

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Саратовский государственный университет генетики,
биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

На правах рукописи

Алексеев Алексей Александрович

**ФАРМАКОЛОГИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ
СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ВОДНОГО РАСТВОРА ФУЛЛЕРЕНА C₆₀
ДЛЯ КОШЕК**

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология
и токсикология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент Пудовкин Николай
Александрович

Саратов 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
1 Обзор литературы	9
1.1. Физико-химические свойства фуллеренов	9
1.2. Биологические свойства соединений фуллеренов	14
1.3. Токсикологические свойства фуллеренов	25
1.4. Применение соединений фуллеренов в различных отраслях экономики	32
2 Материалы и методы исследований	36
3 Собственные исследования	41
3.1. Разработка соединения на основе водного раствора фуллерена C ₆₀ , ресвератрола и бетаина гидрохлорида	41
3.2. Токсикологическая характеристика соединения на основе водного раствора фуллерена C ₆₀ , ресвератрола и бетаина гидрохлорида, применяемого на лабораторных животных	42
3.3. Изменение белково-азотистого обмена у животных под действием водного раствора фуллерена C ₆₀	51
3.4. Влияние нанокompозитного раствора фуллерена C ₆₀ на состояние мочевинообразовательной функции печени животных	62
3.5. Система крови животных под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C ₆₀ , ресвератрола и бетаина гидрохлорида	72
3.6. Состояние про- и антиоксидантной системы защиты организма животных под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C ₆₀ , ресвератрола и бетаина гидрохлорида	81
3.7. Анализ фармакологической эффективности соединения «Гепатопротекторный и антиоксидантный препарат для животных на основе водного раствора фуллерена C ₆₀ , ресвератрола и бетаина гидрохлорида»	89
Заключение	91
Практические предложения	92
Перспективы дальнейшей разработки темы	93
Список сокращений	94
Список литературы	95
Приложения	122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследований. Актуальной проблемой развития нанотехнологий является создание новых материалов, основанных на создании гибридных наноструктур, для различных отраслей экономики. При изучении наноматериалов в настоящее время значительное место отводится наноуглеродным структурам, в том числе фуллеренам [26, 29,94].

Установлено, что водорастворимые аддукты фуллеренов обладают широким спектром биологической активности и проявляют фотодинамическую, антибактериальную, про- и антиоксидантную активность и могут найти свое применение в ветеринарной медицине [62].

Исследования химических, физических и биологических свойств фуллеренов являются основой для дальнейшей перспективной работы в этой области. Их уникальная структура углеродного каркаса в сочетании с огромными возможностями для дериватизации делает фуллерены потенциальным терапевтическим агентом [11].

Фуллерены обладают структурой замкнутой поверхности с сильно развитой системой π -электронов. Они способны к реакциям присоединения, используя которые можно получить широкий спектр продуктов с разнообразными физико-химическими и биологическими свойствами [77]. Однако применение соединений на основе наночастиц фуллеренов остается ограниченным. Поэтому разработка отечественных инновационных лекарственных соединений на основе фуллеренсодержащих наночастиц является одним из приоритетных направлений ветеринарной медицины.

Степень разработанности темы. Потенциал применения фуллерена C_{60} в медицинской химии в качестве биологически активного соединения обоснован в знаковой работе Friedman S.H. et al. [153].

К настоящему моменту достигнуты значительные успехи в области химической модификации фуллеренов для получения водорастворимых производных, такие как карбоксилирование [211], гидрокселирование [130], а также разнообразных комплексов фуллеренов с водорастворимыми

полимерами (например, поли-N-винилпирролидоном (ПВП)) [213], биологически активными соединениями (пептидами, протеинами и другими олигонуклеотидами) [135].

Известные российские ученые занимались изучением физико-химических и биологических свойств соединений фуллеренов: М.А. Думпис, 2012–2019 [23,22,95,63,88,9,11,58]; Л.Б. Пиотровский, 2013–2022 [95,58,34,18,84]; Д.В. Курилов, 2019 – 2021 [19,4,15,52,94,47].

На сегодняшний день имеются единичные упоминания об использовании наноструктурных соединений фуллеренов в биологической науке [49, 94, 73]. Однако никогда не проводилось комплексное лечебно-профилактическое исследование влияния соединений фуллерена на организм животных. Кроме того, не устанавливалась фармако-токсикологическая характеристика влияния данных соединений на гематологические показатели, уровень свободнорадикального окисления, активность антиоксидантной и ферментативной системы животных.

Цель и задачи исследований. Цель работы – разработка фармакологического соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} ; изучение его фармако-токсикологического свойства и эффективности применения животным.

Для достижения заданной цели нами были поставлены следующие задачи.

1. Разработать фармакологическую композицию на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида, установить ее токсикологическую характеристику для лабораторных животных.
2. Изучить изменение белково-азотистого обмена у животных под действием соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} .
3. Дать оценку влияния нанокompозитного раствора фуллерена C_{60} на состояние мочевинообразовательной функции печени животных.
4. Установить изменения в состоянии обмена железа в организме животных под влиянием раствора фуллерена C_{60} .

5. Изучить реакцию свободнорадикальных процессов и состояние антиоксидантной системы организма на введение фармакологической композиции на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида.

Научная новизна. Впервые в ветеринарной практике создана новая фармакологическая композиция на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Обоснована возможность его применения животным. Дана токсикологическая характеристика данного соединения. Изучена фармакодинамика композиции на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Дополнены сведения о влиянии нанофуллеренов на окислительно-восстановительные процессы в организме животных и систему крови.

Научная новизна работы подтверждена 2 патентами на изобретение РФ № 2770534 С1 «Гепатопротекторный и антиоксидантный препарат для животных на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида» и № 2793128 «Препарат на основе водного раствора фуллерена C₆₀, цинка, витамина D₃, С и кверцетина для животных».

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в том, что изучены некоторые особенности действия фармакологической композиции на основе водного раствора фуллерена C₆₀ на организм животных. Определено влияние данных соединений на функциональные способности систем организма – кровеносную и антиоксидантную.

Практическая значимость работы заключается в том, что результаты исследований обосновывают применение данного соединения для лечения и профилактики свободнорадикальных патологий у мелких непродуктивных видов животных (кошек).

Результаты исследований внедрены в ветеринарных клиниках «Ветеринарная диагностика» г. Пензы и «Велес» г. Протвино.

Полученные данные включены в учебный процесс в ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева» и ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова».

Методология и методы исследований. Методологическим подходом к решению поставленных задач явилось системное изучение объектов исследования, анализ и обобщение полученных результатов. Объект исследований – фармакологическая композиция на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Экспериментальные работы с целью определения фармакологических и токсикологических характеристик соединений в разных дозировках проводили на беспородных белых крысах при подкожном и внутрижелудочном введении. Изучение кожно-резорбтивного и аллергического действий проводили на морских свинках. Производственный опыт проведен на мелких непродуктивных животных в условиях клиники «Ветеринарная диагностика» Пензенской области. Цифровой материал подвергался статистической обработке с вычислением критерия Стьюдента на персональном компьютере с использованием стандартной программы вариационной статистики Microsoft Excel.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. По токсикологическим свойствам композиция на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида относится к малоопасным веществам и не вызывает раздражающего и аллергического действия.

2. Влияние соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида на обменные процессы в организме.

3. Соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида оказывает положительное влияние на лечение и профилактику свободнорадикальных патологий в организме животных.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности и обоснованность диссертационных исследований подтверждается значительным объемом комплексных исследований на большом количестве животных, проведенных на современном оборудовании и включающих фармако-токсикологический, клинический, морфо-биохимический, весовой и физико-химический методы исследований, как в эксперименте, на ограниченном количестве животных, так и в условиях ветеринарных клиник. Достоверность исследований обеспечена использованием метода анализа и математической обработки полученных результатов на современном оборудовании.

Материалы диссертации доложены, обсуждены и одобрены на: II Всероссийской (Национальной) научно-практической конференции «АПК России: образование, наука, производство» (г. Пенза, 28–29 сентября 2021 г.); Международной научно-практической конференции «Интеграция образования, науки и практики в АПК: проблемы и перспективы» (г. Луганск, 9–11 ноября 2021 г.); II Всероссийской (Национальной) научно-практической конференции «Наука и образование в XXI веке: современные векторы развития и перспективы» (г. Саратов, 20 января 2022 г.); конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2021 год (г. Саратов, 2 марта 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (г. Санкт-Петербург, 29–30 сентября 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные решения приоритетных задач токсикологии и биотехнологии» (г. Казань, 28 октября 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Современные научные тенденции в ветеринарии» (г. Саратов, 2 декабря 2022 г.).

Публикации. По материалам диссертационных исследований опубликовано 13 научных работ, в том числе 2 патента и 6 статей – в журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки

РФ, для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций. Общий объем публикаций составляет 5,82 печ. л., из которых 3,88 печ. л. принадлежат лично соискателю.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 121 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, собственных исследований и заключения. Список литературы включает в себя 217 источников, из них 118 – иностранных. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 31 рисунками.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Физико-химические свойства фуллеренов

Молекулярный фуллерен состоит из атомов углерода с одинарной и двойной связью, что делает его аллотропом углерода. Как следствие, многие атомы заключены в клеточную структуру (сетку из слитых колец), которая может быть полностью или частично замкнутой. В этой конфигурации молекула фуллерена может принимать самые разные формы и размеры, включая полую сферическую форму, эллипсоид, трубку и многие другие [51,61,71]. Углеродные нанотрубки представляют собой структуры, состоящие из молекул углерода, выстроенных в цилиндрическую форму.

Природные фуллерены часто представляют собой довольно симметричные структуры. Их структура схожа с шестиугольными кольцами и очень похожа на структуру графита.

Исследования фуллерена C_{60} начались в 1985 г., когда Kroto H.W., Curl R.F. и Smalley R.E. [114] открыли третью аллотропную форму углерода после алмаза и графита. О первой реакции функционализации сообщалось вскоре после того, как фуллерены были синтезированы в макроскопических количествах в 1990 г. Функционализированные фуллерены обладают повышенной растворимостью и различными химическими и физическими свойствами, которые позволяют применять их во многих областях. В 1993 г. Wudl F. [198] и его коллеги сообщили о первом водорастворимом производном фуллерена, которое ингибировало активность протеазы ВИЧ-1 (ВИЧ-1 PR) [155,115,129].

Трехмерная форма молекул фуллеренов придает им уникальные физико-химические свойства [87].

Из-за сферической формы фуллеренов атомы углерода сильно пирамидализованы, поэтому обладают высокой реакционной способностью.

Фуллерены C_{60} и C_{70} могут быть обратимо восстановлены с использованием до шести электронов. Это высокое сродство с электроном является результатом присутствия трижды вырожденных низколежащих незанятых молекулярных орбиталей.

Фуллерены могут противостоять высокому давлению и возвращаться к своей первоначальной форме после воздействия более 3000 атмосфер [40,41,42]. Теоретически было рассчитано, что одна молекула C_{60} имеет эффективный модуль объемного сжатия 668 ГПа при сжатии до 75 % ее размера. Это свойство делает фуллерены более твердыми, чем сталь и алмаз, объемные модули которых составляют 160 и 442 ГПа соответственно [187,157,134].

Фуллерены – единственные известные аллотропы углерода, которые можно растворить в некоторых обычных растворителях при комнатной температуре [54].

Исследования растворимости фуллеренов показывали противоречивые и непредсказуемые результаты. Поэтому нет надежной теории, объясняющей поведение фуллеренов в различных растворителях [191,169,149]. Растворимость чистого фуллерена C_{60} при комнатной температуре была определена примерно в 150 растворителях. Установлено, что растворимость охватывает широкий диапазон от 0,01 мг/мл в метаноле до 51,68 мг/мл в 1-хлор-нафталине. Кроме того, растворимость фуллерена C_{70} была измерена в 70 растворителях, однако она ниже, чем у C_{60} .

Растворимость в воде значительно увеличивается путем добавления гидроксильных групп к клетке (давая фуллеренолы).

Для повышения растворимости фуллеренов в воде был разработан ряд методов, таких как приготовление двухфазных коллоидных растворов, синтез производных фуллеренов и полимеров фуллеренов [138,133]. Механизм диспергирования фуллеренов в водных растворах можно объяснить двумя способами: 1) образованием водной оболочки за счет Н-связи и переноса заряда между фуллереном C_{60} и молекулой воды стабилизируют фуллерен в

воде [179,110]; 2) ультразвуковой обработкой, которая создает ковалентную связь между гидроксильными группами и атомами углерода в клетке фуллерена [179,120]. Другие попытки включают инкапсуляцию в специальные носители, такие как циклодекстрины, каликсарены, поливинилпирролидон, мицеллы и липосомы, которые дают преимущества для биофармацевтических приложений, таких как доставка лекарств [113,137].

Сообщалось о больших показателях преломления, диэлектрической проницаемости около 4, больших молекулярных объемах и параметре растворимости Гильдебранда равном $10 \text{ кал}^{1/2} \text{ см}^{-3/2}$, для растворов фуллерена C_{60} .

Через некоторое время после открытия фуллеренов было обнаружено множество их химических модификаций.

1. Эндоедральные фуллерены. Фуллерены с атомами или молекулами металлических кластеров.

Первое описание получения эндоедрального металлофуллерена методом масс-спектрометрии было проведено в 1985 г., а первое выделение – в 1991 г.

В настоящее время существуют различные синтетические методы получения эндоедральных фуллеренов. Например, метод под действием высокой температуры и высокого давления, а также ионной имплантации. Также можно синтезировать эндоедральные фуллерены, инкапсулируемые в благородный газ или атомы неметаллов, такие как N и P.

Следует отметить, что эндоедральные фуллерены с захваченными металлами особенно привлекательны, поскольку очевиден перенос заряда от атомов металла к фуллереновому каркасу, что делает образовавшиеся молекулы уникальными [13]. Это новое семейство металлоуглеродных материалов получило название эндоэдралметаллофуллерены (ЭМФ).

По типу ЭМФ обычно подразделяются на три категории: моно-ЭМФ, ди-ЭМФ и кластер-ЭМФ. Моноэндофуллерены содержат только один атом чистого металла, поэтому они считаются простейшим прототипом ЭМФ. Ди-

ЭМФ содержат два атома чистого металла и обычно обозначаются $M_2@C_n$. Кластер-ЭМФ инкапсулирует различные кластеры, состоящие из разных групп атомов металлов и неметаллов и, следовательно, существенно расширяющих мир эндодральных фуллеренов [78].

На сегодняшний день кластерные ЭМФ, такие как кластерфуллерены нитридов металлов, кластерфуллерены карбидов металлов, металлические оксидные кластерфуллерены, сульфидные кластерфуллерены металлов являются наиболее изученными кластерными фуллеренами.

2. Фуллерены с открытой структурой. К этой группе обычно относят производные фуллеренов, которые подверглись более чем одному разрыву S-связи, при этом их P-система существенно нарушается [158,182]. Аддукты фуллеренов с такой структурой называются фуллероидами. Присоединение органических азидов к фуллерену приводит к выделению азафуллеренов [97].

Первое соединение фуллерена с открытой структурой было синтезировано в 1995 г. посредством самофотооксигенации. Расширение кольца фуллеренов с открытой структурой может быть реализовано региоселективным методом, реакцией присоединения ароматических гидразинов, гидразонов и 1,2-фенилендиаминов в производные дикетонов и фуллеренов с открытой структурой путем внедрения атомов серы или селена [21,54].

3. Димерные и конденсированные фуллерены. Фуллерены могут быть либо непосредственно связаны, либо соединены через функционализированный спейсер с образованием димерных фуллеренов, их также можно сплавить вместе с образованием конденсированных фуллеренов.

Димерные и конденсированные фуллерены представляют собой новый класс аллотропов углерода и вновь модифицированных фуллеренов. Усилия в этой области были в основном направлены на создание полноуглеродных

димеров и полимеров фуллеренов с использованием физических методов, таких как лазерное облучение.

Ковалентные фуллерены содержат два фуллереновых каркаса.

4. Углеродные нанотрубки. Открытие этих трубчатых углеродных нано-структур, а именно углеродных нанотрубок, вызвало большой интерес. Идеальную структуру углеродных нанотрубок обычно изображают как длинный цилиндр, увенчанный на концах двумя кусочками полуфуллеренов.

Углеродные нанотрубки можно разделить на две категории: одностенные углеродные нанотрубки (ОСНТ) (параллельно пустым фуллеренам) и многостенные углеродные нанотрубки-трубки (МУНТ) (параллельные луковичные фуллерены) [83].

Наибольший интерес представляют трубки, которые обычно синтезируются с помощью дугового разряда, лазерная абляция. Нанотрубки также могут образовываться во время горения и пиролиза углеводородов, а при тонком измельчении в последних условиях в качестве катализаторов используются металлы.

Применение более сложных молекул соединений фуллерена до недавнего времени было ограниченным. Однако в настоящее время все более широкое применение фуллерены находят в качестве костных и коллагеновых каркасов, носителей лекарств и генов, а также биосенсоров.

Кроме того, фуллерены имеют значительный потенциал для защиты нейронных схем и долговременной памяти. Появляется все больше исследований о благоприятных клинических свойствах фуллерена C_{60} и других однослойных фуллеренов, а также наноуглеродов на основе графена. Наноуглероды на основе графена имеют общие химические или электродинамические характеристики и свойства [160,136].

Усиленное антиоксидантное действие фуллеренов способствует непосредственному увеличению молекулы фуллерена [82].

Молекула фуллерена до конца не изучена, также не изучено ее влияние на организм в результате дефектов оболочки, которые достаточно часто встречаются в более крупных молекулах.

Анионные производные фуллерена показали антиоксидантные свойства, тогда как катионные производные показали антибактериальные и антипролиферативные свойства. Производные аминокислотного типа оказались наиболее активными из всех производных фуллеренов.

Таким образом, синтезировано множество производных фуллеренов. Получено много патентов на фуллерены, и их база данных быстро растет. Фуллерены и их производные интенсивно исследуются, так как полученные данные свидетельствуют о перспективности их использования в различных отраслях экономики.

1.2 Биологические свойства соединений фуллеренов

Фуллерены инертны, при пероральном введении в водорастворимой форме они не усваиваются в организме. При внутривенном и внутримышечном введении они быстро распределяются по различным тканям организма. Выделяются в основном почками в неизменном виде. Острая токсичность водорастворимых фуллеренов довольно низкая.

Наиболее широко известно антиоксидантное свойство фуллеренов. Свободные радикалы связаны с началом и прогрессированием нейрогенеративных и других заболеваний.

Фуллереновые соединения с их уникальной каркасной структурой в сочетании с большим количеством сопряженных двойных связей в ядре взаимодействуют с биомолекулами и обладают активной реактивностью со свободными радикалами [105,197]. Фуллерены способны удалять несколько радикалов в молекуле и присоединять до 34 метильных радикалов к одной молекуле. Следовательно, они рассматриваются как «свободнорадикальная губка».

Ядро фуллерена может взаимодействовать со свободными радикалами, учитывая его способность поглощать электроны и рассеивать их через 20 бензольных колец, распределенных по его поверхности.

Установлено, что виды гидроксифункциональных групп (ОН) предотвращают ишемию (отравление из-за недостатка кислорода), которая инициируется и распространяется через внезапное увеличение АФК, поскольку ткани реагируют на истощение энергии [133].

Механизм ингибирования фуллеренами АФК происходит за счет ингибирования клеточных уровней АФК.

Установлено, что водорастворимое производное C_{60} , фуллеренол, удаляет свободные радикалы *in vitro* и *in vivo*.

После внутривенного введения крысам SD 90–95 % меченных ^{14}C пирролидиновых фуллереновых частиц распределяются по различным органам, накапливаясь в основном в печени, умеренно проникают через гематоэнцефалический барьер и быстро выводятся через почки [168, 162].

Было показано, что фуллеренол блокирует индуцируемую перекись водорода в гиппокампе крыс [23].

Карбоксифуллерен – другое водорастворимое производное фуллерена, предотвращает апоптотическое повреждение, вызываемое N-метил-D-аспартатом, препятствуя индуцированному притоку Ca^{2+} в клетки коры головного мозга, эффективно проявляя нейропротекторную антиоксидантную активность *in vitro* и *in vivo* (в сотни раз мощнее витамина E) [45].

Защитный эффект фуллерена как поглотителя свободных радикалов и его производных был продемонстрирован в различных системах, включая снижение повреждения при реперфузии ишемии кишечника, защищая типы клеток от апоптоза, оказывая нейропротекторное действие.

Дополнительные свойства, которые показали производные фуллерена, дали многообещающие результаты, в частности в исследованиях средств личной гигиены (например, кремы для кожи, средства против ожогов).

Опубликовано много работ, касающихся биологической активности частиц, содержащих фуллерены [56,57,74]. Было предложено несколько механизмов для описания бактерицидного действия фуллереновых материалов. В частности, фуллерены и их производные продемонстрировали мощную антибактериальную активность в отношении широкого спектра микроорганизмов при воздействии света [128]. Одно из возможных объяснений такого бактерицидного действия связано с уникальной структурой частицы фуллерена.

С точки зрения структурного проектирования фуллерен представляет собой наночастицу с замкнутым каркасом, где сопряжение осуществляется посредством π -электронов. Эта структура, возможно, является основной причиной того, что фуллерены могут поглощать свет и впоследствии генерировать активные формы кислорода [87]. Как только фуллерен (C_{60}) освещается фотонами, он переходит из основного состояния в чрезвычайно короткоживущее ($\sim 1,3$ нс) возбужденное состояние, которое быстро распадается до более низкого триплетного состояния, имеющего более длительное время жизни (50–100 мкс).

Затем, в присутствии молекулярного кислорода ($3O_2$), фуллерен может образовывать АФК, включая синглетный кислород ($1O_2$). Эти радикалы являются короткоживущими окислителями, содержащими один или несколько неспаренных электронов, возбужденных на их самом высоком атомно-молекулярном уровне.

АФК, как правило, считаются ответственными за перекисное окисление липидов у эукариот и разрушение мембран эукариотических клеток. Высокий уровень АФК смертельно опасен для микроорганизмов, вызывая повреждение клеточных молекул, таких как липиды, белки и нуклеиновые кислоты. Интересно, что в некоторых случаях частицы фуллеренов в темных участках могут действовать как антиоксиданты, предотвращая перекисное окисление липидов, индуцированное гидроксильными и супероксидными радикалами [32].

Физическое взаимодействие между фуллеренами и внешней микробной мембраной является еще одним антибактериальным механизмом, при котором наночастицы фуллерена индуцируют разрушение клеточной мембраны и/или расщепление ДНК из-за высокой гидрофобности поверхности частицы, которая может легко взаимодействовать с мембраной липиды [31]. Поскольку разные виды бактерий имеют неодинаковые компоненты клеточной стенки, это может объяснять неодинаковые взаимодействия фуллерена с клетками.

Установлено, что частицы фуллерена биологически более активны по отношению к грамположительным видам бактерий, а не к грамотрицательным микроорганизмам. Это позволяет предположить, что бактерицидный успех зависит от внедрения фуллерена в клеточную стенку бактерии [38].

С физической точки зрения электростатические силы между фуллеренами и поверхностью бактерий играют важную роль при их взаимодействии. По некоторым данным, электростатическое притяжение имеет большое значение в цитотоксическом действии производных фуллерена, вызывая мембранный стресс, опосредованный прямыми физическими контактами, в то время как роль окислительного стресса незначительна [48].

Частицы фуллерена также могут воздействовать на дыхательную цепь бактерий (расположенную в мембране), что указывает на еще один бактериостатический механизм. Возможно, что фуллереновые наночастицы вмешиваются в цепочку клеточного энергетического метаболизма, в отличие от физического разрушения бактериальной мембраны. Высокие концентрации производных фуллерена увеличивают поглощение O_2 и его превращение в H_2O_2 , что, в свою очередь, нарушает работу дыхательной цепи [99].

Многообещающие результаты показали исследования по применению фуллеренов для лечения и профилактики СПИДа. ВИЧ продуцирует

небольшую димерную аспартилпротеазу, которая специфически расщепляет полипротеины-предшественники, кодирующие структурные белки и ферменты вируса. Эта протеолитическая активность абсолютно необходима для производства зрелых инфекционных вирионов, поэтому является привлекательной мишенью для терапевтического вмешательства.

Активный участок этого фермента можно грубо описать как открытый цилиндр, выстланный почти исключительно гидрофобными аминокислотами, за исключением двух каталитических аспарагиновых кислот (Asp25, Asp125).

Было высказано предположение [153], что основной движущей силой ассоциации HIV-Р и производных фуллерена является гидрофобное взаимодействие между неполярным активным центром поверхность HIV-Р и поверхностью фуллерена C₆₀. Происходит замещение в фуллереновом кольце органических фрагментов кислот, содержащих от 1 до 20 атомов углерода и необязательно дополнительно содержащих полярные гетероатомы, такие как кислород и азот. Ингибирование ВИЧ-пина в присутствии фуллерена C₆₀ было продемонстрировано с помощью молекулярного моделирования и экспериментального наблюдения.

Активность фуллеренов против ВИЧ может быть подтверждена экспериментом, в котором производное фуллерена (бис(моносукцинимид) производное бис(2-аминоэтил)дифенил-C₆₀) проявляло активность против ВИЧ типа 1 (ВИЧ-1) и ВИЧ-2 у больных с острой или хронической инфекцией.

На сегодняшний день бифосфонатные соединения и препараты анион фтора в основном используются для лечения остеопороза и других заболеваний костей. Однако первые не всасывается перорально, а последние довольно токсичны. Преимущество фуллерена заключается в его локализации в костях. Следовательно, полифторбифосфонированные производные фуллерена разрабатываются как бимодальные препараты для терапии остеопороза.

Использование фуллеренов в качестве биологических или фармакологических агентов требует изучения их дозировки и уровня в сыворотке с помощью чувствительных и простых иммунологических методов. Это, в свою очередь, требует наличия доступных специфических антител к фуллеренам. Установлено, что иммунизация мышей водорастворимым фуллереном C_{60} с бычьим тиреоглобулином вызывала появление фуллерен-специфических антител IgG [184].

Водорастворимые производные фуллерена способны расщеплять ДНК при воздействии света через O_2 . Однако расщепление ДНК происходит на остатках гуанидина по механизму переноса электрона. Эксперимент показал, что фуллерен-олигонуклеотид может связываться с одноцепочечной или двухцепочечной ДНК и расщеплять нити при воздействии света [141,165].

Другой эксперимент с производным фуллеренкарбоновой кислоты также показал цитотоксичность при воздействии видимого света. Цитотоксичность этого производного фуллерена была связана с его способностью расщеплять ДНК [141,151,216].

Установлено, что попадание соединений фуллеренов через дыхательную систему не приводит к патологии легких. Частицы фуллеренов не остаются в легких в течение длительного времени. Большая их часть выводится через мукоцилиарный транспорт и отхаркивается или проглатывается (попадая таким образом в пищеварительный тракт). Материалы на основе нанougлерода не оказывают неблагоприятного воздействия на легочный сурфактант белков или липидов. Любой оставшийся материал фуллеренов фагоцитируется иммунными клетками в легких, такими как альвеолярные макрофаги, которые, как было установлено, фагоцитируют материалы на основе графена [171,100,119].

Таким образом, длительное воздействие простых соединений фуллеренов может привести к гранулеме или фиброзным изменениям в легких.

Для расщепления частиц фуллерена задействована врожденная иммунная система, а также ферментативная система организма. Наличие сложных соединений не мешает распаду фуллеренов в организме. Несколько взаимодополняющих путей и типы клеток занимаются расщеплением фуллеренов. Эти пути распада включают в себя нейтрофильную миелопероксидазу (МПО), эозинофильную пероксидазу (ЭПО), лактопероксидазу (ЛПО) и макрофаги. Поглощение фуллереновых материалов клетками системы врожденного иммунитета также может способствовать биологическому преимуществу фуллеренов.

Большая часть исследований, посвященных этому процессу, была выполнена с функционализированными, а нечистыми фуллеренами, которые, как известно, влияют на растворимость и взаимодействие с тканями [77,18,138].

Тем не менее, антиоксидантные свойства и усиление клеточного и окислительного стрессов могут быть причиной большинства выявленных противовоспалительных эффектов фуллеренов.

Относительно малоизвестно о всасывании фуллеренового материала в ЖКТ. Многие исследователи полагают, что поглощение первичных фуллеренов связано с их гидрофобной природой в ассоциации с липидными мицеллами [10,11,63,58,59].

С момента попадания фуллеренового материала в рот он подвергается биорасщеплению и взаимодействию с иммунными клетками. Если поверхность наночастицы имеет какие-либо дефекты оболочки, это может привести к модификации поверхности в среде с жестким рН желудка [117,122,192]. Попадая в тонкий кишечник, фуллерены подвергаются дальнейшему биорасщеплению. Поглощение связано с М-клетками Пейеровых бляшек, с лимфоидной тканью кишечника и эпителием (через ограниченный трансцеллюлярный или парацеллюлярный транспорт). Здесь фуллерены в значительной степени взаимодействуют с иммунными клетками лимфатической системы кишечника. Поглощение наночастиц составляет

около 2–3 %. Фуллерены, которые не абсорбируются, могут свободно взаимодействовать с микробиомом кишечника. Это взаимодействие приводит к изменениям в флоре кишечника, которая может благоприятно повлиять на множественные системы органов хозяина [171,196,207].

