

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Саратов 2023

Работа выполнена на кафедре морфологии, патологии животных и биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

Научный руководитель: Пудовкин Николай Александрович,
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Дельцов Александр Александрович, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой «Физиология, фармакология и токсикология им. А.Н. Голикова и И.Е. Мозгова» ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва

Оробец Владимир Александрович, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой «Терапия и фармакология» ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», г. Казань

Защита диссертации состоится « » декабря 2023 года в 9⁰⁰ на заседании диссертационного совета 35.2.035.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова», по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, УК № 3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловский университет и на сайте www.vavilovsar.ru.

Отзывы направлять ученому секретарю диссертационного совета 35.2.035.02 по адресу: 410012, г. Саратов, просп. им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3., ФГБОУ ВО Вавиловский университет; e-mail: vetdust@mail.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Егунова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Котельников А. И., 2008; Джаманбалин К. К., 2023; Курилов Д. В., Заварзин И. В., Ямсков И. А., 2020).

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 (Почкаева Е. И., 2021).

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 (Думпис М. А., Николаев Д. Н., Литасова Е. В., 2018).

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 (Скворцевич Е. Г., Романов Р. В., Стурлис О. В., 2009). 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 исследований. Потенциал применения фуллерена C_{60} в медицинской химии в качестве биологически активного соединения обоснован в знаковой работе Friedman S.H. et al. (Friedman S.H., 1993).

К настоящему моменту достигнуты значительные успехи в области химической модификации фуллеренов для получения водорастворимых производных, такие как карбоксилирование (Larnparth I., 1994), гидроксिलирование (Kokubo K., 2008), а также разнообразных комплексов фуллеренов с водорастворимыми полимерами, например, поли-N-винилпирролидоном (ПВП) (Yamakoshi Y.N., 1994), биологически активными соединениями: пептидами, протеинами и другими олигонуклеотидами (Yang X., 2014).

Известные российские ученые занимались изучением физико-химических и биологических свойств соединений фуллеренов: М.А. Думпис, 2012–2019; Л.Б. Пиотровский, 2013–2022; Д.В. Курилов, 2019–2021.

На сегодняшний день имеются единичные упоминания об использовании наноструктурных соединений фуллеренов в биологической науке (Зафаров С. З.,

2021; Курилов Д. В., Заварзин И. В., Ямсков И. А, 2020; Саркисян З. М., 2020). 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} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида; 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 C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида.

Научная новизна. Впервые в ветеринарной практике создана новая фармакологическая композиция на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Обоснована возможность его применения животным. Дана токсикологическая характеристика данного соединения. Изучена фармакодинамика композиции на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида. Дополнены сведения о влиянии нанопуллеренов 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 C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида» и № 2793128 «Препарат на основе водного раствора фуллерена C_{60} , цинка, витамина D_3 , 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 C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида 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:

- 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.

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

- 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, проведенных на большом количестве животных, с использованием современного оборудования. Исследования проводили на основе фармако-токсикологического, клинического, морфо-биохимического, весового и физико-химического методов как в эксперименте (на ограниченном количестве животных), так и в условиях ветеринарных клиник. Метод анализа и

математической обработки полученных результатов обеспечивает их достоверность.

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

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, в том числе 2 патента и 6 статей – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. 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 странице 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 таблицами (9) и рисунками (31).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида определяли на белых крысах. Соединение вводили им подкожно в дозах 550, 825, 1100, 2500, 5000 мг/кг по действующему веществу; внутривентрикулярно – в тех же дозах. За животными наблюдали в течение 14 суток после введения препарата. Объем вводимого раствора белым крысам – 1,0 мл. Среднюю смертельную дозу (LD₅₀) рассчитывали по методу Кербера. Контролем служили животные, которым вводили стерильный водный раствор фуллерена C₆₀.

Аспирацию крови осуществляли из боковой хвостовой вены (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.

Содержание малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови определяли тиобарбитуровым методом (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., 1977), диеновые конъюгаты – спектрофотометрически (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., 1977), активность каталазы определяли колориметрическим методом (Королюк М.А., 1988).

Исследование метаболизма железа включало в себя определение сывороточного железа (СЖ) колориметрическим методом.

Оценку общей и латентной железосвязывающей способности (ОЖСС) проводили спектрофотометрическим методом (Ахмадеева К.Э., Каримова Р.Г., 2020).

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).

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

Схема исследований представлена на рисунке 1.

