



## НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК 615.9

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ АЛЮМОСИЛИКАТНЫХ НАНОТРУБОК

Н.М. Митрохин<sup>1</sup>, М.И. Голубева<sup>1</sup>,  
И.Н. Разумная<sup>1</sup>, С.А. Фастов<sup>2</sup>,  
И.С. Фастов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» АО «ВНЦ БАВ», 142450, Московская область, г. Старая Купавна, Российская Федерация

<sup>2</sup>ЗАО «Нанотехнологии и инновации», 124482, г. Москва, Зеленоград, Российская Федерация

**А**люмосиликатные нанотрубки рассматриваются как новый класс носителей биологически активных веществ. Исследование проведено в соответствии с действующими нормативно-методическими документами с целью экспериментальной оценки острой токсичности и опасности алюмосиликатных нанотрубок (каолин трубчатый обогащённый) при внутрижелудочном введении и нанесении на кожу мышей и крыс. В работе показано, что алюмосиликатные трубы (производство ЗАО «НТИ», Россия) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 могут быть отнесены к веществам 4 класса опасности (вещества малоопасные). На основании результатов исследования можно полагать, что получен перспективный наноразмерный материал, который может быть использован в качестве носителя лекарственных средств

**Ключевые слова:** алюмосиликатные нанотрубки (каолин трубчатый обогащённый), острая токсичность и опасность, внутрижелудочное введение, нанесение на кожу, мыши, крысы.

**Введение.** Изучение биологических эффектов наночастиц и наноматериалов является актуальной проблемой. Известно, что наночастицы могут проникать в организм через различные барьеры, в том числе через кожу, слизистую дыхательных путей, желудочно-кишечный тракт. Токсическое действие наночастиц определяется не только их массой, но также их размерами и формой [1,2].

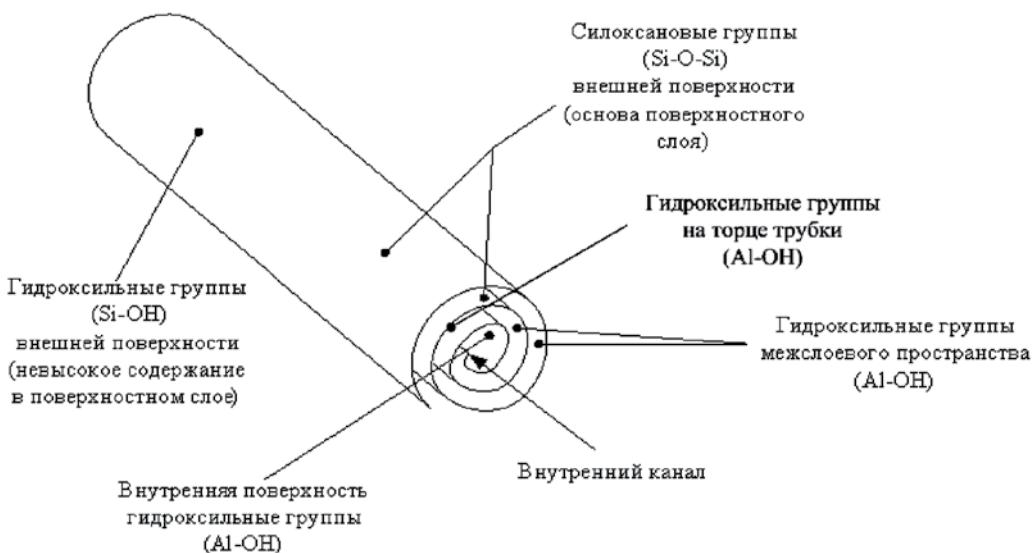
Алюмосиликатные нанотрубки (АНТ) (каолин трубчатый обогащённый) могут рассматриваться как новый класс наноносителей биологически активных веществ для использования в медицине при создании новых лекарственных форм препаратов.

