспородных крыс (самки – 50 шт., массой 145–175 г), учитывали смертность – выживаемость за 30 суток (ЛД<sub>30</sub>), рассчитывали среднюю продолжительность жизни погибших животных (СПЖ), определяли частоту появления признаков синдрома острой лучевой болезни (ОЛБ), при этом отмечали признаки – «взъерошенность», нарушение деятельности ЖКТ («вздутый живот», «диарея»), воспаление слизистой рта («опухшая морда»), воспаление глаз («корки на глазах»), Кроме того, использовали интегральные показатели выживаемости крыс (ИПВ) и интегральный показатель частоты наличия признака у облученных крыс (ИПЧ).

Показатель ИПВ рассчитывали по формуле

$$\text{ИПВ}\% = \frac{\text{суммарное число особей каждые сутки срока наблюдения} \times 100}{\text{исходное число крыс} \times 30}, (1)$$

Т.е. рассчитывали процент общего числа облученных животных, оставшихся в живых в каждые из 30 суток, по отношению к возможной величине данного показателя в случае отсутствия смертности (100% выживания).

Показатель ИПВ (аналог в медицине – «койка-дни») является производным, косвенным показателем, который все же может обнаружить имеющиеся закономерности и на фоне большего числа вариантов, чем при обычных расчетах (по Стьюденту), установить более точно их достоверность.

Аналогичный прием применяли для расчета суммарной частоты проявления признаков ОЛБ у крыс. Этот интегральный показатель частоты (ИПЧ) определяли по формуле:

$$\text{ИПЧ}\% = \frac{\text{суммарное число определяемых признаков у выживших крыс за каждые сутки } 30\text{-суточного срока наблюдения} \times 100}{\text{суммарное возможное максимальное число признаков в каждые сутки у выживших крыс за 30 суток}}, \quad (2)$$

Помимо этого в группах облученных животных на 3, 5, 7, 10, 15, 21 и 30 сутки определяли изменения их средней массы.

Облучение животных проводили попарно в пеналах из оргстекла. Условия облучения: аппарат РУМ – 17, напряжение на трубке 190 кВ, сила тока 10 мА, тубус 40 см, мощность дозы в центре клетки 0,52 Гр/мин. Дозы облучения – 5,0 и 6,0 Гр по мягким тканям.

Водный раствор фуллеренов вводили перорально при помощи зонда по 0,5 мл за 5 дней до облучения (в последний день за 1 час до облучения) и в течение 10 дней после облучения. За 15 дней суммарная доза  $C_{60}$ , полученная животным, составила  $3,7 \times 10^{-5}$  мг/кг

Серии опытов:

1. Облучение 5,0 Гр – 30 крыс (О5);
2. Введение фуллеренов и облучение 5,0 Гр – 20 крыс (Ф+О5);
3. Облучение 6,0 Гр – 18 крыс (О6) ;
4. Введение фуллеренов и облучение 6,0 Гр – 20 крыс (Ф+О6).

Результаты опытов обрабатывались статистически с использованием лицензионной программы Statistica for Windows v.5.0. При этом определялась достоверность различий с использованием критерий Стьюдента, точного метода Фишера и  $\chi^2$ -критерия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У всех крыс, подвергшихся однократному тотальному рентгеновскому облучению, развивалась типичная острая лучевая болезнь, зависящая от дозы излучения и введения per os раствора фуллеренов. Это можно было видеть по частоте возникновения и длительности протекания характерных лучевых синдромов, изменению массы животных, их общего состояния и по показателям выживаемости после воздействий.

Так при дозе облучения в 5,0 Гр у части крыс на протяжении всего срока наблюдения отмечалась «взъерошенность», у отдельных крыс воспаление полости рта («опухшая морда») и у многих – глаз («корки на глазах»). Смертность за 30 дней лучевой болезни составляла (36,7–8,8) % (табл. 1) при средней продолжительности жизни погибших животных ( $14,7 \pm 0,85$ ) суток (табл. 2). Введение раствора фуллеренов облученным животным по вышеприведенной схеме, существенно снизило тяжесть лучевой болезни. Свидетельством этому явилось достоверное до ( $5,0 \pm 4,9$ ) % ( $p = 0,0045$ ) снижение смертности, а также достоверное ( $p = 0,0000$ ) увеличение показателя ИПВ (табл. 3).

В пользу практически-лечебного действия растворов фуллеренов в условиях рентгеновского облучения крыс говорит и динамика выживаемости животных, представленная в табл. 4 и на рис. 1.

Из них следует, что лучевая гибель животных при 5,0 Гр облучения начинается в двух группах с 10 суток, но динамика гибели крыс в группе без введения фуллеренов более выразительна и с 17 суток становится достоверно более интенсивной ( $p = 0,0048$ ).

