

УДК 619:578

**З. С. КЛЕСТОВА**, доктор ветеринарних наук,  
**Л. П. БУЧАЦЬКИЙ\***, доктор біологічних наук,  
**М. І. МАРЧЕНКО\*\***

*Інститут ветеринарної медицини НААН,*

*\*Інститут рибного господарства НААН*

## **ПЕРСПЕКТИВА ВИКОРИСТАННЯ ФУЛЛЕРЕНІВ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ**

*У статті наводиться теоретичне обґрунтування застосування у ветеринарній медицині фуллеренів, як перспективних сполук, що мають широкий спектр дії.*

*Започатковані дослідження із застосування фуллеренів у якості противірусних речовин. Початкові етапи доклінічних випробувань в системі *in vitro* показали перспективність подальших досліджень.*

*Ключові слова: фуллерени, віруси, цитотоксичність, культури клітин тварин.*

Вуглець є основою життя і являється одним з найбільш поширених елементів, що вивчений найбільше, він охоплює цілий розділ органічної хімії. Дослідження чистого вуглецю привертає до себе увагу все більшої кількості хіміків. У 1985 році Н.В Крото, Р.Ф. Керл та Смоллі відкрили та змоделювали існування таких шароподібних молекул, при випаровуванні графіту за температури 1000°С під дією лазера в струмені гелю, які склалися з шестидесяти та семидесяти атомів вуглецю – C<sub>60</sub> та C<sub>70</sub>. Молекули отримали назву **фуллерени** на честь американського інженера та архітектора Річарда Бакмінстера Фуллера, котрий вперше сконструював геодезичний купол, що складався з шестидесятип'ятикутників. У 1996 році Смоллі, Крото і Керл отримали Нобелівську премію з хімії. Відкриття фуллеренів має наслідки для всіх природничих наук. Вони були відкриті шляхом дослідів в сфері астрономії, при спробі встановити активність вуглецю у червоних гігантських зірках у міжзоряних хмарах газу а також завдяки роботі Керла і Смоллі в кластерній хімії в Університеті Райса. Це відкриття розширило знання в області хімії і фізики. Фуллерени були виявлені в геологічних формаціях і в закопчених слідах полум'я. Також фуллерени мають надзвичайно високий спектр застосування в галузі медицини.

Молекули фуллеренів складаються виключно з вуглецю, що приймають форму порожнистої сфери, еліпсоїда труби або кільця. Фуллерени подібні за структурою до графіту, який складається з пласту, сформованого гексагональними кільцями, але вони містять п'ятикутні (або іноді семикутні) кільця, що сприяє формуванню

---

\*\*Науковий керівник – доктор ветеринарних наук З. С. Клестова.

їх об'ємної форми. Форми фуллеренів можуть бути різні. Циліндричні фуллерени часто називають нанотрубками. Найменшим фуллереном є  $C_{60}$ , до речі, ця форма є найбільш поширеною.  $C_{60}$  є з'єднанням із чітко визначеною молекулярною, а не тільки кристалічною будовою. Молекула фуллерену  $C_{60}$  має форму футбольного м'яча і складається з конденсованих шести-і п'ятичленних циклів, що чергуються. До кінця ХХ століття, графіт та алмаз були єдиними відомими алотропними формами вуглецю. У квітні 2003 року фуллеренами були розпочаті дослідження щодо потенційного медичного використання – прикріплення до певних антибіотиків з метою впливу на резистентні бактерії і навіть були здійснені спроби впливати на деякі ракові клітини, такі як меланома.

Фуллерени мають низьку реактивність через стабільність графітоподібних зв'язків, а також досить погано розчиняються у більшості розчинників. Дослідники змогли підвищити реакційну здатність шляхом приєднання активних груп на поверхні фуллеренів.

Також, однією з цікавих властивостей фуллеренів, є їх здатність вміщувати в себе окремі атоми. Так, встановлено здатність фуллерену вміщувати в себе ВІЛ-протеазу. Надпровідність є однією з найбільш цікавих і перспективних властивостей.

### **Застосування фуллеренів в медицині.**

Можливість використання фуллеренів в медицині має надзвичайно високий потенціал. Було встановлено протизапальну, протиалергійну, антиоксидантну дію, нейтралізацію вільних радикалів, використання в якості транспортної системи для переносу ліків.

