

*В.Н. Алдобаев<sup>1</sup>, Л.А. Еременко<sup>1</sup>, А.А. Мазанова<sup>1</sup>, Д.Х. Бикетова<sup>1</sup>, Е.В. Ковалева<sup>1</sup>,*

*Л.Д. Квачева<sup>2</sup>, Г.А. Бадун<sup>3</sup>, В.Е. Мурадян<sup>4</sup>, А.А. Масликов<sup>5</sup>*

**Изучение распределения и оценка основных фармакокинетических параметров окисленных укороченных одностенных нанотрубок в организме детенышей беспородных крыс при поступлении с молоком матери в период грудного вскармливания.**

*<sup>1</sup>ФГБУН «Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НИЦ ТБП ФМБА России), Серпухов, Московская обл.*

*<sup>2</sup>Институт элементоорганических соединений РАН, Москва*

*<sup>3</sup>Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва*

*<sup>4</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка Московской области*

*<sup>5</sup>Международный Университет природы, общества и человека «Дубна», филиал «Протвино», Московская область*

**Введение**

Одним из востребованных видов современных наноматериалов являются углеродные нанотрубки, представляющие собой наноструктурированные формы углерода. Многим исследователям в области фармакологии одностенные (однослойные) углеродные нанотрубки (ОУНТ) видятся удачным решением для создания универсальной транспортной системы доставки лекарственных субстанций с широкой перспективой использования их в наномедицине. Сегодня многочисленной группой населения, принимающей широкий спектр лекарственных средств, являются женщины репродуктивного возраста. Зачастую в период беременности и кормления грудью общее состояние женщин и обострение имеющихся у них хронических заболеваний требуют приема лекарств, которые в случае проникновения через плаценту могут вызвать антенатальные повреждения будущего потомства, либо оказать токсический эффект на новорожденного при поступлении с грудным молоком.

В настоящее время в научной литературе отсутствуют данные, касающиеся экскреции наноматериалов определенного вида с грудным молоком млекопитающих и последующего их распределения в организме детенышей в период вскармливания.

Учитывая вышеизложенное, задача оценки аспектов токсичности ОУНТ в перинатальном и неонатальном периодах приобретает особую актуальность.

В данной статье изложены результаты исследования на аутбредных крысах экскреции с грудным молоком, а также оценки распределения и основных фармакокинетических параметров укороченных окисленных одностенных углеродных нанотрубок (УОУНТ-СООН) при переносе от материнского организма детенышу в период естественного вскармливания.

### **Материалы и методы исследований**

ОУНТ отечественного производства для исследований были на контрактной основе предоставлены ООО "Карбонлайт".

Укороченные окисленные одностенные углеродные нанотрубки получали из так называемых длинных окисленных одностенных углеродных нанотрубок ОУНТ-СООН, имевших следующие характеристики: диаметр ОУНТ-СООН – 0,9 -1,5 нм, длина – 0,5 - 3 мкм, степень очистки – 80-85 % по углероду, 1-2 % по металлам, в сухом виде ОУНТ-СООН агрегированы в пучки диаметром 20-50 нм, по данным термогравиметрического анализа (ТГА) температура горения ОУНТ-СООН в атмосфере воздуха составляла 600 - 750 °С, на графеновой поверхности и фуллереновых полусферах имелись атомы углерода, несущие гидроксильные и карбоксильные группы, количество «дефектных» атомов оценивалось  $\leq$  5% от общего количества структурообразующих атомов углерода; метод синтеза – электродуговой, с использованием никеля и иттрия в качестве катализаторов; методы очистки – обработка кислотами и высокотемпературный отжиг на воздухе.

Для получения УОУНТ-СООН с длиной  $\leq$  500 нм использовали процедуру ультразвуковой резки ОУНТ-СООН в окислительных условиях [1].

Исследованный наноматериал был охарактеризован методами просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ), термогравиметрического анализа и ИК-спектроскопии [1].

