

ТОКСИКОЛОГИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОСТРУКТУР

ПИОТРОВСКИЙ Л. Б., ДУМПИС М. А., ЛИТАСОВА Е. В., САФОНОВА А. Ф.,
СЕЛИНА Е. Н., БУЛЬОН В. В., РОДИОНОВА О. М.,
член-корреспондент РАМН САПРОНОВ Н. С.

Отдел нейрофармакологии,

ГУ « Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»,
Санкт-Петербург

Пиотровский Л. Б., Думпис М. А., Литасова Е. В., Сафонова А. Ф., Селина Е. Н., Бульон В. В., Родионова О. М., Сапронов Н. С. Токсикология углеродных наноструктур // Мед. акад. журн. 2010. Т. 10. № 4. С. 125–134. ГУ « Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Стремительный прогресс нанотехнологий неизбежно ставит в качестве одной из важнейших проблем изучение влияния на людей и окружающую среду как самого производства, так и его продуктов. Эта проблема давно решена для «обычных» веществ, но для наночастиц такие рекомендации пока еще не существуют, отсутствует даже единый подход к решению этой проблемы. Поэтому на сегодняшний день исследования по изучению опасности нанотехнологических продуктов ведутся по принципу «в каждом конкретном случае». Особое место среди наночастиц занимают наноструктуры углерода в целом, и фуллерены в частности. В проведенных ранее исследованиях показано, что биологические эффекты фуллерена зависят от формы введения, от степени агрегации его молекул. Поэтому нельзя говорить о токсичности фуллерена как вещества, необходимо изучение различных его водорастворимых форм. Проведенные исследования по действию комплекса C_{60} /ПВП *in vivo* на мышах и крысах при в/б введении показали полное отсутствие каких-либо токсических проявлений самого фуллерена. Более того, наблюдалось даже его защитное действие, что может быть связано с антиоксидантными свойствами фуллерена C_{60} .

Ключевые слова: токсичность, фуллерен.

Piotrovsky L. B., Dumpis M. A., Litasova E. V., Safonova A. F., Selina E. N., Bulion V. V., Rodionova O. M., Sapronov N. S. Toxicology of carbon nanostructures // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 4. P. 125–134. Institute for Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg, 197376.

Rapid advances in nanotechnology will inevitably raises as one of the most important problems the problem of studying the effect on humans and the environment as the production itself and its products. This problem has long been solved for the «ordinary» substances, but for nanoparticles these recommendations have not yet exist, it is not even a single approach to solving this problem. So far today studies of the dangers of nanotech products are on a «case on the case». A special place among other nanoparticles of carbon nanostructures occupy nanostructures as a whole, and fullerenes, in particular. In earlier studies it was showed that the biological effects of fullerenes depend on the form of administration, the degree of aggregation of its molecules. Therefore we can not talk about the toxicity of the fullerene as a substance, it is necessary to study its various water-soluble forms. Studies on the effects of complex C_{60} /PVP *in vivo* in mice and rats with intraperitoneal introduction showed the full lack of any toxic effects of the fullerene itself. Moreover, there was even his protective action that may be associated with antioxidant properties of the fullerene C_{60} .

Key words: toxicity, fullerene.

Для корреспонденции: Пиотровский Левон Борисович; тел.: (812) 234-32-38; e-mail: levon-piotrovsky@yandex.ru

Развитие науки происходит неравномерно, время от времени случаются скачкообразные прорывы в связи с новейшими открытиями в той или иной области науки. В настоящее время в мире происходит четвертая технологическая революция, связанная с появлением и выходом в практику нанотехнологий, т. е. перехода к использованию систем, размеры которых не превышают 100 нм [31].

Стремительный прогресс нанотехнологий неизбежно ставит в качестве одной из важнейших проблем изучение влияния на людей и окружающую среду как самого производства, так и его продуктов [4]. Эта проблема давно решена для «обычных» веществ. Например, для лекарственных веществ раз-

работаны и утверждены на государственном уровне протоколы, определяющие порядок работы и набор необходимых тестов [11]. Но для наночастиц такие рекомендации пока еще не существуют, отсутствует даже единый подход к решению этой проблемы [7, 43, 44, 54]. Поэтому на сегодняшний день исследования по изучению опасности нанотехнологических продуктов ведутся, как это подчеркивается в докладе Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) [39], по принципу «в каждом конкретном случае» («case on the case»).

Не отрицая необходимости изучения влияния наночастиц на человека и окружающую среду, следует заметить, что эта проблема иногда излишне драма-

тизируется. Это, с одной стороны, достаточно удивительно, так как воздействие наночастиц на организм человека не является новой и совсем уж неисследованной темой. Во-первых, такие работы велись уже достаточно давно, просто раньше вместо термина «наночастицы» употребляли термин «ультрамелькие частицы» [33]. Относительно давно известно, что любые ультрадисперсные частицы, с аэродинамическим диаметром <0.1 мкм, оказывают существенное воздействие на здоровье [59, 70]. Причем, как видно из названия последней статьи (*Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987–1994*), эти исследования велись уже тогда, когда понятия «нанотехнологии» и «наночастицы» еще не были сформулированы. В городской атмосфере достаточно много источников наночастиц, в том числе и выхлопные газы [72]. Во-вторых, окислительный стресс и повреждение митохондрий вызывают и «обычные» загрязнения, присутствующие, в частности, в воздухе мегаполисов [52]. Поэтому не нужно опасаться влияния нанотехнологий на окружающую среду, надо ее еще и чистить, а в городах надо и улицы подметать. В-третьих, люди давно придумали и используют многие другие опасные технологии и продукты. Это и атомная энергетика, и практически любое химическое производство (особенно крупнотоннажное) и т. п. При этом следует подчеркнуть, что оценка риска возникновения непредвиденных ситуаций при производстве наночастиц показывает, что эти производства не являются особенно опасными – производства бензина, полиолефинов и т. п. значительно более опасны, а производство одностенных нанотрубок по опасности сравнимо с виноделием [68].