Ингибирующие эффекты $C_{60}(OH)_n/C_{70}(OH)_n$ ($n = 18–20$) установлены при раке гортани человека и раке шейки матки. Кроме того, конъюгация C_{60} -паклитаксел продуцирует опухолесупрессорную активность в отношении клеток эпителиальной аденокарциномы легкого человека [104,209]. Фуллеренол, конъюгированный с цисплатином, демонстрирует значительное ингибирование роста клеток рака шейки матки *in vitro*. Наноконъюгаты амфифильного фуллерена AF-1/паклитаксела приводят к резкому подавлению роста опухоли денокарциномы протоков молочной железы человека с ингибирующим эффектом, подобным Абрахаме, коммерческим наночастицам конъюгатов паклитаксела.

Установлено, что фуллерен C_{60} (10–100 мг/кг, внутривенно) способен противодействовать самоповреждающему поведению у мышей. Эффект связывали с антиоксидантным действием фуллерена [131,194,214].

Самоповреждающее поведение (самокусание, удары головой, царапание и ковыряние кожи) может имитировать самоагрессию под действием различных соединений. Это связано с повышенной передачей дофамина и увеличением глутамата, что усиливает стимуляции рецепторов, приток Ca^{2+} и вызывает производство оксида азота. Оксид азота быстро реагирует с O_2 радикалами ONOO и другими окислителями.

Исследования показали [170,167,166,202,109], что $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ обладает разнообразной противоопухолевой активностью, что имеет большое значение для многотаргетной терапии опухолей. Превосходная противоопухолевая активность производных фуллерена и их уникальный способ взаимодействия со специфическими молекулами-мишенями помогут найти новый путь разработки лекарств. Поэтому понимание потенциального

противоопухолевого механизма производных фуллерена имеет большое значение для разработок в области наномедицины.

(OH)₂₂ индуцирует функционально зрелые дендритные клетки (ДК) и активирует аллогенные Т-клетки у мышей с опухолями, чтобы уничтожить чужеродные патогены и очищать опухоли, а также подавлять жизнеспособность опухоли путем активации TNF- α , опосредованный клеточный иммунитет ([Gd@C₈₂(OH)₂₂] n) [121,102,180,189]. Эти наночастицы могут эффективно улучшать иммунную систему, включая поляризацию цитокинового баланса в сторону цитокинов Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-2) и снижение продукции цитокинов Th₂ (IL-4, IL-5, IL-6) [109,186,127]. Gd@C₈₂(OH)₂₂ сильно активирует первичные мышечные макрофаги и продуцирует провоспалительные цитокины, способствуя иммунному ингибированию опухоли и не влияя на жизнеспособность.

У моделей злокачественного рака молочной железы человека *in vivo* противоопухолевая активность Gd@C₈₂(OH)₂₂ по существу связана с уменьшением нескольких проангиогенных факторов, таких как матриксные металлопротеиназы (ММР), тем самым подавляя неоваскуляризацию и индуцируя антиметастатическое заключение раковой ткани.

Метастазирование остается огромным препятствием и основной причиной большинства смертей от рака. Имеются данные, свидетельствующие о том, что некоторые производные фуллерена эффективно подавляют метастазирование рака [195,164].

Наночастицы фуллеренола небольшого размера подавляют метастазирование клеток рака молочной железы и легких, нарушая динамику актина [193]. Gd@C₈₂(OH)₂₂ может способствовать формированию толстого волокнистого слоя во внеклеточном матриксе за счет регуляции сигнального пути TNF- α в CAF и формирования клеток фибросаркомы, тем самым блокируя опухоли и ингибируя метастазирование [166,144,178]. Кроме того, Gd@C₈₂(OH)₂₂ влияет на эпигенетическую регуляцию метастазирования рака

поджелудочной железы человека и подавляет инвазию и метастазирование раковых клеток поджелудочной железы

В исследованиях на крысах, у которых вызывали церебральную ишемию и инфаркты головного мозга, которые были связаны с нарушением процессов перекисного окисления липидов и снижением уровня глутатиона.

Внутривенное введение водорастворимого карбоксифуллерена не вызывало защитного эффекта в отношении этих патологий. Это было связано с ограниченной способностью фуллеренов пройти гематоэнцефалический барьер, а высокая интрацеребровентрикулярная доза (0,3 мг/кг) фуллерена оказывала выраженное защитное воздействие на три типа повреждений. Однако доза вызывала серьезные побочные эффекты, включая гибель животных, вызванную ишемией.

Некоторые производные фуллерена с поддерживаемыми мишенями обнаруживают несколько основных путей, позволяющих определенным опухолям успешно уменьшаться [72]. Повышение растворимости фуллеренов в воде/биологических средах увеличивает концентрацию препарата в нужном месте и способствует оптимальной таргетной терапии солидных опухолей. Кроме того, присоединение фуллереновых структурных конъюгированных лекарственных средств (например, ПЭГ, поверхностно-активных веществ, каликсаренов и циклодекстринов) происходило за счет биостабильности и удобного трехмерного каркаса. Эти гидрофильные группы или ионные частицы придают покрытому поверхностно-активному веществу фуллерена C_{60} и $Gd@C_{82}(OH)_n$ разнообразные противоопухолевые эффекты, а также осуществляют доставку лекарств и генов, фоторасщепление ДНК, ингибирование перекисного окисления липидов, антиоксидантную, антиметастазную, антиапоптозную и иммуномодулирующую активность [170,112,206,208].

Исследования, проведенные на рыбах, показали, что коллоидный C_{60} может транспортироваться в мозг. Группу большеротых окуней подвергали воздействию фуллерена C_{60} в течение 48 ч в аквариуме. Воздействие

составляло 0; 0,5 и 1 мг C_{60} /л аквариумной воды с размерами групп девять, девять и четыре особи соответственно. Шесть контрольных рыб подвергались воздействию 100 мкМ H_2O_2 . Значительное увеличение продуктов перекисного окисления липидов наблюдалось в головном мозге рыб при воздействии дозой 0,5 мг/л. Повышенное перекисное окисление липидов в головного мозга в группе 0,5 мг/л было связано с поглощением C_{60} в обонятельном нерве и транспортом из обонятельных луковиц. Этот путь был установлен для других соединений для рыб.

Наноэмульсии (≥ 50 нм) могут проникать в толщу рогового слоя кожи, но не попадают в ее живую часть.

Трансдермальные системы доставки лекарств используют средства повышенной гидратации кожи (окклюзионные пластыри, везикулярные составы, гели или кремы) в дополнение к соответствующим физико-химическим свойствам других фармакологически активных соединений (логарифм распределения октанол – вода коэффициент от 1 до 3, температура плавления ниже 200° и молекулярная масса < 500 Да). Более крупные молекулы и/или соединения с физико-химическими параметрами вне этого диапазона могут проникать через кожу только при ссадинах, эрозиях и растяжениях [197,172]. Общий механизм проникновения наночастиц через кожу зависит от размера и заряда, что может способствовать абсорбции.

Производные фуллерена C_{60} изучены на предмет проникновения через согнутую (60 и 90 мин.) и несогнутую дерматомедированную кожу свиней толщиной 400 мкм. Молекулярный размер производных фуллерена составлял около 3,5 нм. Экспозиция составляла 8 и 24 ч. Через 8 ч соединение в основном располагалось в эпидермальном слое в несогнутой коже, тогда как через 60 мин на согнутой коже обнаруживалось большее содержание эпидермиса. Через 90 мин на согнутой коже установлено еще большее содержание эпидермиса с проникновением в дерму. Через 24 ч максимальная концентрация частиц была определена в верхнем эпидермисе с меньшей концентрацией в дерме. Кожа сгибалась в течение 90 мин, там установлено

наибольшее проникновение фуллерена в дерму. Соединение локализовалось во внутриклеточном пространстве между кератиноцитами.

В исследованиях [190,108,173] показано, что фуллерены могут попадать в дерму. Тем не менее, проникновение, вероятно, низкое, принимая во внимание градиент проникновения от эпидермиса к дерме.

Есть два важных факта, которые считаются барьерами для применения фуллеренов. Во-первых, их относительная нерастворимость в воде и нестабильность. Однако это успешно преодолевается с появлением многочисленных водорастворимых производных фуллерена. Вторым и более важным ограничением является высокая стоимость фуллеренов.

Гидрофобная сфероидная структура и радикальная губка, присущие молекуле фуллерена, имеют очень большое значение. Фуллерены, обладающие некоторыми важными биологическими и медицинскими свойствами, активно исследуются для практического применения, например, в сфере температурных сверхпроводников как компонент солнечных батарей, для производства синтетических алмазов и в качестве смазочных материалов.

Таким образом, большое количество патентных заявок и публикаций указывают на растущий научный и практический интерес к фуллеренам. Их открытие многие исследователи сравнивали с открытием бензола.

1.3 Токсикологические свойства фуллеренов

Несмотря на значительную экспериментальную работу, влияние наносоединений на организм, здоровье и биобезопасность в полной мере не установлено.

Не все наноуглероды и фуллерены созданы человеком. Фуллерены и другие фуллереноподобные или фуллеренсодержащие материалы часто встречаются в природе.

Наночастицы, диаметр которых составляет менее 10 нм, по-видимому, способны проникать через барьер рогового слоя в дерму и накапливаться в

волосяных фолликулах. Есть некоторые доказательства того, что C_{60} обладает способностью глубоко проникать через роговой слой [139].

Установлено [201,146], что миграция фуллерена в коже происходит между клетками и проникает в эпидермис посредством пассивной диффузии. Способность фуллеренов проходить через липидные слои позволяет предположить, что они могут поглощаться капиллярами сосочкового слоя и располагаться где-то еще в организме.

Фуллерены продемонстрировали высокую стабильность, поэтому их практически невозможно разложить в естественной среде. Это означает, что эти наноматериалы способны существовать в течение длительного периода; существует эффект обогащения, благодаря которому частицы могут накапливаться в пищевой цепи. Затем фуллерены могут быть приняты животными перорально, и желудочно-кишечная система нередко поглощает частицы размером от нанометров до микрометров [137].

Установлено, что после внутрижелудочного введения фуллерена C_{60} крысам большая часть C_{60} (>99 %) выводится из организма и лишь небольшая может всасываться в желудочно-кишечный тракт. Таким образом, пероральный прием кажется неэффективным путем проникновения фуллеренов в организм животного.

Легкие постоянно подвергаются воздействию внешней среды, поэтому они уязвимы для различных загрязнителей. Есть доказательства [84] того, что наночастицы могут преодолевать альвеолярно-капиллярный барьер (АКБ) и попадать в кровоток из легких. Существуют два различных механизма транслокации фуллеренов через АКБ: диффузия и пиноцитоз, опосредованный авеолами.

Фуллерен C_{60} обнаруживался преимущественно в капиллярах легочных лимфатических узлов и просвете альвеол после ингаляционного воздействия. Инъекции фуллеренов – эффективный способ их доставки в организм. Большая их часть (>99 %) выводится из организма и лишь небольшая – может всасываться в желудочно-кишечный тракт. Внутривенное введение

некоторых производных фуллеренов с более высокой гидрофильностью (таких как $C_{60}(OH)_x$), показало более широкое распределение в различных тканях и более легкое выведение из организма (56 % введенной дозы выводится с мочой или калом в течение с 72 ч). При внутрибрюшинных (в/б) инъекциях, выполненных водной суспензией фуллерена C_{60} в дозе 0,5 г/кг, обнаружено попадание фуллерена C_{60} в кровь, другие органы и ткани. Кроме того, установлено [94,84], что фуллерен C_{60} в основном накапливается в печени крыс (до 24% от введенного количества) и обнаруживается в основном внутри клеток Купфера, некоторых гепатоцитов капсулы, а также внутри редких HSC. Эксперимент также показал, что концентрация фуллерена C_{60} в печени на 14-й и 21-й дни снизилась до 5 и 1% от значения, измеренного в первый день. Это означает, что C_{60} может выводиться или переноситься печенью.

Однако изучение всасывания, распределения, метаболизма, экскреции различных соединений фуллеренов в организме требует дальнейших исследований.

При изучении соединений фуллеренов важно учитывать их физико-химические характеристики, поскольку считается, что их распределение, метаболизм и деградация могут быть различными при взаимодействии с системами органов [140,200].

В большинстве исследований [138,171,211] с наночастицами использовались внешне применяемые дозы. Основными путями введения было нанесение на кожу, введение в желудочно-кишечный тракт или дыхательные пути.

Количество наночастиц в крови, тканях, моче или фекалиях обычно определяли с помощью меченых радиоактивным изотопом наночастиц, высокоэффективной жидкостной хроматографии или масс-спектрометрии. Качественная информация о внутриклеточной локализации фуллеренов была получена методом электронной микроскопии [139,150]

Многие исследователи установили [11,94,91], что фуллерены могут вызвать интоксикацию, воспалительные реакции и окислительный стресс.

Основные пути воздействия фуллеренового материала на организм человека и животных – попадание через дыхательную систему, кожу и пероральное воздействие.

Установлено, что такие наноуглеродные вещества, как фуллерены не поддаются биологическому разложению и вызывают патологию биологических систем.

Основными путями детоксикации и элиминации фуллеренов, в первую очередь, являются печень, желудочно-кишечный тракт и выделительная система. Однако механизмы выделения фуллеренов до конца неясны.

Считается [98], что наноматериалы, из-за своего относительно небольшого размера, легко обходят естественные тканевые барьеры и проникают в клетки и субклеточные компартменты, где могут быть вызваны любые неблагоприятные эффекты. Однако размер сам по себе не обязательно является определяющим фактором в биораспределении или токсическом потенциале фуллеренов. Модификация поверхности и физико-химические свойства оказывают значительное влияние на их механизм токсического действия.

Исследования показали [98], что фуллерены могут увеличивать синтез провоспалительных медиаторов, в том числе и фактора некроза опухоли. Это свидетельствует о том, что воспалительная реакция может играть значительную роль в токсичности фуллеренов. Однако в *in vivo* воспалительно-опосредованные реакции не совсем понятны, поэтому в дальнейших исследованиях им должно уделяться особое внимание.

Производные фуллерена могут и способны подавлять воспалительные реакции. Молекулы фуллеропирролидинксантина на основе фуллерена C₆₀ были синтезированы Huang L.Z. et al. в 2007 г. [201], затем были диссеминированы в среду для культивирования клеток с 1%-м диметилсульфоксидом. Считалось, что он способен ослабить воспалительные

ответы, в то время как фуллереновая часть будет работать как поглотитель свободных радикалов.

Макрофагоподобные клетки обрабатывали фуллереном перед воздействием липополисахарида; фуллерен эффективно блокировал синтез оксида азота и фактор некроза опухоли альфа. Эти результаты указывают на возможность использования производных фуллерена в качестве противовоспалительных препаратов.

Эффективность обработки фуллереном определяли по его влиянию на клетки, опосредованные фактором некроза опухоли альфа. Установлено, что клеточная линия фибробластов цитотоксична после применения как фуллеренов C_{60}/C_{70} , так и полигидроксилированных препаратов фуллеренов. Кроме того, установлено синергетическое взаимодействие между фуллеренами C_{60}/C_{70} и фактором некроза опухоли, поэтому комбинированная терапия более опасна, чем индивидуальные процедуры.

Фуллерены могут поглощать ультрафиолетовые лучи, а затем генерировать возбужденный синглетный кислород, который может реагировать с аминокислотами, нуклеиновыми кислотами и двойными связями $C=C$ мембранных фосфолипидов. Возможность генерировать АФК, способность накапливать их в клетках и взаимодействовать с биологическими системами, включая клеточные мембраны, может вызывать гибель клеток и привести к смерти организма. Это подтверждается тем, что воздействие фуллеренов C_{60}/C_{70} повышало генерацию АФК и митохондриальную деполяризацию, в то время как полигидроксилированные фуллерены восстанавливали оба показателя [212,106,214]. Было высказано предположение [70] о способности фуллеренов влиять на опухоли посредством опосредованной токсичности и их способности модулировать генерацию АФК.

Общеизвестно, что избыток свободных радикалов и окислительный стресс наносят вред организму человека и животных. Некоторые заболевания связаны с повышенным уровнем продуктов окисления липидов, включая рак,

болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, воспалительные расстройства и астму [132,126,143]. Антиоксидантная активность фуллерена C_{60} была доказана. Установлено, что антиоксидантная способность фуллерена C_{60} в 125 раз больше, чем у витамина С. Механизм антиоксидантного действия может заключаться в окислительно-восстановительной реакции между АФК и молекулами фуллерена за счет прямого переноса электронов, так что АФК окончательно разлагаются [146, 148]. Сообщалось, что крысы, получавшие фуллерен C_{60} , обладали высокой устойчивостью к CCl_4 , токсичность которого опосредована продукцией АФК [154]. Исследования показали, что другой механизм устойчивости фуллеренов к окислению основан на мягком разъединении дыхательной цепи и фосфорилировании во внутренней мембране митохондрий [156].

Индукция АФК считается общим механизмом различной токсичности микотоксинов [143, 202]. Моноспорофеновые анатоксины могут нарушать нормальное функционирование митохондрии и производят АФК и другие свободные радикалы. Эти вещества могут усиливать процесс перекисного окисления липидов и изменять антиоксидантную систему клеток, снижая активность антиоксидантных ферментов, таких как глутатион S-трансфераза (GST), супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза [199, 101]. Этот процесс приводит к повреждению ДНК, увеличению продукции АФК и снижению уровня липидов.

Усиление процессов перекисного окисления липидов с последующей активацией воспалительных ферментов вызывает апоптоз и некроз клеток [181, 103]. Антиоксидантная способность фуллерена C_{60} имеет большое значение для детоксикации моноспорофенов.

Генерация АФК и цитотоксический ответ после применения полигидроксилированных препаратов вызывают противоположный эффект, действуя как цитопротектор, блокирующая цитотоксичность. Следовательно, невозможно обобщить поведение фуллеренов и прогнозировать их поведение, так как они могут вести себя по-разному.

Генерация активных форм кислорода, активация процессов перекисного окисления и повреждение мембран, высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и повышенная проницаемость экспонированных фуллереном клеток к декстрану указывают на скомпрометированную целостность клеточной мембраны. Тот факт, что фуллерены обладают опосредованной цитотоксичностью, которая может быть подавлена введением антиоксиданта аскорбиновой кислоты, доказывает участие реактивного кислорода в механизме токсического действия.

Установлено, что воздействие фуллерена C_{60} на большеротого окуня привело к увеличению продуктов перекисного окисления липидов в мозге и истощению глутатиона в жабрах, который влияет на передачу сигнала и нормальную экспрессию белков [203, 185].

Дальнейшие экспериментальные исследования показали, что наночастицы фуллерена разрушают проницаемость и целостность клеточных мембран при пересечении их [174, 188, 125]. Клеточные мембраны состоят из различных липидов и трансмембранных белков, ответственных за функции и активность клеток. Когда наночастицы фуллерена пересекают клеточные мембраны, они влияют не только на структуру и функции липидных мембран, но и на трансмембранные белки.

Обнаружено, что внеклеточные молекулы фуллерена блокируют поступление калия в белки и препятствуют проникновению ионов калия в канал. Внутриклеточные молекулы фуллерена могли попасть в канал со стороны цитоплазмы и «застревали» в полости, образованной несколькими спиралями канального белка [203, 159].

В некоторых экспериментальных исследованиях цитотоксичности производного фуллерена $C_{60}(OH)_n$ [185,123,183,] также представлены доказательства токсичности фуллерена и его производных. Детали атомистического взаимодействия фуллеренов и белков до сих пор остаются неясными.

Активность соединения фуллерена C₆₀ β-циклодекстрина в отношении расщепления ДНК можно наблюдать, используя сверхскрученную плазмидную ДНК pBR322 при облучении видимым светом. Кроме того, соединение не проявляет значительной цитотоксичности в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y [156]. Фуллерен-олигонуклеотид связывается с определенной одноцепочечной или двухцепочечной ДНК и расщепляет цепь (цепи), расположенную проксимальнее фуллереновой части, под действием света. Также кратко сообщалось о способности фоторасщепления ДНК олигомера фуллерена и функционализированного C₆₀. Водорастворимый конъюгат антрил-циклодекстрин + C₆₀ эффективно расщепляет ДНК pGEX5X2 [167]. Функционализированные липосомы, включающие C₆₀ и C₇₀ в липидный бислой, могут фоторасщеплять сверхскрученную плазмидную ДНК ColE1 при воздействии света $\lambda > 350$ нм.

1.4 Применение соединений фуллеренов в различных отраслях экономики

Уникальные физические и химические свойства фуллеренов обратили внимание многих исследователей на возможность их применения в различных областях, таких как медицина, фотогальваника, адсорбция/хранение газа, фармацевтическая промышленность и др.

Медицинское применение. Главными характеристиками фуллеренов являются размер, гидрофобность, электронная конфигурация и трехмерность. Именно на них обратила особое внимание медицинская химия. Несмотря на очевидные проблемы с растворимостью, исключительная структура углеродного каркаса и обширные возможности для функционализации делают фуллерены потенциальными терапевтическими агентами.

Антиоксиданты/биофармацевтики. Фуллерены легко реагируют со свободными радикалами из-за наличия большого количества

конъюгированных двойных связей. Около 34 метильных радикалов могут присоединяться к одной молекуле фуллерена C₆₀.

Антибактериальная и противомикробная активность.

Антибактериальные свойства гидрофильного фуллерена (производные: фуллеролы и аминфуллерены) вызвали интерес в связи с возможностью их использования в системе очистки воды. Множественные гидроксильные, карбоксильные группы и группы оксида гликоля, присоединенные к фуллерену C₆₀, обладают фотодинамической цитотоксичностью в отношении патогенных микробов, включая полирезистентных к антибиотикам бактерий.

Склонность фуллерена C₆₀ к созданию активных форм кислорода, таких как синглетный кислород и супероксид через фотосенсибилизацию при взаимодействии с органическими растворителями во многом обуславливает его биоцидный эффект [152].

Диагностика. Эндофуллерены образуются, когда ион металла помещается в фуллереновую клетку. Эта эндоэдральная металлофуллереновая клетка может вести себя как изоляционная камера, в которой хранятся реактивные атомы из биологической среды.

Металлофуллерены (ЭМФ) – многообещающие новые соединения. Они были названы лучшими перспективными контрастными веществами для МРТ нового поколения [11].

Исследования показали, что металлофуллеролы концентрируются в микрофагах. Это позволяет предположить, что данные соединения специально нацелены на ткани, богатые микрофагами, и имеют потенциал для использования в химиотерапии при лечении рака костей и лейкемии. [146,118,113,206]

Доставка лекарственных веществ. Фуллерены из-за их высокой биосовместимости, селективности в нацеливании могут быть использованы в качестве матрицы для доставки лекарственных веществ.

Присоединение гидрофильной группы к фуллеренам способствует их водорастворимости, делая их идеально подходящими для лекарственных

веществ и генных клеточных структур. Функционализированные фуллерены могут проходить через клеточную мембрану и прикрепляются к митохондриям.

Новые лекарственные соединения. Фуллерены были одними из первых класса наночастиц на основе углерода, используемых в адресной доставке лекарственных веществ. Из-за необычной структуры и свойств они могут взаимодействовать с клетками и межклеточным веществом.

Фуллерены из-за их хорошей биосовместимости могут стать потенциальными носителями лекарств для клеточной доставки [76], селективная адресная доставка и контролируемое высвобождение переносимых лекарств. Фуллерены, взаимодействуя с гидрофильными частицами, становятся водорастворимыми и приобретают исключительные свойства в доставке лекарственных веществ и генов в клетки.

Поскольку функционализированные фуллерены могут пересекать клеточные мембраны и связываться с митохондриями, их можно использовать для медленной доставки лекарств, чтобы достичь максимальных восстановительных результатов.

Исследования показали, что ДНК-функционализированные фуллерены очень эффективны по сравнению с коммерчески доступными векторами на основе липидов.

При внутримышечном введении фуллерена C_{60} установлено [22,89] восстанавливающее действие на мышцы, занятые силовыми реакциями. Фуллерен C_{60} препятствует мышечному истощению, поэтому может стать перспективным лечебно-профилактическим средством для восстановления нарушений функций скелетных мышц при ишемии.

Рак – одна из основных причин смерти во всем мире. Неспецифический таргетинг доступных в настоящее время схем лечения сопровождается серьезными побочными эффектами. Физико-химические и фотосенсибилизаторные свойства фуллеренов непревзойденны.

Ранее считалось, что фуллерены инертные соединения. Их каркасная структура и растворимость в органических растворителях показали, что они действительно довольно хорошо поддаются экзоэдрической и эндоэдральной функционализации [205,177,204]. Аддукты, образованные процессами присоединения, называются экзоэдрическими, тогда как те, которые образуются в результате окислительно-восстановительных реакций, называются эндоэдральными [97]. Ключ к разблокировке огромного потенциала третьего аллотропа углерода это твердое понимание правил, регулирующих функционализацию наиболее распространенной группы фуллерена (C_{60}). Функционализированные фуллерены имеют большой потенциал, однако эта область требует дальнейшего изучения.

В перспективе открытие фуллеренового ряда даст мощный импульс для развития различных областей науки и промышленности.

Становится все более очевидным, что токсичность и биосовместимость материалов на основе наноуглерода и самого фуллерена нельзя определить только по их характеристикам и свойствам. Необходимы дальнейшие исследования биологических взаимодействий фуллереноподобных материалов, позволяющих разрабатывать новые способы использования фуллеренов.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по теме диссертации проведены в 2020–2023 гг. в лаборатории кафедры морфологии, патологии животных и биологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова». Научно-производственный опыт выполнен в ветеринарной клинике ООО «Ветеринарная Диагностика» (г. Пенза). Объектом исследования послужили белые крысы и кошки различных возрастных групп.

Острую токсичность соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида определяли на белых крысах. Соединение вводили им подкожно в дозах 550, 825, 1100, 2500, 5000 мг/кг по действующему веществу; внутривенно – в тех же дозах. За животными наблюдали в течение 14 суток после введения соединения. Объем вводимого раствора белым крысам – 1,0 мл. Среднюю смертельную дозу (LD_{50}) рассчитывали по методу Кербера. Контролем служили животные, которым вводили стерильный водный раствор фуллерена C_{60} .

Аспирацию крови осуществляли из боковой хвостовой вены, в количестве 0,5 мл, на 1-е и 7-е сутки. На 14-е сутки проводили декапитацию животных в соответствии с Европейской директивой по защите животных, используемых в научных целях [124].

Содержание малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови определяли тиобарбитуровым методом. Малоновый диальдегид является одним из низкомолекулярных конечных продуктов, образующихся при разложении некоторых первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов. При низком pH и повышенной температуре МДА легко вступает в реакцию нуклеофильного присоединения с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), образуя красный флуоресцентный аддукт 1:2 МДА:ТБА [80].

Первичные продукты перекисного окисления липидов в ткани печени (диеновые конъюгаты) экстрагировали с использованием различных систем растворителей. В системе гептан-изопропанол 1:1 диеновые конъюгаты в основном экстрагировались спиртом. Процедура оценки тканевых диеновых конъюгатов включала в себя экстракцию смесью гептан-изопропанол, очистку и спектрофотометрическое измерение экстинкции в спиртовой фракции. Сопряженный диеновый фрагмент представляет собой сильный хромофор, который можно обнаружить спектрофотометрически. Когда диеновые конъюгаты присутствуют в жирных кислотах, они демонстрируют характерное поглощение в УФ-диапазоне около 234 нм [81] (рисунок 1).



Рисунок 1 – Изучение состояния антиоксидантной активности

Активность каталазы определяли колориметрическим методом. Этот метод основан на реакции неразложившейся перекиси водорода с молибдатом аммония с образованием желтоватого цвета, который имеет максимальный спектр поглощения при 374 нм [46].

Исследование метаболизма железа включало в себя определение сывороточного железа (СЖ) колориметрическим методом. Все железо, связанное с белком, высвобождается из трансферрина при добавлении кислотного агента для снижения рН образца. После этого центрифугирование позволяет высвобождать апотрансферрин, не содержащий железа, трансферрин и другие белки плазмы. За этим следует добавление хромогенного железохелатирующего агента, который легко образует комплексы с двухвалентным железом. Примеры используемых агентов включают в себя дисульфонат батофенантролина и феррозин. Полученный комплекс приводит к изменению цвета, которое зависит от концентрации комплекса и оптических характеристик используемого агента.

Оценку общей и латентной железосвязывающей способности (ОЖСС) проводили спектрофотометрическим методом по следующему принципу: к образцу добавляют Fe^{+3} для насыщения трансферрина сыворотки. Незакомплексованный Fe^{+3} осаждают карбонатом гидроокиси магния, а железо, связанное с белком в супернатанте, затем измеряют спектрофотометрически [6].

Коэффициент насыщения трансферрина железом рассчитывали по соотношению СЖ/ОЖСС.

Определение гематологических показателей проводили на Mindray BC-2800 Vet (Китай), биохимических – на MNCHIP Pointcare V5 (Китай) (рисунки 2,3).



Рисунок 2 – Гематологический анализатор Mindray BC-2800 Vet (Китай)



Рисунок 3 – Биохимический анализатор MNCHIP Pointcare V5 (Китай)

Цифровой материал подвергся статистической обработке с вычислением критерия Стьюдента на персональном компьютере с использованием стандартной программы вариационной статистики Microsoft Excel.

Схема исследований представлена на рисунке 4.