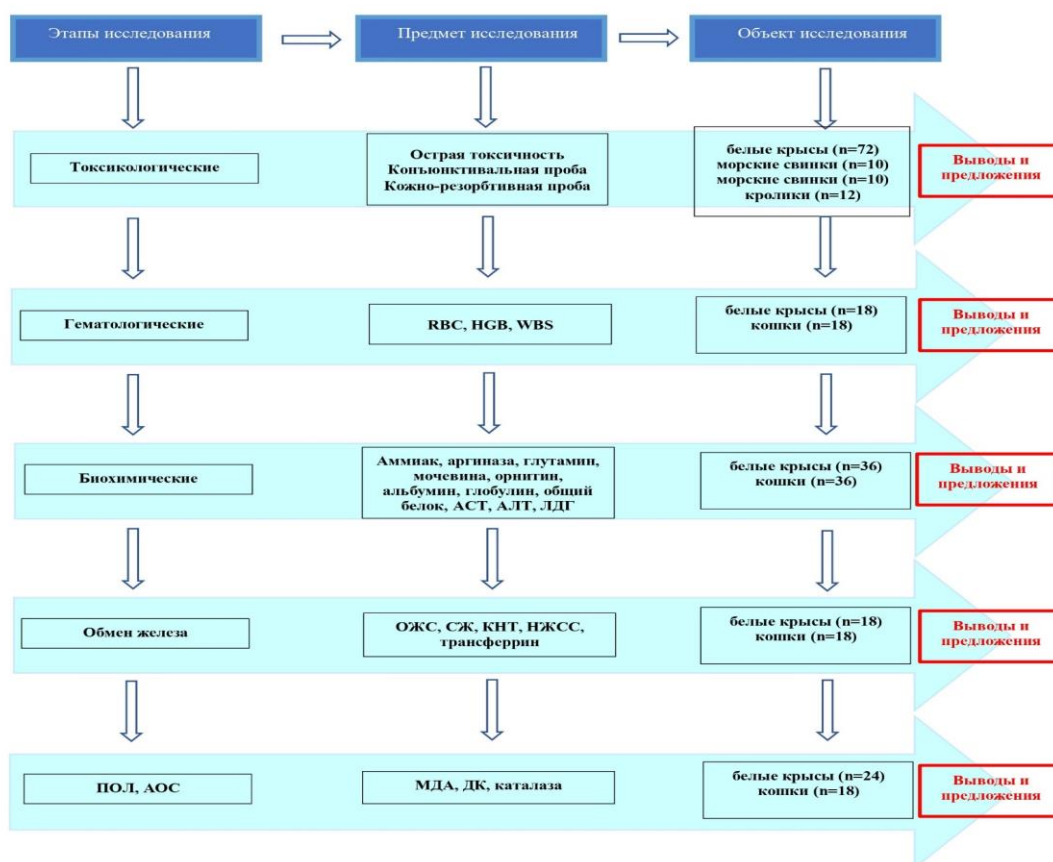


Рисунок 1 – Общая схема исследований
Разработка соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида.

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 плуроником 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.

Токсикологическая характеристика соединения на основе водного раствора фуллерена C₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида, применяемого на лабораторных животных.

Результаты исследований по определению острой токсичности изучаемого соединения для лабораторных животных представлены в таблице 1.

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

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

Животные, получавшие фармакологическую композицию в дозах 550, 825 и 1100 мг/кг 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. После введения изучаемого соединения в дозе 2500 и 5000 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.

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

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, животным второй группы вводили полученное гепатопротекторное и антиоксидантное соединение 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-е и 14-е сутки после введения соединения. Результаты исследований представлены на рисунках 2, 3.

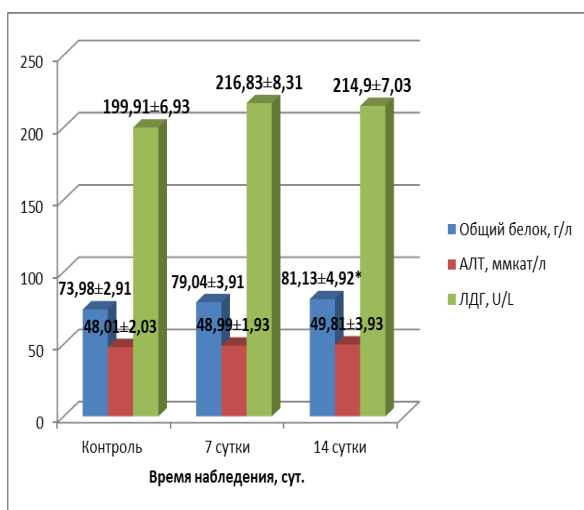


Рисунок 2 – Показатели белкового обмена кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