При изучении наночастиц основная проблема заключается в том, что их свойства, в том числе биологические и токсикологические, не могут быть выведены из сравнения с аналогами в макродисперсной форме или в виде сплошных фаз, так как свойства наноматериалов определяются не только и не столько их химическим составом, сколько разнообразием их поверхностных характеристик, размеров, формы и др. [7]. В зависимости от размера, площади поверхности, наличия примесей и других параметров, которые не всегда можно на сегодня оценить, свойства, проявляемые образцами одинаковой структуры, могут существенно отличаться. Так, например, незначительные, менее 0.1%, загрязнения поверхности резко усиливают токсические эффекты [34].

Следовательно, описание и стандартизация наночастиц требуют введения новых, не использовавшихся ранее в биологии и фармакологии, параметров. Например, для корреляций структура-активность в случае плохо растворимых частиц более приемлемым параметром является площадь их поверхности, а не масса, как это было принято ранее [58, 69, 79].

Естественно, что при дроблении любого вещества увеличивается площадь поверхности на единицу массы, и в какой-то момент число частиц становится сопоставимым с числом атомов на их поверхности. В результате свойства материала начинают зависеть от размера частиц. Происходит это именно в области наноуровня, где играют существенную роль поверхностные явления и проявляются квантовые законы.

В результате при изучении биологических (равно как и других свойств) наноматериалов часто одно и то же название применяется к разным веществам. Наиболее ярко это можно продемонстрировать на примере наноструктур углерода и, в частности, фуллеренов.

Открытие наноструктур углерода, к которым относятся фуллерены, одно- и многостенные нанотрубки, наноионы, нанохорны, наноконны и графен, сыграло важную роль в формировании общей концепции наночастиц [2]. Согласно определению наноауки и нанотехнологий, данному в докладе Royal Societies [57], важную роль в проявлении особых свойств наноразмерных материалов играет увеличение числа поверхностных атомов, которые отличаются от атомов, находящихся в однородном объеме, по своим свойствам. С этой точки зрения наноструктуры углерода представляют собой истинные идеальные наночастицы, так как в них 100% атомов находятся на поверхности, а самым существенным отличием наноуровня являются ярко выраженные поверхностные взаимодействия, для которых обычным, наиболее привычным для всех, названием является определение «межмолекулярные взаимодействия». К настоящему времени есть данные о биологических свойствах практически всех перечисленных наноструктур, допускающих, в той или иной степени, применение их в биологии [см., например, 17, 23, 48].

Из наноструктур углерода наиболее изучен фуллерен C_{60} и, в меньшей степени, фуллерен C_{70} . Почему именно фуллерены привлекли такое внимание? Во-первых, фуллерен C_{60} наиболее доступен. Во-вторых, и это наиболее важно, фуллерены представляют собой единственную молекулярную форму углерода. И в этом случае мы изучаем достаточно «обычную» проблему взаимодействия биологических молекулярных (или надмолекулярных) структур с молекулой, которая может быть однозначно охарактеризована как по свойствам, так и по размерам. Отметим, что это невозможно в случае других наноструктур углерода, для которых понятие молекула неприменимо. С точки зрения изучения биологической активности и связи структура-активность, казалось бы, можно выделить еще одно преимущество – все атомы углерода в этой молекуле равноценны. Но, как будет показано ниже, это преимущество, имеющее значение на уровне одной молекулы, может и не играть существенной роли при ассоциации молекул в агрегаты.

Первые фуллерены – C_{60} и C_{70} – были открыты в 1985 г., хотя теоретически устойчивость «геодезической» структуры C_{60} была предсказана раньше [1, 61]. Позднее они были обнаружены в природе, в древесных углях и продуктах сгорания органических соединений [19, 56, 73].

Фуллерены представляют собой единственную известную форму углерода, характеризующуюся строго определенными по молекулярному весу и свойствам молекулами. Практически сразу после открытия фуллерены привлекли внимание многих исследователей, в том числе и с точки зрения возможности их использования в биологии и медицине [10].

В последнее время в литературе интенсивно обсуждается вопрос о токсичности фуллеренов. Достаточно отметить лишь несколько статей, в которых авторы пытаются обосновать тезис о токсичности самого фуллерена [41, 60, 71]. Однако результаты, полученные этими авторами, находятся в резком противоречии с полученными ранее данными об отсутствии у фуллеренов ярко выраженной токсичности [8, 30, 51, 62]. Более того, сами авторы работы [60] позднее признали методические недостатки своего исследования, связанные с наличием в испытанных образцах достаточно большой концентрации тетрагидрофурана [59]. Тем не менее, вопрос о токсичности фуллеренов продолжает широко обсуждаться.

Фуллерен C_{60} в биологических системах выступает как двуликий Янус: с одной стороны, при освещении он способен проявлять свойства окислителя – прооксиданта, с другой – в темноте он выступает в роли высокоактивного антиоксиданта из-за способности «улавливать» свободные радикалы. Первое действие определяется фотодинамической активностью молекулы (опосредованное способностью превращать обычный триплетный кислород в синглетный, один из наиболее сильных окислителей). Второе – электронодефицитностью той же молекулы, высокой способностью присоединять свободные радикалы (антиоксидантное действие) [9].

Исследование биологических свойств фуллеренов осложняется тем, что они практически нерастворимы в полярных, приемлемых для биологических исследований, растворителях. Тем не менее, в воде фуллерены способны образовывать молекулярно-коллоидные растворы, в которых молекулы фуллерена объединяются в достаточно большие, отрицательно заряженные гидратированные агрегаты, размер которых зависит от способа получения [8, 24].

Но нельзя забывать и еще одно свойство, опять-таки присущее именно молекуле C_{60} , – ее высокую липофильность. В химии лекарственных веществ липофильность вещества измеряется логарифмом коэффициента распределения вещества между водой и

липофильной фазой ($\log P$), чаще всего между октанолом и водой ($\log P_{ow}$). Для фуллерена эта величина равна 6.67 [50], что еще раз указывает на высокую липофильность молекул фуллерена C_{60} . Следовательно, молекулы (подчеркиваем, что именно молекулы) фуллерена C_{60} должны взаимодействовать в биологических системах с липидами, которые представляют собой основу всех биологических мембран. Однако такая высокая липофильность и, соответственно, низкая растворимость в воде [порядка 7.96 нг/л (1.1×10^{-11} М)] [50] создают определенные проблемы при изучении биологического действия фуллеренов в целом и фуллерена C_{60} в частности.