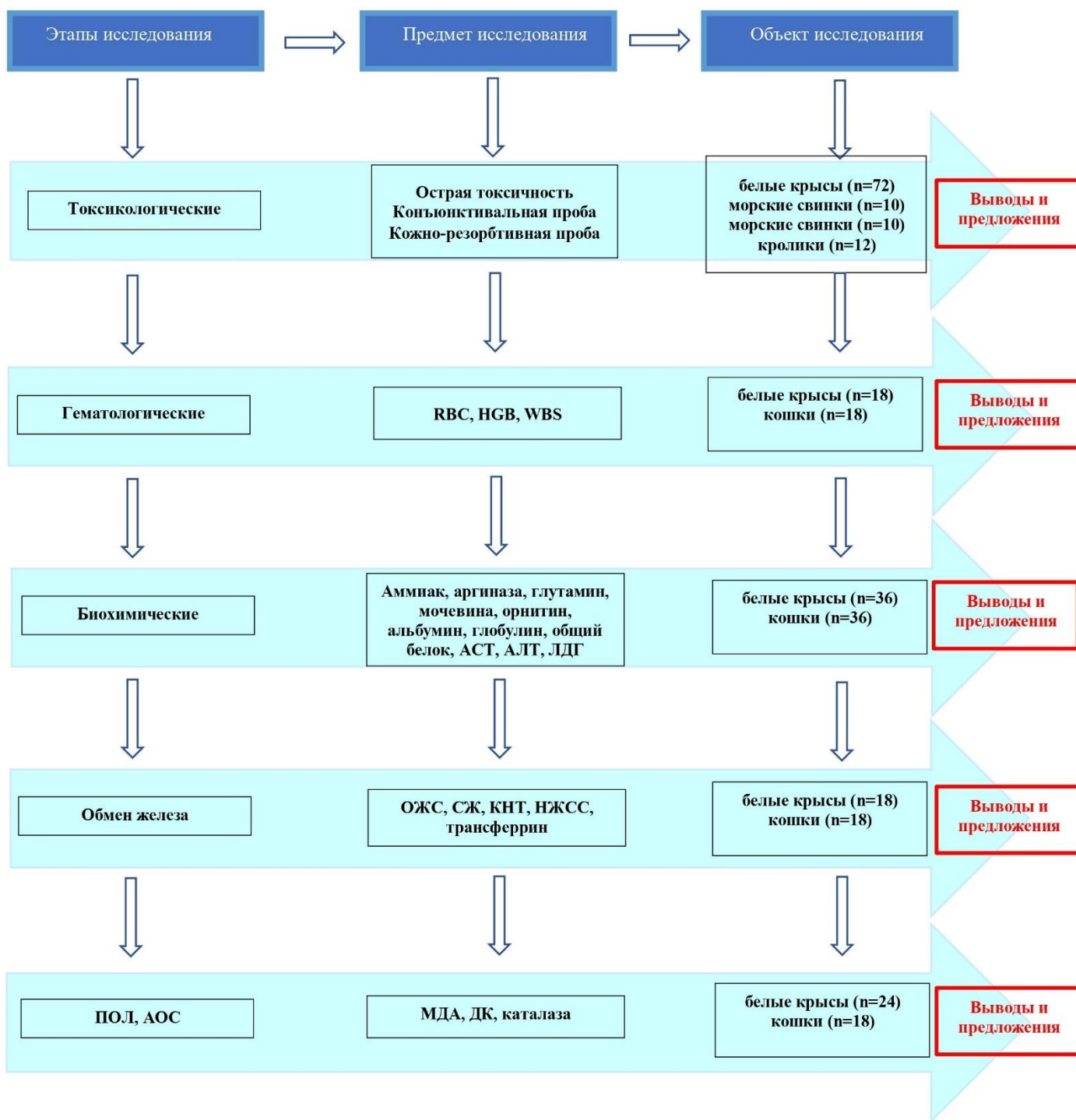


Рисунок 4 – Общая схема исследований

3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Разработка соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида

Первым этапом исследований была разработка высокоэффективного соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, обладающего выраженным гепатопротекторным и антиоксидантным, иммуностимулирующим действием, низкой токсичностью, высокой эффективностью в профилактике и лечении патологий печени, свободнорадикальной патологии у животных, а также удобством введения и дозировки.

Мы разработали гепатопротекторное и антиоксидантное соединение для животных на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида при следующем соотношении компонентов в мас.мг: водный раствор фуллерена C₆₀, стабилизированный плуронином F-127, – 1 мл (1 мг по ДВ); ресвератрол – 25 мг; бетаина гидрохлорид – 10 мг.

Полученное соединение представляет собой прозрачный раствор темно-коричневого цвета, без запаха. Оно ингибирует процессы перекисного окисления липидов, стимулирует антиоксидантную систему защиты организма, обладает низкой токсичностью и стимулирует обменные процессы (рисунок 5).

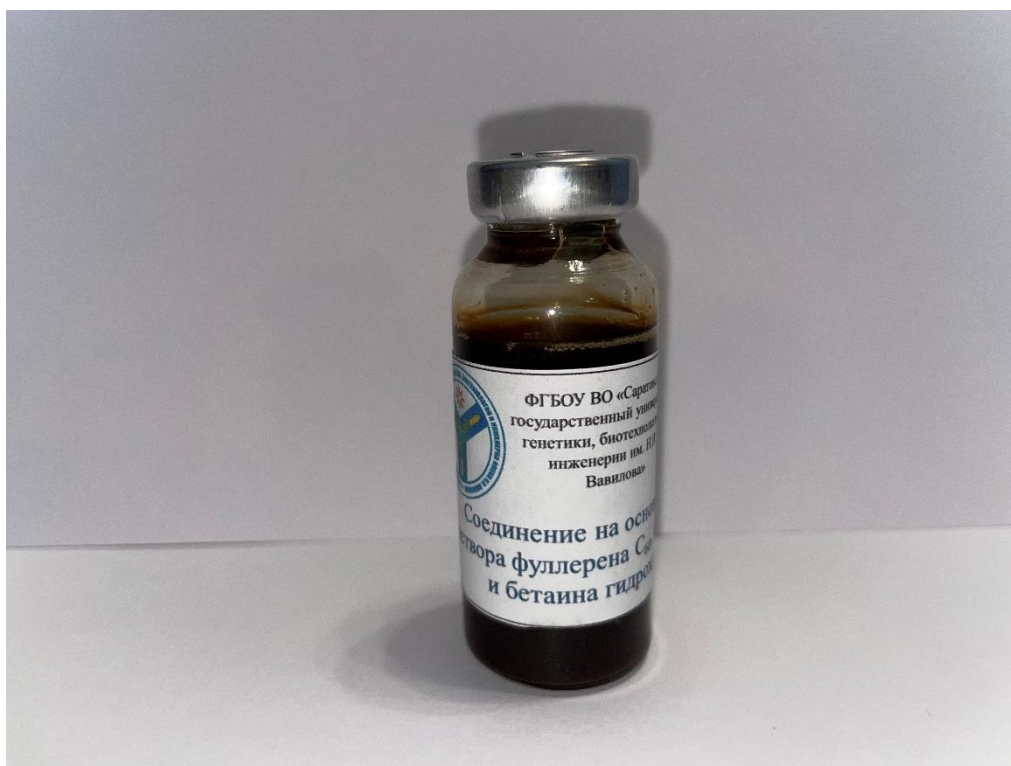


Рисунок 5 – Соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида (опытный образец)

3.2 Токсикологическая характеристика соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида, применяемого на лабораторных животных

Фуллерены представляют собой группу молекул, и их токсичность может различаться, поскольку зависит от размера молекулы, состава, свойств поверхности и функционализации. Кроме того, токсичность фуллеренов может быть связана с используемыми растворителями и их побочными продуктами, а также с примесями металлов [2, 3].

В доступной литературе встречаются противоречивые данные по механизму токсического действия фуллеренов. Высокие дозы соединений способны вызывать окислительный стресс за счет образования активных форм кислорода [36]. Другими механизмами являются активация каспазы 3/7, которая может привести к апоптозу, дестабилизации лизосомальной мембраны и снижению потенциала митохондриальной мембраны,

повреждению мембраны и ДНК. Фуллерены также могут усиливать экспрессию генов, связанных с воспалительным процессом, активностью металлоэндопептидаз и реакцией иммунной системы. Кроме того, нарушение фагоцитоза из-за волокнистой структуры длинных углеродных нанотрубок может привести к негативным последствиям [93,128].

Однако другие исследования сообщают об отсутствии летального исхода после воздействия высоких доз коллоидных фуллеренов на эпидермальные и бактериальные клетки человека, острой или подострой токсичности фуллеренов и антиоксидантных свойств, а также об отсутствии генотоксичности, фототоксичности и прооксидантной активности водорастворимых фуллеренов [2,128].

Результаты исследований по определению острой токсичности изучаемого соединения для лабораторных животных представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Острая токсичность соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида для белых крыс при подкожном введении

Группа	Доза, мг/кг	Количество животных в опыте	Наблюдавшийся эффект	
			пало	выжило
1-я	550	6	0	6
2-я	825	6	0	6
3-я	1100	6	0	6
4-я	2500	6	0	6
5-я	5000	6	0	6
6-я	Контроль	6	0	6

Клиника токсического действия при подкожном введении соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина

гидрохлорида у белых крыс сопровождалась следующими симптомами. Животные, получавшие фармакологическую композицию в изучаемых дозах в течение всего периода наблюдения (14 суток), активно передвигались по клеткам, по пищевому и питьевому поведению не отличались от крыс контрольной группы, реакция на внешние раздражители (звук, свет) была адекватная и на уровне контроля.

Таблица 2 – Острая токсичность соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида для белых крыс при внутрижелудочном введении

Группа	Доза, мг/кг	Количество животных в опыте	Наблюдавшийся эффект	
			пало	выжило
1-я	550	6	0	6
2-я	825	6	0	6
3-я	1100	6	0	6
4-я	2500	6	0	6
5-я	5000	6	0	6
6-я	Контроль	6	0	6

При внутрижелудочном введении соединения в дозе 2500 мг/кг белые крысы в течение первых суток были угнетены, малоподвижны, отказывались от корма. Реакция на внешние раздражители была понижена. На вторые сутки после введения соединения восстанавливались пищевое и питьевое поведение, реакции на внешние раздражители. В течение 14 суток исследований гибели опытных животных не отмечено. В связи с этим установить LD₅₀ не представилось возможным. Это позволяет считать изучаемое соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида нетоксичным в испытанном диапазоне

доз. Результаты изменения массы тела белых крыс представлены на рисунках 6 и 7.

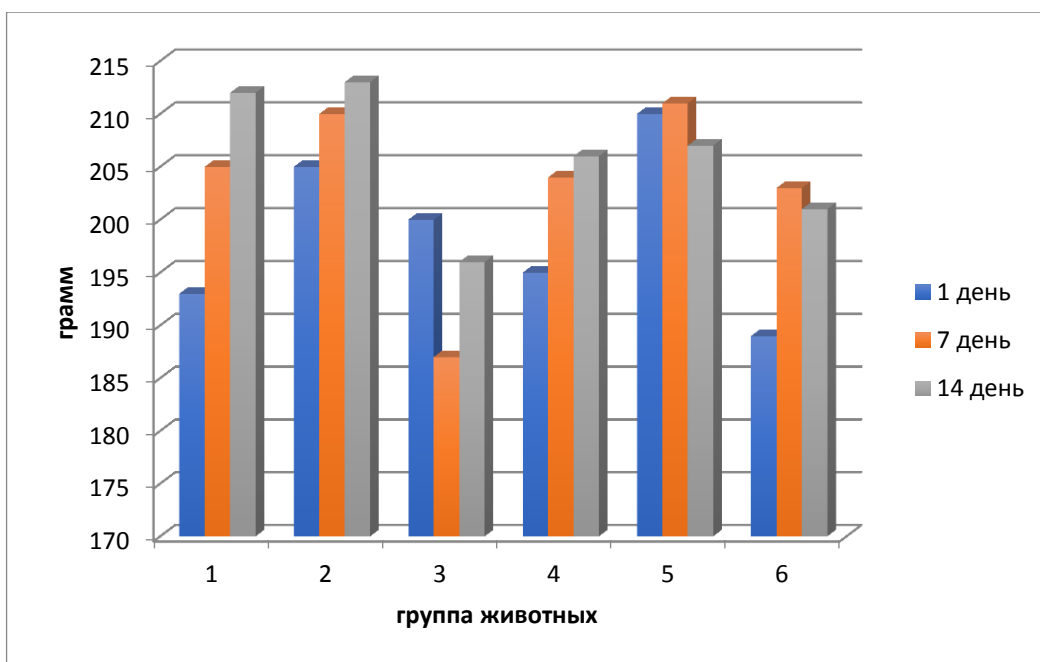


Рисунок 6 – Динамика массы тела белых крыс при подкожном введении соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида

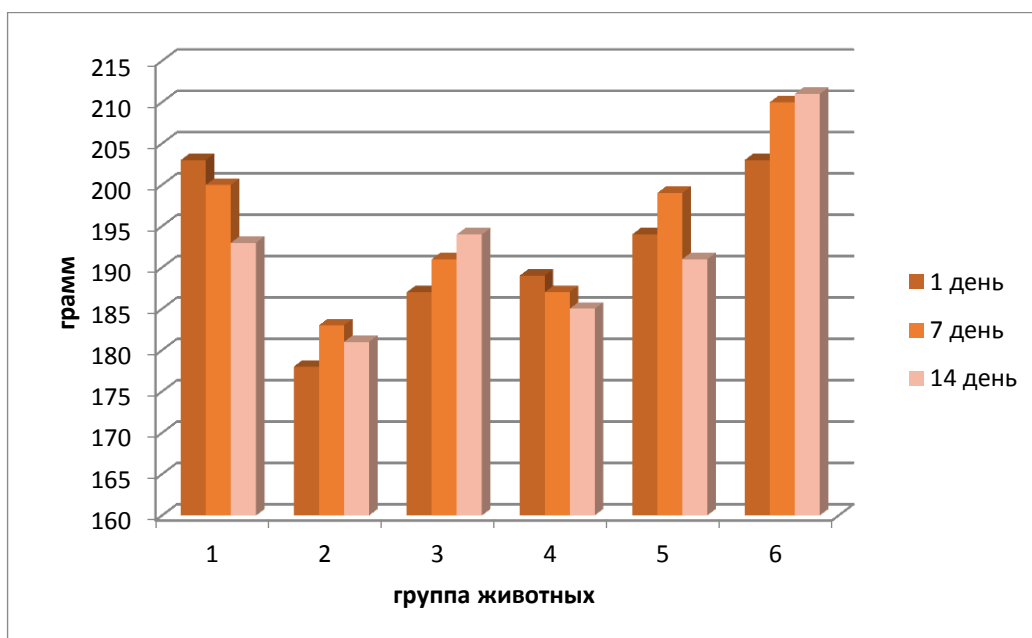


Рисунок 7 – Динамика массы тела белых крыс при внутрижелудочном введении соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида

Установлено, что после подкожного и внутрижелудочного введения изучаемого соединения значительных колебаний в массе тела не было. Все изменения находились в пределах погрешностей.

Для оценки раздражающего действия использовали самцов и самок взрослых морских свинок массой 450–600 г. Животных содержали в условиях централизованной фильтрации воздуха при контролируемой температуре (22 ± 2 °C), влажности (55 ± 10 %) и фотопериодичности 12/12 ч. Животных ежедневно кормили коммерческим кормом, свежие овощи и вода были доступны вволю. Всего использовали 10 животных, разделенных на 2 группы.

Морским свинкам 1-й опытной группы применяли гепатопротекторное и антиоксидантное соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида, при следующем соотношении компонентов в мас. мг: водный раствор фуллерена C_{60} , стабилизированный плуронином F-127, – 1 мл (1 мг по ДВ), ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг.

Морским свинкам 2-й опытной группы вводили гепатопротекторное и антиоксидантное соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Раствор готовили путем смешивания в 1 мл водного раствора фуллерена C_{60} (1 мг/мл по ДВ), 2500 мг ресвератрола, 1000 мг – бетаина гидрохлорида.

Шерсть с кожи морских свинок (в средней части спины за плечами) срезали электрической машинкой для стрижки, за 24 ч до нанесения испытуемого вещества, также выстригали вторую область, примерно на 3 см ниже, для контроля. Использовали животных только с интактной неповрежденной кожей.

Тестируемое вещество (0,5 мл или 0,5 г) помещали на стерильную марлевую салфетку размером 2×2 см и накладывали на неповрежденную кожу в центре спины. Через 18 ч экспозиции марлевую повязку снимали.

Первое чтение результата проводили еще через 6 ч. Два дополнительных показания были получены с 24-часовыми интервалами.

Помимо измерения эритемы и отека (с помощью штангенциркуля) учитывали другие токсические эффекты [7]. За этим следовала классификация степени кожной реакции, которая оценивалась в баллах, от 0 до 4, в соответствии со шкалой Патерсона. Для исключения развития контактного дерматита механическое воздействие на опытный участок кожи свели к минимуму (рисунок 8).



Рисунок 8 – Кожно-резорбтивная реакция на соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} через сутки после нанесения соединения

В ходе опытов установлено, что гепатопротекторное и антиоксидантное соединение для животных на основе водного раствора фуллерена C_{60} не вызывает раздражение или сенсibilизации на коже и не оставляет воспаления.

Раздражающее действие гепатопротекторного и антиоксидантного соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида изучали на животных в 2 сериях опытов. Для этого

использовали морских свинок (10 голов), разделенных на 2 группы (таблица 3).

Морским свинкам 1-й опытной группы применяли изучаемое соединение в следующей дозе: водный раствор фуллерена C_{60} – 1 мл (1 мг по ДВ), ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг. Морским свинкам 2-й опытной группы вводили 1 мл водного раствора фуллерена C_{60} (1 мг/мл по ДВ), 2500 мг ресвератрола, 1000 мг – бетаина гидрохлорида.

Аналогичные опыты проводили на кроликах. С этой целью подобрано 2 группы кроликов по 6 голов в каждой (см. таблицу 3).

Таблица 3 – Раздражающее действие гепатопротекторного и антиоксидантного соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида, оказываемое на лабораторных животных

Вид животного	Группа	Результат реакции, сут.	
		7-е	14-е
Морские свинки	1-я опытная	–	–
	2-я опытная	–	–
Кролики	1-я опытная	–	–
	2-я опытная	–	–

Кроликам 1-й опытной группы применяли соединение при следующем соотношении компонентов: водный раствор фуллерена C_{60} – 1 мл (1 мг по ДВ), ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг; кроликам 2-й опытной группы – 1 мл водного раствора фуллерена C_{60} (1 мг/мл по ДВ), 2500 мг ресвератрола, 1000 мг бетаина гидрохлорида. Установлено, что нанесение на кожу этих животных растворов 1 и 2 не оказывало патологического воздействия как на 7-е, так и на 14-е сутки

Для постановки конъюнктивальной пробы использовали морских свинок, 10 голов, по 5 животных в группе.

В 1-й опытной группе применяли изучаемое соединение: водный раствор фуллерена C₆₀, стабилизированный плуронином F-127, – 1 мл (1 мг по ДВ), ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг.

Морским свинкам 2-й опытной группы применяли изучаемое соединение в дозе 1 мл водного раствора фуллерена C₆₀ (1 мг/мл по ДВ), 2500 мг ресвератрола, 1000 мг – бетаина гидрохлорида.

Перед введением исследовали оба глаза каждого экспериментального животного, предварительно отобранного для тестирования. Животных с раздражением глаз, дефектами или ранее существовавшей травмой роговицы не использовали.

Животные содержались индивидуально. Температура в помещении в ходе эксперимента была 20 °С (±3 °С), относительная влажность не менее 30 % и, желательно, искусственное освещение. Для кормления использовали коммерческие корма, доступ к воде был неограничен.

Исследуемое вещество, по 1 капле, помещали в конъюнктивальный мешок одного глаза каждого животного после осторожного оттягивания нижнего века от глазного яблока. Затем веки также осторожно держали вместе в течение примерно одной секунды для предотвращения потери введенного соединения. Другой глаз, который остался необработанным, служил контролем.

Глаза подопытных животных не промывали в течение 24 ч после закапывания соединения.

За животными проводили наблюдение. Глаза всесторонне обследовали на наличие или отсутствие поражений, на наличие клинических признаков боли или дистресса (например, повторяющееся царапание или протирание глаз, чрезмерное моргание или слезотечение). Гиперчувствительность немедленного и замедленного типа оценивали через 24–48 ч. В течение всего периода наблюдения изменений в состоянии лабораторных животных после нанесения соединения установлено не было (рисунки 9, 10).



Рисунок 9 – Постановка конъюнктивальной пробы с применением соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида через 15 мин после введения



Рисунок 10 – Постановка конъюнктивальной пробы с применением соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида через двое суток после введения

Таким образом, разработанное соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида относится к IV классу опасности и к группе малотоксичных веществ.

3.3 Изменение белково-азотистого обмена у животных под действием водного раствора фуллерена C₆₀

Печень обладает высоким уровнем метаболизма и выполняет множество функций, включая детоксикацию компонентов крови, поступающих из пищеварительного тракта, выработку желчи для улучшения пищеварения, метаболизм углеводов, липидов, белков и лекарств, баланс рН крови, синтез белков плазмы, хранение и синтез гликогена и липидов [17].

В организме животных печень выполняет ряд жизненно важных функций. Одной из главных является участие в белково-азотистом обмене; участвует в обмене глюкозы и конвертации различных источников энергии в глюкозу (глюконеогенез); синтезирует многие белки плазмы крови (процессы кроветворения) во время беременности позвоночных животных. Данная железа, являясь крупной в организме животных, служит фильтром при содержании в крови избыточного количества гормонов, витаминов и медиаторов, а также участвует при выведении токсичных продуктов обмена веществ (азот- и углеродсодержащие группы веществ) [25].

Интенсивное развитие ветеринарной медицины ставит перед научными работниками и практикующими ветеринарными специалистами задачи по разработке мер предупреждения заболеваний, предотвращения рецидивов, что, главным образом, зависит от комплексного, научно обоснованного и эффективного фармакологического воздействия на организм больных мелких домашних животных [28,37]. Значительная роль в этом отводится и фуллерену C₆₀. Его применение оказывает положительное влияние на функции гепатоцитов, способствует восстановлению обменных процессов в ЖКТ, улучшая метаболические и окислительно-восстановительные процессы

в организме, снижая воспалительный и фиброзирующий процессы в печени [59].

При таких заболеваниях печени, как цирроз, вирусный и хронический гепатит применение фуллерена C_{60} ускоряет нормализацию концентрации билирубина в сыворотке крови, активность трансаминаз, реакцию взрывного преобразования лимфоцитов, стимулируемых тканевыми антигенными тканями печени и селезенки. Кроме того, сокращает время циркуляции специфических гуморальных антител (HBs) и антигенов вируса гепатита В (HBsAg), снижает тяжесть общих симптомов заболевания [30, 59].

Во время приема препарата при хронической почечной недостаточности из-за энтеросорбции снижается концентрация мочевины, креатинина и молекул средней массы в крови, что уменьшает симптомы уремического отравления.

Для исследований были сформированы 3 группы белых крыс, массой тела 180–200 г, возрастом 3 месяца. Животных подбирали по принципу аналогов, по 6 в каждой группе.

Первая группа служила контролем. Водный раствор фуллерена C_{60} вводили в дозе 5 мл на (по ДВ 5 мг/кг) 1 кг массы тела 7 (2 группа животных). Также вводили соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , включающего в себя водный раствор фуллерена C_{60} , L-карнозина и янтарной кислоты в следующем соотношении компонентов, мас./мг: водный раствор фуллерена C_{60} , стабилизированный плуроником F-127 – 5 мл (5 мг по ДВ), L-карнозин – 50 мг, янтарная кислота – 50 мг на 1 кг массы тела (3 группа). Изучаемое соединение вводили внутримышечно, однократно. Декапитацию животных проводили на 7-е сутки в соответствии с Европейской директивой по защите животных, используемых в научных целях [124].

Первым этапом наших исследований было изучение показателей белково-азотистого соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} . Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Показатели белково-азотистого обмена белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀ (M±m; n=6)

Показатель	1-я группа контрольная	2-я группа опытная	3-я группа опытная
Общий белок, г/л	77,54±0,18	87,54±2,34*	89,54±1,47*
Мочевина, ммоль /л	7,77±0,12	7,90±0,14	8,54±0,32*
Глутамин, мкмоль/л	0,03±0,002	0,02±0,001*	0,02±0,002*
Аммиак, мкмоль/л	0,10±0,005	0,12±0,002*	0,11±0,001*
Орнитин, мкмоль/л	5,62±0,12	6,85±0,13*	6,84±0,12*

* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Сравнивая полученные результаты с контрольными значениями, было установлено, что происходит повышение концентрации общего белка в крови лабораторных животных на 12,9 % (2-я группа) и 15,5 % (3-я группа) относительно контроля (см. таблицу 4).

Уровень мочевины у контрольных белых крыс составил 7,77±0,12 ммоль /л. После введения изучаемого соединения концентрация мочевины была выше контрольных значений у животных 2-й и 3-й групп на 1,7 и 9,9 % соответственно.

Мочевина – это небольшая органическая молекула, содержащая две amino (NH₂) группы и связанную карбамильную (CO) группу. Это главный азотистый конечный продукт катаболизма белков и аминокислот. Белки сначала разлагаются до составляющих аминокислот, которые, в свою очередь, разлагаются (дезаминируются) с образованием токсичного аммиака (NH₃) [1].

Повышенный катаболизм белка и, как следствие, повышенный синтез мочевины объясняют, по крайней мере, частично, повышенное содержание мочевины в плазме, которое сопровождает состояния, связанные с инфекциями [1].

После введения изучаемого соединения содержание глутамина в крови у животных 2-й и 3-й групп понизилось на 33,3 % относительно контрольных значений ($0,03 \pm 0,002$ мкмоль/л).

Глутамин является самой распространенной и универсальной аминокислотой в организме и имеет фундаментальное значение для промежуточного метаболизма, межорганического обмена азота посредством транспорта аммиака (NH_3) между тканями и гомеостаза pH. Почти в каждой клетке глутамин можно использовать в качестве субстрата для синтеза нуклеотидов (пуринов, пиримидинов и аминсахаров), никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН), антиоксидантов и многих других биосинтетических путей, участвующих в поддержании целостности и функции клеток [79].

Нами установлено, что уровень аммиака в крови повышается у животных 2-й группы (+20,0 %) и 3-й групп (+10,0 %) относительно 1-й группы. Аммиак – это вещество, содержащее азот, которое обычно выводится с мочой. Повышение уровня аммиака в крови является неблагоприятным признаком, свидетельствующим о том, что почки или печень не работают должным образом, позволяя продуктам обмена оставаться в кровотоке. Аммиак, как и многие другие продукты метаболизма в организме, может быть токсичным для клеток [69].

Изменение содержания орнитина в сыворотке крови под влиянием изучаемого соединения мы наблюдали у животных 2-й и 3-й групп, повышение его количества на 21,7–21,8 % относительно контроля. Орнитин – один из промежуточных метаболитов цикла мочевины, который не входит в состав природных белков [2]. Скорее, он образуется в цитозоле из аргинина и должен транспортироваться в митохондрии, где используется в качестве субстрата для фермента орнитинтранскарбамилазы для образования цитруллина. Избыток орнитина катаболизируется двумя ферментами: орнитин-5-аминотрансферазой, которая является митохондриальным ферментом и превращает орнитин в предшественник пролина, и

орнитиндекарбоксилазой, которая находится в цитозоле и превращает орнитин в путресцин.

Более подробно остановимся на особенностях белкового обмена в организме белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀. Установлено, что концентрация общего белка у животных повысилась на 8,6 % (2-я группа) и 10,1 % (3-я группа) по отношению к контролю. Другие исследованные показатели белкового обмена также изменялись. Так, например, содержание альбуминов в крови животных как 2-й, так и 3-й опытных групп повысилось на 8,6 % (34,30±0,55 г/л) и 10,1 % (35,87±0,84 г/л) относительно контрольного значения (таблица 5).

Таблица 5 – Показатели белкового обмена белых крыс, г/л, после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀ (M±m; n=6)

Показатели	1-я группа контрольная	2-я группа опытная	3-я группа опытная
Общий белок	77,54±0,18	84,24±0,26*	85,35±1,44*
Альбумины	30,75±0,23	34,30±0,55*	35,87±0,84*
Глобулины			
α-глобулины	19,66±0,20	19,30±0,14	20,00±0,43
β-глобулины	18,82±0,34	20,83±0,24*	20,14±0,18
γ-глобулины	8,37±0,08	9,77±0,23*	9,52±0,19*

* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Печень производит все белки, за исключением белков, синтезируемых иммунной системой (гамма-глобулины или иммуноглобулины). Это достигается путем повторной сборки аминокислот в белок. Основным белком, вырабатываемый печенью, называется альбумином [1].

Нормальный альбумин в кровотоке важен для многих физиологических функций. Одна из этих функций – нормальное поддержание давления

жидкости в артериях и венах. Если количество белка падает ниже определенного уровня, то жидкость из этих сосудов может вытекать и скапливаться в брюшной или грудной полостях.