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

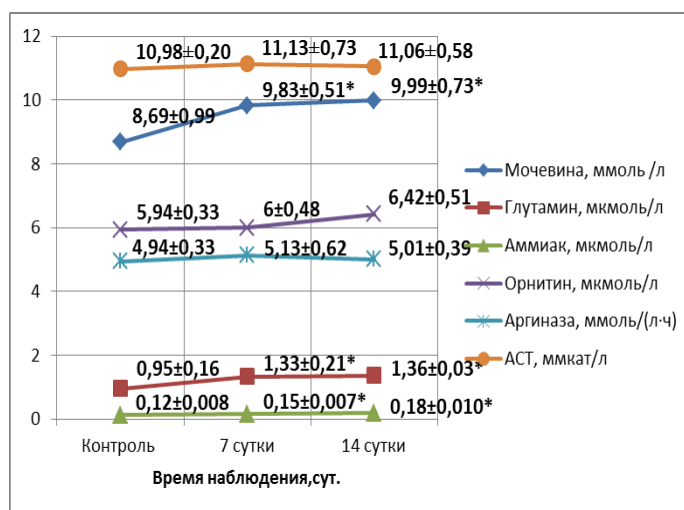


Рисунок 3 – Показатели белково-азотистого обмена кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Установлено, что после введения изучаемого соединения 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 (см. рисунок 3). При изучении остальных показателей достоверных различий не установлено.

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.

Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} на организм животных. Они 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.

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

Для исследований были сформированы 3 группы кошек. Животных подбирали в группы по принципу аналогов, по 6 в каждой. Первая группа служила контролем, второй группе животных вводили соединение 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-е и 14-е сутки после введения соединения.

Достоверных различий в содержании общего белка в сыворотке крови кошек после введения соединения фуллерена C_{60} не установлено. 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. 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. В остальных изучаемых показателях достоверных различий не установлено. После введения изучаемого соединения активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) в крови кошек достоверно не изменилась. Достоверное повышение активности аргиназы установлено на 14-е сутки (+10,1 %) по сравнению с контролем.

Таким образом, соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида способствует усилению таких специфических функций печени, как белоксинтезирующая и мочевинообразовательная. 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.

Система крови животных под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида.

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. Животных подбирали в группы по принципу аналогов, по 6 в каждой. Первая группа служила контролем, животным второй группы вводили полученное гепатопротекторное и антиоксидантное соединение 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-е и 14-е сутки после введения соединения.

Результаты исследований по содержанию эритроцитов и лейкоцитов в крови кошек представлены на рисунке 4. 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.

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

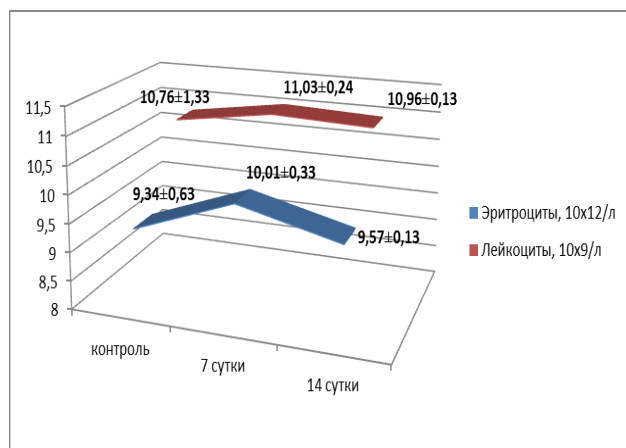


Рисунок 4 – Количество эритроцитов и лейкоцитов в крови кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

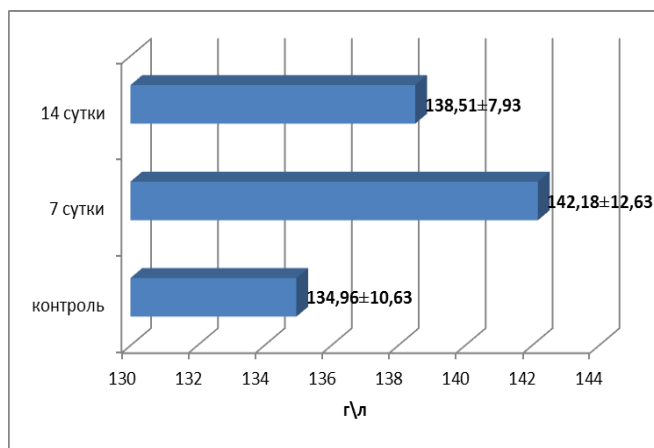


Рисунок 5 – Уровень гемоглобина, г/л, в крови кошек после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

Состояние про- и антиоксидантной системы защиты организма животных под влиянием соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида.