Поэтому на сегодняшний день разработано несколько форм введения фуллеренов в контакт с биологическими объектами. Из них можно назвать кристаллическую форму [38, 42], мицеллярные коллоидные растворы, называемые наноС60, комплексы включения с органическими веществами и полимерами (C_{60}/γ -циклодекстрин, C_{60} /поливинилпирролидон и др.) [10].

Вообще в исследованиях биологической активности фуллерена C_{60} самая запутанная ситуация возникает при изучении свойств наноС60. Известно несколько методов получения наноС60 – несколько вариантов с заменой растворителей при длительном перемешивании с водой [24, 25, 53]. Эти водные коллоидные дисперсии отличаются друг от друга не только размером агрегатов, но, что значительно более существенно, зарядами на агрегатах и их гидрофильными свойствами [25]. Отметим, что последние два свойства принципиально отличают дисперсии от самого фуллерена, который, как минимум, не гидрофилен. Еще более осложняет ситуацию то, что при получении наноС60 методом замены растворителя, особенно при использовании тетрагидрофурана, в конечном образце обнаруживаются примесь или самого органического растворителя (до 10 об.%) или продуктов его распада [41, 45], которые и являются причиной наблюдаемой «токсичности» фуллерена [37, 40]. Образцы наноС60, приготовленные различными методами, очень отличаются друг от друга и по биологическим свойствам [24, 25, 36, 53]. Такие отличия в физических, химических и биологических свойствах позволяют утверждать, что мы имеем дело с *различными веществами*, хотя все они и называются одинаково – наноС60. Более того, в некоторых работах вообще данные, полученные на образцах наноС60, относят к самому фуллерену. Т. е. мы имеем дело с подменой понятий – данные, полученные на одном соединении, относят к другому.

Особо следует остановиться на производных фуллерена. Во многих исследованиях допускается серьезная ошибка – сравниваются между собой свойства незамещенного фуллерена и его функци-

анализированных производных. Однако достаточно тривиально, что введение заместителя в любое соединение приводит к изменению его свойств. Мы же не сравниваем свойства бензола и, например, бензойной кислоты, понимая, что это различные соединения, причем в последнем случае заместитель играет решающую роль в проявлении биологической активности. Но почему-то считается возможным делать это в случае производных фуллерена. В биологии, а тем более в дизайне лекарственных веществ, известно множество примеров, когда резкое изменение биологических свойств (вплоть до обращения эффекта) вызывается незначительным изменением структуры. В случае производных фуллерена это тоже имеет место быть, о чем, в частности, может свидетельствовать высокая острая токсичность N,N' -(2-гидроксикарбонилэтилкарбонил)- p,p' -бис(2-аминоэтил)дифенилметанофуллерена [67]. Совершенно очевидно, что относительные размеры фуллеренового кора и заместителя в этом соединении, по крайней мере, близки. И, учитывая низкую токсичность других производных фуллерена [4], можно утверждать, что решающий вклад в его токсическое действие вносит именно заместитель.

Говоря о производных, надо отметить, что, во-первых, введение любого заместителя меняет свойства двух атомов фуллеренового кора, нарушая (в той или иной степени) систему сопряжения. Может быть, это сказывается не очень существенно в случае моно- или ди-аддуктов, но существенно в случае полизамещенных. Например, в полигидроксипроизводных фуллеренах (фуллеренолах) число гидроксильных групп может варьироваться от 12 до 28 [10], при этом число атомов углерода, изменивших свою гибридизацию, составляет в этих соединениях от 24 до 56. Следовательно, в случае фуллеренолов мы имеем дело с совершенно другими химическими соединениями, свойства которых никак не могут определяться фуллереновым кором, которого, кстати, там уже почти и нет, а есть каркасная полуненасыщенная структура. Более того, в фуллеренолах атомы кислорода могут внедряться между атомами углерода кора в виде гемикетальных групп, что делает структуру совсем нефуллереновой [28, 29].

Во-вторых, очень часто при изучении производных фуллерена исследователи имеют дело не с индивидуальными соединениями, а со смесью соединений, каждое из которых может обладать собственным набором свойств. Например, в работе [35] прямо указывается, что различные образцы полигидроксилированных производных C_{60} отличаются друг от друга как растворимостью в воде, так и биологическими свойствами. Примеры изучения биологической активности с использованием смеси соединений можно расширить (см. например, [46,

47, 77]. Так что следует окончательно определиться с тем, что *каждое производное фуллерена представляет собой индивидуальное соединение*. Более того, из доступного на сегодня набора производных фуллерена C_{60} трудно составить конгенеричную серию для анализа связи структура-активность (т.е. серию, в которой данный эффект реализуется по одному и тому же механизму). Тем более, что токсическое действие зависит не только (и даже не столько) от наличия в молекуле фуллеренового кора, а от числа и, главное, природы заместителей [9]. Правда, справедливости ради следует отметить, что недавно появилась информация о первой попытке реализации этого подхода при изучении супероксиддисмутазной активности карбоксифуллеренов [16].

Большинство известных производных фуллерена представляет собой водорастворимые соединения и могут, в принципе, рассматриваться как «обычные» лекарственные вещества и исследоваться стандартными методами (см. например [67]), а не как наночастицы (если не происходит их агрегации, что свойственно не только фуллеренам, но и их производным [18, 26]).

Надо отметить еще одно обстоятельство: нарушение исходной структуры наночастиц углерода приводит или к появлению, или к возрастанию токсичности. Это показано как на производных фуллерена, так и на нанотрубках. Для уже упоминавшегося выше N,N' -(2-гидроксикарбонилэтилкарбонил)- p,p' -бис(2-аминоэтил)-дифенилметанофуллерена величина LD_{50} составляет 25 мг/кг [67]. Токсичность нанотрубок зависит от наличия дефектов структуры и некоторых физико-химических параметров [54, 55].

Поэтому нами в течение нескольких лет проводится изучение биологических свойств самого незамещенного (нефункционализованного) фуллерена C_{60} и некоторых его производных с использованием различных форм введения его в контакт с биологическими объектами.