Таблица 1 – Показатель смертности крыс в опытах с рентгеновским облучением и введением раствора фуллеренов

№ n/n	Серия опытов	n	Погибло	%	Сравниваемые серии	p
1	О 5,0 Гр	30	11	$36,7 \pm 8,8$	1–2	0,0045
2	Ф+О 5,0 Гр	20	1	$5,0 \pm 4,9$	–	–
3	О 6,0 Гр	18	12	$66,7 \pm 11,1$	3–4	> 0,2
4	Ф+О 6,0 Гр	20	11	$55,0 \pm 11,1$	–	–

Таблица 2 – Средняя продолжительность жизни погибших крыс в опытах с рентгеновским облучением и введением раствора фуллеренов (сутки)

№ n/n	Серия опытов	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	Сравниваемые серии	p
1	О 5,0 Гр	$14,73 \pm 0,85$	–	–
2	Ф+О 5,0 Гр	10,0	–	–
3	О 6,0 Гр	$10,8 \pm 0,95$	3–4	0,160
4	Ф+О 6,0 Гр	$13,6 \pm 1,77$	–	–

Таблица 3 – Изменение интегрального показателя выживаемости (ИПВ%) в опытах с рентгеновским облучением и введением крысам раствора фуллеренов

№ n/n	Серия опытов	Суммарная частота выживаемости крыс	ИПВ%	Сравниваемые серии	p
1	О 5,0 Гр	740 из 900	$82,2 \pm 1,27$	1–2	0,000
2	Ф+О 5,0 Гр	579 из 600	$90,5 \pm 0,75$	–	–
3	О 6,0 Гр	297 из 540	$55,0 \pm 2,14$	3–4	0,000
4	Ф+О 6,0 Гр	409 из 600	$68,2 \pm 1,9$	–	–