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.

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.

Анализируя результаты, представленные в таблице 2, было установлено, что после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} ,

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.

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.

Таблица 2 – 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*

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

В ткани легких максимальное снижение концентрации МДА установлено после введения соединения 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 C_{60} 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 C_{60} в дозах 2 мл (-15,1 %) и 3 мл (-20,9 %) относительно контрольных значений.

Следующим этапом наших исследований было изучение активности каталазы. Результаты исследований представлены в таблице 3.

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 %).

Таблица 3 – Активность каталазы, ммоль/л, в сыворотке крови и тканях внутренних органов белых крыс после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида ($M \pm m$; $n = 6$)

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

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.

В ткани легких активность каталазы повысилась на 10,1 %, почек и печени – на 7,0 % относительно контроля. После введения остальных изучаемых доз достоверных отличий в этих тканях не установлено.

В ткани сердца после введения соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} в дозах 1, 2 и 3 мл активность каталазы повысилась на 8,6; 11,7 и 9,8 % соответственно относительно контроля.

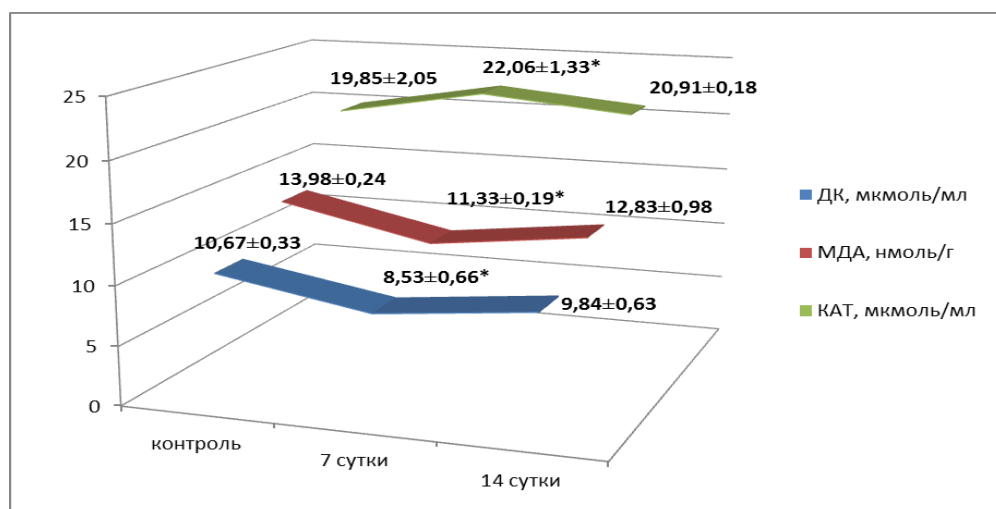
В скелетной мускулатуре достоверных различий в активности каталазы не установлено.

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

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 группе вводили полученное 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-е и 14-е сутки после введения соединения. Результаты исследований представлены на рисунке 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.



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

Рисунок 6 – 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.

Анализ фармакологической эффективности соединения «Гепатопротекторный и антиоксидантный препарат для животных на основе водного раствора фуллерена C_{60} , 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 при введении и дозировании. В его состав входят

водный раствор фуллерена C_{60} , стабилизированный плуронином F-127, – 1 мл (1 мг по ДВ), ресвератрол – 25 мг, бетаина гидрохлорид – 10 мг.

Разработанное соединение на основе водного раствора фуллерена C_{60} , 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 C_{60} , ресвератрола и бетаина гидрохлорида позволяют сделать следующий вывод: соединение для профилактики и лечения свободнорадикальной патологии у животных не вызывает выраженных изменений кожи опытных животных.

Полученное соединение оказывает положительное влияние на организм животных. После его введения мы наблюдали изменения показателей белково-азотистого обмена, которые выражались в повышении уровней общего белка, аммиака и мочевины в сыворотке крови белых крыс. Однако при этом 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 белоксинтезирующая и мочевинообразовательная. 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} снижает образование 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 к 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.

Предложения производству

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 уточнении и изучении закономерности действия наносоединений на организм животных.