Использование поверхностей, модифицированных фуллереном, имеет существенное преимущество при изучении его действия на клеточные культуры, так как в этом случае наблюдается максимальный контакт клеток с фуллереном - они распластаются на поверхности и колонизируют ее в виде конфлуэнтного монослоя. Этим данная система принципиально отличается от водорастворимых комплексов и мелкодисперсных суспензий фуллерена C_{60} .

Тестирование про- и антиоксидантной активности фуллерена проводилось нами в модельных (химических) и биологических системах с использованием флуоресцентного зонда 2',7'-дихлорофлуоресцеина. Проведенное нами изучение свойств поверхности, покрытой фуллереном (кристаллический фуллерен, фуллерит), показало, что в бесклеточной системе она

обладает выраженным антиоксидантным действием, разрушая перекись водорода. На этой же поверхности нормально растут культуры различных клеток. Но все это происходит в темноте. Однако при освещении культуры клеток, растущих на поверхности, покрытой фуллереном, достаточно быстро происходит полная гибель клеток. Использование специфических ловушек для различных форм кислорода показало, что в этом случае окислителем является синглетный кислород [63]. Так что кристаллический фуллерен ведет себя по отношению к биологическим системам классически – антиоксидант без освещения и оксидант при освещении. Следовательно, токсическое действие твердого фуллерена на биологические объекты проявляется только при освещении.

Молекулы фуллерена C_{60} можно вводить в биологические системы и в низкоагрегированном состоянии. В данном случае речь идет о двух типах комплексов включения: C_{60}/γ -циклодекстрин (C_{60}/γ -ЦД) и C_{60} /поливинилпирролидон (C_{60} /ПВП) [10]. При использовании комплексов C_{60}/γ -ЦД удалось включить отдельные молекулы фуллерена и некоторых его производных в молекулы белков [20,21]. Таких же результатов можно добиться и с использованием комплексов C_{60} /ПВП [15]. Исследования противовирусного действия этого комплекса показали, что фуллерен блокирует мембранозависимые стадии цикла репликации вируса, что также свидетельствует о действии если не изолированных, то, во всяком случае, низкоагрегированных молекул фуллерена [64]. Таким образом, при использовании препаратов, содержащих низкоагрегированные молекулы фуллерена, можно констатировать проявление его липофильных (мембранотропных) свойств.

При этом следует также отметить, что если в бесклеточной системе комплекс C_{60} /ПВП проявляет свойства фотосенситизатора, то при прибавлении его в среду при культивировании клеток он теряет свои фотодинамические свойства. В этом случае мы наблюдаем резкое отличие действия изолированных (или низкоагрегированных) молекул фуллерена от действия тех же молекул, но находящихся в высокоагрегированном состоянии (упоминавшийся ранее кристаллический фуллерен на поверхности) [63].

Сравнение вирулицидного действия комплекса C_{60} /ПВП и наноС60, приготовленного обработкой ультразвуком смеси толуольного раствора фуллерена и воды, показало, что инкубация вирионов в буферном растворе с комплексом C_{60} /ПВП приводит к их разрушению. При электрономикроскопическом исследовании вирусов, подвергнутых действию комплекса C_{60} /ПВП, установлено, что при этом происходит нарушение строения белковой «щетки» и разрушение липидных мембран. О прямом взаимодействии комплекса с вирионами может свидетель-

ствовать и тот факт, что на ранних этапах инкубации видны «вирионы с шапочками», число которых резко уменьшается во времени. При этом действие комплекса C_{60} /ПВП на вирионы светонезависимо: освещение смеси вирионов с комплексом, причем даже с использованием УФ-света, не приводит к существенному усилению действия. Однако совершенно другая картина наблюдается при использовании наноС60 – действие проявляется только при освещении, что свидетельствует о фотодинамической активности наноС60 [13].

Таким образом, даже на примере только фуллерена C_{60} четко видна одна из проблем перехода к работе в области наноразмеров – свойства данного образца (физические, химические и биологические), как уже указывалось выше, зависят от степени агрегации, размера агрегатов, их строения, а не только (и не столько), как все уже привыкли, от чисто химического состава.

Вернемся еще раз к комплексам включения фуллерена – комплексам C_{60}/γ -ЦД и C_{60} /ПВП. Из того и другого комплекса изолированная молекула C_{60} может включаться в супрамолекулярный комплекс с белками, в частности с альбумином [15, 21]. Однако из комплекса C_{60}/γ -ЦД молекулы фуллерена переходят в липосомы, сохраняя свою фотодинамическую активность [49], тогда как комплекс C_{60} /ПВП придает клеткам устойчивость к действию ультрафиолетового облучения [80]. В случае комплекса C_{60} /ПВП наблюдаются также некоторые эффекты, например влияние на дифференциацию клеток [75,76], которые не описаны для комплекса C_{60}/γ -ЦД. Некоторые из этих эффектов могут быть связаны с действием самого ПВП. Следовательно, и эти комплексы следует рассматривать как самостоятельные супрамолекулярные соединения с различным биологическим действием.

С учетом всего вышесказанного становится очевидным, что нельзя говорить просто о биологической активности фуллерена, не указывая формы его применения. И водорастворимые комплексы включения, и различные образцы наноС60, и кристаллический фуллерен, и суспензии кристаллического фуллерена, содержащие макрочастицы (см. например, [42]) представляют собой отдельные соединения. Главное отличие всех этих форм фуллерена – степень ассоциации молекул фуллерена. Каждый из этих ассоциатов, в лучшем случае, – индивидуальная супрамолекулярная структура. Часто же это смесь структур, характеризующаяся (например, для всех типов наноС60) определенной дисперсией [24, 25].

Это приводит к тому, что в литературе существует чересполосица данных, в частности, по токсичности фуллерена, связанная с тем, что исследования выполнены на разных наночастицах (соединениях).

Причем практически во всех описанных примерах изучения биологических и токсикологических свойств не изучался сам немодифицированный фуллерен C_{60} в виде изолированных молекул, а все исследования выполнены или на агрегатах, образованных этими молекулами, или супрамолекулярных комплексов, образованных с участием молекул фуллерена. Следовательно, мы знаем физические и химические свойства молекулы фуллерена, но не знаем ее биологических свойств.