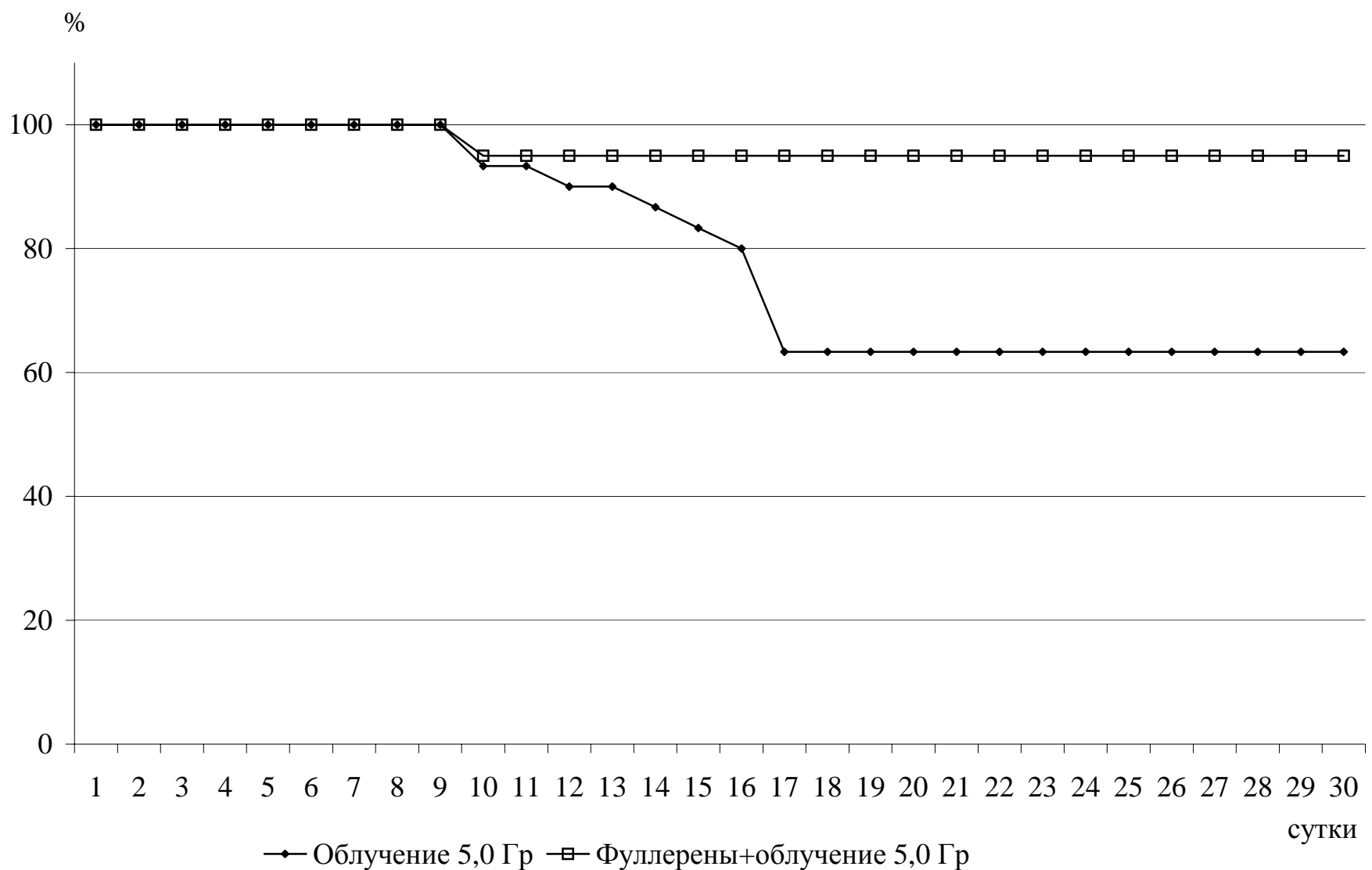


Рисунок 1 – Выживаемость крыс в опытах с рентгеновским облучением в дозе 5,0 Гр и введением раствора фуллеренов

Таблица 4 – Динамика выживаемости крыс в опытах с рентгеновским облучением и введением раствора фуллеренов

Сутки	О 5,0 Гр		Ф+О 5 Гр		О 6 Гр		Ф+О 6 Гр	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1	30	100	20	100	18	100	20	100
2	30	100	20	100	18	100	20	100
3	30	100	20	100	18	100	20	100
4	30	100	20	100	18	100	20	100
5	30	100	20	100	18	100	20	100
6	30	100	20	100	18	100	20	100
7	30	100	20	100	17	94,4	20	100
8	30	100	20	100	16	88,9	20	100
9	30	100	20	100	12	66,7	17	85
10	28	93,3	19	95	11	61,1	16	80
11	28	93,3	19	95	9	50	13	65
12	27	90,0	19	95	9	50	13	65
13	27	90,0	19	95	8	44,4	13	65
14	26	86,7	19	95	7	38,9	13	65
15	25	83,3	19	95	7	38,9	12	60
16	24	80,0	19	95	7	38,9	11	55
17	19	63,3	19	95	7	38,9	11	55
18	19	63,3	19	95	7	38,9	11	55
19	19	63,3	19	95	6	33,3	11	55
20	19	63,3	19	95	6	33,3	11	55
21	19	63,3	19	95	6	33,3	11	55
22	19	63,3	19	95	6	33,3	11	55
23	19	63,3	19	95	6	33,3	10	50
24	19	63,3	19	95	6	33,3	10	50
25	19	63,3	19	95	6	33,3	9	45
26	19	63,3	19	95	6	33,3	9	45
27	19	63,3	19	95	6	33,3	9	45
28	19	63,3	19	95	6	33,3	9	45
29	19	63,3	19	95	6	33,3	9	45
30	19	63,3	19	95	6	33,3	9	45

При анализе изменения массы животных отдельно учитывались показатели для выживших и погибших особей к 30 суткам. Рис. 2 иллюстрирует диаметрально противоположную динамику изменений средней массы для выживших и погибших животных, которая выражается в прогрессивном и достоверном увеличении прироста массы к 30 суткам у выживших крыс. При этом введение раствора фуллеренов при облучении мало влияет на среднюю массу выживших животных. Отмечен лишь несколько больший, но незначимый, прирост только на 10 и 15 сутки, а дальше различия не выявлены. У погибших крыс, получавших раствор фуллеренов, из-за малого их числа, можно отметить наличие более высокой массы на 3–7 сутки, превосходящей исходную.

Введение раствора фуллеренов облученным крысам влияет на часть показателей частоты появления признаков ОЛБ (табл. 5).

Так, показатель общего состояния животных – «взъерошенность» в группе Ф+О5 достоверно реже наблюдается в течение 30 суток, показатель ИПЧ с  $(11,2 \pm 1,16)$  % при одном облучении снижается до  $(2,4 \pm 1,78)$  % при дополнительном введении фуллеренов ( $p = 0,0000$ ). Последнее полностью снижает синдром воспаления слизистой рта, но практически не влияет на частоту признаков воспаления слизистой глаз. Отсутствует также положительное действие раствора фуллеренов и по частоте появления признаков лучевого поражения ЖКТ (табл. 6).

Приведенные выше данные показывают, что исследуемый раствор фуллеренов при ОЛБ средней тяжести ( $ЛД_{36,7/30}$ ) оказывает по ряду показателей противолучевое (профилактически-лечебное) действие на облученных животных, проявляющееся в снижении смертности и уменьшении частоты части характерных признаков болезни.

Эксперименты с более тяжелой формой ОЛБ подтверждают и расширяют это положение. Облучение крыс в дозе 6,0 Гр вызывает у них развитие ОЛБ с  $ЛД_{66,7/30}$  при средней продолжительности жизни погибших животных  $(10,8 \pm 0,95)$  суток (табл. 1, 2).