Концентрации глобулина в сыворотке включают альфа, бета и гамма фракции на основе электрофоретического фракционирования белков. Белки острой фазы, комплемент и фибриноген мигрируют в альфа- и бета-фракции, а иммуноглобулины мигрируют во фракции гамма-глобулина. Их содержание у животных 2-й и 3-й групп повысилось на 16,7 и 13,7 % соответственно по сравнению с контролем. В то же время концентрация α -глобулинов у животных достоверно не изменилась.

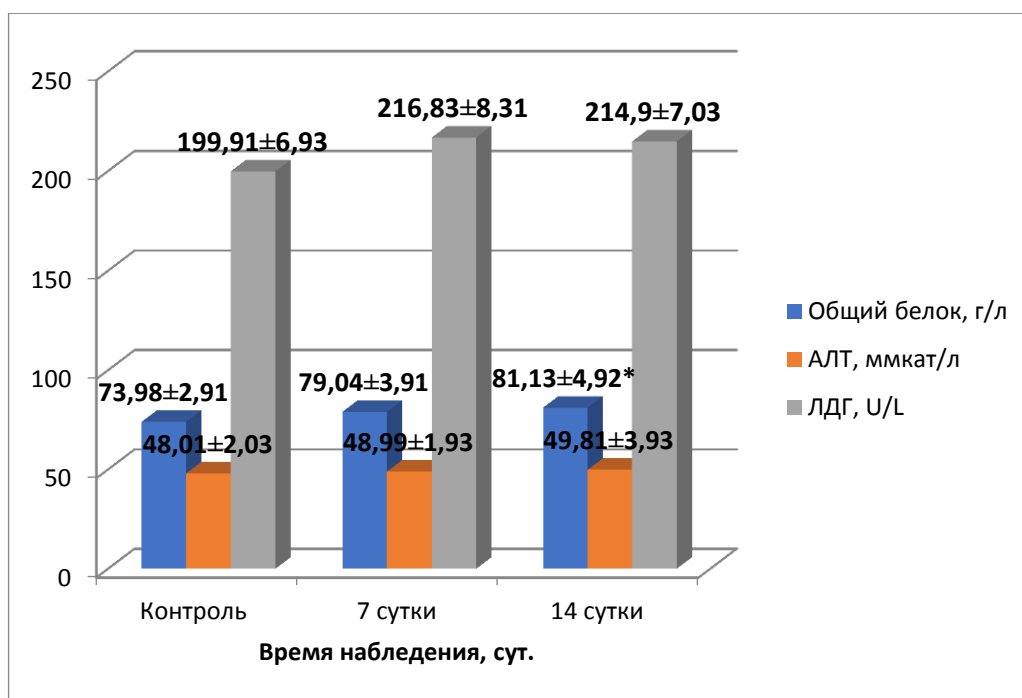
Концентрация β -глобулинов у животных 2-й и 3-й групп оказалась выше, чем у контрольных животных, на 10,7 и 7 % соответственно.

Далее мы изучили влияние соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида на показатели белково-азотистого обмена кошек. Первая группа служила контролем, второй вводили полученный гепатопротекторное и антиоксидантное соединение для животных на основе водного раствора фуллерена C_{60} , – 3 мл, 3 мг по действующему веществу, ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг подкожно. Кровь для исследований брали на 7 и 14 сутки после введения соединения.

Результаты исследований представлены на рисунках 11, 12.

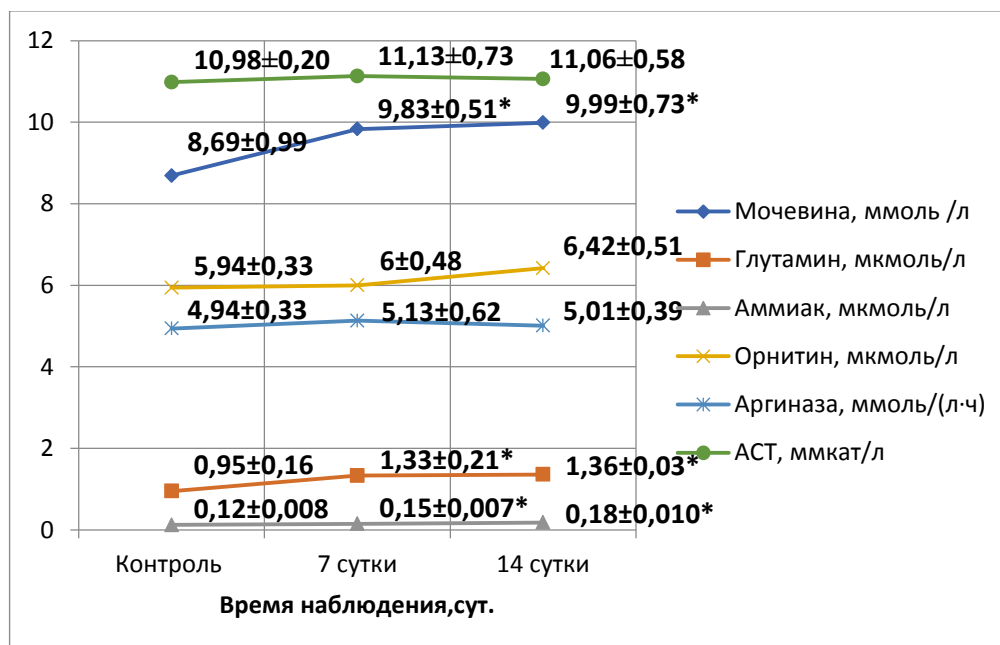
Установлено, что после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида произошло достоверное повышение мочевины на 7-е (на 13,1 %) и 14-е (на 15,0 %) сутки относительно контроля.

Исходный уровень глутамина составил $0,95 \pm 0,16$ мкмоль/мл. После введения разработанного соединения его концентрация повысилась на 7-е (40,0 %) и 14-е (43,2 %) сутки (рисунок 12).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 11 – Показатели белкового обмена кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 12 – Показатели белково-азотистого обмена кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Уровень аммиака в сыворотке крови повысился на 25,0 % (7-е сутки) и 50,0 % (14-е сутки).

При изучении остальных показателей достоверных различий не установлено.

Особенности белково-азотистого обмена у кошек заключаются в регуляции потерь азота в организме и контроле активности ферментов цикла мочевины [14]. Эта регуляция осуществляется несколькими механизмами.

Первый уровень – субстратная регуляция, когда концентрация аммиака и/или аспартата снижается или увеличивается, происходит уменьшение или увеличение поступления азота в цикл мочевины с последующим увеличением или уменьшением синтеза мочевины.

Второй уровень является аллостерической регуляцией, N-ацетилглутамат является абсолютным аллостерическим активатором карбамоилфосфатсинтазы, первой ступени синтеза мочевины. Таким образом, изменения концентрации N-ацетилглутамата в митохондриях печени будут диктовать изменения активности карбамоилфосфатсинтазы и синтеза мочевины на секундной основе. На концентрацию N-ацетилглутамата влияет активность N-ацетилглутаматсинтазы. Поток через N-ацетилглутаматсинтазы модулируется концентрацией глутаминовой кислоты и аллостерической активацией фермента аргинина. Как глутамат, так и аргинин быстро увеличиваются при увеличении потребления белка. Когда концентрация субстратов уменьшается, N-ацетилглутамат уменьшается, поскольку он диффундирует из митохондрий и расщепляется ацетилазой.

Третий уровень контроля цикла мочевины происходит по мере увеличения и уменьшения концентрации орнитина в печени. Во время постабсорбционного состояния орнитин истощается из-за относительно высокой активности орнитин-дельта-аминотрансаминазы в печени, что ограничивает доступность орнитина для принятия карбамилфосфата с образованием цитруллина. Таким образом, низкая концентрация орнитина в

печени заметно снижает синтез мочевины в периоды низкого уровня аргинина (во время постабсорбционного состояния или в периоды низкого потребления белка).

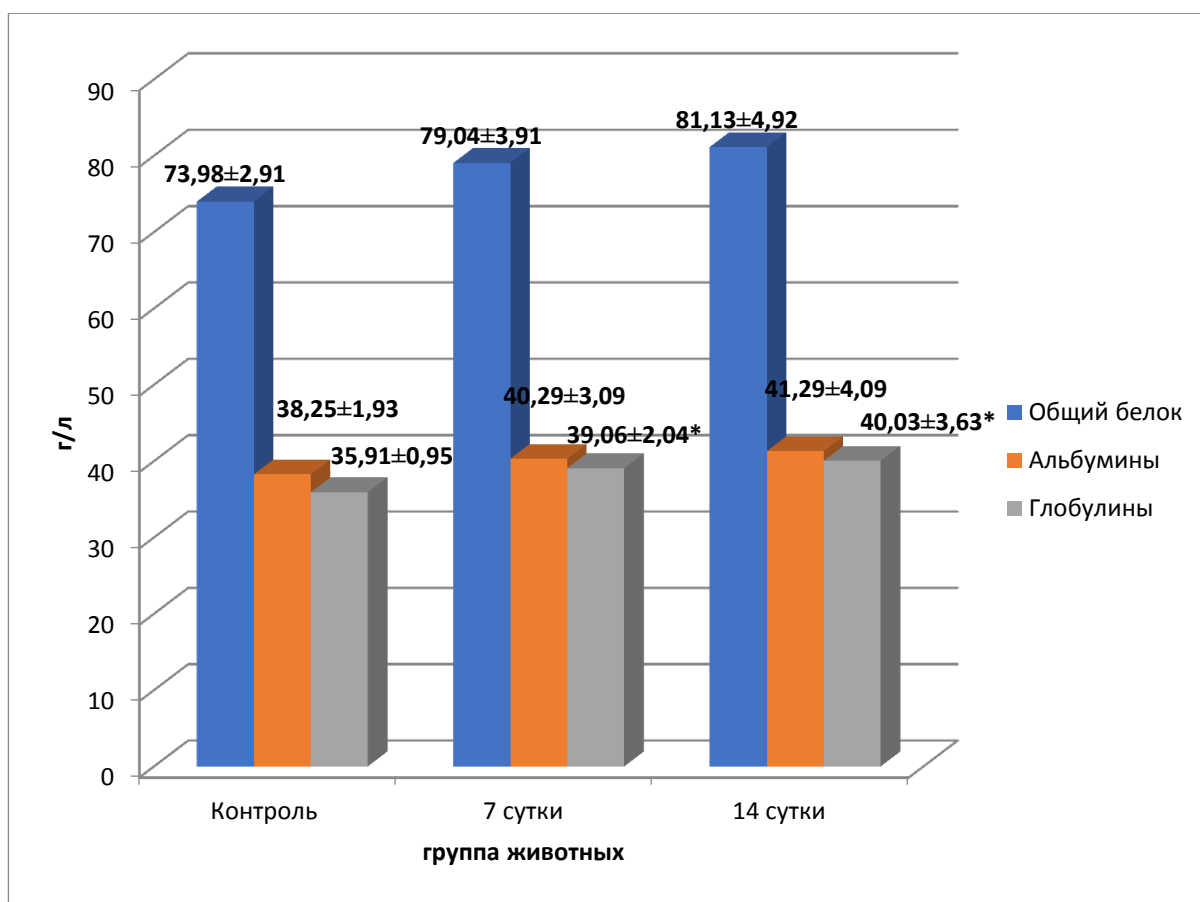
Таким образом, по-видимому, у кошек катаболические ферменты азота на в печени установлены на постоянно высоком уровне, достаточном для того, чтобы первые три уровня контроля могли эффективно и действенно окислять любое избыточное потребление белка. Особенность этой ферментативной схемы заключается в ограниченной способности сохранять азот при низком его поступлении. Кошки, как строгие хищники, способны поддерживать уровень глюкозы в крови и подавлять катаболические ферменты азота [33].

Далее мы изучили особенности белкового обмена в организме кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Результаты исследований представлены на рисунке 13.

Установлено, что после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида содержание общего белка в сыворотке крови достоверно не изменилось на 7-е сутки. На 14-е сутки уровень общего белка повысился на 9,6 % относительно контроля.

Уровень альбуминов в сыворотке крови достоверно не изменился независимо от сроков наблюдения.

Исходная концентрация глобулинов в сыворотке крови кошек составила $35,91 \pm 0,95$ г/л. После введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида искомый показатель повысился на 7-е и 14-е сутки на 8,8 и 11,5 % соответственно относительно контроля (рисунок 13).

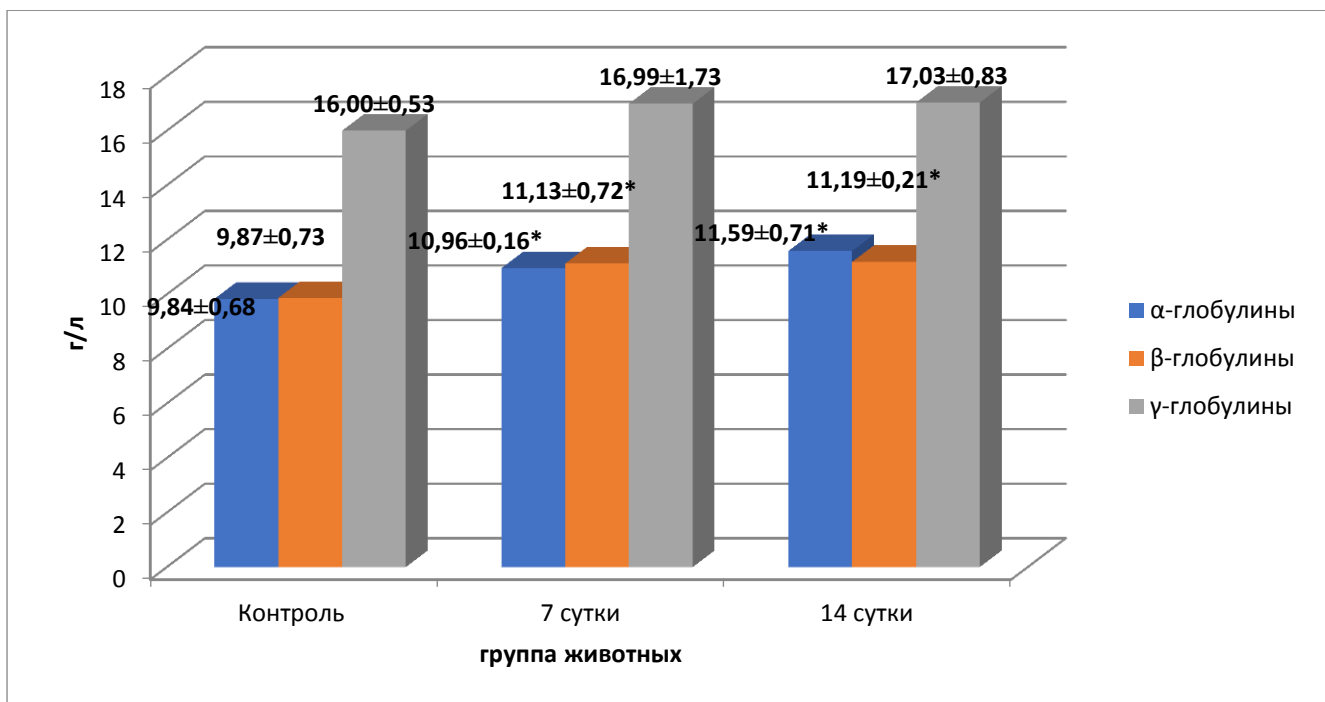


* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 13 – Показатели белкового обмена кошек, г/л, после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Увеличение общего количества глобулинов в сыворотке является еще одним часто наблюдаемым биохимическим отклонением, которое, как считается, является результатом неспецифического иммунного ответа. В нашем исследовании была установлена незначительная гиперглобулинемия. Концентрация глобулинов по фракциям представлена на рисунке 14.

Установлено, что концентрация α -глобулинов на 7-е и 14-е сутки повысилась на 11,4 и 17,7 % соответственно относительно контроля ($9,84 \pm 0,68$ г/л) (рисунок 14).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 14 – Концентрация глобулинов в сыворотке крови кошек, г/л, после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Исходный уровень β-глобулинов составил $9,87 \pm 0,73$ г/л. После введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида концентрация β-глобулинов повысилась на 12,8 % (7-е сутки) и 13,4 % (14-е сутки).

Достоверных различий в уровнях γ-глобулинов не установлено.

Таким образом, после введения изучаемого соединения мы наблюдали изменения показателей белково-азотистого обмена, которые выражались в повышении уровней общего белка, аммиака и мочевины в сыворотке крови животных. Однако произошло снижение концентрации глутамин. Также установлено изменение содержания в сыворотке крови альбуминов (на 8,6–10,1 %) и глобулинов (на 6–6,5 %). Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} на организм животных. Представленные результаты указывают на то, что поверхность белков является высоко восприимчивой к молекулам

фуллеренов C_{60} , а также на то, что эти лиганды склонны взаимодействовать с активными центрами белков и могут прикрепляться к поверхности их рецепторов.

3.4 Влияние нанокompозитного раствора фуллерена C_{60} на состояние мочевинообразовательной функции печени животных

Фуллерен C_{60} представляет собой сферическую молекулу наноуглерода, содержащую 30 углеродных двойных связей. В настоящее время фуллерены, их производные и комплексы находят все большее и большее применение. При поиске лекарственных препаратов, изменяя структуру производных фуллерена, можно обеспечить точную «подстройку» их структуры для получения лекарственного вещества с определенным биологическим эффектом или для создания средств доставки лекарственного препарата к месту воздействия без побочных эффектов в других тканях и органах. При этом остается малоисследованным вопрос о влиянии наноуглеродов на метаболизм организма [11, 94, 85].

Для исследований были сформированы 3 группы белых крыс, массой тела 180–200 г, возрастом 3 месяца. Животных подбирали в группы по принципу аналогов, по 6 в каждой.

Первая группа служила контролем. Водный раствор фуллерена C_{60} вводили в дозе 5 мл на (по ДВ 5 мг/кг) 1 кг массы тела (2 группа животных). Так же вводили соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} включающего в себя водный раствор фуллерена C_{60} , L-карнозина и янтарной кислоты в следующем соотношении компонентов, мас./мг: водный раствор фуллерена C_{60} , стабилизированный плуроником F-127, – 5 мл (5 мг по ДВ), L-карнозин – 50 мг, янтарная кислота – 50 мг на 1 кг массы тела (3 группа). Изучаемые соединения вводили подкожно, однократно.

Печень – это центральный орган химического гомеостаза организма, где создается единый обменный и энергетический пул для осуществления

метаболизм белков, углеводов, липидов, витаминов, ферментов и т.д. Печень выполняет следующие важнейшие функции: биосинтетическую, регуляторно-гомеостатическую, мочевино- и желчеобразовательную, глюконеогенную, выделительную, детоксикационную и др. [30, 44, 96]. Изучение влияния соединений на основе водного раствора фуллерена C₆₀ на эти специфические функции печени позволит с новых позиций оценить изменение обмена веществ в организме животных и понять более тонкие механизмы действия препарата [64,175].

Для оценки состояния белково-азотистого обмена и мочевинообразовательной функции печени мы определяли в сыворотке крови содержание общего белка, метаболитов орнитинового цикла и глутаминовой кислоты-глутамин, а также активность некоторых ферментов. Результаты влияния соединений фуллерена C₆₀ на некоторые биохимические показатели крови представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Изменения биохимических показателей крови под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀ (M±m; n = 6)

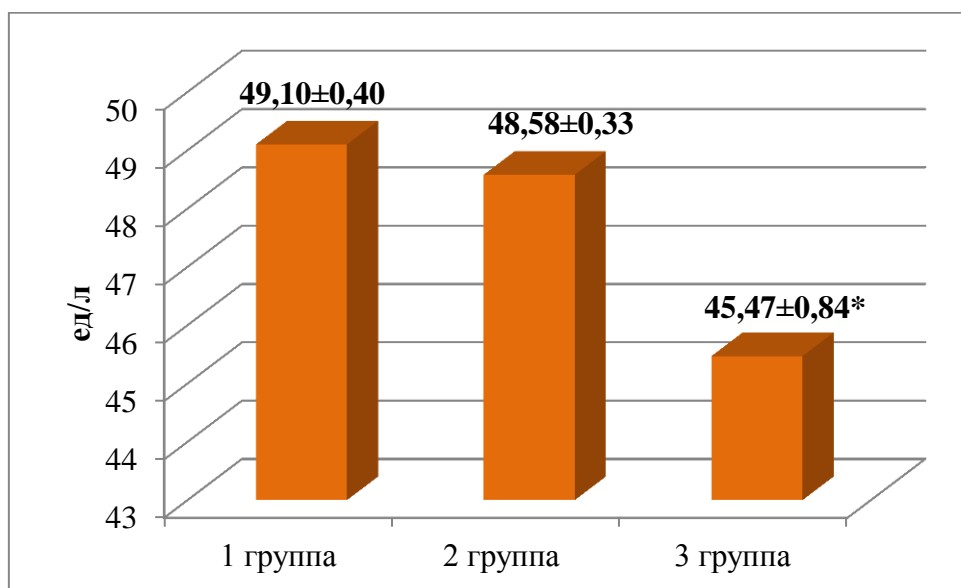
Показатель	1-я группа контрольная	2-я группа опытная	3-я группа опытная
Общий белок, г/л	77,54±0,18	87,54±2,34*	89,54±1,47*
Мочевина, ммоль /л	7,77±0,12	7,90±0,14*	8,54±0,32*
Глутамин, мкмоль/л	0,03±0,002	0,02±0,001*	0,02±0,002*
Аммиак, мкмоль/л	0,10±0,005	0,12±0,002*	0,11±0,001*
Орнитин, мкмоль/л	5,62±0,12	6,85±0,13*	6,84±0,12

* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

По данным таблицы 6, введение соединения привело к повышению уровня общего белка у животных обеих опытных групп. Так, у крыс, которым вводили водный раствор фуллерена C₆₀, данный показатель

повысился на 12,9 % (2-я группа), а у животных, которым вводили соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, на 15,5 % (3-я группа).

Как известно, аминокислоты, образующиеся в процесс распада белка, подвергаются различным превращениям, в частности, дезаминированию и переаминированию [5]. Можно предположить, что в организме подопытных животных процесс дезаминирования преобладает над переаминированием. Это подтверждается снижением активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), фермента из группы аминотрансфераз, играющего одну из ключевых ролей в обмене аминокислот и катализирующего реакцию трансаминирования между аланином и альфа-кетоглутаратом. У животных 2-й опытной группы активность энзима снизилась на 1,1 %, у крыс, которые получали соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, на 7,4 % (рисунок 15).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 15 – Изменение активности фермента АЛТ в сыворотке крови крыс под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀ (M±m; n = 6)

Об усилении процессов дезаминирования аминокислот может свидетельствовать повышение в крови уровня аммиака, одного из конечных

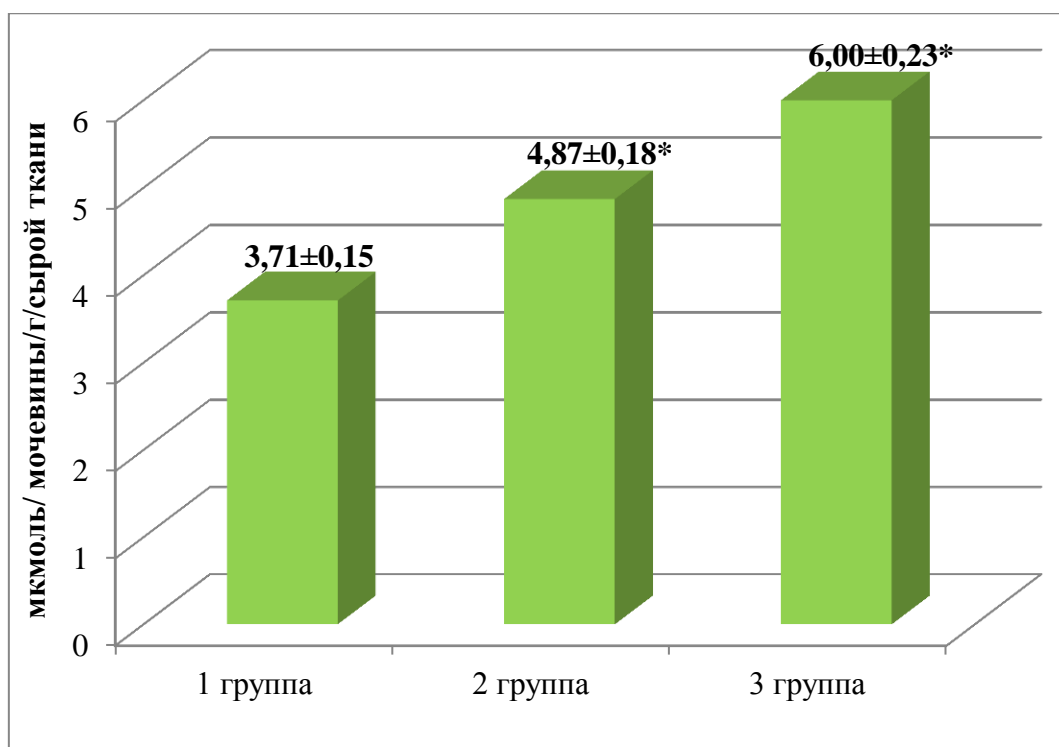
продуктов данного превращения [8, 68]. Мы наблюдали повышение по сравнению с контролем концентрации этого метаболита у крыс, которым вводили водный раствор фуллерена C₆₀, на 20,0 %, а у животных, которым вводили соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, на 10,0 %.

Образующийся аммиак является цитотоксическим ядом, его детоксикация в организме осуществляется различными способами. Например, в процессе амидирования глутаминовой кислоты и образования из нее глутамина. Из таблицы 6 видно, что концентрация глутамина в сыворотке крови подопытных животных снижалась, причем у животных обеих экспериментальных групп одинаково, на 33,3 %. Исходя из этого, можно предположить, что основным путем детоксикации аммиака у животных, которым давали фуллерен C₆₀, является орнитиновый цикл мочевинообразования.

Это подтверждается повышением активности аргиназы, последнего фермента цикла мочевины. У животных 2-й группы активность энзима повысилась на 31,3 %, а у крыс 3-й опытной группы на 61,7 % по сравнению с контролем (рисунок 16).

Аргиназа катализирует расщепление аргинина на орнитин и мочевины. Следовательно, повышение по сравнению с контрольными животными концентрации мочевины и орнитина также может свидетельствовать об усилении процесса мочевинообразования у подопытных крыс. Концентрация орнитина повысилась на 22 %, а мочевины – на 1,67 и 9,91 % у животных 2-й и 3-й опытных групп соответственно.

Что касается активности фермента лактатдегидрогеназы, то у крыс обеих экспериментальных групп она незначительно, но повышалась, что также может свидетельствовать об усилении обменных процессов под влиянием исследуемого соединения (рисунок 17).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 16 – Изменение активности фермента аргиназы в сыворотке крови крыс под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} ($M \pm m$; $n = 6$)

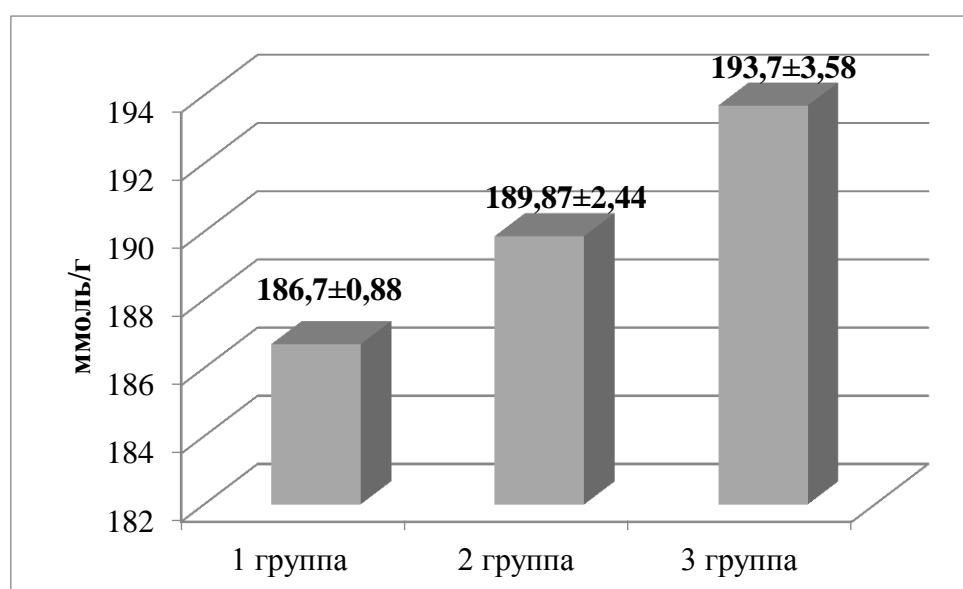


Рисунок 17 – Изменение активности фермента ЛДГ в сыворотке крови крыс под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} ($M \pm m$; $n = 6$)

Далее мы изучили изменение мочевинообразовательной функции печени у кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Для исследований были сформированы 3 группы кошек. Животных подбирали в группы по принципу аналогов, по 6 в каждой. Первая группа служила контролем, второй вводили полученный гепатопротекторное и антиоксидантное соединение для животных на основе водного раствора фуллерена C_{60} , – 3 мл, 3 мг по действующему веществу, ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг подкожно. Кровь для исследований брали на 7 и 14 сутки после введения соединения. Достоверных различий в содержании общего белка в сыворотке крови кошек после введения соединения фуллерена C_{60} не установлено (рисунок 18).