Таким образом, одна из главных трудностей при изучении свойств наноматериалов, особенно их биологических эффектов, заключается в том, что в большинстве случаев изучаемые образцы плохо стандартизованы по своим «нанохарактеристикам». Речь идет о специфических параметрах наночастиц – размер частиц (или дисперсность), площадь поверхности, наличие примесей, причем не в массе частицы, а на поверхности, способность к агрегации, устойчивость и т.п. Поэтому одним из важнейших направлений в развитии нанотехнологий, особенно нанобиологии, наномедицины и нанофармацевтики, является разработка надежных и применимых в повседневной практике методов анализа и стандартизации исследуемых образцов (или, если воспользоваться фармацевтической терминологией, субстанций).

Мы постарались осветить эту проблему на примерах исследования биологической активности фуллерена C_{60} и его производных. Но эта проблема существует, может быть, не всегда так остро, и в других случаях. Что же касается токсичности самого нефункционализованного фуллерена, то надо еще раз отметить, что вся имеющаяся на сегодня совокупность данных позволяет считать фуллерен C_{60} нетоксичным (или малотоксичным) соединением (памятуя, однако, что еще Парацельс сказал «Все вещи есть яд. Только доза определяет, что это вещество не ядовито.» [32]).

Именно в развитие и для уточнения тезиса о нетоксичности фуллерена C_{60} нами было предпринято систематическое исследование его токсикологических характеристик в составе комплекса C_{60} /ПВП при внутрибрюшинном (в/б) введении мышам и крысам. Работа проводилась на основании методических документов Государственного санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации [5, 6, 12, 14].

Острая токсичность комплекса C_{60} /ПВП исследована на нелинейных белых мышах и крысах-самцах линии Вистар при внутрибрюшинном введении. Животным однократно в/б вводили комплекс C_{60} /ПВП и ПВП в высоких концентрациях (20%, 25%, 32% раствор, вплоть до максимально возможной – 40% раствор) в одном и том же объеме (мышам – из расчета 1 мл на животное массой 25 г, крысам

– 5 мл на животное 200 г). За животными наблюдали на протяжении 14 дней, регистрировали гибель и особенности поведения. Установлено, что LD_{50} комплекса C_{60} /ПВП для мышей $14,1 \pm 1,1$ г/кг, а для ПВП $11,6 \pm 0,8$ г/кг, (первые сутки после введения). Наблюдения за животными показали, что в группах, получавших комплекс C_{60} /ПВП, животные погибали только в течение первых двух суток. У мышей контрольной группы, получавших ПВП, гибель животных продолжалась на протяжении 7 сут. Учитывая количество погибших животных за 7 сут, LD_{50} комплекса C_{60} /ПВП составила $11,2 \pm 0,8$ г/кг, а для ПВП – $9,68 \pm 0,8$ г/кг.

В опытах на крысах исследуемые вещества вводили в диапазоне доз от 5 до 10 г/кг. Гибель животных, получавших комплекс C_{60} /ПВП, была зарегистрирована на 4-е и 5-е сут, а в контрольной группе – на 3-и–4-е сут. Учитывая количество погибших животных за 5 сут, LD_{50} комплекса C_{60} /ПВП составила $7,9 \pm 1,0$ г/кг и $6,8 \pm 0,7$ г/кг для ПВП.

Хроническую токсичность комплекса C_{60} /ПВП изучали на 120 крысах-самцах. Водные растворы ПВП и C_{60} /ПВП вводили в/б в течение 30 сут в дозах 350 и 700 мг/кг, что соответствовало 1/20 и 1/10 LD_{50} ПВП, установленной при изучении острой токсичности на крысах.

Для оценки функционального состояния органов и систем организма подопытных животных использовали следующие показатели и тесты:

- Интегральные показатели
- Центральная нервная система
- Мочевыделительная система
- Морфологическое исследование некоторых органов
- Гематологические показатели: лейкоцитарные, эритроцитарные и тромбоцитарные

Сумма интегральных показателей включала общее состояние животных, массу тела и индекс внутренних органов. Ежедневное наблюдение за животными, получавшими ПВП и комплекс C_{60} /ПВП, не выявило никаких отклонений в их состоянии и поведении по сравнению с контрольной группой. Между группами статистически значимых различий в приросте массы тела и относительной массы внутренних органов крыс не выявлено.

Действие на ЦНС оценивалось по способности к суммации подпороговых импульсов под влиянием ПВП и комплекса C_{60} /ПВП. Достоверных различий с контролем не наблюдалось.

Комплекс C_{60} /ПВП в дозах 350 и 700 мг/кг на 14-е сут введения вызывал незначительное, но достоверное увеличение диуреза на 4-й и 5-й ч наблюдения, что может свидетельствовать об оптимизации выделительной функции почек, при этом общее суточное количество выделяемой мочи было таким же,

Влияние длительного введения комплекса C_{60} /ПВП и ПВП на активность АЛАТ, АсАТ, ЩФ и содержание мочевины в сыворотке крови крыс

Группы n=6	14 дней				30 дней			
	АЛАТ (ммоль/ч·л)	АсАТ (ммоль/ч·л)	ЩФ (нмоль/с·л)	Мочевина (ммоль/л)	АЛАТ (ммоль/ч·л)	АсАТ (ммоль/ч·л)	ЩФ (нмоль/с·л)	Мочевина (ммоль/л)
Интактные (контроль)	1,46±0,07	1,29±0,04	921,3±101,8	10,4±0,6	1,24±0,02333	1,35±0,09	913,1±96,6	8,3±0,6
ПВП, 350 мг/кг	1,20±0,09	1,20±0,04	621,8±54,5	10,0±0,6	1,11±0,08	1,17±0,03	731,4±41,4	8,5±0,4
C_{60} /ПВП, 350 мг/кг	1,43±0,15	1,26±0,08	738,6±78,5	9,6±0,5	0,91±0,08	1,06±0,03	911,6±107,8	9,4±0,3
ПВП, 700 мг/кг	1,14±0,06	1,08±0,04	713,2±85,3	10,5±0,6	0,94±0,08	1,19±0,07	755,1±51,5	9,0±0,5
C_{60} /ПВП, 700 мг/кг	1,36±0,18	1,13±0,04	847,2±83,3	8,7±0,3	1,02±0,13	1,22±0,10	837,4±71,9	9,8±0,7

как у интактных животных. На 30-е сут изменений в почасовом суточном диурезе не наблюдалось. По физиологическим показателям мочи (удельный вес, рН, белок, сахар, кетоновые тела, микроскопия осадка) достоверных различий не выявлено.