Особливий інтерес викликало в 1991 році повідомлення групи вчених з Bell Laboratory (США) про те, що легований калієм фуллерен є зверхпровідником з температурою фазового переходу в надпровідний стан, рівної приблизно  $18^{\circ}\text{K}$  [3]. Надалі було виявлено, що фуллероїди на основі інших лужних (крім натрію) і лужноземельних металів також є зверхпровідниками. При цьому максимальна температура переходу виявилася рівною  $42^{\circ}\text{K}$ . Виявили, що деякі металофуллерени – високотемпературні надпровідники. Дослідження, що проводяться з ідентифікації надпровідної вуглецевмісної фази, виявленої у шунгітах, привели в 1994 році до відкриття ще більш високотемпературного металофуллерену  $\text{Cu}_n\text{C}_{60}$ , з температурою переходу вище температури рідкого азоту.

Фуллерени можуть бути потужними сорбентами, а також володіють антивірусною активністю.

Один час у світі широко пропагувалася токсичність фуллеренів. Головним її обґрунтуванням служила стаття В. Колвіна із співробітниками з університету Райса і Е. Обердостера з університету Далласа. За їхніми спостереженнями, у риб, які плавали у воді з домішками фуллеренів, відбувалися негативні зміни в мозку, а клітини людської шкіри при контакті з розчином зовсім гинули. У якості «токсичного» фуллерену в цих роботах застосовувалися водні дисперсії  $\text{papo-C}_{60}$  ( $n\text{C}_{60}$ ,  $\text{THF}/n\text{C}_{60}$ ), приготовані за однією і тією ж методикою, в якій, в якості проміжного розчинника, використовувався досить токсичний тетрагідрофуран (ТГФ,  $\text{THF}$ ).

Харківські вчені більше десяти років працювали з водними розчинами фуллеренів і не помічали їх шкідливого впливу, в тому числі на шкіру. Вони зробили припущення (в 2007 році) про те, що помилка їх попередників полягала в методі приготування водного розчину фуллеренів. Потім їх висновок був підтверджений американськими вченими. Американські дослідники використовували тетрагідрофуран (ТГФ) у стандартних маніпуляціях (з подібною дисперсією). Це не призводило до бажаного результату, а газо-хроматографічний аналіз завжди виявляв ТГФ і продукти його деградації, які є невід'ємними і превалюючими компонентами частинок  $\text{C}_{60}$ . І, саме, ТГФ і продукти його окисної модифікації і подальшої їх полімеризації обумовлюють негативні біологічні ефекти частинок  $\text{C}_{60}$ .

Як відомо, багато нейродегенеративних захворювань спричинені надлишковим продукуванням радикалів NO, які виникають через гіперзбудження рецепторів глутамінової кислоти. Тому з'єднання, які діють як пастки для радикалів, здатні запобігати загибелі нейронів. Відома подібна активність похідних  $\text{C}_{60}$ . Дійсно, є два похідних, що добре розчиняються у воді і які є відмінними пастками радикалів. В досліджах *in vitro* показали дозозалежне зменшення загибелі нейронів, причому одне похідне виявилось більш активним за інше.

Фуллерен  $\text{C}_{60}$  дає слабку смугу УФ поглинання в області 700 нм, що робить можливим використання таких сполук для фотодинамічної терапії, завдяки більш ефективному проникненню через тканини світла з більшою довжиною хвилі. Фотозбуджені похідні фуллерену можуть або генерувати синглетний кисень, що розщеплює ДНК, або безпосередньо окислювати біомолекули за механізмом переносу електрона. Саме ці ефекти, мабуть, і відповідальні за здатність похідних  $\text{C}_{60}$  спричинювати цитотоксичну дію. Наприклад, в досліджах *in vitro* на ракових клітинах HeLa S3 при використанні фуллероциклопентану 5 було показано, що цитотоксична активність проявляється тільки при опроміненні.

Інший випадок протипухлинної активності виявлений при локальному опроміненні мишей з прищепленою фібромою, оброблених функціональними похідними фуллерену. При цьому спостерігалось не тільки скорочення маси пухлини, але і її некроз без пошкодження шкіри. Було відзначено, що похідні  $\text{C}_{60}$  акумулюються в пухлині не за рахунок специфічного тропізму, а через відмінну проникну здатність судин і відносну незрілість лімфатичної системи пухлинної тканини.

Похідні фуллерену 5 і 6 проявляють інгібуючу активність по відношенню до цистеїнової (папаїн, катепсини) і серинових (трипсин, плазмін, тромбін) протеаз. Механізм інгібування поки неясний, але передбачається, що гідрофобність і електрофільність фуллеренового сфероїду дуже важливі для інгібування.