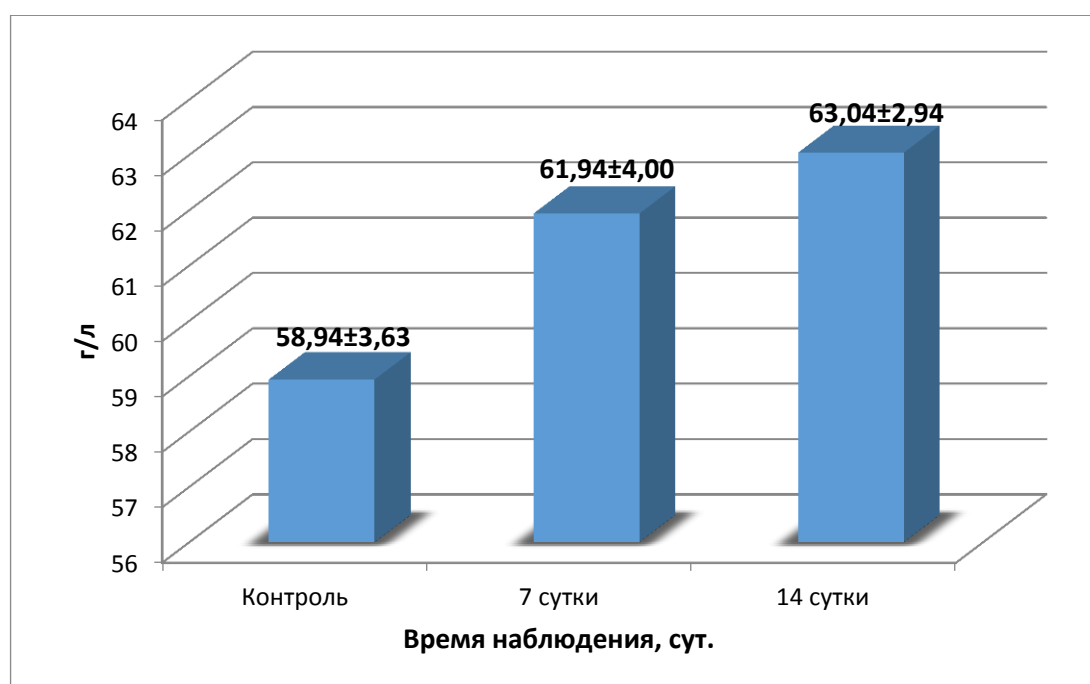
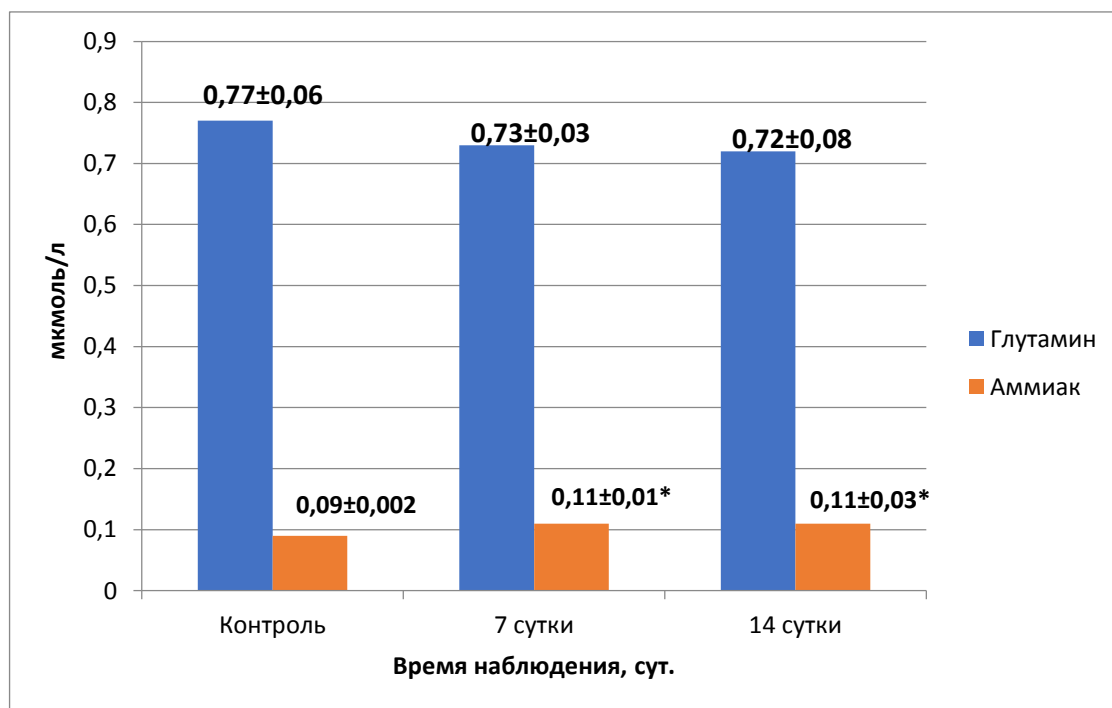


Рисунок 18 – Содержание общего белка в сыворотке крови кошек под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M\pm m$; $n = 6$)

Исходная концентрация аммиака составила $0,09 \pm 0,002$ мкмоль/л. После введения изучаемого соединения на 7-е и 14-е сутки уровень аммиака повысился на 22,2 % относительно контроля (рисунок 19).

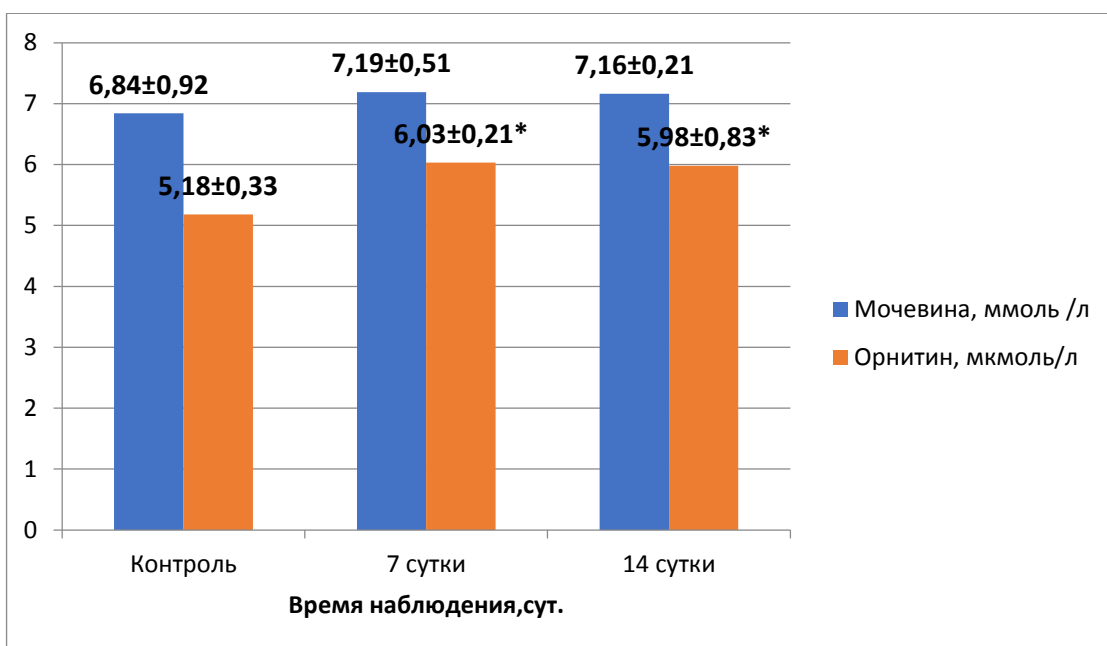


* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 19 – Содержание глутамина и аммиака в сыворотке крови кошек под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

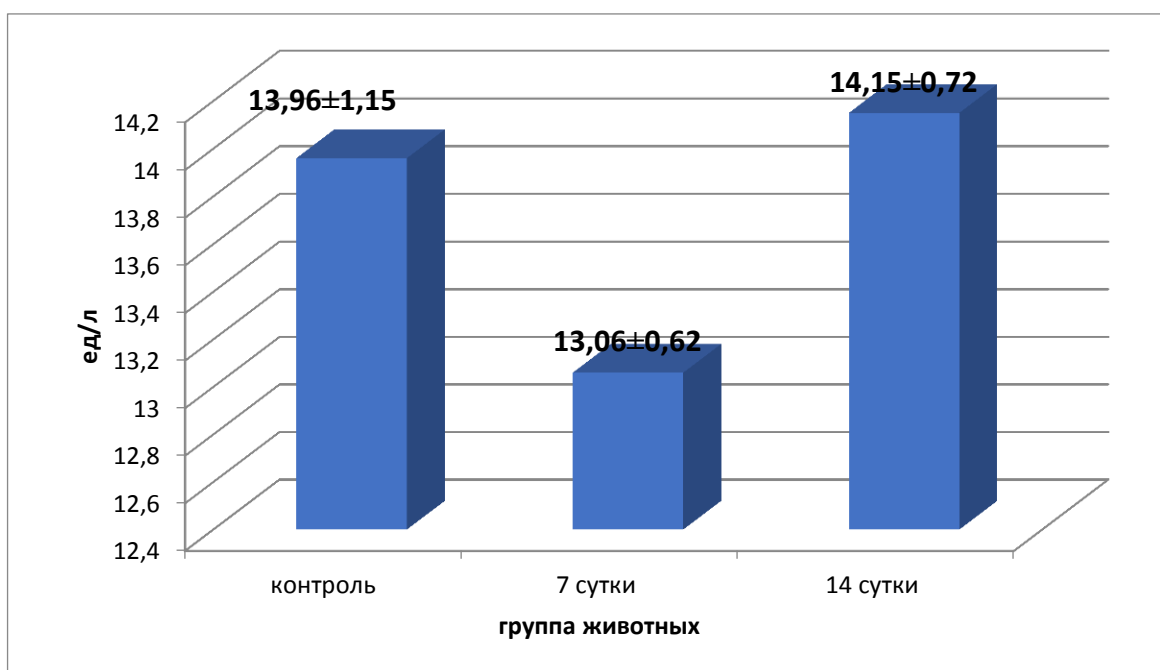
Установлено, что произошло достоверное повышение орнитина в сыворотке крови на 7-е и 14-е сутки на 16,4 и 15,4 % соответственно относительно контроля (рисунок 20). В остальных изучаемых показателях достоверных различий не установлено.

После введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) в крови кошек достоверно не изменилась (рисунок 21).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 20 – Содержание мочевины и орнитина в сыворотке крови кошек под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

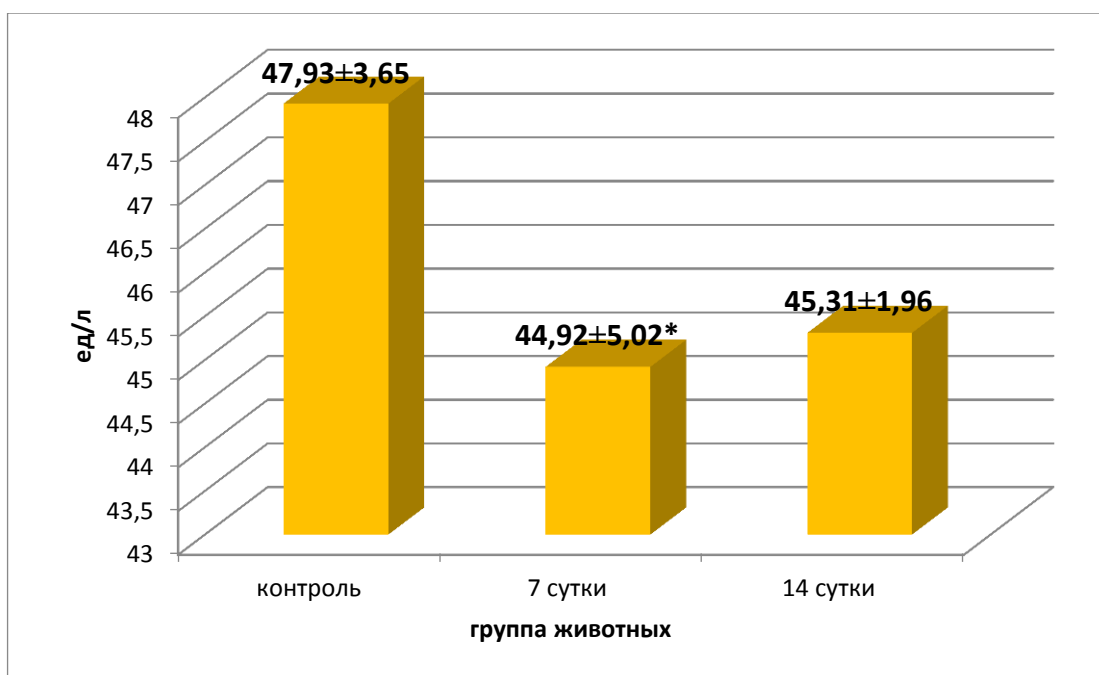


* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 21 – Сдвиги активности аспаратаминотрансферазы в крови кошек, ед./л, после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

АЛТ, будучи высокочувствительным и достаточно специфичным ферментом, является биомаркером гепатоцеллюлярного повреждения у разных видов животных.

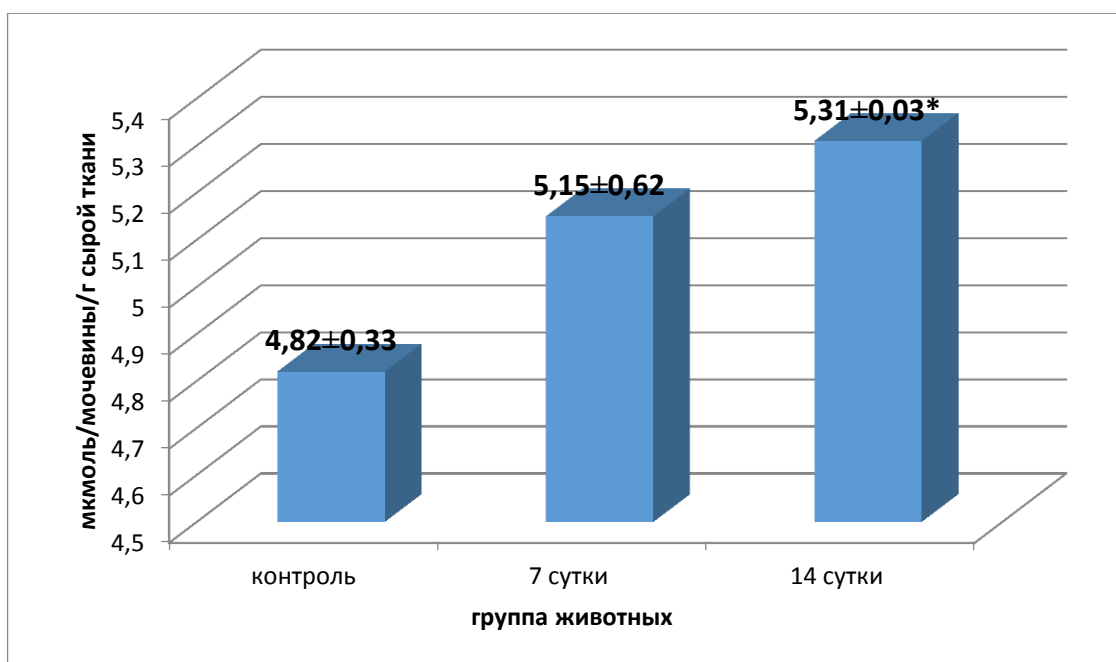
Активность аланинаминотрансферазы после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида незначительно понизилась, однако достоверных различий не установлено (рисунок 22).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 22 – Сдвиги активности аланинаминотрансферазы в крови кошек, ед./л, после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Достоверное повышение активности аргиназы установлено на 14-е сутки (+10,1 %) по сравнению с контролем. На 7-е сутки после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида достоверного повышения не установлено (рисунок 23).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 23 – Сдвиги активности аргиназы в крови кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Аргиназа является конечным ферментом цикла мочевины, который отвечает за гидролиз аргинина до мочевины и орнитина, а дефицит аргиназы в печени, как сообщается, вызывает наличие повышенного количества аммиака в крови. Основная роль аргиназы в печени заключается в детоксикации аммиака посредством цикла мочевины [111].

Особенность цикла мочевины в организме кошек – высокая и постоянная активность этого процесса, на который минимально влияет уровень белка в рационе [217].

Метаболическая система кошек приспособлена к использованию белка и жира для производства энергии и поддержания уровня глюкозы в крови, даже когда источники белка в рационе ограничены [43]. В результате потребность кошек в белке более чем в два раза выше, чем у других видов животных [210]. Этот факт может объяснить более активный цикл мочевины у кошек по сравнению с другими животными.

Таким образом, соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида способствует усилению таких специфических функций печени, как белоксинтезирующая и мочевинообразовательная. Установлено, что введение соединения статистически достоверно повышало уровень общего белка в крови. Снижение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови животных 2-й и 3-й опытных групп на 1,1 и 7,4 % соответственно позволяет предположить снижение процессов трансамирования аминокислот. Повышение концентрации аммиака может свидетельствовать об усилении процессов дезаминирования аминокислот. При этом у животных детоксикация аммиака осуществлялась благодаря некоторому усилению интенсивности образования мочевины в печени, но не системы глутаминовая кислота-глутамин. Подтверждением этому может служить повышение концентрации в крови некоторых метаболитов орнитинового цикла и снижение концентрации глутамин.

3.5 Система крови животных под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида

Исследования биологических функций и гомеостаза железа прояснили его роль в физиологии животных и возникновении различных заболеваний [6]. Железо, необходимое для синтеза гемоглобина, необходимо всем клеткам для производства гема и кластеров железо-сера (Fe/S), которые являются компонентами белков и ферментов, участвующих в жизненно важных биологических процессах, таких как дыхание, репликация и восстановление нуклеиновых кислот, в метаболических реакциях и защите организма [66].

Избыточные количества железа в организме способны высвобождать электроны и вызывают повреждения компонентов клетки. Поэтому обмен железа в организме строго регулируется.

Двусторонняя природа железа также проявляется и в неравномерном его распределении в тканях организма, когда одни ткани содержат большое количество железа, а другие – недостаточное [67].

В связи с этим в настоящее время проводятся работы по созданию новых препаратов, оказывающее стимулирующее действие на процессы кроветворения и обменные процессы в организме животных [20, 53, 86]. Особое внимание привлекают препараты на основе наноматериалов.

Все больше внимание исследователей привлекают фуллерены, однако применение соединений на основе наночастиц фуллеренов в ветеринарной медицине остается ограниченным. Поэтому разработка отечественных инновационных лекарственных соединений на основе фуллеренсодержащих наночастиц является одним из приоритетных направлений ветеринарной медицины. Понимание молекулярных основ действия этих частиц на клетки организма животных необходимо для определения биобезопасности их применения.

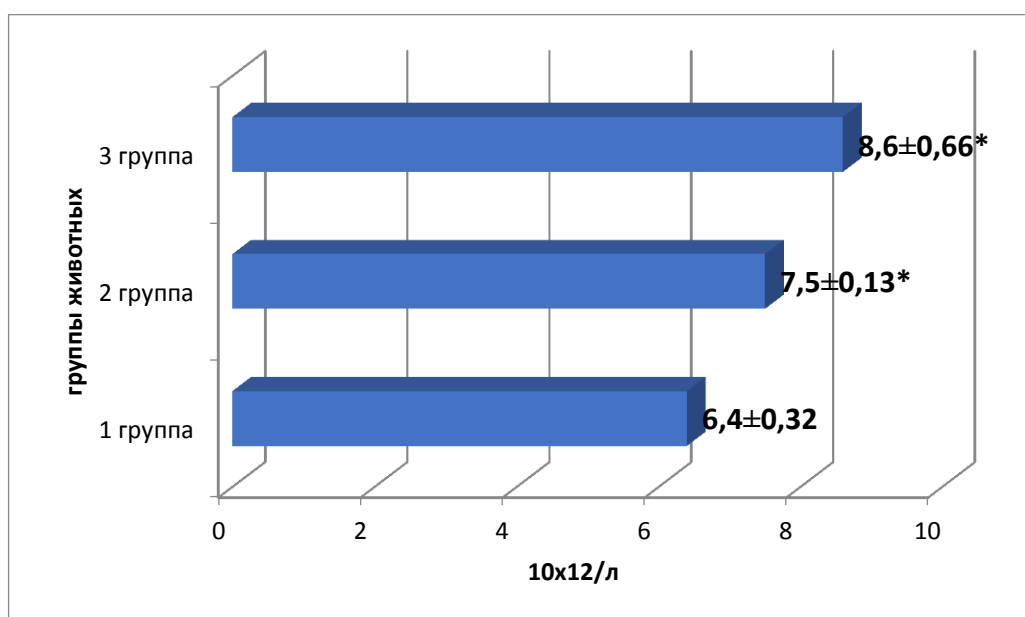
Для исследований были сформированы 3 группы белых крыс линии, массой тела 180–200 г, возрастом 3 месяца. Животных подбирали в группы по принципу аналогов, по 6 в каждой.

Первая группа служила контролем. Животным 2-й группы вводили 1 мл водного раствора фуллерена C_{60} (1 мг/мл по ДВ), 25 мг ресвератрола, 10 мг бетоина гидрохлорида; 3-й группы – 1 мл водного раствора фуллерена C_{60} (1 мг/мл по ДВ), 2500 мг ресвератрола, 1000 мг бетоина гидрохлорида. Изучаемое соединение вводили подкожно, однократно. Глицериновую нагрузку проводили через 24 ч после введения.

Образцы крови для изучения обмена железа собирали в пробирку с ЭДТА. Цельную кровь (2 мл) для измерения показателей обмена железа, концентрации железа в сыворотке, общей железосвязывающей способности

(ОЖС) и концентрации трансферрина собирали в пробирку для отделения сыворотки и немедленно центрифугировали.

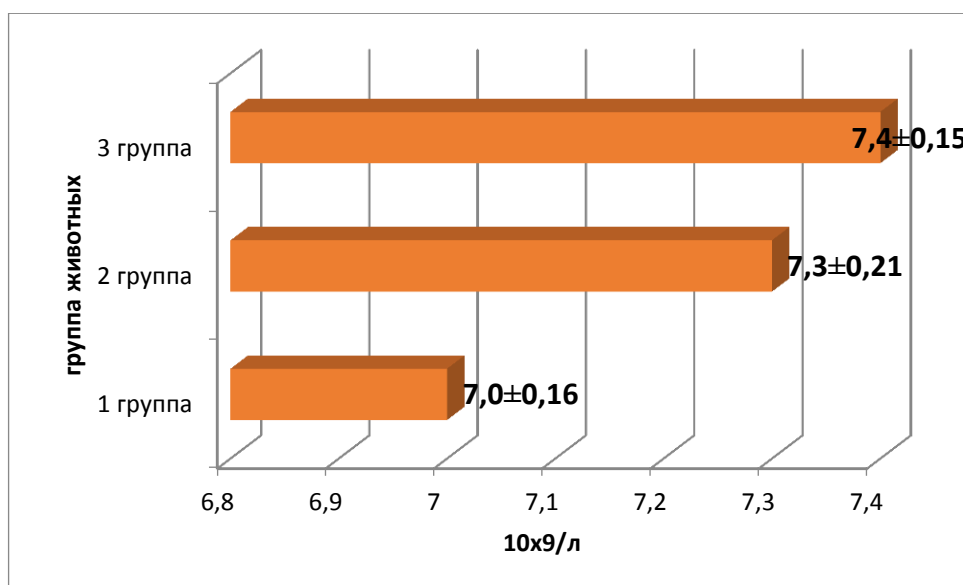
Первым этапом наших исследований было изучение влияния водного раствора фуллерена C_{60} на гематологические показатели организма белых крыс. Установлено, что количество эритроцитов в крови животных после введения изучаемого соединения повысилось на 17,8 % (2-я группа) и 34,4 % (3-я группа) относительно контроля (1-я группа) (рисунок 24).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 24 – Количество эритроцитов, $10^{12}/л$, в крови белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

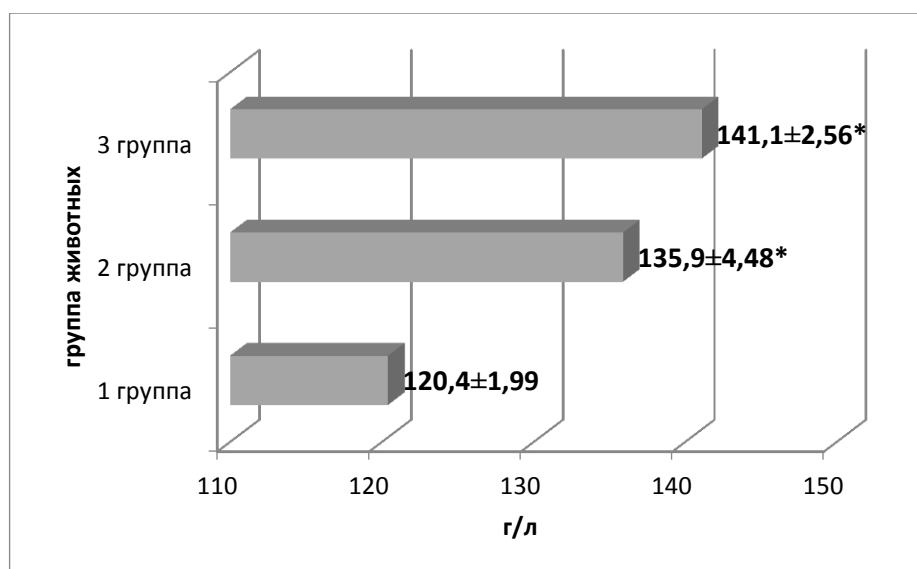
Количество лейкоцитов в крови лабораторных животных достоверно не изменилось после введения соединения водного раствора фуллерена C_{60} относительно контроля (рисунок 25).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 25 – Количество лейкоцитов, $10^9/\text{л}$, в крови белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Концентрация гемоглобина в крови белых крыс 2-й и 3-й групп после введения соединения водного раствора фуллерена C_{60} повысилась на 12,8 и 17,2 % соответственно по сравнению с контролем (рисунок 26).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 26 – Уровень гемоглобина, г/л, в крови белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Результаты исследований влияния соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида на обмен железа в организме белых крыс представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Состояние обмена железа в сыворотке крови белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида (M±m; n = 6)

Группа	ОЖС, мкмоль/л	СЖ, мкмоль/л	КНТ, %	НЖСС, мкмоль/л	Транс- феррин, г/л
1-я группа контроль	112,33±5,69	54,26±2,00	48,3	54,53±0,99	2,33±0,44
2-я группа	143,98±5,13*	65,05±2,51*	45,2	66,04±4,00*	3,03±0,31
3-я группа	159,61±6,74*	67,82±3,93*	42,5	69,52±3,33*	4,00±0,52

* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Анализируя результаты, представленные в таблице 7, можно сделать вывод, что общая железосвязывающая способность сыворотки крови у животных 2-й группы повысилась на 28,18 %, у 3-й группы – на 42,1 % относительно 1-й группы (контроль). Это косвенно говорит о возможности соединения фуллерена тормозить развитие анемии в организме животных.

Сделанный вывод подтверждается коррекцией остальных исследуемых тестов метаболизма железа крови.

Концентрация железа в сыворотке крови повысилась у животных 2-й и 3-й групп на 19,9 и 25 % соответственно относительно контроля.

Коэффициент насыщения трансферрином (КНТ) – это расчетное значение (сывороточное железо / ОЖС × 100): сколько трансферрина связало железо [66]. Установлено, что у контрольных животных КНТ составил 48,3

%. После введения изучаемого соединения происходит снижение КНТ у животных 2-й группы на 6,9 % и у животных 3-й группы – на 13,6 % относительно животных 1-й группы (контроль).

Также установлено повышение ненасыщенной железосвязывающей способности сыворотки крови белых крыс на 21,6 % (2-я группа) и 27,5 % (3-я группа) относительно контроля ($54,53 \pm 0,99$ мкмоль/мл).

Уровень трансферрина в сыворотке крови белых крыс 1-й группы составил $2,33 \pm 0,44$ г/л, после введения изучаемого соединения концентрация трансферрина поднялась до $3,03 \pm 0,31$ г/л (+30,0 %) у животных 2-й группы и $4,00 \pm 0,52$ г/л (+71,1 %) у животных 3-й группы.

По результатам наших исследований можно предположить, что молекулы фуллерена прикрепляются к поверхности трансферрина и частично ингибируют связывание и биологические функции белка. Этот вывод согласуется с экспериментальными данными, касающимися взаимодействий трансферрина с высокогидрофобными соединениями, которые показывают, что такие комплексы приводят к непоправимому нарушению биологических функций трансферрина [52].

Таким образом, водный раствор фуллерена C_{60} вызывает изменение гематологических показателей организма лабораторных животных. Установлено, что происходит повышение количества эритроцитов на 17,2 % (2-я группа животных) и 34,4 % (3-я группа животных), относительно контроля (1-я группа животных). Однако не установлено достоверного изменения количества лейкоцитов. Также происходит стимуляция обмена железа, выражающаяся в повышении общей железосвязывающей способности сыворотки крови у животных 2-й группы на 28,18 %, 3-й группы – на 42,1 %, уровня концентрации трансферрина на 30,0 и 71,1 % соответственно относительно животных 1-й группы (контроль).

Далее мы изучили влияние соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида на гематологические показатели кошек. Для исследований были сформированы 3 группы кошек.