Морфологический состав периферической крови крыс, полученной из хвостовой вены на 14-е и 30-е сут введения изучаемых веществ, варьировал незначительно и находился в пределах допустимых значений данной популяции животных.

Морфологическое исследование проведено для селезенки, печени и почек. У животных, получавших ПВП и комплекс C_{60} /ПВП в течение 30 сут, отсутствовали морфологические проявления токсического повреждения паренхимы печени, почек и ткани селезенки. Однако у некоторых животных отмечался фибринозный спленит, что является, по-видимому, результатом локального повреждения брюшины при в/б введении изучаемых веществ [22, 27, 74, 78].

На 14-й и 30-й дни в сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) унифицированным методом Райтмана-Френкеля, активность щелочной фосфатазы (ЩФ) унифицированным методом, а также содержание мочевины уреазным фенол/гипохлоритным методом. Определения проводили с помощью наборов реагентов ООО «Витал Девелопмент Корпорэйшн». Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования представлены в таблице 1. Оценка представленных данных позволяет заключить, что активность АЛАТ, АсАТ и ЩФ, а также содержание мочевины в сыворотке крови интактных крыс, определяемые в двух сериях экспериментов, варьировали незначительно. Введение животным

ПВП в дозе 350 и 700 мг/кг в течение 14 и 30 дней не приводило к каким-либо достоверным изменениям в активности этих ферментов и содержании мочевины. Инъекции крысам комплекса C_{60} /ПВП в дозах 350 и 700 мг/кг в течение 14 и 30 дней также не вызывали достоверных изменений в активности изученных ферментов и содержании мочевины.

Таким образом, длительное в/б (14 и 30 дней) как ПВП, так и комплекса C_{60} /ПВП в больших дозах (350 и 700 мг/кг) не оказывало какого-либо влияния на активность ферментов-маркеров, увеличение активности которых свидетельствует о повреждениях в тканях. И то, и другое соединение не влияли и на содержание мочевины, отклонение которого от нормы свидетельствует о нарушении функции почек.

Подчеркнем еще одно важное биологическое свойство фуллерена C_{60} , проявляемое им в комплексе с ПВП – он не просто не токсичен, но препятствует проявлению токсического (или иного нежелательного) действия самого ПВП. Впервые это было описано в работе [75], в которой было показано, что сам ПВП ингибирует дифференцировку и пролиферацию клеток, однако этот эффект значительно ослабляется при применении комплекса C_{60} /ПВП. Введение комплекса C_{60} /ПВП в дорсальную область гиппокампа крысы предупреждает нарушения памяти, вызванные введением циклогексимида, тогда как сам ПВП в этом случае оказывает негативное действие [65, 66].

Было также показано, что если ПВП (1 мл 10% раствора в/б, крысы) вызывает, хоть и незначительные, но видимые морфологические изменения в тканях внутренних органов (головной мозг, миокард, легкие, печень, селезенка, почки), то введение комплекса C_{60} /ПВП (1 мл 10% и 25% раствора в воде) значительно снижает эти негативные явления [3].

В заключение следует повторить, что токсичность есть крайнее проявление биологической активности, приводящее к гибели биологического объекта.

Следовательно, механизмы проявления токсичности данным веществом есть суть механизма его биологической активности. Как было сказано выше, в случае фуллеренов в основе их биологической активности лежат, в первую очередь, три свойства этих молекул – липофильность, определяющая мембранотропные свойства, электронодефицитность, приводящая к способности взаимодействовать со свободными радикалами, и способность фуллерена в возбужденном состоянии передавать энергию молекуле обычного кислорода и превращать его в синглетный кислород. Способность фуллерена проявлять те или иные свойства, приводящие к воздействию на биологические объекты, зависит как от условий биологического эксперимента, так и от способа его введения, а точнее от степени диспергированности молекул фуллерена. Поведенные нами исследования позволяют сделать вывод об отсутствии у фуллерена C_{60} (в виде комплекса C_{60} /ПВП) токсического действия *in vivo*, что делает в частности этот комплекс перспективным соединением для применения его в биологии и медицине.