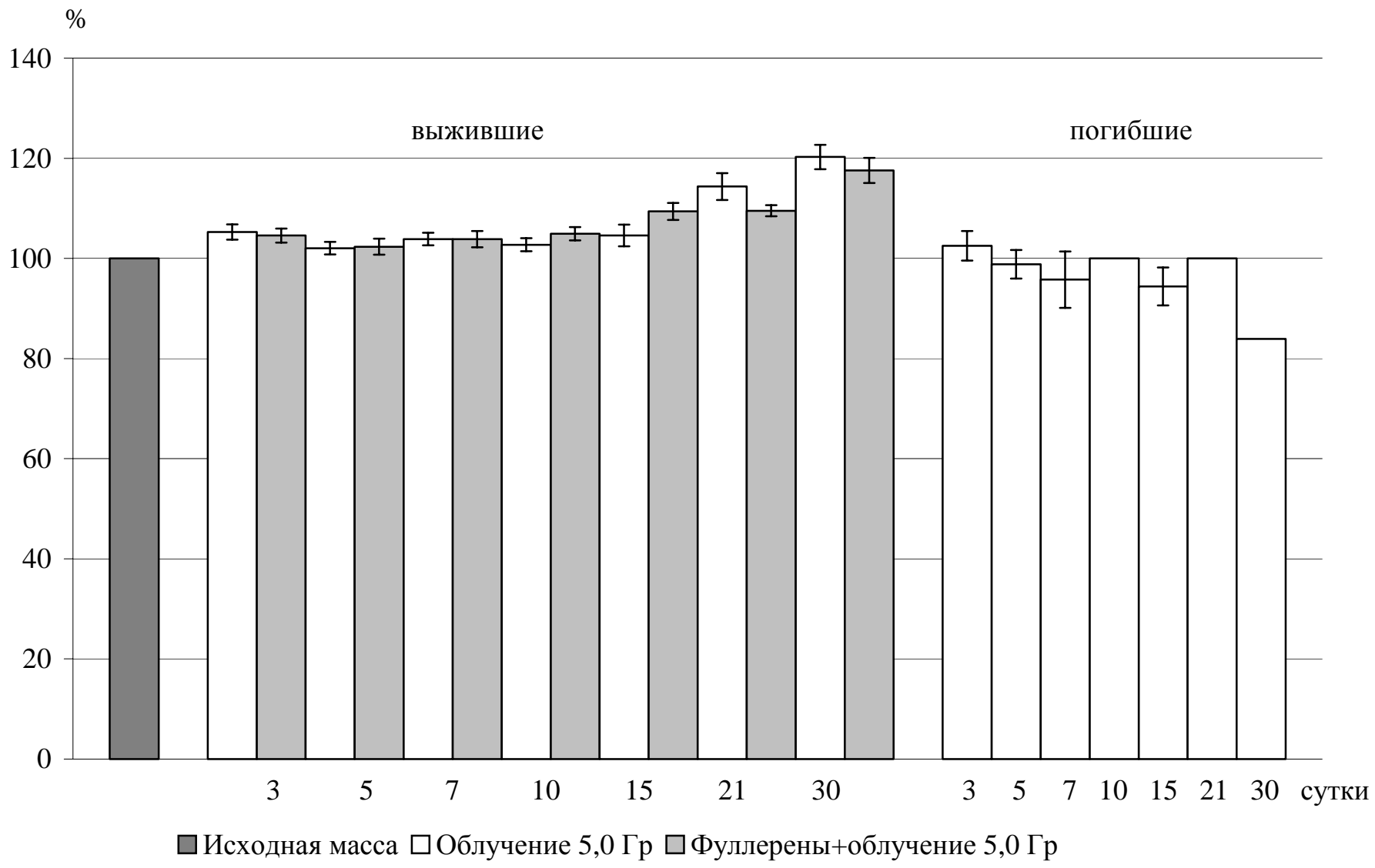


Рисунок 2 – Изменение массы крыс в опытах с рентгеновским облучением (5,0 Гр) и введением раствора фуллеренов

Таблица 5 – Частота появления за 30 суток признаков острой лучевой болезни у крыс в опытах с рентгеновским облучением и введением фуллеренов