Животных подбирали в группы по принципу аналогов, по 6 в каждой. Первая группа служила контролем, второй вводили полученный гепатопротекторное и антиоксидантное соединение для животных на основе водного раствора фуллерена C₆₀, – 3 мл, 3 мг по действующему веществу, ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг подкожно. Кровь для исследований брали на 7 и 14 сутки после введения соединения.

Имеются сведения, что водорастворимый фуллерен C₆₀ может проникать в мембраны эритроцитов млекопитающих и изменять структуру мембран; мембраны могут становиться мягче и легче ломаться, что также является важным показателем безопасного применения фуллерена C₆₀ [215].

Результаты исследований по содержанию эритроцитов и лейкоцитов в крови кошек представлены на рисунке 27. Установлено, что после введения изучаемого соединения количество эритроцитов и лейкоцитов в сыворотке крови кошек достоверно не изменилось. На 7-е и 14-е сутки количество эритроцитов повысилось на 2,5 и 1,8 %, а лейкоцитов – на 7,1 и 2,4 % относительно контрольного значения.

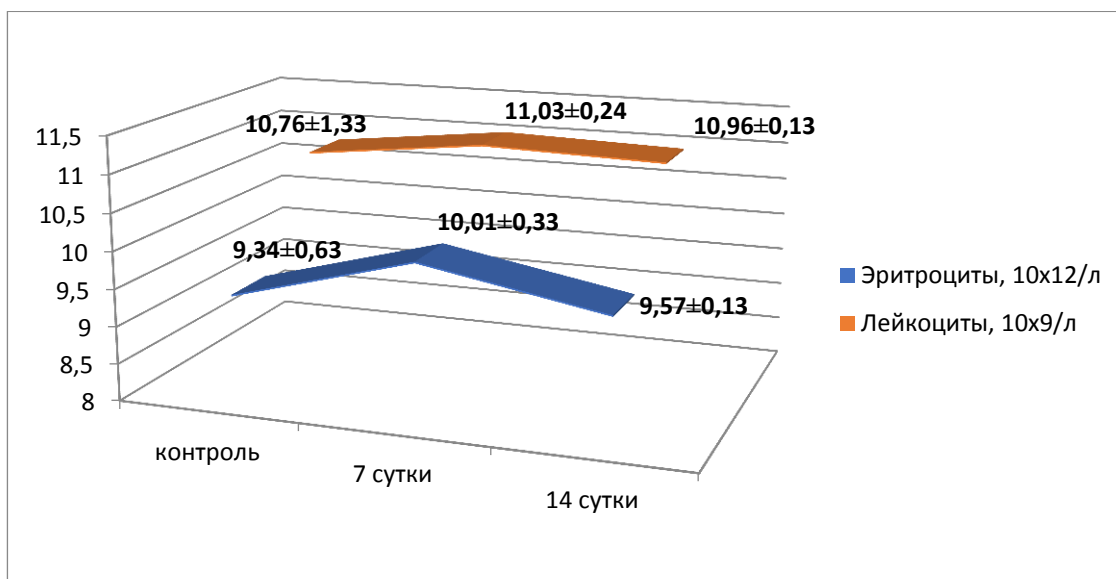


Рисунок 27 – Количество эритроцитов и лейкоцитов в крови кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида (M±m; n = 6)

Концентрация гемоглобина в крови также достоверно не изменилась (рисунок 28). На 7-е и 14-е сутки концентрация гемоглобина повысилась на 5,3 и 2,6 % относительно контроля.

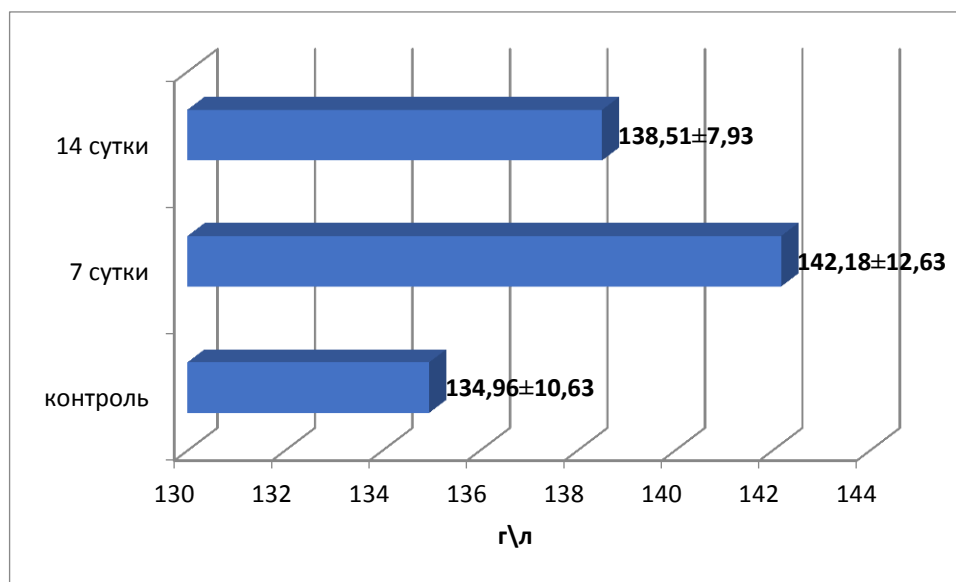
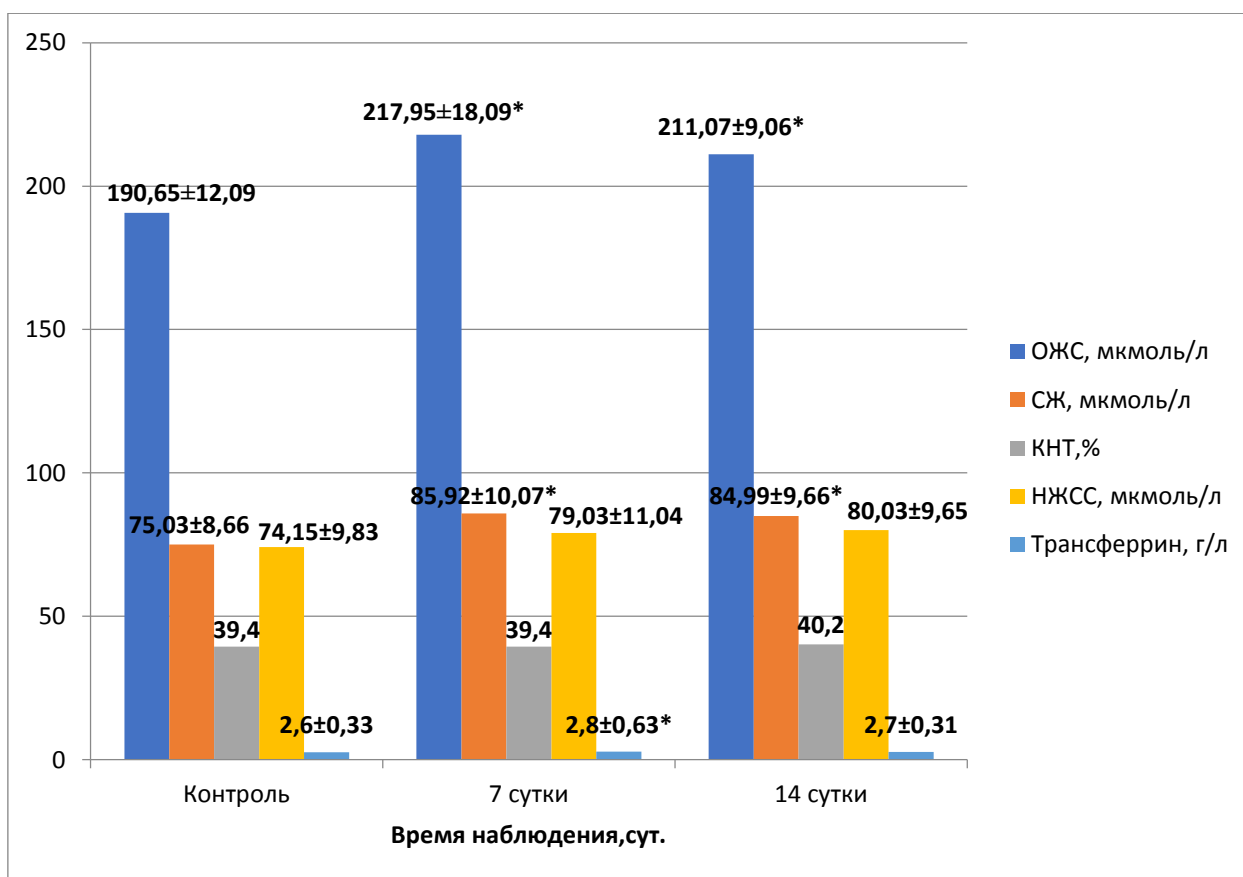


Рисунок 28 – Уровень гемоглобина, г/л, в крови кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Анализируя результаты, представленные на рисунке 29, можно отметить, что ОЖС на 7-е и 14-е сутки после введения изучаемого соединения повысилась на 14,3 и 10,7 % относительно контрольного значения.

Концентрация сывороточного железа также повысилась на 14,5 % (7-е сутки) и 13,2 % (14-е сутки) относительно контроля. Концентрация железа в сыворотке снижается, когда потребности в эритропоэзе превышают запасы железа в организме и поступление его пищей. В нашем исследовании мы обнаружили повышение концентрации железа в опытных группах кошек, что косвенно подтверждает благоприятное воздействие разработанного соединения на организм животных.



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 29 – Состояние обмена железа в сыворотке крови кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Коэффициент насыщения трансферрином находился на уровне 39,4–40,2 %. Он обычно снижается при железодефицитной анемии из-за недостаточных запасов железа и в норме снижается при анемии и воспалительных заболеваниях. Референтный диапазон коэффициента насыщения трансферрином для кошек в настоящее время не установлен, однако 25–45% считается нормальным для людей.

Достоверных различий в концентрациях ненасыщенной железосвязывающей способности и трансферрина не установлено, независимо от срока наблюдения.

3.6 Состояние про- и антиоксидантной системы защиты организма животных под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида

Фуллерены и их производные хорошо известны как новые классы антиоксидантов, и они высокоактивны к некоторым свободным радикалам, особенно к таким, как активные формы кислорода (АФК), супероксид, гидроксильный радикал, пероксильные радикалы и оксид азота. Эти вредные радикалы атакуют липиды, белки, ДНК и другие биологические ткани и органы [2, 50].

Таким образом, водорастворимые фуллерены, в том числе комплексы включения «хозяин – гость», являются перспективными соединениями для практического использования в качестве антиоксидантов. Однако такая возможность функционализированных фуллеренов к расщеплению свободных радикалов системно не была изучена, и разработка более эффективных и легкодоступных антиоксидантных производных фуллеренов является актуальной и своевременной задачей в ветеринарной медицине.

Для исследований были сформированы 4 группы белых крыс, массой тела 180–200 г, возрастом 3 месяца. Животных подбирали в группы по принципу аналогов, по 6 в каждой.

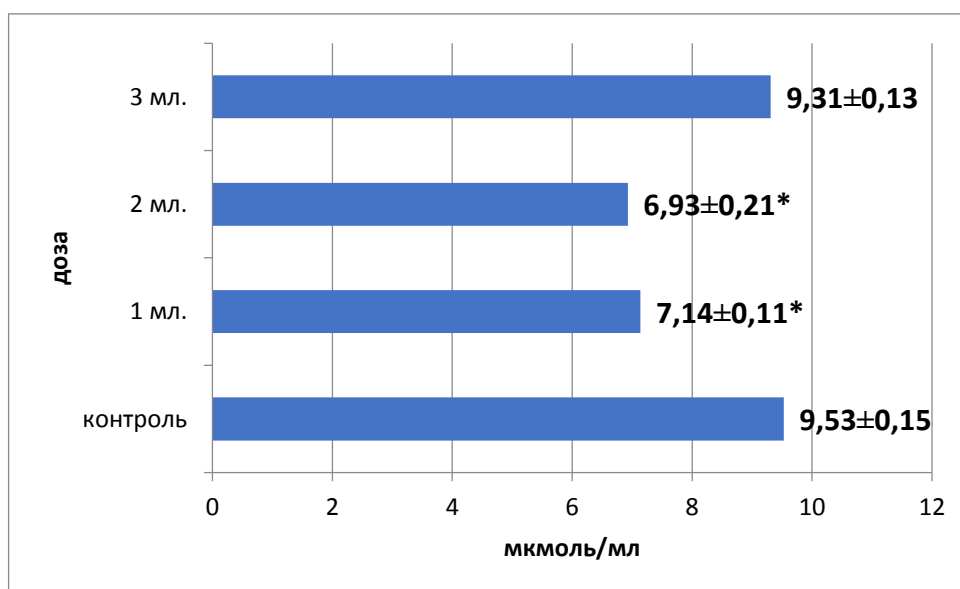
Соединение вводили в дозе 1, 2 и 3 мл (5, 10 и 15 мг/кг по действующему веществу соответственно) подкожно. Умерщвление белых крыс проводили на 7-е сутки после введения соединения с целью взятия крови и тканей органов для биохимических исследований. Эвтаназия достигалась путем одномоментной декапитации согласно рекомендациям по деонтологии медико-биологического эксперимента. Из собранной крови стандартным методом готовилась сыворотка.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) проводили тиобарбитуровым методом. Определение диеновых конъюгатов (ДК) в сыворотке крови определяли спектрометрическим методом.

Антиоксидантную обеспеченность организма оценивали по активности фермента каталазы в сыворотке крови и гомогенатах.

Первым этапом наших исследований было определения уровня диеновых конъюгатов в сыворотке крови белых крыс. Диеновые конъюгаты являются первичными продуктами перекисного окисления липидов.

Анализ полученных результатов показал, что после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} в дозах 1 и 2 мл концентрация ДК повысилась на 34,3 и 30,4 % соответственно относительно контроля, после введения в дозе 3 мл достоверной разницы с контролем не установлено (рисунок 30).



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 30 – Содержание диеновых конъюгатов, мкмоль/мл, в сыворотке крови белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Окисление липопротеинов включает в себя перекисное окисление их полиненасыщенных жирных кислот и дает большое количество продуктов перекисного окисления липидов, таких как сопряженные гидропероксиды диена. При расщеплении этих продуктов образуются альдегиды, такие как малоновый диальдегид, которые действуют как токсические мессенджеры в

процессах образования повреждений клеток [24, 55, 27]. Перекисное окисление начинается только тогда, когда израсходованы молекулы антиоксидантов, в частности витамин Е, присутствующие в липопротеиновой частице. Это время задержки представляет собой устойчивость липопротеинов к перекисному окислению липидов [55].

Анализируя результаты, представленные в таблице 8, было установлено, что после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида в дозах 1 и 2 мл концентрация МДА понизилась на 20,8 и 23,3 % соответственно относительно контроля. При введении изучаемого соединения в дозе 3 мл достоверных различий относительно контроля не установлено.

Таблица 8 – Содержание малонового диальдегида, нмоль/г, в сыворотке крови и тканях внутренних органов белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида (M±m; n = 6)

Кровь/ткани	Контроль	Доза, мл		
		1	2	3
Сыворотка крови	7,66±0,73	6,34±0,21*	6,21±0,28*	7,13±0,33
Головной мозг	16,58±0,33	12,87±0,59*	12,00±0,35*	14,42±0,32*
Легкие	15,02±0,49	12,03±0,17*	11,25±0,31*	12,40±0,77*
Почки	13,00±0,07	11,41±0,31*	12,52±0,72	13,04±0,40
Печень	15,47±0,24	12,63±0,37*	12,31±0,23*	14,54±0,76
Сердце	8,05±0,24	7,04±0,13*	6,54±0,20*	7,51±0,14
Скелетные мышцы	5,21±0,13	5,00±0,38	4,91±0,18	5,05±0,24
Толстый кишечник	7,21±0,43	6,53±0,32*	6,23±0,28*	6,33±0,18*
Тонкий кишечник	7,42±0,36	6,77±0,16*	6,59±0,16*	7,00±0,58
Желудок	7,91±0,52	7,45±0,24	6,87±0,16*	6,54±0,13*

* p<0,05 – достоверность различий относительно здоровых животных

В тканях головного мозга содержание МДА снизилось на 28,8; 38,2 и 15,0 % после введения изучаемого соединения в дозах 1, 2 и 3 мл соответственно относительно контроля.

В ткани легких максимальное снижение концентрации МДА установлено после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида в дозе 2 мл (-35,5 %); после введения в дозах 1 и 3 мл содержание малонового диальдегида снижалось на 24,8 %.

Достоверное снижение МДА в тканях почек установлено при введении изучаемого соединения в дозе 1 мл – на 13,9 %. В остальных случаях различий не установлено.

В печени произошло достоверное снижение МДА после введения водного раствора фуллерена C₆₀ лишь в дозах 1 и 2 мл – на 24,6 и 25,7 % соответственно относительно контроля.

Исходный уровень МДА в миокарде составил 8,05±0,24 нмоль/г, после введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 1, 2 и 3 мл произошло снижение концентрации МДА до 7,04±0,13 нмоль/г (-14,3 %), 6,54±0,20 нмоль/г (-23,1 %) и 7,51±0,14 нмоль/г (-7,1 %) соответственно относительно контрольных значений.

В скелетной мускулатуре достоверных различий в уровнях МДА не установлено.

В ткани толстого отдела кишечника концентрация МДА понизилась на 10,4 % (1 мл), 15,7 % (2 мл) и 13,9 % (3 мл) относительно контроля.

В ткани тонкого отдела кишечника также произошло снижение МДА после введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 1 и 2 мл на 9,6 и 12,6 % соответственно относительно контроля.

В ткани желудка достоверное снижение МДА установлено после введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 2 мл (-15,1 %) и 3 мл (-20,9 %) относительно контрольных значений.

Малоновый диальдегид представляет собой высокореактивный трехуглеродный диальдегид, образующийся как побочный продукт перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот и арахидоновой кислоты. Он также является биологическим маркером окислительного стресса в организме. МДА образуется из полиненасыщенных липидов после деградации активными формами кислорода. Малоновый диальдегид также образуется после реакции с дезоксиаденозином и дезоксигуанозином в ДНК. Это происходит в тканях животных, особенно в условиях дефицита антиоксидантов [16].

Недавние исследования [163] подтвердили наличие значительного количества МДА в некоторых тканях организма, где он, по-видимому, возникает главным образом в результате окисления арахидоновой кислоты в клеточных мембранах.

Среди побочных продуктов процессов перекисного окисления липидов МДА является одним из наиболее часто встречающихся биомаркеров, позволяющих установить общий уровень перекисного окисления липидов в организме [39].

Следующим этапом наших исследований было изучение активности каталазы в тканях и органах после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} в организме белых крыс. Результаты исследований представлены в таблице 9.

Установлено, что активность каталазы в сыворотке крови достоверно повысилась только после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} в дозе 2 мл (+14,1 %).

В ткани головного мозга активность каталазы после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} повысилась от 11,2 до 11,6 % относительно контрольного значения.

Таблица 9 – Активность каталазы, ммоль/л, в сыворотке крови и тканях внутренних органов белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида (M±m; n = 6)

Кровь/ткани	Контроль	Доза, мл		
		1	2	3
Сыворотка крови	19,72±0,33	20,54±0,32	22,50±0,71*	20,99±0,54
Головной мозг	11,69±0,21	12,03±0,14	13,00±0,38*	13,05±0,32*
Легкие	39,54 ±1,13	40,52 ±0,21	43,54 ±1,03*	41,99 ±1,15
Почки	63,54±2,41	65,94 ±1,54	68,04 ±2,00*	66,17 ±1,61
Печень	65,92 ±2,71	68,93 ±2,04	70,43 ±1,40*	67,93 ±2,01
Сердце	22,74 ±1,03	24,71 ±1,73*	25,41 ±1,16*	24,98 ±1,03*
Скелетные мышцы	27,98 ±1,05	27,93 ±0,39	28,05 ±1,00	28,24 ±0,32
Толстый кишечник	18,05 ±0,32	19,03 ±0,72	20,42 ±0,03*	20,73 ±0,51*
Тонкий кишечник	18,33 ±0,65	20,21 ±0,66*	21,04 ±0,73*	20,65 ±0,54*
Желудок	18,00 ±0,43	20,61 ±0,65*	20,89 ±0,54*	19,96 ±0,28*

* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

После введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозе 2 мл активность фермента в ткани легких повысилась на 10,1 %, почек и печени – на 7,0 % относительно контроля. После введения остальных изучаемых доз достоверных отличий в активности каталазы в этих тканях не установлено.

В ткани сердца после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 1, 2 и 3 мл активность каталазы повысилась на 8,6; 11,7 и 9,8 % соответственно относительно контроля.

В скелетной мускулатуре достоверных различий в активности каталазы не установлено.

В ткани толстого отдела кишечника активность каталазы повысилась на 13,3 % (2 мл) и 14,8 % (3 мл) относительно контроля.

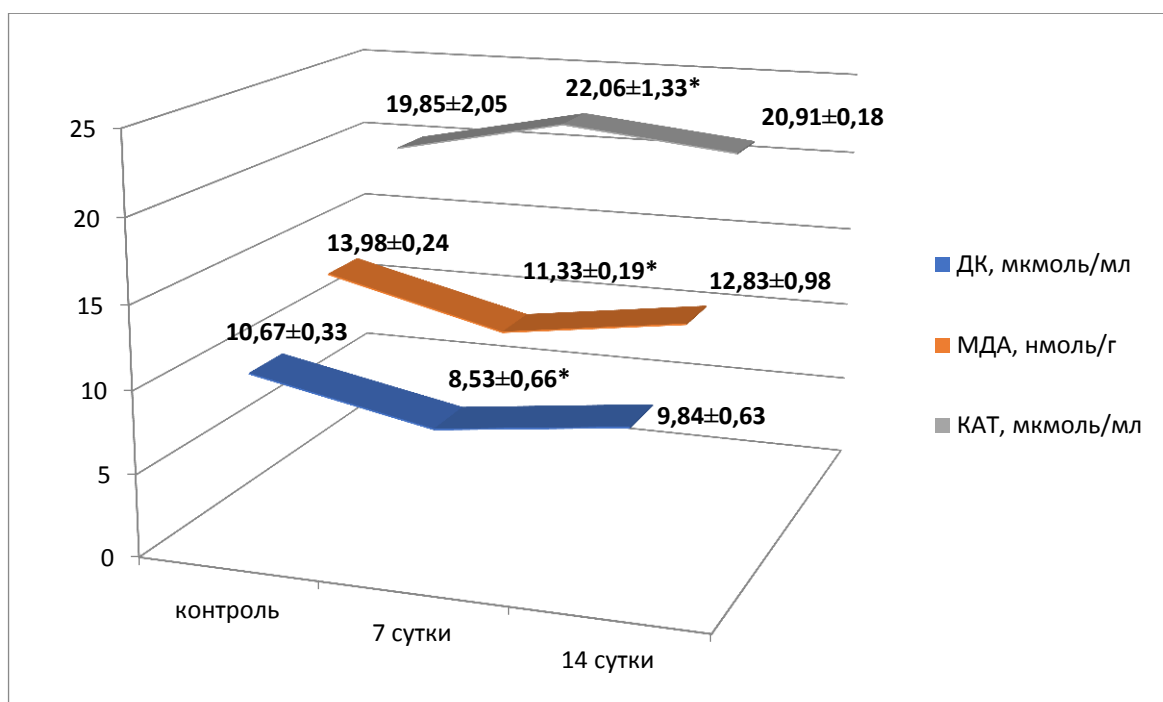
В ткани тонкого отдела кишечника после введения водного раствора фуллерена C_{60} активность каталазы повысилась от 10,2 до 14,7 %.

Исходная активность каталазы в ткани желудка составила $18,00 \pm 0,43$ ммоль/л, после введения изучаемого соединения в дозе 1 мл составила $20,61 \pm 0,65$ ммоль/мл (+14,5 %), в дозе 2 мл – $20,89 \pm 0,54$ ммоль/мл (16,1 %), в дозе 3 мл – $19,96 \pm 0,28$ ммоль/мл (+10,8 %) относительно контроля.

Существует множество ферментов, способных нейтрализовать перекись водорода. Эти ферменты включают в себя каталазу, глутатионпероксидазу и другие пероксидазы, такие как цитохром С-пероксидаза и НАДН-пероксидаза [75].

Каталаза является ключевым ферментом, использующим в качестве субстрата перекись водорода, нерадикальную АФК. Каталаза расщепляет две молекулы перекиси водорода на одну молекулу кислорода и две молекулы воды в двух стадийной реакции. Этот фермент отвечает за нейтрализацию путем разложения перекиси водорода, тем самым поддерживая оптимальный уровень молекулы в клетке, что также необходимо для клеточных сигнальных процессов [16, 35].

Далее мы провели исследования влияния соединения фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида на состояние перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы в организме кошек. Для исследований были сформированы 3 группы кошек. Животных подбирали в группы по принципу аналогов, по 6 в каждой. Первая группа служила контролем, второй вводили полученный гепатопротекторное и антиоксидантное соединение для животных на основе водного раствора фуллерена C_{60} , – 3 мл, 3 мг по действующему веществу, ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг подкожно. Кровь для исследований брали на 7 и 14 сутки после введения соединения. Результаты исследований представлены на рисунке 31.



* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных

Рисунок 31 – Состояние перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы в организме кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Установлено, что произошло достоверное изменение концентраций диеновых конъюгатов ($-25,1 \%$), малонового диальдегида ($-23,4 \%$) и активности каталазы ($+11,1 \%$) на 7-е сутки. Достоверных различий в изменении изучаемых показателей на 14-е сутки не установлено.

Таким образом, после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} происходит активизация антиоксидантной системы защиты организма.

Соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида вызывает ингибирование образования малонового диальдегида в органах и тканях организма. Наибольший эффект у белых крыс достигается после введения в дозе 2 мл (10 мг/кг массы тела). Антиоксидантная система защиты отвечает активацией каталазы в организме.

3.7 Анализ фармакологической эффективности соединения «Гепатопротекторный и антиоксидантный препарат для животных на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида»

Полученное соединение представляет собой прозрачный раствор темно-коричневого цвета, без запаха, обладающий выраженным гепатопротекторным, антиоксидантным, антигипоксическим эффектом, является ингибитором свободнорадикальных процессов, повышает стрессоустойчивость организма, низкотоксичен и удобен во введении и дозировании. В его составе водный раствор фуллерена C₆₀, стабилизированный плуронином F-127, – 1 мл (1 мг по ДВ), ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг.

Разработанное соединение на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида относится к IV классу опасности и к группе малотоксичных веществ. Исследования по оценке раздражающего действия на кожу животных гепатопротекторного и антиоксидантного соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида позволяют сделать вывод о том, что соединение для профилактики и лечения свободнорадикальной патологии у животных не вызывает выраженных изменений кожи опытных животных.

Полученное соединение обладает положительным влиянием на организм животных. После его введения мы наблюдали изменения показателей белко-азотистого обмена, которые выражались в повышении уровней общего белка, аммиака и мочевины в сыворотке крови белых крыс. Однако произошло снижение концентрации глутамина. Также установлено изменение содержания в сыворотке крови альбуминов на 8,6– 10,1 % и глобулинов на 6–6,5 %. Также соединение усиливает такие специфические функции печени, как белоксинтезирующую и мочевинообразовательную. Установлено, что введение соединения повышает уровень общего белка в

крови и снижает процессы трансамирования аминокислот. Повышение концентрации аммиака может свидетельствовать об усилении процессов дезаминирования аминокислот.

При этом у животных детоксикация аммиака осуществлялась благодаря некоторому усилению интенсивности образования мочевины в печени, но не системы глутаминовая кислота – глутамин. Подтверждением этому может служить повышение концентрации в крови некоторых метаболитов орнитинового цикла и снижение концентрации глутамина.

Полученное соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} вызывает изменение гематологических показателей организма животных, выражающееся в повышении количества эритроцитов и уровня гемоглобина. Кроме того, происходит стимуляция обмена железа, выражающаяся в повышении общей железосвязывающей способности сыворотки крови у животных, и уровня концентрации трансферрина.

Соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} вызывает ингибирование образования малонового диальдегида в органах и тканях организма. Наибольший эффект достигается после введения соединения в дозе 2 мл. Антиоксидантная система защиты отвечает активацией каталазы в организме.

Наиболее эффективная доза для кошек – 2 мл соединения на 1 кг массы тела.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Полученное соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида относится к 4-му классу опасности и группе малотоксичных веществ. Соединение не обладает кожно-резорбтивным и аллергизирующим действиями.

2. Разработанное соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида оказывает стимулирующее действие на белково-азотистый обмен в организме животных. Установлено повышение содержания общего белка и белковых фракций в сыворотке крови животных.

3. Нанокompозитный раствор фуллерена оказывает выраженное действие на мочевинообразовательную функцию печени, вызывая снижение процессов трансаминирования аминокислот. Повышение аммиака в сыворотке крови животных может свидетельствовать об усилении процессов дезаминирования аминокислот.

4. Соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида вызывает незначительные изменения в гематологических показателях у животных. Установлено повышение общей железосвязывающей способности и концентрации трансферрина.

5. Соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида вызывает ингибирование процессов перекисного окисления липидов в организме, выражающееся в снижении уровня диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в сыворотке крови и тканях внутренних органов животных. Установлено антиоксидантное действие полученного соединения, выраженное в повышении активности каталазы в сыворотке крови и тканях внутренних органов животных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. В ветеринарную практику предложено внедрить новые формы наносоединений на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида для проведения лечебно-профилактических мероприятий при нарушениях обменных процессов и состояния перекисного окисления липидов в организме животных.

2. Для ингибирования процессов перекисного окисления липидов в организме кошек рекомендуется вводить инъекционную форму соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида в дозе 2 мл композиции на 1 кг массы тела животного.

3. Результаты исследований внедрены в учебный процесс в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» и в ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева».

4. Результаты исследований внедрены в практику ветеринарных клиник «Ветеринарная диагностика» г. Пензы и «Велес» г. Протвино.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенные исследования не охватывают всей глубины проблемы создания новых эффективных ветеринарных соединений на основе перспективных носителей. Нуждаются в дальнейшем уточнении и изучении закономерности действия наносоединений на организм животных.

В этой связи дальнейшие перспективы разработки темы диссертационной работы будут связаны с проведением дополнительных углубленных исследований по фармакологическому, физиологическому, технологическому и экономическому обоснованию применения нанополлимеров для животных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АКБ – альвеолярно-капиллярный барьер
- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- АФК – активная форма кислорода
- ДК – диеновые конъюгаты
- КНТ – коэффициент насыщения трансферрина
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- ЛПО – лактопероксидаза
- МДА – малоновый диальдегид
- ММР – матриксные металлопротеиназы
- МПО – миелопероксидаза
- МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки-трубки
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- ОЖС – общая железосвязывающая способность
- ОЖСС – общая и латентная железосвязывающая способность
- ОН – гидроксифункциональная группа
- ОСНТ – одностенные углеродные нанотрубки
- СЖ – сывороточное железо
- ТБК – тиобарбитуровая кислота
- ЭМФ – эндохедралметаллофуллерены
- ЭПО – эозинофильная пероксидаза

Список литературы

1. Активность ферментов печени при введении в рацион свиней минеральной добавки / И. В. Зирук [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 4 (67). – С. 50–51.
2. Алексеев, А. А. Изменение белково-азотистого обмена у лабораторных животных под действием водного раствора фуллерена C_{60} / А. А. Алексеев, Н. А. Пудовкин, В. В. Салаутин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Т. 247. № 3. – С. 6–10. DOI 10.31588/2413-4201-1883-247-3-6-10. – EDN PNPYLY.
3. Анализ токсичности и антиоксидантных свойств комплексов фуллерена C_{60} с фолиевой кислотой / И. С. Рябоконт [и др.] // OpenScience 2021: сб. тез. VIII Всерос. молодежного научного форума. – Гатчина, 2022. – С. 174.
4. Антиоксидантные свойства аминокислотных производных фуллерена C_{60} / В. А. Волков [и др.] // Журнал физической химии. – 2019. – Т. 93. – № 11. – С. 1674–1680. – DOI 10.1134/S0044453719110347. – EDN RKFGUR.
5. Антиоксидантные свойства аминокислотных производных фуллерена C_{60} / В. А. Волков [и др.] // Журн. физ. химии. – 2019. – Т. 93. – № 11. – С. 1674–1680.
6. Ахмадеева, К. Э. Биохимический состав крови у собак с хронической сердечной недостаточностью в декомпенсированной стадии / К. Э. Ахмадеева, Р. Г. Каримова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2020. – Т. 244. – № 4. – С. 27–30.
7. Балакирев, Н. А. Изучение кожно-резорбтивного действия фармакологически активного соединения на основе железо-гидроксид полимальтозного комплекса / Н. А. Балакирев, А. А. Дельцов, В. И. Максимов // Кролиководство и звероводство. – 2021. – № 6. – С. 36–40. – DOI 10.52178/00234885_2021_6_36. – EDN RFAMTJ.

8. Баркова, Д. А. Особенности активности ферментов белкового обмена и уровня билирубина при хроническом гепатите / Д. А. Баркова // Современные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса: Сборник статей по итогам международной научно-практической конференции, Саратов, 16–22 июля 2019 года. – Саратов: Общество с ограниченной ответственностью "Амирит", 2019. – С. 213-216. – EDN DKYOVl.
9. Биодegradация молекул фуллерена C₆₀ под действием миелопероксидазы / Е. В. Литасова [и др.] // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 471. – № 3. – С. 362–365. DOI 10.7868/S0869565216330276. – EDN WYLWXH.
10. Биологическая активность нанобиокomпозитов фуллерена C₆₀ / Венгерович Н Г, Тюнин М А, Антоненкова Е В [и др.] // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2011. – Т. 12. – С. 161-177. – EDN PCAPDJ.
11. Биологическая активность фуллеренов - реалии и перспективы / М. А. Думпис, Д. Н. Николаев, Е. В. Литасова [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018. – Т. 16, № 1. – С. 4-20. – DOI 10.17816/RCF1614-20. – EDN XMRPLN.
12. Биологические свойства фуллерена C₆₀ и его производных / Е. А. Турецкий [и др.] // Естественные и технические науки. – 2019. – № 9(135). – С. 109–117. EDN KCKIKE.
13. Бузмакова, М. М. Экспериментальное исследование реокинетики эпоксидного связующего, модифицированного фуллеренами C₆₀ / М. М. Бузмакова, В. Г. Гилев, С. В. Русаков // Вестник Пермского университета. Физика. – 2019. – № 2. – С. 35–40. DOI 10.17072/1994-3598-2019-2-35-40. – EDN JMTDXL.
14. Бутенко, А. В. Изучение острой токсичности препарата на основе толтразурила, тинидазола и левамизола / А. В. Бутенко, В. А. Оробец, И. В. Киреев // Международный вестник ветеринарии. – 2022. – № 3. – С. 68–76. – DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.3.68. EDN NXELUE.

15. Взаимосвязь антиоксидантных свойств и размеров наночастиц аминокислотных производных фуллерена C_{60} с ростостимулирующей активностью / М. В. Воронков [и др.] // Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты: лекции и тезисы. Москва, 28–30 октября 2019. – М.: Российский университет дружбы народов (РУДН), 2019. – С. 238–240. – EDN EMIYYX.
16. Взаимосвязь распределения концентрации малонового диальдегида в сыворотке крови и тканях экспериментальных животных / О. Н. Павлова [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2019. – Т. 238. – № 2. – С. 150–154.
17. Вилковыский, И. Ф. Современный подход к лечению опухолей печени у собак и кошек / И. Ф. Вилковыский // Ветеринарная медицина. – 2009. – № 4. – С. 23-25. – EDN NCPRIJ.
18. Влияние водорастворимых комплексов фуллерена с гексометонием на модельные липидные мембраны / Д. А. Халенева [и др.] // Гены и клетки. – 2020. – Т. 15. – № S3. – С. 67–68. – EDN WMMCUL.
19. Влияние коллоидного водного раствора фуллерена C_{60} , как экологически безопасного регулятора роста, на прорастание семян и урожайность пшеницы / О. В. Ямскова, В. В. Кондратьева, Т. В. Воронкова [и др.] // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2019. – № 3(56). – С. 39-45. – EDN KFMDFR.
20. Влияние микроэлементов на морфологические показатели крови подсвинков / Г. П. Демкин, В. В. Салаутин, И. Ю. Домницкий [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2018. – № 1(136). – С. 59-64. – EDN YOSOYK.
21. Влияние производных фуллеренов C_{70} на транскрипционную активность генов оксидативного метаболизма / Е. А. Савинова [и др.] // Медицинская генетика. – 2023. – Т. 22. № 2. – С. 30–39. DOI: 10.25557/2073-7998.2023.02.30-39. – EDN XDFLMR.

22. Влияние различных водорастворимых форм фуллерена C_{60} на метаболическую активность и ультраструктуру клеток в культуре / Е. М. Еропкина [и др.] // Биофизика. – 2012. Т. 57. – № 3. С. 468–475. – EDNPAUGXZ.
23. Влияние фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ на показатели системы гемостаза invitro / Т. Ф. Субботина [и др.] // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2012. – Т. 19. – № 2. – С. 19–22. EDNSOBZMJ.
24. Воронцова, О. А. Динамика накопления диеновых конъюгатов в сыворотке крови кошек с заболеваниями нижних мочевыводящих путей / О. А. Воронцова, А. А. Алексеев // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии: материалы Национальной науч.-практ. конф. с международным участием, посвящ. 90-летию факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет». Оренбург, 2020. – С. 48–50.
25. Гепатопротекторное действие Оксиметилурацила при экспериментальном токсическом гепатите / Т. М. Прохорова, Э. В. Попова, О. А. Гуркина [и др.] // Аграрная наука. – 2021. – № 4. – С. 17-20. – DOI 10.32634/0869-8155-2021-348-4-17-20. – EDN YYUYEX.
26. Гибридные наноструктуры на основе фуллеренов для применения в медицине / А. И. Котельников [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2008. – № 17-2. – С. 340–343. EDN ITVZRT.
27. Дежаткина, С. В. Характеристика липидно-углеводного обмена на фоне введения каротиноидов в рацион свиней: монография / С. В. Дежаткина, А. С. Проворов, Н. А. Проворова. Ульяновск: УлГАУ, 2020. - 144 с.
28. Дельцов, А. А. Оценка параметров хронической токсичности комплексного препарата "Абиовит" / А. А. Дельцов, О. Р. Родькина, К. О. Белова // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2022. – № 6. – С. 38-45. – DOI 10.36871/vet.zoo.bio.202206005. – EDN RSVFYV.

29. Джаманбалин, К. К. Новые интеллектуальные материалы – фуллерены и углеродные нанотрубки / К. К. Джаманбалин // Известия высших учебных заведений. Уральский регион. – 2023. – № 1. – С. 72–76. EDN VILOQU.
30. Жерлицын, С. Н. Обзор встречаемости и классификация основных заболеваний печени у животных / С. Н. Жерлицын // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 2(44). – С 40–42.
31. Захаров, Е. Е. Оценка генотоксичности водорастворимого производного фуллерена C_{60} -(L-Аргинина) $_8$ методом ДНК-комет / Е. Е. Захаров, И. Н. Гапоненко // Актуальные проблемы биомедицины - 2020: сб. тез. XXVI Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием, Санкт-Петербург, 26–27 марта 2020. – СПб.: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, 2020. – С. 307–308. EDN SNKAHG.
32. Изменения количественных и функциональных характеристик бактериопланктона под влиянием водных дисперсий немодифицированного фуллерена C_{60} / И. В. Мошарова [и др.] // Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 487. – № 2. – С. 217–220. DOI: 10.31857/S0869-56524872217-220. – EDN SGLLOH.
33. Изучение эмбриотоксического эффекта антиоксидантного противовоспалительного препарата для животных / В.А. Оробец [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2019. – № 6(176). – С. 93–98. EDN QAMTJS.
34. Ильин, В. В. Исследование стабильности пленок фуллерена C_{60} / В. В. Ильин, Л. Б. Пиотровский // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15. № 2. – С. 42–45. DOI 10.17816/RCF15242-45. – EDN ZCJISH.
35. Исследование динамики активности каталазы в сердце и мышечной ткани крыс при механическом воздействии на гематофтальмический барьер / О.

- Н. Павлова [и др.] // Генетика и разведение животных. – 2020. – № 3. – С. 106–113.
36. Исследование острой токсичности нового антисептического средства на основе наночастиц оксида меди / А. А. Дельцов [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2022. – № 2. – С. 74-80. – DOI 10.36871/vet.zoo.bio.202202010. – EDN UJBVNB.
37. Исследование ранозаживляющего действия антисептиков на основе гидрозолей наночастиц металлов / А. А. Дельцов [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2022. – № 8. – С. 30-39. – DOI 10.36871/vet.zoo.bio.202208004. – EDN XIKCLD.
38. Исследование совместного действия антибиотика новатрона с фуллереном C_{60} и кофеином на клетки буккального эпителия человека / В. А. Сало [и др.] // Экобиологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление биологическими ресурсами: материалы 4-й науч.-практ. молодежной конф., Севастополь, 02–04 октября 2017. – Севастополь: Колорит, 2017. – С. 223–227. EDN ZSFUUV.
39. Каримова, Р. Г. Активность нитроксидергической системы у кошек и собак при хронической почечной недостаточности / Р. Г. Каримова, А. А. Белова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2020. – Т. 241. – № 1. С. 99–103.
40. Кинзябаева, З. С. Люминесцентные свойства азотсодержащих бисаддуктов фуллерена C_{60} / З. С. Кинзябаева, Г. Л. Шарипов // Вестник Башкирского университета. – 2019. – Т. 24. – № 3. – С. 593–599. DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2019.3.9. – EDN OZLMUO.
41. Кинзябаева, З. С. Реакция [2+4]-циклоприсоединения 2-меркаптоэтанола к фуллерену C_{60} в присутствии NaN под действием ультразвука / З. С. Кинзябаева, А. М. Дмитриев // Вестник Башкирского университета. – 2020. – Т. 25. – № 3. – С. 506–511. DOI 10.33184/bulletin-bsu-2020.3.7. – EDN QHDDQB.

42. Кинзябаева, З. С. Синтез гибридных молекул фуллерена C_{60} с катехоламинами под действием ультразвука / З. С. Кинзябаева, Д. Ш. Сабиров // Журнал органической химии. – 2023. – Т. 59 – № 2. – С. 237–242. – DOI: 10.31857/S051474922302009X. – EDN QJTCBN.
43. Киреев, И. В. Изучение кумулятивных свойств антиоксидантного противовоспалительного препарата для животных / И. В. Киреев, В. А. Оробец, Д. П. Моторная // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 7. – С. 106–110. EDN HGIRCI.
44. Кузнецов, В. В. Действие силового поля фуллеренов на линейные молекулы: структура бутатриена в фуллерене C_{80} / В. В. Кузнецов // Научный вестник. – 2017. – № 1(11). – С. 180–185. DOI: 10.17117/nv.2017.01.180. – EDN YNCHKD.
45. Литасова, Е. В. Фуллеренкарбоновые кислоты и перспективы их использования в химии лекарственных веществ / Е. В. Литасова, Л. Б. Пиотровский // Медицинский академический журнал. – 2018. – Т. 18, № 2. – С. 19-28. – DOI 10.17816/MAJ18219-28. – EDN VAIANH.
46. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
47. Механизм антиоксидантного действия и взаимосвязь строения и активности N-монозамещенных аминокислотных производных фуллерена C_{60} / В. А. Волков [и др.] // Кинетика и катализ. – 2021. – Т. 62. № 3. – С. 343–353. DOI 10.31857/S0453881121030096. – EDN QXYEND.
48. Механизм ингибирующего действия n-монозамещенных аминокислотных производных фуллерена C_{60} / М. В. Воронков [и др.] // Биоантиоксидант: материалы X Междунар. конф., посвящ. 105-летию со дня рождения академика Н.М. Эмануэля, Москва, 29 сентября, 2020. – М.: Российский университет дружбы народов (РУДН), 2020. – С. 25–26. EDN DEKNZV.
49. Модификация изолейцина (Ile) молекулой фуллереном C_{60} , и его исследование / С. З. Зафаров [и др.] // Вестник Педагогического

- университета // Естественные науки. – 2021. – № 2(10). – С. 200–206. EDNUKVGMN.
50. Мокшин, Д. А. Особенности свободнорадикальных процессов в организме белых крыс при введении фосфорсодержащего вещества / Д. А. Мокшин, Н. А. Пудовкин // Естественные науки. – 2018. – №1(62). – С. 44–48.
51. Неравновесный рост алмаза при высокотемпературном синтезе композита из смеси порошков кобальта и фуллерена под высоким давлением / Н. А. Бульенков [и др.] // Металлы. – 2018. – № 1. – С. 41–47. EDN TDINPG.
52. Новые стимуляторы роста растений на основе водорастворимых наночастиц n-замещенных моноаминокислотных производных фуллерена C₆₀ и изучение механизма их действия / В. А. Волков [и др.] // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – № 4. – С. 745–752. DOI 10.31857/S000630292004016X. – EDN ETRBGB.
53. О возможности изучения морфологии эритроцитов методами атомно-силовой микроскопии / А. А. Нагдалян [и др.] // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 209.
54. О создании стандартных образцов состава водных дисперсий фуллеренов / И. В. Михеев [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2018. – Т. 73. – № 9. – С. 651–662. DOI: 10.1134/S0044450218090062. – EDN UWYYWH.
55. Особенности процессов перекисного окисления липидов в организме кошек с заболеваниями мочевыводящих путей / О. А. Воронцова [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2021. – № 4. – С. 37–40.
56. Перспективы применения фуллеренов и их производных как антиоксидантов / М. О. Аверьянова [и др.] // Молодежь, наука, медицина: тез. 65-й Всерос. межвуз. студ. науч. конф. с междунар. участием, Тверь, 17–18 апреля 2019. – Тверь, 2019. – С. 8. EDN NTWRXE.

57. Перспективы применения фуллеренов и их производных как антиоксидантов / М. О. Аверьянова [и др.] // Modern Science. – 2019. – № 6-3. – С. 11–14. EDN GLTEGQ.
58. Пиотровский, Л. Б. Зачем нам сегодня нужны фуллерены? / Л. Б. Пиотровский, Е. В. Литасова, М. А. Думпис // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 5–15. DOI 10.17816/RCF1725-15. – EDN XBGVOD.
59. Пиотровский, Л. Б. Фуллерены в биологии / Л. Б. Пиотровский, О. И. Киселев. – СПб.: Росток, 2006. – 336 с.
60. Пиотровский, Л. Б. Фуллерены в дизайне лекарственных веществ / Л. Б. Пиотровский // Российские нанотехнологии. – 2007. – Т. 2, № 7-8. – С. 6-18. – EDN IADHGF.
61. Половников, М. А. Движение атомов и молекул внутри фуллерена C_{60} / М. А. Половников, А. И. Чичинин // Краткие сообщения по физике ФИАН. – 2023. – Т. 50. – № 1. – С. 14–21. EDN RNCAFQ.
62. Почкаева, Е. И. Аддукт фуллерена C_{60} с L-аргинином: исследование физико-химических свойств и биологической активности / Е. И. Почкаева, А. А. Мещеряков, С. В. Агеев // Актуальные проблемы биомедицины - 2021: материалы XXVII Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием, Санкт-Петербург, 25–26 марта 2021. – СПб.: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, 2021. – С. 315–316. – EDN GXKKIZ.
63. Продукты взаимодействия аминокислот с фуллереном C_{60} / М. А. Думпис [и др.] // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2014. – № 24(50). – С. 32–34. EDN SHNZDN.
64. Производные фуллерена как нанодобавки для полимерных композитов / А. В. Пенькова [и др.] // Успехи химии. – 2017. – Т. 86. – № 6. – С. 530–566.

65. Прохорова, Т. М. Изменение поведения и показателей билирубина у лабораторных крыс при хроническом токсическом гепатите / Т. М. Прохорова, А. А. Алексеев // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии имени В.Р. Филиппова. – 2020. – № 1(58). – С. 121–126.
66. Пудовкин, Н. А. Обмен железа в организме поросят и пути его коррекции / Н. А. Пудовкин, Т. В. Гарипов, П. В. Смутнев // Аграрный научный журнал. – 2015. – № 6. – С. 32–34.
67. Пудовкин, Н. А. Влияние препарата Ферран на обмен железа в организме кроликов / Н. А. Пудовкин // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины». – 2011. – Т. 47. – Вып. 2. Ч. 1. – С. 195–196.
68. Пудовкин, Н. А. Характеристика свободнорадикального окисления липидов и его связь с обменом железа при терапии хронического гепатита / Н. А. Пудовкин, Д. А. Баркова // Ульяновский медико-биологический журнал. 2019. – № 1. – С. 46–52.
69. Пудовкин, Н. А. Влияние различных стресс-факторов на свободнорадикальное окисление липидов и поведение белых крыс / Н. А. Пудовкин, В. В. Салаутин, Т. М. Прохорова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2017. – № 3(35). – С. 3–7.
70. Раков, Э. Г. Нанотрубки и фуллерены: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности 210602 "Наноматериалы" / Э. Г. Раков; Э. Г. Раков. – Москва: Физматкнига (ФМ), 2006. – 374 с. – (Новая университетская библиотека). – ISBN 5-98699-009-9. – EDN QKВМОВ.
71. Рехвиашвили, С. Ш. Моделирование взаимодействия фуллерена C_{60} с эпитаксиальным графеном / С. Ш. Рехвиашвили, М. М. Бухурова // Журнал физической химии. – 2018. – Т. 92. – № 10. – С. 1562–1566. DOI: 10.1134/S0044453718100266. – EDN YMFVUD

72. Самоассоциация фуллерена и его комплексообразование с химиотерапевтическими препаратами – перспективное противоопухолевое средство / А. А. Мосунов [и др.] // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2019. – Т. 4. – № 4. – С. 480–489. EDN YRRDTJ.
73. Саркисян, З. М. Биологически активные соединения фуллеренов / З. М. Саркисян // Журнал общей химии. – 2020. – Т. 90. – № 10. – С. 1522–1532. DOI 10.31857/S0044460X20100078. – EDNLTEXEL.
74. Саркисян, З. М. Обзор биологической активности фуллеренов и их производных / З. М. Саркисян // Медицина: теория и практика. – 2019. – Т. 4. – № 3. – С. 220. EDN VGMBСА.
75. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма / М. А. Луцкий [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 12-1. – С. 24–28.
76. Синтез новых липофильных производных фуллерена C_{60} / И. М. Сахаутдинов [и др.] // Вестник Башкирского университета. – 2021. – Т. 26. – № 3. – С. 650–654. DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2021.3.20. – EDN CMZIKH.
77. Скворцевич, Е. Г. Биологические эффекты наноструктур углерода / Е. Г. Скворцевич, Р. В. Романов, О. В. Стурлис // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2009. – № 1. – С. 114–120. EDN KVМFZV.
78. Смагулова, А. К. Теоретическое исследование электронного спектра поглощения кластеров фуллеренов от C_{20} до C_{100} с применением полуэмпирических методов / А. К. Смагулова, Т. Т. Машан // Вестник Евразийского национального университета имени Л.Н. Гумилева. Серия: Химия. География. Экология. – 2019. – № 1(126). – С. 55–59. DOI: 10.32523/2616-6771-2019-126-1-55-59. – EDN FVBLYD.

79. Смутнев, П. В. Влияние химио- и пробиотических препаратов на белковоазотистый обмен и глюконеогенную функцию печени кроликов, больных эймериозом: дис. ... канд. вет. наук: 03.00.19 / Смутнев П. В. – Саратов, 2009. – 140 с.
80. Стальная, И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–67.
81. Стальная, И. Д. Методы определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 67–68.
82. Твердотельный ЯМР аминокислотных производных фуллерена C₆₀ / О. В. Ямскова [и др.] // Журнал физической химии. – 2019. – Т. 93. – № 2. – С. 266–268. DOI: 10.1134/S004445371902033X. – EDN RFVJNL.
83. Терещенко, В. И. Исследование структуры и физико-химических свойств производных фуллерена / В. И. Терещенко, Н. В. Семакина // Химия - XXI век: сб. тез., Ижевск, 29–30 ноября 2022. – Ижевск: Издательский дом «Удмуртский университет», 2022. – С. 190–191. EDN LDLIKT.
84. Токсикология наноструктур углерода. Ч. I. Сферические наночастицы (фуллерены и наноионы) / Е. В. Литасова [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2022. – Т. 20. – № 1. – С. 5–15. DOI 10.17816/RCF2015-15. – EDN KOKLHW.
85. Трошин, П. А. Органическая химия фуллеренов: основные реакции, типы соединений фуллеренов и перспективы их практического использования / П. А. Трошин, Р. Н. Любовская // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – № 4. – С. 323–369.
86. Тухватуллина, Л. А. Влияние препаратов «Имунофан» и «Фоспренил» на морфологический состав крови телят / Л. А. Тухватуллина, Р. Г. Каримова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Т. 247. – № 3. – С. 262–266.

87. Умарализода, М. У. Влияние фуллерена-60 на изменение теплоемкости оксидола на линии насыщения / М. У. Умарализода // Вестник Бохтарского государственного университета имени Носира Хусрава. Серия естественных наук. – 2022. – № 2-2(99). – С. 58–61. EDNGGPJTA.
88. Фуллерен C_{60} как компонент ранозаживляющих композиций / Е. В. Литасова [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т. 13. № S3. – С. 99–100. EDN YHHNYP.
89. Фуллерен C_{60} как перспективное терапевтическое средство для коррекции и профилактики усталости скелетных мышц / И.И. Прилуцкий, И.В. Верещака, А.В. Мазниченко [и др.] // J Нанобиотехнология. – 2017. №15 (1). – С.8. doi: 10.1186/s12951-016-0246-1. PMID: 28086894; PMCID: PMC5237293.
90. Фуллереновые комплексы в медицине / А. С. Надыкто [и др.] // Экологические проблемы региона и пути их разрешения: материалы XVI Междунар. науч.-практ. конф., Омск, 12–13 мая 2022. – Омск: Омский государственный технический университет, 2022. – С. 314–318. EDN CMINUK.
91. Фуллерены – основа материалов будущего / В.И. Трефилов, Д.В. Щур, Б.П. Тарасов [и др.] // – Киев: «АДЕФ Украина», 2001. – 148 с.
92. Фуллерены: учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности "Химия" и специализирующихся в обл. неорган., орган. и физ. химии / Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова; [Сидоров Л. Н. и др.]. – Москва: Экзамен, 2005. – 687 с. – ISBN 5-472-00294-X. – EDN QKBCFF.
93. Фуллерены: *in vivo* исследования биораспределения, токсичности и биологического действия / О. Д. Гендриксон [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2014. – Т. 9. – № 11–12. – С. 5–17.
94. Фуллерены: физико-химические и биологические свойства аминокислотных, пептидных и других водорастворимых производных / Д. В. Курилов, И. В. Заварзин, И. А. Ямсков [и др.]. // Москва: ООО "МАКС

- Пресс", 2020. – 176 с. – ISBN 978-5-317-06391-7. – DOI 10.29003/m898.978-5-317-06391-7. – EDN PPCBUZ.
95. Характеризация производных фуллерена по фрагментным масс-спектрам МАЛДИ / Б. Л. Мильман [и др.] // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 17. – № 2. – С. 177–183. EDN GKWUBF.
96. Характеристика мочевинообразовательной функции печени кошек, больных хламидиозом / А. Ю. Струговщиков [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2020. – № 12. – С. 72–74.
97. Чарыков, Н. А. Физико-химические свойства аддуктов легких фуллеренов и аминокислот / Н. А. Чарыков, В. А. Кескинов, А. В. Петров // Журнал физической химии. – 2021. – Т. 95. – № 11. – С. 1623–1640. DOI: 10.31857/S0044453721110066. – EDN TWRBZD.
98. Шевченко, Т. В. Углеродсодержащие материалы - фуллерены: свойства, применение / Т. В. Шевченко, Ю. В. Устинова; Кемеровский государственный университет. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2021. – 91 с. – ISBN 978-5-8353-2851-2. – EDN PKYNYF.
99. Ямалова, Н. Р. Биологические свойства водорастворимого полигидроксилированного фуллерена $C_{60}(OH)_{22-24}$ / Н. Р. Ямалова, С. В. Агеев // Актуальные проблемы биомедицины - 2021: материалы XXVII Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием, Санкт-Петербург, 25–26 марта 2021. – СПб.: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, 2021. – С. 324–325. EDN FSMRAG.
100. [60]fullerene nanoconjugate with gemcitabine: Synthesis, biophysical properties and biological evaluation for treating pancreatic cancer / P. Nalepa [et al.] // Cancer Nanotechnol. – 2020. – Vol.11. - P. 2. DOI: 10.1186/s12645-020-00058-4.

101. [Gd@C-82(OH)(22)](n) Nanoparticles Induce Dendritic Cell Maturation and Activate Th1 Immune Responses / D. Yang [et al.] // ACS Nano. – 2010. - №4. – P.1178–1186. DOI: 10.1021/nn901478z.
102. A bis-malonic acid fullerene derivative significantly suppressed IL-33-induced IL-6 expression by inhibiting NF-kappaB activation / M. Funakoshi-Tago [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2016. Vol. 40. – P. 254–264. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.031.
103. A fullerene based hybrid nanoparticle facilitates enhanced photodynamic therapy via changing light source and oxygen consumption / Y. Yan [et al.] // Colloids Surf. B-Biointerfaces. – 2020. - Vol.186. – P.110700. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110700.
104. A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: Synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture / T. Y. Zakharian [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2005. - Vol.127. – P. 12508–12509. DOI: 10.1021/ja0546525.
105. A water-soluble beta-cyclodextrin derivative possessing a fullerene tether as an efficient photodriven DNA-cleavage reagent / Y. Liu [et al.] // Tetrahedron Lett. 2005. - Vol.46. – P.2507–2511. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.01.181.
106. Acridine adduct of [60] fullerene with enhanced DNA-cleaving activity / Y. N. Yamakoshi [et al.] // J. Org. Chem. 1996. Vol.61. – P. 7236–7237. DOI: 10.1021/jo961210q.
107. Alekseev, A. A. The effect of an aqueous solution of fullerene C₆₀ on protein-nitrogen metabolism in laboratory animals / A. A. Alekseev, N. A. Pudovkin, V. V. Salautin // Наука и образование в XXI веке: современные векторы развития и перспективы: Сборник статей II Всероссийской (Национальной) научно-практической конференции, Саратов, 20 января 2022 года. – Саратов: ООО "Центр социальных агроинноваций СГАУ", 2022. – P. 127-131. – DOI 10.54697/9785604711_127. – EDN VLNSQM.
108. Anti-inflammatory effect of fullerene C₆₀ in a mice model of atopic dermatitis / N. Shershakova [et al.] // J. Nanobiotechnol. 2016. - №14. – P. 8. DOI: 10.1186/s12951-016-0159-z.