Литература

1. Бочвар Д.А., Гальперн Е.Г. О гипотетических системах: карбододекаэдре, s-икозаэдрене и карбо-s-икозаэдре // ДАН СССР. 1973. Т. 209. С. 610–612.
2. Вуль А.Я., Соколов В.И. Исследования нанотрубок и наноалмазам // Рос. нанотехнол. 2007. Т. 3. № 3–4. С. 9–22.
3. Зайцева О.Б., Тюнин М.А., Попов В.А. и др. Морфологические изменения в тканях внутренних органов при внутрибрюшинном введении комплекса C_{60} с поливинилпирролидоном / Биосовместимые наноструктурные материалы и покрытия медицинского назначения. Белгород, 2006. С. 376–380.
4. Колесниченко А.В., Тимофеев М.А., Протопопова М.В. Токсичность наноматериалов – 15 лет исследования // Рос. нанотехнол. 2008. Т. 3. № 3–4. С. 54–61.
5. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 1. Гематологические исследования. Коагулологические исследования. Химико-микроскопические исследования / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Лабора, 2008.
6. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека: Метод. реком. МР 1.2.2522-09, М., 2009.
7. Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В. и др. Методические подходы к оценке безопасности наноматериалов // Гигиена и санитария. 2007. Т. 6. С. 3–10.
8. Пиотровский Л.Б. Фуллерены в биологии и медицине: проблемы и перспективы / Фундаментальные направления молекулярной медицины. СПб.: Росток, 2005. С. 195–268.
9. Пиотровский Л.Б. Фуллерены в дизайне лекарственных веществ // Рос. нанотехнологии. 2007. Т. 2. № 7–8. С. 6–18.
10. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. СПб.: Росток, 2006.
11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005.
12. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. М., 2000. С. 352.
13. Сироткин А.К., Пиотровский Л.Б., Познякова Л.Н. и др. Влияние комплексов фуллерена C_{60} с поливинилпирролидоном на морфологию вирусов гриппа // Вопр. биол. мед. фарм. хим. 2005. Т. 3. С. 21–24.
14. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О. и др. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы). М.: Медицина, 1978.
15. Шавловский М.М., Соловьев К.В., Думпис М.А. и др. Комплексы фуллерена C_{60} с белками плазмы крови человека // Нанотехнологии в биологии и медицине / Под ред. Е.В. Шляхто. СПб.: Любавич, 2009. С. 101–107.
16. Ali S.S., Hardt J.I., Dugan L.L. SOD Activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study // Nanomedicine. NBM. 2008. Vol. 4. P. 294–383.
17. Ajima K., Yudasaka M., Murakami T. Carbon nanohorns as anticancer drug carriers // Mol. Pharm. 2005. Vol. 2. P. 475–480.
18. Angelini G., De Maria P., Fontana A. et al. Study of the aggregation properties of a novel amphiphilic C_{60} fullerene derivative // Langmuir. 2001. Vol. 17. P. 6404–6407.
19. Bang J.J., Guerrero P.A., Lopez D.A. et al. Carbon nanotubes and other fullerene nanocrystals in domestic propane and natural gas combustion streams // J. Nanosci. Nanotechnol. 2004. Vol. 4. P. 716–718.
20. Belgorodsky B., Fadeev L., Ittah V. et al. Formation and Characterization of stable human serum albumin-tris-malonic acid [C_{60}]fullerene complex // Bioconjugate Chem. 2005. Vol. 16. P. 1058–1062.
21. Benyamini H., Shulman-Peleg A., Wolfson H.J. et al. Interaction of C_{60} -fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment // Bioconjugate Chem. 2006. Vol. 17. P. 378–386.
22. Bessman J.D. Automated Blood Counts and Differentials // Johns Hopkins University Press, 1986.
23. Bianco A., Prato M. Can carbon nanotubes be considered useful tools for biological applications? // Adv. Mat. 2003. Vol. 15. P. 1765–1768.
24. Brant J., Lecoanet H., Wiesner M.R. Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in

- aqueous systems // *J. Nanopart. Res.* 2005. Vol. 7. P. 545–553.
25. Brant J.A., Labille J., Bottero J.-Y. et al. Characterizing the Impact of Preparation Method on Fullerene Cluster Structure and Chemistry // *Langmuir*. 2006. Vol. 22. P. 3878–3885.
 26. Brant J.A., Labille J., Robichaud C.O. Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release // *J. Colloid Interface Sci.* 2007. Vol. 314. P. 281–288.
 27. Brown B. *Hematology: Principles and Procedures* // Philadelphia: Lea & Febiger. 1976.
 28. Chiang L.Y., Wang L.-Y., Swirczewski J.W. et al. Efficient Synthesis of Polyhydroxylated Fullerene Derivatives via Hydrolysis of Polycyclosulfated Precursors // *J. Org. Chem.* 1994. Vol. 59. P. 3960–3968.
 29. Chiang L.Y., Swirczewski J.W., Hsu C.S. et al. Multi-hydroxy Additions onto C60 Fullerene Molecules // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992. P. 1791–1793.
 30. Da Ros T., Prato M. Medicinal chemistry with fullerenes and fullerene derivatives // *Chem. Commun.* 1999. P. 663–669.
 31. Dai L., From conventional technology to carbon nanotechnology: The fourth industrial revolution and the discoveries of C60, carbon nanotube and nanodiamond // *Carbon nanotechnology* / Ed. L.Dai. Elsevier, 2006. P. 3–11.
 32. Deichmann W.B., Henschler D., Holmsted B. et al. What is there that is not poison? A study of the Third defense by Paracelsus // *Arch. Toxicol.* 1986. Vol. 58. P. 207–213.
 33. Donaldson K., Stone V., Clouter A. et al. Ultrafine particles // *Occup. Environ. Med.* 2001. Vol. 58. P. 211–216.
 34. Donaldson K., Stone V., Tran C.L. Nanotoxicology // *Occup. Environ. Med.* 2004. Vol. 61. P. 727–728.
 35. Dugan L., Turetsky D., Du C. et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 9434–9439.
 36. Duncan L.K., Jinschek J.R., Vikesland P.J. C60 colloid formation in aqueous systems: effects of preparation method on size, structure, and surface charge // *Environ. Sci. Technol.* 2008. Vol. 42. P. 173–178.
 37. Eilperin J. Nanotechnology's big question: safety, some say micromaterials are coming to market without adequate controls / *The Washington Post*. 2005. October 23. P. A11.
 38. Endoh S., Maru J., Uchida K. et al. Preparing samples for fullerene C60 hazard tests: Stable dispersion of fullerene crystals in water using a bead mill // *Adv. Powder Technol.* 2009. Vol. 20. P. 567–575.
 39. European Commission Health & Consumer Protection. SCENIHR opinion on "The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies". September 2005.
 40. Feder B.J. Study raises concerns about carbon particles // *The New York Times*. 2004. March 29.
 41. Fortner I.D., Lyon D.Y., Sayes C.M. et al. C60 in water: nanocrystal formation and microbial response // *Environ. Sci. Technol.* 2005. Vol. 39. P. 4307–4316.
 42. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M. et al. [60]Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity // *Nano Lett.* 2005. Vol. 5. P. 2578–2585.
 43. Helland A., Kastenholz H., Thidell A. et al. Nanoparticulate materials and regulatory policy in Europe: An analysis of stakeholder perspectives // *J. Nanopart. Res.* 2006. Vol. 8. C. 709–719.
 44. Helland A., Scheringer M., Siegrist M. et al. Risk assessment of engineered nanomaterials: A survey of industrial approaches // *Environ. Sci. Technol.* 2008. Vol. 42. P. 640–646.
 45. Henry T.B., Menn F., Fleming J.T. et al. Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression // *Environ. Health Perspect.* 2007. Vol. 115. C. 1059–1065.
 46. Hu Z., Guan W., Wang W. et al. Synthesis of β -alanine C60 derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells // *Cell Biol. Internat.* 2007. Vol. 31. P. 798–804.
 47. Hu Z., Xing H.P., Zhu Z. et al. Synthesis of cystine C60 derivative and its protective effects on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells // *Chin. Chem. Lett.* 2007. Vol. 18. P. 145–148.
 48. Huang H., Pierstorff E., Osawa E., Ho D. Active Nanodiamond Hydrogels for Chemotherapeutic Delivery // *Nano Lett.* 2007. Vol. 7. P. 3305–3314.
 49. Ikeda A., Doi Y., Hashizume M. et al. An extremely effective dna photocleavage utilizing functionalized liposomes with a fullerene-enriched lipid bilayer // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129. P. 4140–4141.
 50. Jafvert C.T., Kulkarni P.P. Buckminsterfullerene's (C60) Octanol-Water Partition Coefficient (Kow) and Aqueous Solubility // *Environ. Sci. Technol.* 2008. Vol. 42. P. 5945–5950.
 51. Jensen A.W., Wilson S.R., Schuster D.I. Biological applications of fullerenes // *Bioorg Med Chem.* 1996. Vol. 4. P. 767–779.
 52. Li N., Sioutas C., Cho A. et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage // *Environ. Health Perspect.* 2003. Vol. 111. P. 455–460.
 53. Lyon D.Y., Adams L.K., Falkner J.C. Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size // *Environ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 40. C. 4360–4366.
 54. Maynard A.D. Nanotechnology: The Next Big Thing, or Much Ado about Nothing? // *Ann. Occup. Hyg.* 2007. Vol. 51. C. 1–12.
 55. Muller J., Huaux F., Fonseca A. et al. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: toxicological aspects // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. Vol. 21. P. 1698–1705.