№ п/п	Признак и серия	Начало-конец, сут.	Максимум, сут.	Частота появления	Показатель ИПЧ%	Сравниваемые группы	p (по $\chi^2$ )
1	Взъерошенность О 5,0 Гр	3–30	3–10 25–30	83 из 740	11,2 ± 1,16	1–2	0,000
2	Взъерошенность Ф+О 5,0 Гр	3–17	3–4	14 из 579	24,2 ± 1,78	–	–
3	Взъерошенность О 6,0 Гр	3–30	3–5 7–13	64 из 297	21,5 ± 2,40	3–4	0,945
4	Взъерошенность Ф+О 6,0 Гр	3–30	5–12	90 из 409	22,0 ± 2,0	–	–
5	Опухшая морда О 5,0 Гр	7–9	7	3 из 740	0,41 ± 0,23	5–6	0,341
6	Опухшая морда Ф+О 5,0 Гр	0	0	0 из 579	0	–	–
7	Опухшая морда О 6,0 Гр	7–28	7–10	31 из 297	10,4 ± 1,77	7–8	0,103
8	Опухшая морда Ф+О 6,0 Гр	6–24	9–10	61 из 409	14,9 ± 1,76	–	–
9	Корки на глазах О 5,0 Гр	3–30	3–8 10–14	208 из 740	28,1 ± 1,65	9–10	0,712
10	Корки на глазах Ф+О 5,0 Гр	3–21	4–10	169 из 579	29,2 ± 1,89	–	–
11	Корки на глазах О 6,0 Гр	3–30	5–13	140 из 297	47,1 ± 3,0	11–12	0,520
12	Корки на глазах Ф+О 6,0 Гр	3–30	6–10	204 из 409	49,9 ± 2,47	–	–

Таблица 6 – Частота появления за 30 суток признаков лучевого поражения ЖКТ у крыс в опытах с рентгеновским облучением и введением раствора фуллеренов

№ п/п	Признак и серия	Начало-конец, сут.	Максимум, сут.	Частота появления	Показатель ИПЧ%	Сравниваемые группы	p (по $\chi^2$ )
1	Вздутый живот О 5,0 Гр	3	3	16 из 740	$2,16 \pm 0,53$	1–2	0,744
2	Вздутый живот Ф+О 5,0 Гр	3–4	3	15 из 579	$2,59 \pm 0,66$	–	–
3	Диарея О 5,0 Гр	3	3	2 из 740	$0,27 \pm 0,19$	3–4	0,796
4	Диарея Ф+О 5,0 Гр	3–4	3–4	2 из 579	$0,34 \pm 0,24$	–	–
5	Вздутый живот О 6,0 Гр	3–18	3	17 из 297	$5,72 \pm 1,35$	5–6	0,344
6	Вздутый живот Ф+О 6,0 Гр	3–5	3	16 из 409	$3,91 \pm 0,48$	–	–
7	Диарея О 6,0 Гр	3–6	3–4	23 из 297	$7,74 \pm 1,55$	7–8	0,208
8	Диарея Ф+О 6,0 Гр	3–8	3–5	21 из 409	$5,13 \pm 1,09$	–	–

У облученных животных наблюдались все описанные выше характерные признаки ОЛБ, частота проявления и длительность которых существенно выше, чем при меньшей дозе радиации (табл. 5).

Сравнительный анализ изменений в двух группах облученных крыс с введением и без введения раствора фуллеренов, выявляют существенные различия в их закономерностях. Это прежде всего следует из динамики выживаемости животных (рис. 3, табл. 4). При одном облучении в дозе 6,0 Гр начало гибели происходит на 7 сутки. Введение раствора фуллеренов увеличивает этот срок до 9 суток. В период массовой гибели животных

(9–11 сутки) процент гибнущих крыс практически совпадает. Однако, поздняя гибель облученных животных различается несколько сильнее. При одном облучении поздняя гибель наблюдается на 13–19 сутки (при средней продолжительности в этот период – 15,9 суток), а в группе крыс с введением раствора фуллеренов на 15–26 сутки (при СПЖ равной 20 суткам). Различия между группами животных по анализируемым показателям и недостоверны, но характер их изменений позволяет говорить о выраженной тенденции облегчения тяжести ОЛБ у крыс на фоне введения им раствора фуллеренов. Хотя и 30-суточная смертность  $LD_{66,7/30}$ , и  $LD_{55/30}$  (с фуллеренами) статистически не различимы также как и повысившиеся на фоне введения фуллеренов СПЖ с  $(10,8 \pm 0,95)$  до  $(13,6 \pm 1,8)$  суток, другие показатели эти различия выявляют. Описанная в работе [5] «медиана выживаемости» – срок соответствующий 50 % смертности, для одного облучения составляет 11 суток, а при применении фуллеренов достигает 23 суток (в 2,1 раза дольше). Интегральный показатель выживаемости (табл. 3) достоверно возрастает ( $p = 0,000$ ) после введения раствора фуллеренов крысам при облучении.

Маловыразительны различия, обнаруживаемые при рассмотрении частоты проявления отдельных признаков ОЛБ (табл. 5, 6). Можно лишь отметить недостоверно меньшее значение показателя ИПЧ для признаков «вздутый живот» и «диарея». Кроме того, в группе с фуллеренами несколько слабее выражен признак «диарея» при подсчете частоты его возникновения по суткам (до 9 суток). Последнее демонстрируется на рис. 4.

Дополнительные данные о характере действия раствора фуллеренов на облученных крыс в дозе 6,0 Гр получены при изучении изменений средней массы выживших и погибших животных у 30 суткам (рис. 5).