109. Antioxidative function and biodistribution of $[\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ nanoparticles in tumor-bearing mice / J. Wang [et al.] // *Biochem. Pharm.* – 2006. - Vol.71. – P. 872–881. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.12.001.
110. Applications of Functionalized Fullerenes in Tumor Theranostics / Z. Y. Chen [et al.] // *Theranostics*. - 2012. - №2. – P. 238–250. DOI: 10.7150/thno.3509.
111. Arginase I and II: do their functions overlap / S. D. Cederbaum [et al.] // *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004. - Vol.81. – P. 38–44.
112. Buckysomes: Fullerene-based nanocarriers for hydrophobic molecule delivery / R. Partha [et al.] // *ACS Nano*. – 2008. - №2. – P. 1950–1958. DOI: 10.1021/nn800422k.
113. C_{60} Fullerene as an Effective Nanoplatfrom of Alkaloid Berberine Delivery into Leukemic Cells / A. Grebinyk [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2019.- №11. – P. 586. DOI: 10.3390/pharmaceutics11110586.
114. C_{60} : Buck-minsterfullerene / H.W. Kroto [et al.] // *Nature*. – 1985. – V. 318, No 6042. – P. 162–163
115. Castano, A. P. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity / A. P. Castano, P. Mroz, M. R. Hamblin // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. - №6. – P. 535–545. DOI: 10.1038/nrc1894.
116. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers / G. P. Tegos [et al.] // *Chem. Biol.* 2005. - №12. – P. 1127–1135 DOI: 10.1016/j.chembiol.2005.08.014.
117. Chiang, L. Y. Efficient Synthesis of Polyhydroxylated Fullerene Derivatives Via Hydrolysis of Polycyclosulfated Precursors / L. Y. Chiang [et al.] // *J. Org. Chem.* 1994. - Vol.59. – P. 3960–3968. DOI: 10.1021/jo00093a030.
118. Complexation with C_{60} Fullerene Increases Doxorubicin Efficiency against Leukemic Cells in vitro / A. Grebinyk [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2019. - Vol.14. –P. 61. DOI: 10.1186/s11671-019-2894-1.

119. Conjugation of a water-soluble gadolinium endohedral fulleride with an antibody as a magnetic resonance imaging contrast agent / C. Y. Shu [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – 2008. - Vol.19. – P. 651–655. DOI: 10.1021/bc7002742.
120. Coussens, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations / L. M. Coussens, B. Fingleton, L.M. Matrisian // *Science*. 2002. - Vol.295. – P.2387–2392. DOI: 10.1126/science.1067100.
121. Couzin-Frankel, J. Breakthrough of the year 2013 / J. Couzin-Frankel // *Cancer immunotherapy. Science.* – 2013. - Vol.342. – P. 1432–1433. DOI: 10.1126/science.342.6165.1432.
122. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction / Y. Nakagawa [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2011.- Vol.85. – P. 1429–1440. DOI: 10.1007/s00204-011-0688-z.
123. Dawid, A. The influence of distribution of hydroxyl groups on vibrational spectra of fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ isomers: DFT study / A. Dawid, K. Górny, Z. Gburski // *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectroscopy.* – 2015. – V. 136. – P. 1993–1997.
124. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance): European Commission: Brussels; 2010.
125. Dual inhibitory pathways of metallofullereneol $Gd@C(8)(2)(OH)(2)(2)$ on matrix metalloproteinase-2: Molecular insight into drug-like nanomedicine / S. G. Kang [et al.] // *Sci. Rep.* - 2014. - №4. – P. 4775. DOI: 10.1038/srep04775.
126. Effect of chemical modification on the ability of pyrrolidinium fullerene to induce apoptosis of cells transformed by JAK2 V617F mutant / M. Funakoshi-Tago [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2014. - Vol. 20. – P. 258–263. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.035.
127. Effects of N-acetyl-l-cysteine on target sites of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes / Y. Nakagawa [et al.] // *Arch. Toxicol.* - 2013.- Vol.88. – P. 115–126. DOI: 10.1007/s00204-013-1096-3.

128. Experimental evidence for the interaction of C₆₀ fullerene with lipid vesicle membranes / J. Zupanc [et al.] // Carbon. – 2012. - Vol.50(3). – P. 1170–1178.
129. Facile and Scalable Synthesis of a Highly Hydroxylated Water-Soluble Fullerenol as a Single Nanoparticle / K. Kokubo [et al.] // Nano Res. – 2011. №4. – P. 204–215. DOI: 10.1007/s12274-010-0071-z.
130. Facile Synthesis of Highly Water-Soluble Fullerenes More Than Half-Covered by Hydroxyl Groups / K. Kokubo [et al.] // ACS Nano. – 2008. - №2(2). – P.327–333.
131. Fullerene C₆₀ Penetration into Leukemic Cells and Its Photoinduced Cytotoxic Effects / D. Franskevych [et al.] // Nanoscale Res. Lett. – 2017. - №12. – P.40. DOI: 10.1186/s11671-016-1819-5.
132. Fullerene derivative prevents cellular transformation induced by JAK2 V617F mutant through inhibiting c-Jun N-terminal kinase pathway / M. Funakoshi-Tago [et al.] // Cell Signal. – 2012. - Vol. 24. – P. 2024–2034. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.06.014.
133. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. / Y. W. Chen [et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2004. – Vol. 287. – P. 21–26. DOI: 10.1152/ajpregu.00310.2003.
134. Fullerene Nanoparticles Selectively Enter Oxidation-Damaged Cerebral Microvessel Endothelial Cells and Inhibit JNK-Related Apoptosis / F. Lao [et al.] // ACS Nano. – 2009. - №3. – P.3358–3368. DOI: 10.1021/nn900912n.
135. Fullerene–biomolecule conjugates and their biomedical applications / X. Yang et al. // International Journal of Nanomedicine. – 2014. - №9. – P. 77–92.
136. Fullerene-conjugated doxorubicin in cells / J. H. Liu [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2010. - №2. – P. 1384–1389. DOI: 10.1021/am100037y.
137. Fullerenol nanoparticles as a new delivery system for doxorubicin / D. S. Jovic [et al.] // RSC Adv. – 2016. №6. – P. 38563–38578. DOI: 10.1039/C6RA03879D.
138. Fullerenol-cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy / P. Chaudhuri [et al.] // ACS Nano. – 2009. - №3. – P.2505–2514. DOI: 10.1021/nn900318y.

139. Functional Gadofullerene Nanoparticles Trigger Robust Cancer Immunotherapy Based on Rebuilding an Immunosuppressive Tumor Microenvironment / L. Li [et al.] // *Nano Lett.* – 2020. - Vol.20. – P. 4487–4496. DOI: 10.1021/acs.nanolett.0c01287.
140. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism / P. Mroz [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. - Vol.43. – P. 711–719. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.005.
141. Gadolinium metallofullerenol nanoparticles inhibit cancer metastasis through matrix metalloproteinase inhibition: Imprisoning instead of poisoning cancer cells / H. Meng [et al.] // *Nanomedicine* – 2011. - №08. – P.19.
142. Gd@C82-(ethylenediamine)₈ Nanoparticle: A New High-Efficiency Water-Soluble ROS Scavenger / J. Li [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2016. - №8. – P. 25770–25776. DOI: 10.1021/acsami.6b08659.
143. Gd-metallofullerenol nanomaterial as non-toxic breast cancer stem cell-specific inhibitor / Y. Liu [et al.] // *Nat. Commun.* – 2015. - №6. – P.5988. DOI: 10.1038/ncomms6988.
144. Gd-Metallofullerenol Nanomaterial Suppresses Pancreatic Cancer Metastasis by Inhibiting the Interaction of Histone Deacetylase 1 and Metastasis-Associated Protein 1 / Y. M. Pan [et al.] // *ACS Nano.* – 2015. - №9. – P. 6826–6836. DOI: 10.1021/nn506782f.
145. Ge, Z. S. Functional block copolymer assemblies responsive to tumor and intracellular microenvironments for site-specific drug delivery and enhanced imaging performance / Z. S. Ge, S. Y. Liu // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. - Vol.42. – P. 7289–7325. DOI: 10.1039/c3cs60048c.
146. Gravit, L. Cancer immunotherapy / L. Gravit // *Nature.* – 2013. - Vol. 504. – P. 1. DOI: 10.1038/504S1a.
147. Gupta, R. Molecular dynamics simulation study of translocation of fullerene C₆₀ through skin bilayer: effect of concentration on barrier properties / R. Gupta, B.

- Rai // *Nanoscale*. – 2017. - Vol. 9(12). – P. 4114-4127. doi: 10.1039/c6nr09186e. PMID: 28280822.
148. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell*. – 2011. - Vol.144. – P. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
149. Hand-ground fullerene-nanodiamond composite for photosensitized water treatment and photodynamic cancer therapy / H. Lee [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* – 2021. - Vol. 587. – P. 101–109. DOI: 10.1016/j.jcis.2020.12.020.
150. Highly hydroxylated fullerene localizes at the cytoskeleton and inhibits oxidative stress in adipocytes and a subcutaneous adipose-tissue equivalent / L. Xiao [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. - Vol. 51. – P. 1376–1389. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.026.
151. Hydrophilic Molybdenum Oxide Nanomaterials with Controlled Morphology and Strong Plasmonic Absorption for Photothermal Ablation of Cancer Cells / G. S. Song [et al.] // *ACS Appl. Mater. Inter.* – 2014. - №6. – P. 3915–3922. DOI: 10.1021/am4050184.
152. Implication of variable characters for the taxonomy of *Altiphylax stoliczkai* and *Altiphylax yarkandensis* with comments on the ZSI ‘syntype’ of the latter taxon. / S. Das [et al.] // *Zootaxa*. – 2017. - Vol. 4320(1). – P. 183–192. DOI: 10.11646/zootaxa.4320.1.11
153. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and Experimental verification / S.H. Friedman [et al.] // *J Am Chem Soc.* - 1993. - Vol. 115(15). – P.6506–6509.
154. Injectable Fullerenol/Alginate Hydrogel for Suppression of Oxidative Stress Damage in Brown Adipose-Derived Stem Cells and Cardiac Repair / T. Hao [et al.] // *ACS Nano*. – 2017. - №11. – P. 5474–5488. DOI: 10.1021/acsnano.7b00221.
155. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future / R. R. Arvizo [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. - Vol. 41. – P. 2943–2970. DOI: 10.1039/c2cs15355f.

156. Kang, S. G. Non-destructive inhibition of metallofullerenol Gd@C(82)(OH)(22) on WW domain: Implication on signal transduction pathway / S. G. Kang, T. Huynh, R. Zhou // *Sci. Rep.* – 2012. - №2. – P. 957. DOI: 10.1038/srep00957.
157. Lai, H. S. Free radical scavenging activity of fullerenol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs / H. S. Lai, W. J. Chen, L. Y. Chiang // *World J. Surg.* – 2000. - Vol.24. – P. 450–454. DOI: 10.1007/s002689910071.
158. Li, Q. Induction of Endogenous Reactive Oxygen Species in Mitochondria by Fullerene-Based Photodynamic Therapy / Q. Li, C. Liu, H. Li // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2016. - Vol. 16. – P. 5592–5597. DOI: 10.1166/jnn.2016.11717.
159. Light-assisted gadofullerene nanoparticles disrupt tumor vasculatures for potent melanoma treatment / Z. Lu [et al.] // *J. Mater. Chem. B.* – 2020. - №8. – P. 2508–2518. DOI: 10.1039/C9TB02752A.
160. Lin, E.Y. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy / E.Y. Lin, A.V. Nguyen, R.G. Russell // *J. Exp. Med.* – 2001. - Vol.193. – P. 727–740. DOI: 10.1084/jem.193.6.727.
161. Liu, Y. Water-Soluble Supramolecular Fullerene Assembly Mediated by Metallobridged β -Cyclodextrins / Y. Liu // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2004. - Vol. 43. – P. 2690–2694.
162. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines / P. J. Murray [et al.] // *Immunity.* – 2014. - Vol. 41. – P. 14–20. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
163. Malondialdehyde - a potential marker of nanoparticle toxicity in an aquatic environment / L. Cepoi, L. Rudi, T. Chiriac [et al.] // *One Health & Risk Management.* – 2020. – Vol. 1, No. 1. – P. 64-71. – DOI 10.38045/ohrm.2020.1.10. – EDN PUAAYT.
164. Meng, J. Epigenetic modulation of human breast cancer by metallofullerenol nanoparticles: In vivo treatment and in vitro analysis / J. Meng // *Nanoscale.* – 2011. - №3. – P. 4713–4719. DOI: 10.1039/c1nr10898k.

165. Metallofullerol nanoparticles with low toxicity inhibit tumor growth by induction of G0/G1 arrest / J. Meng [et al.] // *Nanomedicine*. – 2012. - №8. – P. 203–213. DOI: 10.2217/nnm.12.95.
166. Molecular mechanism of Gd@C82(OH)22 increasing collagen expression: Implication for encaging tumor / J. Liu [et al.] // *Biomaterials*. – 2018. - Vol.152. – P. 24–36. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.027.
167. Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@C82(OH)22 and its implication for de novo design of nanomedicine / S. G. Kang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. - Vol. 109. – P. 15431–15436. DOI: 10.1073/pnas.1204600109.
168. Mott, J. D. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases / J. D. Mott, Z. Werb // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2004. - Vol. 16. – P. 558–564. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.07.010.
169. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis / D. E. Lee [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. - Vol.41. – P. 2656–2672. DOI: 10.1039/C2CS15261D.
170. Multihydroxylated [Gd@C₈₂(OH)₂₂]_n nanoparticles: Antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity / C. Chen [et al.] // *Nano Lett.* – 2005. - №5. – P. 2050–2057. DOI: 10.1021/nl051624b.
171. Nano-bio effects: Interaction of nanomaterials with cells / L. C. Cheng [et al.] // *Nanoscale*. – 2013. - №5. – P. 3547–3569. DOI: 10.1039/c3nr34276j.
172. Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation / C. M. Sayes [et al.] // *Biomaterials*. – 2005. - Vol.26. – P. 7587–7595. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.027.
173. Near-Infrared Light-Harvesting Fullerene-Based Nanoparticles for Promoted Synergetic Tumor Phototheranostics / H. Shi [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2019. - №11. – P. 44970–44977. DOI: 10.1021/acsami.9b17716.
174. Nm23-H1 regulates the proliferation and differentiation of the human chronic myeloid leukemia K562 cell line: A functional proteomics study / L. Jin [et al.] // *Life Sci.* – 2009. - Vol. 84. – P. 458–467. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.01.010.

175. Optimization of the solvent-exchange process for high-yield synthesis of aqueous fullerene dispersions / I. V. Mikheev [et al.] // *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. – 2018. - №9(1). – P. 41–45.
176. Physicochemical Determinants of Multiwalled Carbon Nanotube Bacterial Cytotoxicity / S. Kang [et al.] // *Environmental Science & Technology*. – 2008. - Vol. 42. – P. 7528–7534. DOI: 10.1021/es8010173.
177. Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system / S. F. Ye [et al.] // *Int. J. Nanomed.* – 2014. - №9. – P. 2073–2087. DOI: 10.2147/IJN.S56973.
178. Polyhydroxylated fullerenols regulate macrophage for cancer adoptive immunotherapy and greatly inhibit the tumor metastasis / J. Tang [et al.] // *Nanomedicine*. – 2016. - №12. – P.945–954. DOI: 10.1016/j.nano.2015.11.021.
179. Polyhydroxylated metallofullerenols stimulate IL-1beta secretion of macrophage through TLRs/MyD88/NF-kappaB pathway and NLRP(3) inflammasome activation / Z. Chen et al. // *Small*. – 2014. - №10. – P. 2362–2372. DOI: 10.1002/sml.201302825.
180. Potent angiogenesis inhibition by the particulate form of fullerene derivatives / H. Meng [et al.] // *ACS Nano*. 2010. - №4. – P. 2773–2783. DOI: 10.1021/nn100448z.
181. Potential hepatoprotective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas / R. Injac [et al.] // *Biomaterials*. – 2008. - Vol.29. – P. 3451–3460. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.048.
182. Preparation of (99m)Tc-C(60)(OH)(x) and its biodistribution studies / Q. Li [et al.] // *Nucl. Med. Biol.* – 2002. - Vol. 29. – P. 707–710. DOI: 10.1016/S0969-8051(02)00313-X.
183. Pristine (C₆₀) and hydroxylated [C₆₀(OH)₂₄] fullerene phototoxicity towards HaCaT keratinocytes: type I vs type II mechanisms / B.Z. Zhao [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – V. 21, No 5. – P. 1056–1063.

184. Production of monoclonal antibodies against fullerene C₆₀ and development of a fullerene enzyme immunoassay / O.D. Hendrickson, N.S. Fedyunina, A.V. Zherdev [et al.] // *Analyst*. – 2012. – V. 137, No 1. – P. 98–105.
185. Protective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer / R. Injac [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. Vol. 30. – P. 1184–1196. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.060.
186. Radical reactions of C₆₀ / P. J. Krusic [et al.] // *Science*. – 1991. - Vol. 254. – P. 1183–1185. DOI: 10.1126/science.254.5035.1183.
187. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo / M. Kuroki [et al.] // *J. Clin. Investig.* – 1996. - Vol.98. – P. 1667–1675. DOI: 10.1172/JCI118962.
188. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications / J. P. Kamat [et al.] // *Toxicology*. – 2000. - Vol. 155. – P. 55–61. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00277-8.
189. Regulation on mechanical properties of collagen: Enhanced bioactivities of metallofullerol / Y. Song [et al.] // *Nanomedicine*. – 2014. - №10. – P. 783–793. DOI: 10.1016/j.nano.2013.11.011.
190. Rofstad, E. K. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts / E. K. Rofstad, E. F. Halsor // *Cancer Res.* – 2000. - Vol. 60. – P. 4932–4938.
191. Shape Effect of Carbon Nanovectors on Angiogenesis / P. Chaudhuri [et al.] // *ACS Nano*. – 2010. - №4. – P. 574–582. DOI: 10.1021/nn901465h.
192. Size distribution of fulleranol nanoparticles in cell culture medium and their influence on antioxidative enzymes in Chinese hamster ovary cells / B. U. Srdjenovic [et al.] // *Hem. Ind.* – 2015. - Vol. 69. – P. 425–431. DOI: 10.2298/HEMIND131218054S.

193. Small size fullerene nanoparticles suppress lung metastasis of breast cancer cell by disrupting actin dynamics / Y. Qin [et al.] // *J. Nanobiotechnol.* – 2018. - Vol. 16. – P. 54. DOI: 10.1186/s12951-018-0380-z.
194. Stern, S. T. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity / S. T. Stern, P. P. Adiseshaiah, R. M. Crist // *Part. Fibre Toxicol.* – 2012. - №9. – P.20. DOI: 10.1186/1743-8977-9-20.
195. Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fullerene in a mouse breast cancer model / F. Jiao [et al.] // *Carbon.* – 2010. - Vol.48. – P. 2231–2243. DOI: 10.1016/j.carbon.2010.02.032.
196. Study of the Cytotoxic Effects of the New Synthetic Isothiocyanate CM9 and Its Fullerene Derivative on Human T-Leukemia Cells / E. De Gianni [et al.] // *Toxins.* – 2015. - №7. – P. 535–552. doi: 10.3390/toxins7020535.
197. Synthesis and evaluation of anticancer activity in cells of novel stoichiometric pegylated fullerene-doxorubicin conjugates / G. E. Magoulas [et al.] // *Pharm. Res.* – 2015. - Vol. 32. – P. 1676–1693. DOI: 10.1007/s11095-014-1566-1.
198. Synthesis of a Fullerene Derivative for the Inhibition of HIV Enzymes / F. Wudl [et al.] // *Am. Chem. Soc.* – 1993. – V.115. – P.6510-6512.
199. Synthesis of amphiphilic amino acid C-60 derivatives and their protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells / Z. Hu [et al.] // *Carbon.* – 2008. - Vol.46. – P. 99–109. DOI: 10.1016/j.carbon.2007.10.041.
200. Synthesis of α -Cyclodextrin-[60] fullerene Conjugate and Its DNA Cleavage Performance / J. J. Wang [et al.] // *Chin. J. Chem.* – 2014. - Vol.32. – P. 78–84. DOI: 10.1002/cjoc.201300737.
201. Synthesis of β -alanine C₆₀ derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells / L.Z. Huang [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 2007. – V. 31, No 8. – P. 798–804.

202. The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-alpha mediated cellular immunity / Y. Liu [et al.] // *Biomaterials*. - 2009. - Vol. 30. - P. 3934–3945. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.001.
203. The protective activities of water-soluble C-60 derivatives against nitric oxide-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells / Z. Hu [et al.] // *Biomaterials*. - 2010. - Vol. 31. - P. 8872–8881. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.025.
204. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials / J. J. Yin [et al.] // *Biomaterials*. - 2009. - Vol.30. - P. 611–621. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.061.
205. The use of fullerene substituted phenylalanine amino acid as a passport for peptides through cell membranes / J. H. Yang [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* - 2007. - №5. - P. 260–266. DOI: 10.1039/B614298B.
206. Toxicity of C₆₀ fullerene-cisplatin nanocomplex against Lewis lung carcinoma cells / S. Prylutska [et al.] // *Arch. Toxicol.* - 2019. - Vol. 93. - P. 1213–1226. DOI: 10.1007/s00204-019-02441-6.
207. Toxicity of polyhydroxylated fullerene to mitochondria / L. Y. Yang [et al.] // *J. Hazard. Mater.* - 2016. - Vol.301. - P. 119–126. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.08.046.
208. Tumor-inhibitory effect and immunomodulatory activity of fullerol C-60(OH)(x) / J. D. Zhu [et al.] // *Small*. - 2008. - №4. - P. 1168–1175. DOI: 10.1002/smll.200701219.
209. Tuning the autophagy-inducing activity of lanthanide-based nanocrystals through specific surface-coating peptides / Y. J. Zhang [et al.] // *Nat. Mater.* 2012. - №11. - P.817–826. DOI: 10.1038/nmat3363.
210. Urea kinetics of a carnivore, *Felis Silvestris Catus* / K. Russel [et al.] // *British Journal of Nutrition*. - 2000. - Vol.84. - № 597–604.

211. Water-soluble Malonic Acid Derivatives of C₆₀ with a Defined Three-dimensional Structure / I. Larnparth [et al.] // Chem. Soc., Chem. Commun. – 1994. – P. 1727–1729.
212. Yadav, D. The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer / D. Yadav, A. B. Lowenfels // Gastroenterology. – 2013. - Vol.144. – P. 1252–1261. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.068.
213. Yamakoshi, Y. N. Solubilization of Fullerenes into Water with Polyvinylpyrrolidone Applicable to Biological Tests / Y. N. Yamakoshi // J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN. - 1994. - P. 517–518.
214. Yang, Z. X. Nanomedicine: De novo design of nanodrugs / Z. X. Yang, S. G. Kang, R. H. Zhou // Nanoscale. – 2014. - №6. – P. 663–677. DOI: 10.1039/C3NR04535H.
215. Zhang, X. Mechanical characteristics of human red blood cell membrane change due to C₆₀ nanoparticle infiltration / X. Zhang, Z. Yong, Y. Zheng // Physical chemistry chemical physics. – 2013. - №15(7). – P.15.
216. Zheng, Y. Nanoparticle-based drug delivery systems for controllable photodynamic cancer therapy / Y. Zheng, Z. Li, H. Chen, Y. Gao // Eur. J. Pharm. Sci. – 2020. - Vol. 144. – P.105213. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105213.
217. Zoran, D. L. The carnivore connection to nutrition in cats / D. L. Zoran // Journal of the American Veterinary Medical Association – 2002. - Vol. 221. – P.1559–1567.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2770534

Гепатопротекторный и антиоксидантный препарат для животных на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова" (RU)*

Авторы: *Пудовкин Николай Александрович (RU), Салаутин Владимир Васильевич (RU), Алексеев Алексей Александрович (RU), Струговщиков Алексей Юрьевич (RU)*

Заявка № **2020137577**

Приоритет изобретения **16 ноября 2020 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **18 апреля 2022 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **16 ноября 2040 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

документ подписан электронной подписью
Сертификат 68b8007e14e40f0a94e6bd24145d5c7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 20.03.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2793128

Препарат на основе водного раствора фуллерена C₆₀, цинка, витамина D₃, С и кверцетина для животных

Патентообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "САРАТОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ГЕНЕТИКИ,
БИОТЕХНОЛОГИИ И ИНЖЕНЕРИИ ИМЕНИ Н.И.
ВАВИЛОВА" (RU)**

Авторы: **Пудовкин Николай Александрович (RU), Клюкин Сергей
Дмитриевич (RU), Алексеев Алексей Александрович (RU)**

Заявка № 2022132564

Приоритет изобретения **12 декабря 2022 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **29 марта 2023 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **12 декабря 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат: 68b80077e14e40f03a94e6bd24145d5c7
Владелец: **Зубов Юлиан Сергеевич**
Действителен с 2023-03-29 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов



АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Выдан аспиранту кафедры «Морфология, патология животных и биология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова» Алексееву Алексею Александровичу в том, что результаты его научных исследований по оценке терапевтической эффективности соединений на основе наночастиц углерода при заболевании животных выполнены и внедрены в практическую деятельность ветеринарной клиники ООО «ВЕТЕРИНАРНАЯ ДИАГНОСТИКА» г. Пенза и используются при проведении лечебно-профилактических мероприятий при лечении животных.

Руководитель организации

14.03.2023г.



(Шутова Т.И.)

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Выдан аспиранту кафедры «Морфология, патология животных и биология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова» Алексееву Алексею Александровичу в том, что результаты ее научных исследований по оценке терапевтической эффективности соединений на основе наночастиц углерода при заболевании животных, выполнены и внедрены в практическую деятельность ветеринарной клиники «Велес» г. Протвино и используются при проведении лечебно-профилактических мероприятий при лечении животных.

Руководитель организации



Воеводин Д.С.

14.03.2023г.

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО Вавиловский
университет

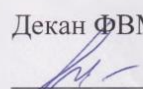
/  / Макаров С.А.
«24» апреля 2023 г.

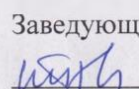


АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы по теме диссертации в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы по теме диссертации Алексеева Алексея Александровича выполненной на базе кафедры «Морфология, патология животных и биология» ФГБОУ ВО Вавиловский университет внедрены в учебный процесс и используются при чтении лекций и проведении лабораторных занятий по курсам «Патологическая физиология» и «Патологическая анатомия животных» (специальность 36.05.01 – Ветеринария). Протокол заседания кафедры «Морфология, патология животных и биология» №14 от 20.04.2023 г.

Декан ФВМПИБ
 / Моргунова Н.Л./
«20» апреля 2023г.

Заведующий кафедрой
 /Пудовкин Н.А./
«20» апреля 2023г.

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по образовательной
деятельности ФГБОУ ВО
«Астраханский государственный
университет имени В.Н. Татищева»



[Signature]
Трещев А.М.
2023 г.

АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы по теме диссертации в учебный процесс

Результаты научно-исследовательской работы по теме диссертации Алексева Алексея Александровича выполненной на базе кафедры «Морфология, патология животных и биология» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова» внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева».

Полученные результаты используются при чтении лекций и проведении лабораторных занятий по курсам «Внутренние незаразные болезни», «Ветеринарная фармакология. Токсикология», «Эндемические заболевания сельскохозяйственных животных», «Физиология и этология животных» и «Гематология домашних, продуктивных животных и птиц» (специальность 36.05.01 – Ветеринария). Протокол заседания кафедры «Ветеринарная медицина» №11 от 04.05.2023 г.

Декан ФАГиВМ

[Signature] / Дубин Р.И./
«24» апреля 2023г.

И. о заведующего кафедрой

[Signature] /Захаркина Н.И./
«24» апреля 2023г.

**ФИЗИОЛОГИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ**



САРАТОВ 2021

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Саратовский государственный аграрный университет
имени Н. И. Вавилова

Н.А. Пудовкин, Т.М. Прохорова, С.Д. Клюкин, С.В. Савина, А.А. Алексеев

ФИЗИОЛОГИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Учебное пособие

Направление подготовки
36.03.02 Зоотехния

Саратов 2021

Н.А. Пудовкин, Т.М. Прохорова, С.Д. Клюкин,
С.В. Савина, А.А. Алексеев

**ФИЗИОЛОГИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ**

Учебное пособие

Направление подготовки
36.03.02 Зоотехния

ISBN 978-5-00140-877-2



9 785001 408772 >

Подписано в печать 21.10.2021.
Формат 60×84 1/16. Гарнитура Times New Roman. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 6,86. Тираж 100 экз. Заказ № 4199-21/25101.

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами
в ООО «Амирит», 410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 88.
Тел.: 8-800-700-86-33 | (845-2) 24-86-33
E-mail: zakaz@amirit.ru
Сайт: amirit.ru