АНТ имеют многослойную трубчатую структуру, характеристика которой схематично представлена на рисунке 1. АНТ обладают внутрен-

ней полостью, в связи с чем находят применение в качестве контейнеров для адресной доставки лекарственных средств (ЛС) и обеспечения их пролонгированного действия [3-7]. АНТ характеризуются химической стабильностью, механической прочностью и высокой сорбционной способностью, что дает возможность помещать ЛС внутрь полости [5-8]. АНТ могут быть получены как из природных источников, так и путем химического синтеза [5]. В работе [9] показано, что АНТ обладают низкой цитотоксичностью, что подтверждает перспективность их использования в медицинских целях.

Настоящее исследование проведено с целью экспериментальной оценки острой токсичности и опасности АНТ на мышах и крысах при внутрижелудочном (в/ж) введении и нанесении на кожу.

**Митрохин Николай Михайлович** (Mitrokhin Nikolay Mihailovich), доктор биологических наук, профессор, генеральный директор АО «ВНЦ БАВ», 142450, Московская обл. г. Старая Купавна, Российская Федерация  
**Голубева Маргарита Ивановна** (Golubeva Margarita Ivanovna), кандидат биологических наук, завед. лаб. профилактической токсикологии и гигиены АО «ВНЦ БАВ», 142450, Московская обл. г. Старая Купавна, Российская Федерация, vnc@pc-club.ru,  
**Разумная Ирина Николаевна** (Razumnaya Irina Nikolaevna) АО «ВНЦ БАВ», 142450, Московская обл. г. Старая Купавна, Российская Федерация  
**Фастов Сергей Анатольевич** (Fastow Sergey Anatoljevich) ЗАО «Нанотехнологии и инновации», 124482, г. Москва, Зеленоград, Российская Федерация  
**Фастов Илья Сергеевич** (Fastow Ilya Sergeevich) ЗАО «Нанотехнологии и инновации», 124482, г. Москва, Зеленоград, Российская Федерация



**Рис. 1.** Схематичное изображение многослойной трубчатой структуры алюмосиликатных нанотрубок.

**Материалы и методы исследования.** АНТ произведены компанией ЗАО «Нанотехнологии и инновации» из природного каолина по ТУ 57 2920-001-17527415-12. Порошкообразный материал АНТ в основном представлен трубчатой фракцией (не менее 80%). Измерение размеров АНТ проведено при помощи атомно-силового микроскопа «Solver Pro, NT-MDT» и просвечивающей электронной микроскопии на Hitachi H-500 (рис. 2).

Внешний диаметр АНТ составляет 90-140 нм, внутренний диаметр – 10-60 нм, длина – 300-2000 нм. Удельная поверхность использованных нанотрубок составляет 62.4 м<sup>2</sup>/г, удельный вес 2.55 г / см<sup>3</sup>. Химический состав алюмосиликатных нанотрубок: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 2SiO<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O.

Экспериментальные исследования проводили в соответствии с действующими нормативно-методическими документами и Приказом Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». Эксперименты проводились в весенний период. Животных, полученных из питомника РАМН, прошедших карантин в течение 10 дней, содержали в однотипных условиях вивария на стандартном пищевом рационе. В экспериментах использовали нелинейных белых мышей самцов и самок массой тела 18-24 г, нелинейных белых крыс самцов и самок массой тела 180-240 г. Группы формировались методом случайных чисел с использованием массы тела в качестве ведущего признака. Каждая подопытная и контрольная группа состояла из 10 особей.

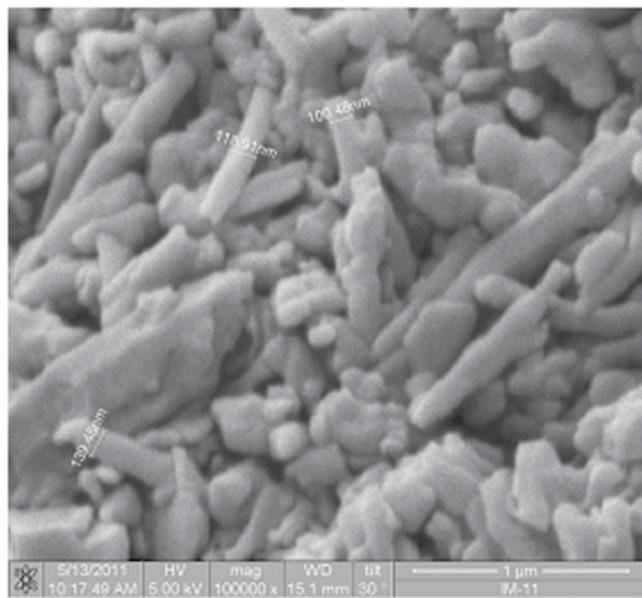
Проведено изучение острой токсичности АНТ при в/ж введении крысам и мышам в виде суспензии в 1% крахмальном геле в максимально допустимых объемах и нанесении на кожу крысам