Для изучения экскреции с грудным молоком и распределения данного наноматериала в организме детенышей крыс в период вскармливания были отработаны условия включения  $^3\text{H}$  - метки в ОУНТ-СООН. Радиоактивную метку включали в препараты методом термической активации [2]. Истинная удельная активность полученного

таким способом меченого препарата, определяемая при полном разложении, составляла 2,1 мКи/мг.

Количественное определение препарата  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН в тканях подопытных животных проводили с учетом оценки уровней сцинтилляции минерализатов биологических образцов [1].

Суспензии  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН с концентрацией 1,1 мг/мл готовили в водном растворе 4 % w/v проксанола-268 [3]. Для стабилизации в суспензии погружали волновод ультразвукового диспергатора Ultrasonic Processor «Cole Parmer» и проводили обработку ультразвуком в течение 30 мин при выходной мощности излучателя 600 Вт при внешнем охлаждении емкости с суспензиями в ванночке со льдом. Полученные в результате стабилизированные суспензии служили исходными для приготовления серий разбавленных калибровочных суспензий  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН в 4 % w/v проксаноле-268 и для введения экспериментальным животным. Условия стабилизации суспензий выбрали с учетом рекомендаций производителя наноматериала - ООО «Карбонлайт».

Все эксперименты с животными проводили в соответствии с действующими требованиями [4]. Однократному внутривенному введению суспензий  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН лактирующим самкам в дозе 0,8 мг/кг предшествовали плановые процедуры спаривания, определения сроков беременности, наблюдения за матерями и потомством, сортировка и отбраковка потомства с целью оставить для экспериментов хорошо сформированных, жизнеспособных особей со сходным весом в начале периода вскармливания. Таким образом, в эксперимент отобрали родивших лактирующих самок аутбредных крыс массой 300-350 г с потомством обоего пола в возрасте 12-13 суток на день инъекции матери суспензии  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН. В период эксперимента крысы содержались в стандартных условиях вивария [5], на рационе, соответствующем действующим нормам [6].

Для оценки уровней  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН в грудном молоке была выделена группа родивших лактирующих самок, представленная пятью особями. Каждая самка вскармливала по шесть детенышей. Внутривенное введение стабилизированных суспензий меченых нанотрубок в хвостовую вену было проведено в дозе 0,8 мг/кг, объем введения составлял 0,25 мл. Для приближенного измерения концентрации  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН в грудном молоке в период вскармливания через 1, 2, 5, 6, 7 и 9 суток с момента введения матери

суспензии  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН производили вскрытие потомства. У детенышей отбирали на исследование образцы желудочного содержимого. Перед вскрытием детенышей крыс подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации. Желудочное содержимое, представляющее собой чистый денатурированный белок грудного молока до момента перехода детенышей на смешанное питание, служило хорошей кинетической моделью.

Для изучения распределения и оценки основных фармакокинетических параметров  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН в организме детенышей беспородных крыс при поступлении с молоком матери в период вскармливания была использована упомянутая выше группа родивших лактирующих самок, представленная пятью особями. Для исследования накопления  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН в основных органах и тканях детенышей в период вскармливания через 1, 2, 5, 6, 7 и 9 суток с момента введения суспензии  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН матери отбирали образцы крови, тканей печени, селезёнки, почек, легких, сердечной мышцы, скелетных мышц и головного мозга. Перед вскрытием детенышей крыс подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации.

Данные по удельному содержанию  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН в образцах желудочного содержимого и во всех исследованных органах и тканях детенышей обрабатывались специализированной программой для оценки фармакокинетических и токсикокинетических параметров -WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM Version 5.2 Build 200701231637 Core Version 19 Dec 2006.

### **Результаты и обсуждение**

Ряд кинетических параметров, характеризующих экскрецию  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН с грудным молоком у лактирующих самок беспородных крыс после однократного внутривенного введения в виде стабилизированной суспензии, приведен в табл.1.