Из рис. 5 видно, что выжившие и погибшие крысы имеют разнонаправленный ход изменений, совпадающий с данными для облучения в 5,0 Гр (рис. 2). При этом прирост веса у выживших при одном облучении и облучении на фоне введения фуллеренов практически не различался. Наблюдается прогрессивный прирост средней массы крыс вплоть до 30 суток.

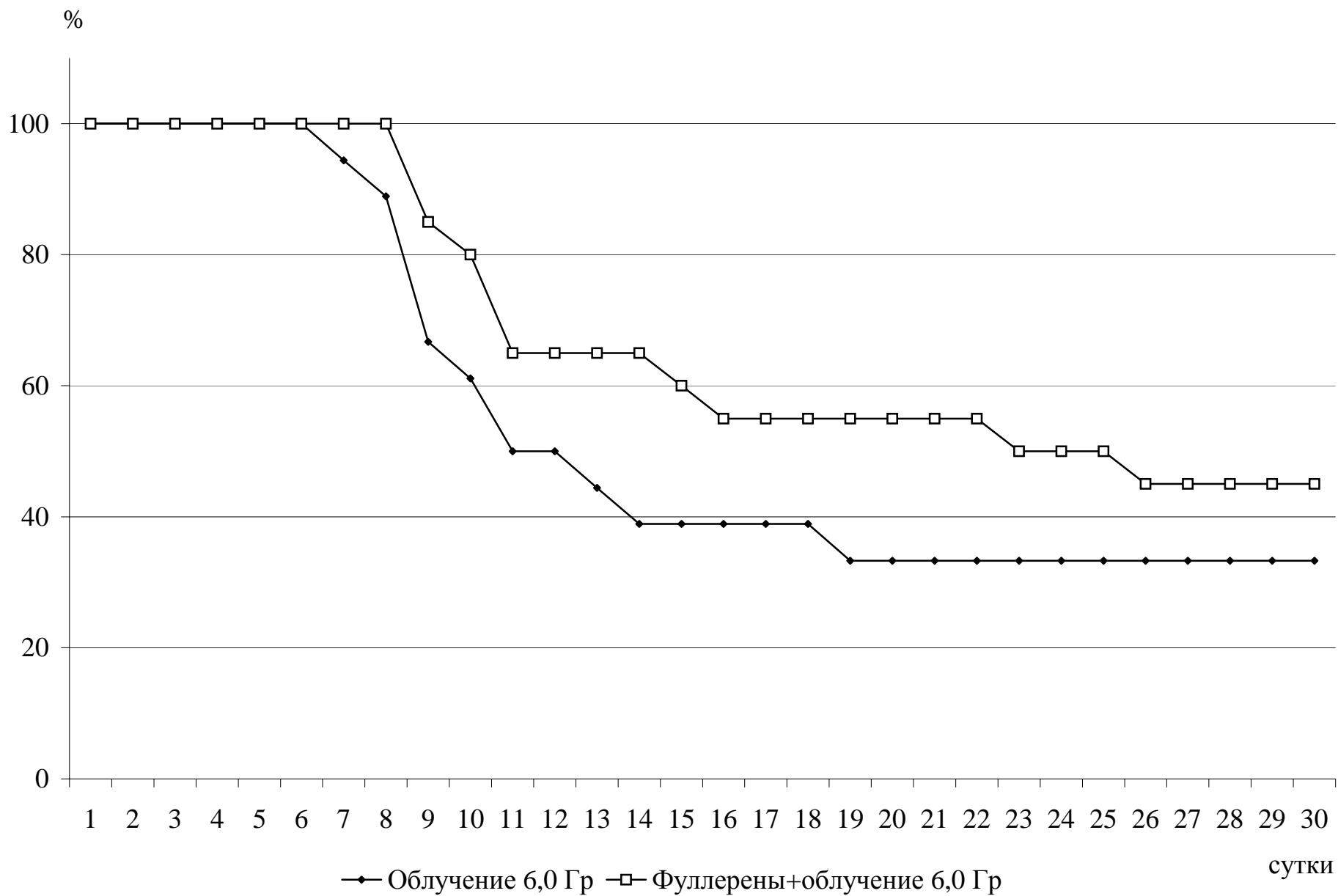


Рисунок 3 – Выживаемость крыс в опытах с рентгеновским облучением в дозе 6,0 Гр и введением раствора фуллеренов