в виде мази на вазелиновой основе (при экспозиции 4 часа), мышам «пробирочным методом» при погружении хвостов на 2/3 их длины в 25 %-ную взвесь препарата в 1 % крахмальном геле (на 2 ч). Период наблюдения за животными после однократного введения препарата составил 14 дней.

Общее состояние подопытных животных определяли по внешнему виду, поведенческим реакциям, клинической картине интоксикации, пищевой активности, динамике массы тела (еженедельно). Критерием острой токсичности служили изменения этих показателей и возможная гибель подопытных животных. Кроме того, оценивали признаки возможного местного раздражающего действия АНТ. По завершении эксперимента подопытных крыс подвергали эвтаназии, вскрывали, оценивали макроскопическую картину, определяли относительную массу органов (печень, сердце, селезенка, почки, надпочечники, щитовидная железа, тимус, у самок – яичники, матку, у самцов – семенники). Класс опасности вещества при в/ж и накожном путях поступления определяли в соответствии с классификацией ГОСТ 12.1.007-76.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием критерия t Стьюдента. Разницу между контролем и опытом считали достоверной при P≤0,05.

**Результаты и обсуждение.** Определение острой токсичности АНТ при в/ж введении крысам. В/ж крысам самцам и самкам АНТ вводили в диапазоне доз от 5000 до 20000 мг/кг. АНТ в дозах 15000 и 20000 мг/кг вводили дробно в два приема с интервалом в два часа, введение в больших дозах технически не представляется возможным. Признаков токсического отравления, а также гибели при введении испытанных доз



а.



б.

**Рис. 2. а.** Изображения алюмосиликатных нанотрубок, полученные на РЭМ «Quanta 200 3D»  
**б.** Изображения алюмосиликатных нанотрубок, полученные на АСМ «Solver Pro, NT-MDT» и на ПЭМ Hitachi H-500.

не отмечали. Динамика массы тела подопытных крыс самцов и самок не отличалась от контрольных групп.

При макроскопическом исследовании внутренних органов подопытных и контрольных животных во время вскрытия в конце эксперимента каких-либо особенностей не выявлено. Органы расположены правильно, свободная жидкость в грудной и брюшной полостях отсутствует. Определение относительной массы внутренних органов контрольных и подопытных крыс (самцов и самок), получавших АНТ в максимальной дозе 20000 мг/кг, не выявило достоверных отклонений от контроля.

Таким образом, величина  $DL_{50}$  АНТ при в/ж введении крысам самцам и самкам составила более 20000 мг/кг.

*Определение острой токсичности АНТ при в/ж введении мышам.* В/ж мышам самцам и самкам АНТ вводили в диапазоне доз от 5000 до 20000 мг/кг. Доза 20000 мг/кг технически является максимально вводимой. После введения АНТ в дозах 10000, 15000 и 20000 мг/кг через 2-3 минуты у животных отмечали снижение двигательной активности, которое сохранялось в течение 1-1,5 часов, после чего состояние животных нормализовалось. У контрольных мышей, которым в/ж вводили 1% крахмальный гель, не отмечали изменений в поведении.

В дальнейшем в течение всего периода наблюдения (14 дней) подопытные животные по поведению, двигательной и пищевой активности, дина-

мике массы тела не отличались от контрольных. Гибели мышей при введении испытанных доз не отмечали.