Саме ці властивості можуть бути відповідальні за анти-ВІЛ-активність фуллеренових циклоаддуктів. Активна сторона ВІЛ-протеази являє собою квазісферичну гідрофобну порожнину, діаметр якої близько 10 Å. На її поверхні два амінокислотних залишки аспартат 25 і аспартат 125 каталізують гідроліз субстрату, тому інгібування аспартатної активності може призводити до закриття протеїнового шару і, як наслідок, до зупинки внутрішнього реплікативного циклу

вірусу. На основі молекулярного моделювання було встановлено, що фуллереновий сфероїд координується переважно гідрофобною стороною цього ферменту, тобто при досить сильній взаємодії можна очікувати інгібування ВІЛ-протеази. Дійсно, таке інгібування було виявлено для водорозчинного з'єднання 6. Основна ідея конструювання найбільш активних фуллеренових інгібіторів ВІЛ-протеази полягає у виборі структур із стеричною відповідністю з каналами гідрофобної структури ферменту.

**Мета роботи:** проаналізувати можливість застосування фуллеренів для розробки противірусних препаратів.

#### **Матеріали, методи, результати**

Цитотоксичну дію дослідних речовин оцінювали в системі *in vitro* у перещеплюваних культурах клітин тварин мікрометодом у 96-лункових культуральних планшетах відповідно до «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2005), «Методическим рекомендациям по первинному изучению антивирусных свойств синтетических и природных соединений» (Минск, 1986) і ін.

Тестовані хімічні наносполуки: Фуллерен № 2; Фуллерен № 7.

Використано лінію перещеплюваних культур клітин тварин: ВНК-21 (культура клітин нирки новонародженого сирійського хом'яка).

Культивування клітин проводили у суміші поживних середовищ 199 та ДМЕ (1:1) з додаванням 5-7 % сироватки крові ВРХ, прогрітої при  $+56^{\circ}\text{C}$  протягом 1 години. Для отримання суспензії клітин для подальшого пересіву використовували суміш, що складалась з 0,02% розчину Версену та 0,25 % розчину трипсину (5:1). Всі культури клітин були тестовані на відсутність контамінації мікроорганізмами у тіогліколевому середовищі та МПБ. Моношар клітин вирощували у скляних та пластикових культуральних флаконах об'ємом  $50\text{ см}^3$  та у 96-лункових культуральних планшетах.

Статистичні методи:

Обробку отриманих даних здійснювали з використанням комп'ютерної техніки в Microsoft Excel. При цьому визначали середнє арифметичне (M), статистичну помилку середнього арифметичного (m), середнє квадратичне відхилення ( $\delta$ ), показник різниці між середнім арифметичним двох варіаційних рядів за критерієм вірогідності (td) і таблицею Стьюдента. Різницю між двома величинами вважали вірогідною при  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ .

Визначали розчинність та параметри стерилізації нових хімічних речовин фуллеренів (наносполук).

Для проведення дослідів були використані готові водні розчини фуллеренів (люб'язно надані співробітниками Інституту рибного господарства НААН), для контролю стерильності речовин, з метою попередження потрапляння сторонньої мікрофлори фуллерени були пропущені через бактеріальний фільтр з величиною пор  $0,22\text{ мкм}$ .

Для проведення досліджень з визначення максимально допустимої концентрації в культурах клітин обидва тестовані фуллерени були приготовані у різних концентраціях: 125, 250, 500,  $1000\text{ мкг/см}^3$ .

При тестуванні фуллеренів було досліджено їх цитотоксичну властивість, а саме визначено максимально допустиму концентрацію для клітин культури ВНК-21 (дані наведені в таблиці 1).

Таблиця 1

### Визначення МДК фуллеренів в культурі клітин ВНК-21 (n=3)

№ п/п	Назва тестованої речовини	Тестовані концентрації, мкг/см <sup>3</sup>				МДК для КК ВНК-21, мкг/см <sup>3</sup>
		1000	500	250	125	
1	Фуллерен № 2	+	+/-	-	-	250
2	Фуллерен № 7	+	+/-	-	-	250

Таким чином, встановлено, що МДК фуллеренів становила 250 мкг/см<sup>3</sup> у культурі клітин ВНК-21. Це надає можливість проведенню подальших експериментів з визначення протівірусних властивостей.

#### Висновки.

1. Аналіз наукової літератури довів перспективність застосування фуллеренів для створення лікувальних засобів.

2. Встановлені цитотоксичні показники для живих клітин тварин в культурі двох фуллеренів та можливість їх використання в дослідженнях з розробки нових засобів протівірусної терапії щодо інфекційних захворювань тварин.

3. Вперше досліджено *in vitro* в культурі клітин ВНК-21 цитотоксичні властивості нових нанополук – фуллеренів. Встановлено максимально допустиму концентрацію, що склала 250 мкг/см<sup>3</sup>.