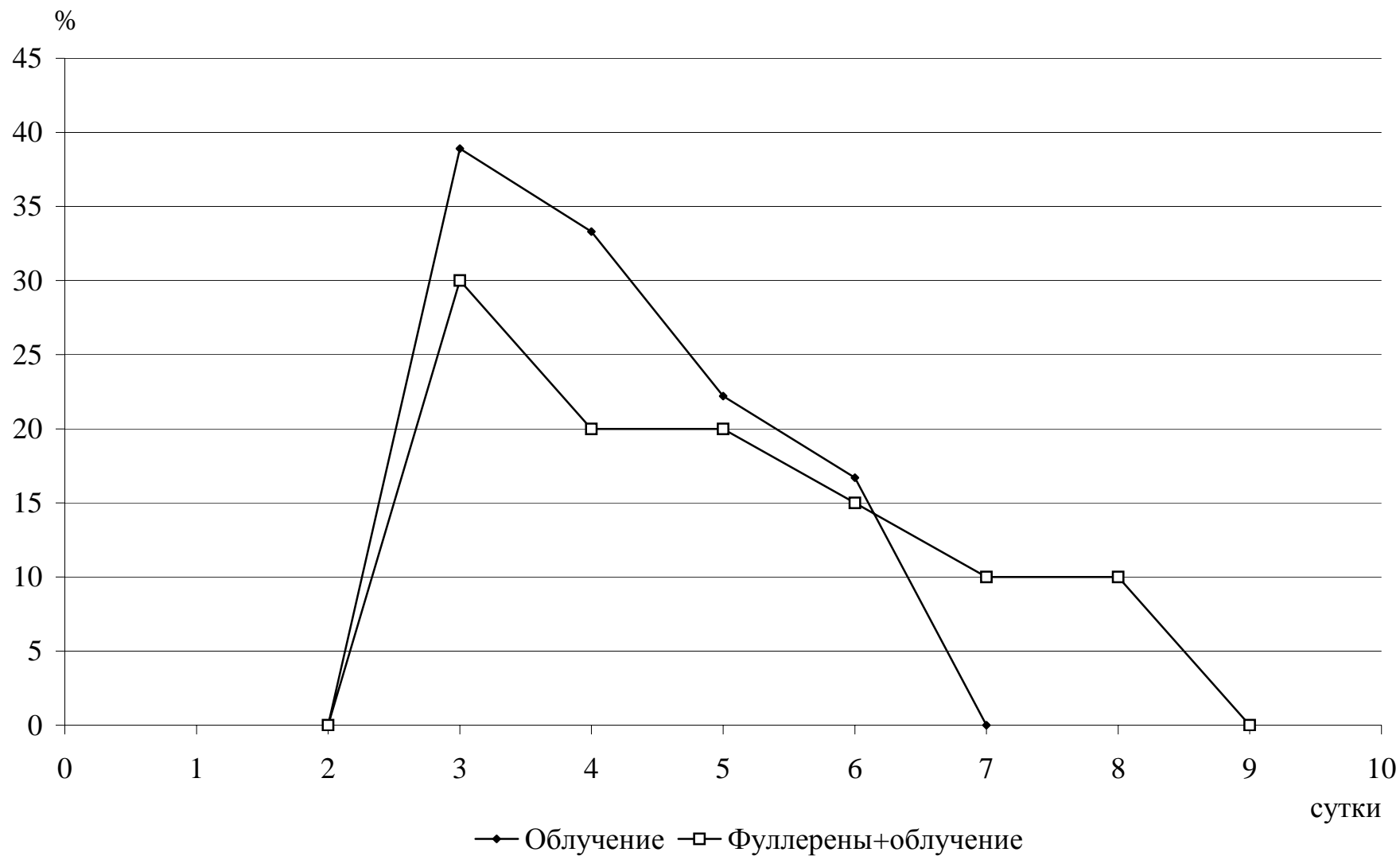


Рисунок 4 – Частота признака "диарея" у крыс в опытах с рентгеновским облучением в дозе 6,0 Гр и введением раствора фуллеренов