*Определение острой токсичности АНТ при накожном нанесении крысам.* На крысах острую токсичность АНТ изучали при эпидермальной аппликации на эпилированную кожу в виде вазелиновой мази в концентрациях 25 %, 50 %, и 65 %, что соответствует дозам 1250 мг/кг (15 мг/см<sup>2</sup>), 2500 мг/кг (30 мг/см<sup>2</sup>) и 3250 мг/кг (40 мг/см<sup>2</sup>). Нанесение вещества в больших концентрациях технически не представляется возможным. Признаков токсического отравления, гибели животных, а также местного раздражающего действия вещества при аппликации в испытанных концентрациях не наблюдали. Динамика массы тела крыс при однократном нанесении на кожу мази АНТ не отличалась от контроля.

При макроскопическом исследовании внутренних органов во время вскрытия в конце эксперимента каких-либо особенностей не выявлено. Органы расположены правильно, свободная жидкость в грудной и брюшной полостях отсутствует. Определение относительной массы внутренних органов контрольных и подопытных крыс (самцов и самок), подвергавшихся воздействию АНТ в максимальной дозе 3250 мг/кг (40 мг/см<sup>2</sup>), не выявило достоверных отклонений от контроля.

*Определение острой токсичности АНТ при накожном нанесении мышам.* Клинических признаков интоксикации и гибели мышей самцов и самок при хвостовой аппликации 25 % взвеси

алюмосиликатных нанотрубок в 1 % крахмальном геле не наблюдали. Динамика массы тела мышей не отличалась от контроля.

**Заключение.** Изучена острая токсичность препарата АНТ (каолин трубчатый обогащенный) производства ЗАО «НТИИ», Россия, при однократном в/ж введении и нанесении на кожу нелинейных крыс обоего пола и нелинейных мышей обоего пола.  $DL_{50}$  АНТ для крыс обоего пола и мышей обоего пола при в/ж поступлении составила более 20000 мг/кг.  $DL_{50}$  АНТ для крыс

обоего пола и мышей обоего пола при нанесении на кожу составила более 3250 мг/кг (40 мг/см<sup>2</sup>).

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что при в/ж введении и нанесении на кожу лабораторным грызунам (крысы обоего пола и мыши обоего пола) АНТ (каолин трубчатый обогащенный) производства ЗАО «НТИИ», Россия в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 по уровню средних смертельных доз ( $DL_{50}$ ) может быть отнесен к веществам 4 класса опасности (вещества малоопасные).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.** Хамидулина Х.Х., Давыдова Ю.О. Международные подходы к оценке токсичности и опасности наночастиц и наноматериалов.// Токсикологический вестник. - 57-53 - №6. - 2011.
- 2.** Elder, E.C.P. *The Toxicology of Nanomaterials*. - Univ. Rochester, 2007 37 - p.
- 3.** M. Ebbesen, T. G. Jensen. *Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications*. *J. Biomed. Biotech.*, 2006) 11-1 ,1).
- 4.** S. Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, A. M. Seifalian. *A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools*, *Int. J. Nanomedicine*, 2011) 2979-2963 ,6).
- 5.** Крылов И.Б., Терентьев А.О., Фастов С.А. Анализ состава и геометрических параметров алюмосиликатных нанотрубок. В кн.: Сборник материалов III Всероссийской молодежной конференции с элементами научной школы «Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества». М.; 2012: - С. 39-37.
- 7.** Y.M. Lvov and R.R. Price, *Halloysite nanotubules: a novel substrate for the controlled delivery of bioactive molecules*, in *Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials*. Wiley, chap. 14, p. 454 (2008)).
- 8.** Elshad Abdullayev, Yuri Lvov, *Halloysite Clay Nanotubes as Ceramic «Skeleton» for Functional Biopolymer Composites with Sustained Drug Release*, *Journal of Materials Chemistry B*, 2903-2894, 1, 2013, DOI: 10.1039/C3TB20059K, Feature Article.
- 9.** Sergey A. Fastov, Alexey O. Terent'ev, Ilija S. Fastov, Victoria V. Firstova, Olga V. Kalmantseva. *Study of halloysite clay nanotube toxicity as related to their structure* // 245st ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, LA. April //2013 ,11-7 277 PMSE/POLY Poster Session, веб публикация: [http://abstracts.acs.org/chem/245nm/program/view.php?obj\\_id=185265&terms=](http://abstracts.acs.org/chem/245nm/program/view.php?obj_id=185265&terms=)