Дальнейшие перспективы разработки темы диссертационной работы будут связаны с проведением дополнительных углубленных исследований по

фармакологическому, физиологическому, технологическому и экономическому обоснованию применения нанополлиленов для животных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Патенты:

1. Патент № 2770534 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/00, А61К 33/44, А61К 36/00. Гепатопротекторный и антиоксидантный препарат для животных на основе водного раствора фуллерепа С₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида / Пудовкин Н. А., Салаутин В. В., Алексеев А. А., Струговщиков А. Ю.; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». – № 2020137577; заявл. 16.11.2020; опубли. 18.04.2022, Бюл. № 11. – 21с.

2. Патент № 2793128 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/352, А61К 31/375, А61К 31/593. Препарат на основе водного раствора фуллерепа С₆₀, цинка, витамина D3, С и кверцетина для животных / Пудовкин Н. А., Клюкин С. Д., Алексеев А. А.; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова». – № 2022132564; заявл. 12.12.2022; опубли. 29.03.2023, Бюл. № 11. – 16 с.

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

3. **Алексеев, А. А.** Изменение белково-азотистого обмена у лабораторных животных под действием водного раствора фуллерепа С₆₀ / 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.

4. Состояние глюконеогенной функции печени белых крыс под влиянием нанокмполитного водного раствора фуллерепа С₆₀ / **А. А. Алексеев**, Н. А. Пудовкин, В. В. Салаутин, С. Д. Клюкин // Международный вестник ветеринарии. – 2022. – № 2. – С. 58–64.

5. Влияние водного раствора фуллерепа на процессы про- и антиоксидации в организме белых крыс / Н. А. Пудовкин, С. Д. Клюкин, **А. А. Алексеев**, В. В. Салаутин // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. – 2022. – № 2(67). – С. 102–108.

6. **Алексеев, А. А.** Токсикологическая характеристика водного раствора фуллерепа С₆₀, ресвератрола и бетаина гидрохлорида на лабораторных животных / А. А. Алексеев, С. Д. Клюкин, Н. А. Пудовкин // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2023. – № 1(22). – С. 22–30.

7. **Алексеев, А. А.** Влияние соединения на основе водного раствора фуллерена C_{60} на гематологические показатели белых крыс / **А. А. Алексеев, Н. А. Пудовкин, С. Д. Клюкин** // Аграрный научный журнал. – 2023. – № 4. – С. 40–43.

8. **Клюкин, С. Д.** Влияние фармакологической композиции на основе фуллерена C_{60} на показатели белково-азотистого обмена кошек / **С. Д. Клюкин, А. А. Алексеев, Н. А. Пудовкин** // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2023. – № 5. – С. 86–89.

В других изданиях:

9. **Алексеев, А. А.** Влияние раствора фуллерена C_{60} на состояние процессов перекисного окисления липидов в организме белых крыс / **А. А. Алексеев** // АПК России: образование, наука, производство: Всероссийская (национальная) научно-практическая конференция, Саратов, 28–29 сентября 2021. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2021. – С. 9–12.

10. **Алексеев, А. А.** Фармакокинетика препарата на основе водного раствора фуллерена C_{60} (по данным лабораторного опыта) / **А. А. Алексеев** // Интеграция образования, науки и практики в АПК: проблемы и перспективы: Международная научно-практическая конференция, Луганск, 09–11 ноября 2021. – Луганск: ГОУ ВО ЛНР ЛГАУ, 2021. – С. 72–73.

11. **Alekseev, A. A.** The effect of an aqueous solution of fullerene C_{60} 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: II Всероссийская (Национальная) научно-практическая конференция, Саратов, 20 января 2022. – Саратов: ООО «Центр социальных агроинноваций СГАУ», 2022. – С. 127–131.

12. **Алексеев, А. А.** Изучение раздражающего и аллергического действия соединений на основе водного раствора фуллерена / **А. А. Алексеев, С. Д. Клюкин, Н. А. Пудовкин** // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Международная научная конференция, посвященная 100-летию кафедр клинической диагностики, внутренних болезней животных им. Синева А.В., акушерства, Санкт-Петербург, МСХ РФ, СПбГУВМ, 29–30 сентября 2022. – СПб., 2022. – С. 160–162.

13. **Алексеев, А. А.** Влияние соединений фуллерена на белковосинтезирующую функцию печени животных / **А. А. Алексеев, С. Д. Клюкин, Н. А. Пудовкин, Д. С. Фролов** // Фундаментальные и прикладные решения приоритетных задач токсикологии и биотехнологии. Международная научно-практическая конференция, Казань, 28 октября 2022; под ред. Н. М. Василевского, А. М.Тремасовой, И. И. Идиятова, Е. Ю. Закировой. – Казань: Альянс, 2022. – С. 12–17.