1

Таблица 1

Основные кинетические параметры экскреции  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН с грудным молоком у самок крыс.

Название параметра	N, фактическое количество исходных данных для расчета фармакокинетических параметров*	Среднее значение	Коэффициент вариации, CV %
T <sub>1/2</sub> , сут	18	2,7	8,7
AUC, сут*мкг/г		0,46	5,6
C <sub>max</sub> , мкг/г		0,12	5,9

\*- в данном случае N совпадает с количеством вскрытых в ходе эксперимента детенышей

Из данных табл. 1 следует, что <sup>3</sup>H-УОУНТ-СООН в период лактации проникали в грудное молоко подопытных крыс. После однократного внутривенного введения в дозе 0,8 мг/кг расчетная пиковая концентрация в грудном молоке составляла примерно 0,12 мкг/мл, и достигалась через 3-5 часов с момента введения. Период полувыведения составлял 2,7 суток. На 9-е сутки концентрация <sup>3</sup>H-УОУНТ-СООН в молоке превышала фоновые значения уже без статистической достоверности.

Ряд кинетических параметров, характеризующих распределение и изменение концентрации <sup>3</sup>H-УОУНТ-СООН в организме детенышей беспородных крыс при поступлении с молоком матери в период вскармливания приведены в табл. 2

2

Таблица 2

Кинетические параметры изменения концентраций <sup>3</sup>H-УОУНТ-СООН в основных органах и тканях детенышей крыс в период грудного вскармливания

Кровь			
Название параметра	N, фактическое количество исходных данных для расчета фармакокинетических параметров*	Среднее значение	Коэффициент вариации, CV %
T <sub>1/2</sub> , сут	18	2,4	14,0
AUC, сут*мкг/мл		0,88	13,1

$t_{\max}$ , СУТ		3,4	14,0
$C_{\max}$ , МКГ/МЛ		0,10	11,2
Печень			
$T_{1/2}$ , СУТ	18	2,1	2,8
AUC, СУТ*МКГ/Г		0,6	2,8
$t_{\max}$ , СУТ		3,0	2,8
$C_{\max}$ , МКГ/Г		0,07	11,2
Легкие			
$T_{1/2}$ , СУТ	18	2,1	12,8
AUC, СУТ*МКГ/Г		0,47	12,4
$t_{\max}$ , СУТ		3,1	12,8
$C_{\max}$ , МКГ/Г		0,06	11,2
Селезенка			
$T_{1/2}$ , СУТ	18	2,2	5,7
AUC, СУТ*МКГ/Г		0,71	5,5
$t_{\max}$ , СУТ		3,1	5,7
$C_{\max}$ , МКГ/Г		0,08	4,9
Головной мозг			
$T_{1/2}$ , СУТ	18	1,94	3,5
AUC, СУТ*МКГ/Г		0,53	3,4
$t_{\max}$ , СУТ		2,8	3,5
$C_{\max}$ , МКГ/Г		0,07	3,3
Почки			
$T_{1/2}$ , СУТ	18	2,2	8,8
AUC, СУТ*МКГ/Г		0,57	8,4
$t_{\max}$ , СУТ		3,2	8,8
$C_{\max}$ , МКГ/Г		0,07	7,4
Мышечная ткань			
$T_{1/2}$ , СУТ	18	2,3	8,3
AUC, СУТ*МКГ/Г		0,6	7,8
$t_{\max}$ , СУТ		3,4	8,3
$C_{\max}$ , МКГ/Г		0,07	6,7
Сердце			

$T_{1/2}$ , сут	18	1,96	12,6
AUC, сут*мкг/г		0,59	12,7
$t_{max}$ , сут		2,8	12,6
$C_{max}$ , мкг/г		0,08	11,7

\*- в данном случае N совпадает с количеством вскрытых в ходе эксперимента детенышей

Из данных табл. 2 следует, что  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН поступали в организм детенышей с молоком матери в период кормления и достоверно регистрировались во всех исследованных органах и тканях в описанных условиях эксперимента. Период наблюдений оставлял 9 суток с момента введения и приходился на финальную часть естественного периода вскармливания для крыс. Иными словами, к 9-10 суткам эксперимента детеныши стали естественным образом переходить на комбинированное питание (комбикорм + молоко матери).