## REFERENCES:

- 1.** Khamidulina Kh.Kh., Davydova Yu.O. International approaches to assessment toxicity and hazard nanoparticles and nanomaterials.// *Toksikologicheskiy vestnik*, 2011.- №6.- P. 53-57. (in Russian)
- 2.** Elder, E.C.P. *The Toxicology of Nanomaterials*. – Univ. Rochester, 2007. – 37 p.
- 3.** M. Ebbesen, T. G. Jensen. *Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications*. *J. Biomed. Biotech.*, 1, 1-11 (2006).
- 4.** S. Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, A. M. Seifalian. *A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools*, *Int. J. Nanomedicine*, 6, 2963-2979 (2011).
- 5.** Krylov I.B., Terent'ev A.O., Fastov S.A. Analysis of the composition and geometrical parameters aluminosilicate nanotubes. In the book.: Collection of III All-Russian Youth Conference with elements of scientific school "Functional nanomaterials and high-purity substances", M.; 2012: 37-39. (in Russian)
- 7.** Y.M. Lvov and R.R. Price, *Halloysite nanotubules: a novel substrate for the controlled delivery of bioactive molecules*, in *Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials*. Wiley, chap. 14, p. 454 (2008).
- 8.** Elshad Abdullayev, Yuri Lvov, *Halloysite Clay Nanotubes as Ceramic «Skeleton» for Functional Biopolymer Composites with Sustained Drug Release*, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1, 2894-2903, DOI: 10.1039/C3TB20059K, Feature Article.
- 9.** Sergey A. Fastov, Alexey O. Terent'ev, Ilija S. Fastov, Victoria V. Firstova, Olga V. Kalmantseva. *Study of halloysite clay nanotube toxicity as related to their structure* // 245st ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, LA. April 7-11, 2013 // 277 PMSE/POLY Poster Session, web-publishing: [http://abstracts.acs.org/chem/245nm/program/view.php?obj\\_id=185265&terms=](http://abstracts.acs.org/chem/245nm/program/view.php?obj_id=185265&terms=)

N.M. Mitrokhin<sup>1</sup>, M.I. Golubeva<sup>1</sup>, I.N. Razumnaya<sup>1</sup>, S.A. Fastov<sup>2</sup>, I.S. Fastov<sup>2</sup>

## EXPERIMENTAL DATA ON INVESTIGATION INTO TOXICITY AND HAZARD OF ALUMINOSILICATE NANOTUBES

<sup>1</sup> Joint-stock Company «National Research Center for Biologically Active Compounds», 142450, Staraya Kupavna, Moscow region, Russian Federation

<sup>2</sup>Closed Joint-Stock Company «Nanotechnologies & Innovations» (JSC N&T), 124482 Zelenograd, Moscow, Russian Federation

Aluminosilicate clay nanotubes (ANT, halloysite clay) are considered as a new class of carriers for biologically active substances. The study was conducted in accordance with regulatory guidance documents in force for the purpose of experimental evaluation of acute toxicity and hazard of ANT intragastrically administrated and applied to the skin in mice and rats. It is shown that the tubular enriched kaolin (aluminosilicate clay nanotubes) (production of °SC «NT&I», Russia) in accordance with GOST 12.1.007-76 may be referred to hazard class 4 (low hazard substance). Based on the results of the study, it could be said that a promising nano-sized material (ANT) was produced that can be used as a drug carrier for medications.

**Keywords:** Aluminosilicate clay nanotubes (halloysite clay), acute toxicity and hazard, intra gastric administration, application to skin, mice, rats.

Материал поступил в редакцию 26.01.2016 г.