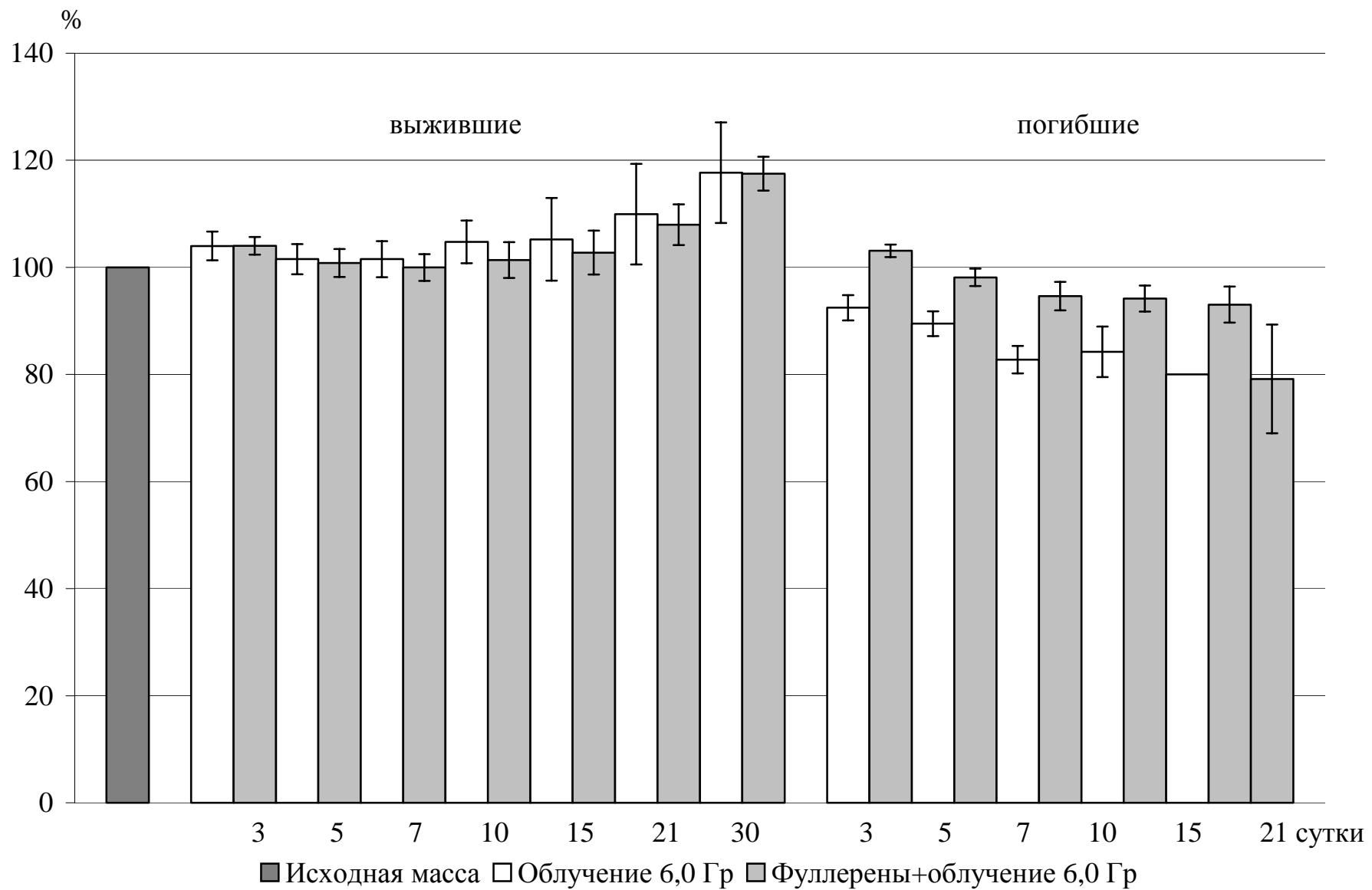


Рисунок 5 – Изменение массы крыс в опытах с рентгеновским облучением (6,0 Гр) и введением раствора фуллеренов

В тоже время у погибших падение массы крыс к 15 суткам при одном облучении достоверно тормозится в совпадающие сроки наблюдений и имеет достоверные различия (3, 5, 7 сутки), что указывает на выраженную стимуляцию жизненных процессов у погибающих крыс, которым ввели раствор фуллеренов.

Таким образом, несмотря на низкую концентрацию гидратированных фуллеренов в водном растворе, они оказывают заметное противолучевое (профилактически-лечебное) действие на облученных крыс. Это говорит в пользу гипотезы [6] о возможном каталитическом влиянии фуллереновых производных на молекулы воды, ведущему к образованию активных миметических структур, участвующих в противолучевых реакциях. Полученные нами данные дают перспективу к дальнейшему исследованию механизма радиопротекторного и лечебного действия водных растворов фуллеренов.



## СПИСОК ССЫЛОК

1. Фуллерены: Учебное пособие / Л.Н. Сидоров, М.А. Юровский и др. – М.: Издательство "Экзамен", 2005. – 688 с. (Серия "Учебное пособие для вузов").
2. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. – СРБ.: ООО «Издательство Росток», 2006. – 336 с.
3. Trajkovic S., Dobrii S., Jievic V. et al. Tissue-protective effects of fulleranol  $C_{60}(OH)_{24}$  and amifostine in irradiated rats // Colloids Surf. B: Biointerface. – 2007. – Vol. 58. – Н. 39–43.
4. Andrievsky G.V., Kosevich M.V. et al. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes // J. Chem. Commun. – 1995. – Vol. 12. – P. 1281–1282.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. Д-ра физ.-мат. наук Ю.А. Данилова, под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 460 с.
6. Bensasson R.V., Brettreich M., Frederiksen J. et al. Reactions of  $e^-_{aq}$ ,  $CO_2^{\cdot-}$ ,  $HO_2^{\cdot}$ ,  $O_2^{\cdot-}$  and  $HO_2(^1\Delta_g)$  with a dendro[60]fulleren and  $C_{60}[C(COOH)_2]_n$  ( $n=2-6$ ) // Free Rad. Biol. Med. – 2000. – Vol. 29. – P. 26–33