#### Список використаної літератури

1. Kroto H. W., Heath J. R., O'Brien S. C. et al. // Nature-1985.-Vol. 318.- P. 162.
2. Kratschmer W., Lamb L. D., Fostiropoulos K., Hoffman D. R. // Ibid- 1990.- Vol. 347.- P. 354.
3. Hebard A. F., Rosseinsky M. J., Haddon R. C. et al. // Ibid.- 1991.-Vol. 350.- P. 600.
4. Allemand P. M., Khemani K. C., Koch A. et al. // Science. – 1991.-Vol. 253.- P. 301.
5. Rao C. N. R., Ram Seshadri // MRS Bull- 1994.- Vol.19, № 11.- P. 28.
6. Козырев С. В., Поткин В. В. // ФТП.- 1993.- Т. 27, вып. 9.- С. 1409.
7. Osawa E., Yoshida M., Fujita M. // MRS Bull- 1994.-Vol. 19, № 11.- P. 33.
8. Kroto H. W. Buckminster fullerene/ H. W. Kroto, A. W. Allef, S. P. Balm//Chem.Rev. –1991.- P. 1213–35. RefType: Generic
9. Moghimi S. ., Nanomedicine: current status and future prospects/ S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray // FASEB.- 2005.- (3):311-30.
10. Allen T. M., Drug delivery systems: entering the mainstream/ T. M. Allen, P. R. Cullis // Science.- 2004.-19;303(5665):1818-22.
11. Moghimi S. M. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice/ S. M. Moghimi , A. C. Hunter, J. C. Murray // Pharmacol Rev.- 2001.- 53(2):283-318.

12. *Sahoo S. K.* Nano tech approachestodrugdelivery andimaging./ S. K. Sahoo, V. Labhasetwar //DrugDiscov Today.– 2003.– 8(24):1112-20.
13. *Fowler P. W.* A stable non-classicalmetallofullerenefamily/ P. W. Fowler, T. Heine, J. C. Duchamp, G. Rice, T. Glass et al. // Nature.– 2000.– 408(6811): 427-8.
14. *Bianco A.* Applications of carbon nanotubes indrugdelivery/ A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato //CurrOpinChem Biol.– 2005.–9 (6) : 674-9.
15. *Emerich D. F.* Nanotechnology andmedicine/ D. F. Emerich, C. G. Thanos // ExpertOpinBiol Ther.- 2003.- 3(4):655-63.
16. *Marckmann P.* Clinical manifestation of gadodiamide-related nephrogenic systemic fibrosis/ P. Marckmann, L. Skov, K. Rossen, H. S. Thomsen.//Clin Nephrol. – 2008.– 69(3):161-8.
17. *Marckmann P.* Nephrogenic systemic fibrosis: suspect edcausative role of gadodiamideused for contrast-enhanced magnetic resonan ceimaging. / P. Marckmann, L. Skov, K. Rossen, Dupont A, Damholt MB, Heaf JG etal // J AmSoc Nephrol.– 2006.– 17(9):2359-62.
18. *Ryan J. J, Bateman H. R, Stover A, Gomez G, Norton S. K, Zhao W et al.* Fullerene nanomaterials inhibit thea llergicres ponse.// J Immunol. –2007.– 179(1):665–72.
19. *Nigrovic P. A, Lee D. M.* Mastcells ininflammatory arthritis.//rthritisRes Ther.–2005.– 7(1):1-11.
20. *Nel A, Xia T, Madler L, Li N.* Toxicpo tential of materials atthenanolevel.// Science.– 2006.– 311(5761):622-7.
21. *Maynard A. D, Aitken R. J, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdorster G. et al.* Safe handling of nanotechnology.// Nature.– 2006.– 444(7117):267–9.

## **ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ ФУЛЛЕРЕНОВ В ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЕ** /Клестова З. С., Бучацкий Л. П., Марченко М. И.

*В статье наводится теоретическое обоснование по применению в ветеринарной медицине фуллеренов, как перспективных соединений, имеющих широкий спектр действия.*

*Начаты исследования по применению фуллеренов в качестве противовирусных веществ. Начальные этапы доклинических испытаний в системе in vitro показали перспективность дальнейших исследований.*

*Ключевые слова: фуллерены, вирусы, цитотоксичность, культуры клеток животных..*

## **PROSPECT OF FULLERENES APPLICATION IN VETERINARY MEDICINE**/ Z. S. Klestova, L. P. Buchackiy, M. I. Marchenko.

*The article provides a theoretical justification of fullerenes application in veterinary medicine, as promising compounds with a broad spectrum of action.*

*The researches on the application of fullerenes as antiviral agents were initiated. The initial stages of pre-clinical tests in vitro system demonstrated promise for further research.*

*Keywords: fullerenes, viruses cytotoxicity cellscultures of animal.*

**Рецензент - доктор ветеринарних наук, професор В. В. Недосеков**

Рукопис надійшов 26. 07. 2013р