56. Murr L.E., Soto K.F. A TEM study of soot, carbon nanotubes, and related fullerene nanopolyhedra in common fuel-gas combustion sources // *Mater. Characteriz.* 2005. Vol. 55. P. 50–65.
57. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, Nanoscience and nanotechnologies. July 2004.
58. Oberdörster G., Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles // *Particulate Sci. Technol.* 1996. Vol. 14. P. 135–151.
59. Oberdörster G., Utell M.J. Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract-and beyond [Editorial] // *Environ Health Perspect.* 2002. V. 110. P. A440–A441.
60. Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass // *Environl. Health Perspect.* 2004. Vol. 112. P. 1058–1062.
61. Osawa E. Superaromaticity // *Kogaku (Kyoto)*. 1970. Vol. 25. P. 854–863.
62. Piotrovsky L.B. Biological activity of pristine fullerene C60 / *Carbon nanotechnology* // Ed. L. Dai. Elsevier, 2006. P. 235–253.
63. Piotrovsky L.B., Eropkin M.Yu., Eropkina E.M. et al. Biological effects in cell cultures of fullerene C60: dependence on aggregation state // *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes* / Cataldo F., Da Ros T. (eds.) Springer. 2008.
64. Piotrovsky L.B., Kiselev O.I. Fullerenes and viruses // *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* 2004. Vol. 12. P. 397–403.
65. Podol'skii I.Ya., Kondrat'eva E.V., Shcheglov I.V. et al. Fullerene C60 complexed with poly(N-vinylpyrrolidone) prevents the disturbance of long-term memory consolidation // *Phys. Solid States.* 2002. Vol. 44. P. 552–554.
66. Podolski I.Ya., Kondratjeva E.V., Gurin S.S. et al. Fullerene C60 complexed with poly(N-vinylpyrrolidone) prevents the disturbance of long-term memory consolidation induced by cycloheximide // *Fullerenes, nanotubes, and carbon nanostructures.* 2004. Vol. 12. P. 421–424.
67. Rajagopalan P., Wudl F., Schinazi R.F. et al. Pharmacokinetics of a water-soluble fullerene in rats // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. Vol. 40. P. 2262–2265.
68. Robichaud C.O., Tanzil D., Weilenmann U. et al. Relative risk analysis of several manufactured nanomaterials: an insurance industry context // *Environ. Sci. Technol.* 2005. Vol. 39. P. 8985–8994.
69. Rogers E.J., Hsieh S.F., Organti N. et al. A high throughput in vitro analytical approach to screen for oxidative stress potential exerted by nanomaterials using a biologically relevant matrix: Human blood serum // *Toxicol. in Vitro.* 2008. Vol. 22. P. 1639–1647.
70. Samet J.M., Dominici F., Curriero F.C. et al. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987–1994 // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 343. P. 1742–1749.
71. Sayes C.M., Fortner J.D., Guo W. et al. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes // *Nano Lett.* 2004. Vol. 4. P. 1881–1887.
72. Shi J.P., Evans D.E., Khan A.A., and Harrison R.M. Sources and concentration of nanoparticles (<10 nm diameter) in the urban atmosphere // *Atmos. Environ.* 2001. Vol. 35. P. 1193–1202.
73. Shibuya M., Kato M., Ozawa M., Fang P.H., Osawa E. Detection of buckminsterfullerene in usual soot and commercial charcoals // *Full. Sci. Technol.* 1999. Vol. 7. P. 181–193.
74. Statfnd B.E. *Clinical Decision Levels for Lab Tests / Medec. Books.* 1987.
75. Tsuchiya T., Oguri I., Yamakoshi Y.N. et al. Effect of [60]fullerene on the chondrogenesis in mouse embryonic limb bulb cell culture system // *Full. Sci. Technol.* 1996. Vol. 4. P. 989–999.
76. Tsuchiya T., Yamakoshi Y.N., Miyata N. A novel promoting action of fullerene C60 on the chondrogenesis in rat embryonic limb bud cell culture system // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. Vol. 206. P. 885–894.
77. Wharton T., Kini V.U. et al. New non-ionic, highly water-soluble derivatives of C60 designed for biological compatibility // *Tetrahedron Lett.* 2001. Vol. 42. P. 5159–5162.
78. Williams W.J. et al. *Hematology / McGraw Hill.* New York, 1972.
79. Wittmaack K. In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: Particle number, surface area, or what? // *Environ. Health Perspect.* 2007. Vol. 115. P. 187–194.
80. Xiao L., Takada H. et al. The water-soluble fullerene derivative 'Radical Sponge®' exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes // *Biorg. Med. Chem. Lett.* 2006. Vol. 16. P. 1590–1595.