$^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН сравнительно равномерно распределялись по исследованным органам и тканям детенышей ( $C_{max}$  в крови/ $C_{max}$  в ткани легких = 1,7). Максимальные концентрации отмечены в крови, сердечной мышце и селезенке, минимальная – в легких. Значения показателей периода полувыведения в различных внутренних органах и тканях варьировали от 1,94 до 2,4 суток для тканей головного мозга и крови соответственно.

По возрастанию величины параметра AUC все исследованные органы и ткани можно было расположить в следующий ряд по степени накопления  $^3\text{H}$ -УОУНТ-СООН: легкие  $\leq$  головной мозг  $\leq$  почки  $\leq$  сердце  $\leq$  скелетные мышцы  $\leq$  печень  $\leq$  кровь.

### **Выводы**

1. Впервые была изучена экскреция УОУНТ-СООН с грудным молоком на модели лактирующих крыс после однократного внутривенного введения.

2. Установлено, что при парентеральном (внутривенном) пути поступления УОУНТ-СООН в организм лактирующих самок беспородных крыс в дозе 0,8 мг/кг, экскреция с грудным молоком сохраняется на статистически значимом уровне в течение 10 суток с момента введения.

3. Впервые было установлено распределение по основным внутренним органам и оценены фармакокинетические параметры для УОУНТ-СООН у потомства крыс, получавшего нанотрубки с грудным молоком в период вскармливания.

4. Показано, что уровни накопления УОУНТ-СООН в основных органах и тканях потомства крыс достигали своих максимумов в среднем через 3,1 суток после разового попадания в организм матери. С учетом среднего периода полувыведения, составившего 2,2 суток, концентрации одностенных углеродных нанотрубок в основных органах и тканях падали до уровня фона к 9-10-м суткам с момента введения их матери; отношение  $C_{\max}$  в грудном молоке /  $\bar{C}_{\max}$  в тканях составляло 1,6.

5. Кинетический профиль УОУНТ-СООН в органах и тканях детенышей беспородных крыс при вскармливании накладывался на кинетический профиль таковых в грудном молоке матери, иными словами в конкретных условиях эксперимента естественное очищение грудного молока совпадало по времени с очищением основных органов и тканей детенышей.



## Литература

1. Алдобаев В.Н., Еременко Л.А., Мазанова А.А. и др. Изучение распределения и оценка основных фармакокинетических параметров укороченных окисленных одностенных углеродных нанотрубок (УОУНТ-СООН) при многократном внутрижелудочном введении на модели аутбредных крыс // Нанотехнологии и охрана здоровья, 2011. –№ 2 – С.16-22.
2. Алдобаев В.Н., Еременко Л.А., Мазанова А.А. и др. Изучение распределения, экскреции и оценка основных фармакокинетических параметров одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) в организме мелких лабораторных животных при различных способах введения // Сборник тезисов докладов научно-технологических сессий Международного форума по нанотехнологиям «Rusnanotech'08», Москва, 2008. – Т. 2. – С. 314-315.
3. Иваницкий Г.Р., Воробьев С.И. Кровезаменитель “Перфторан” // Вестник РАН, 1997. – Т. 67. – № 11. – С. 998-1013.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть первая – Издание ФГБУ «НЦЭМСП» Минздравсоцразвития России, 2012.
5. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 6 апреля 1973 г. № 1045-73.
6. Приказ Минздрава СССР № 1179 от 14.10.83 года «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».