



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110033** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)**C07C 229/50** (2006.01)**C07C 227/14** (2006.01)**A61K 31/197** (2006.01)**A61P 31/16** (2006.01)**A61P 31/18** (2006.01)**A61P 31/22** (2006.01)**A61P 35/00****A61P 17/06** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2012 15155	(72) Винахідник(и): Раснецов Лев Давідовіч (RU), Шварцман Яков Юдєлевіч (RU), Суворова Ольга Ніколаєвна (RU)
(22) Дата подання заявки: 06.02.2012	(73) Власник(и): Раснецов Лев Давідовіч, ул. Грузинская, д. 15, кв. 39, г. Нижний Новгород, 603000, Российская Федерация (RU)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.11.2015	(74) Представник: Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2011103541	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EP 1 645 279 A1; 12.04.2006 RU 2236852 C1; 27.09.2004 RU 2316320 C1; 10.02.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 01.02.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: RU	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.06.2013, Бюл.№ 12	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2015, Бюл.№ 21	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/RU2012/000063, 06.02.2012	

(54) ГІДРАТОВАНІ N-ФУЛЕРЕН-АМІНОКИСЛОТИ, СПОСІБ ЇХ ОДЕРЖАННЯ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЇХ ОСНОВІ**(57) Реферат:**

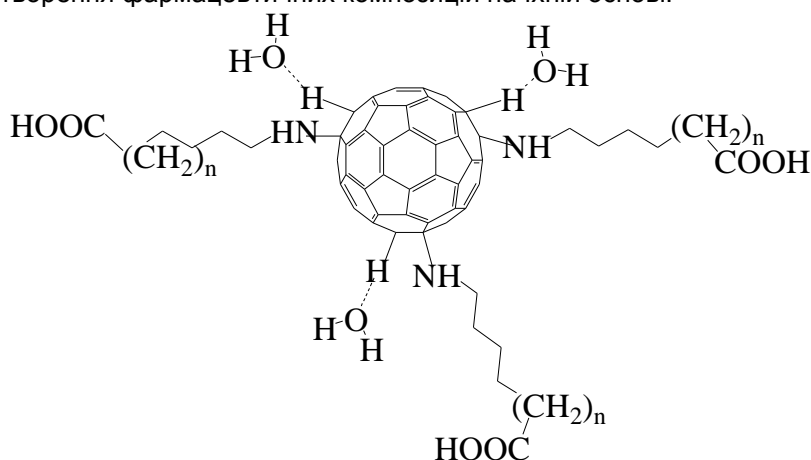
Винахід стосується фармацевтичної промисловості й медицини, а саме нових гідратованих амінокислотних похідних фулерену C_{60} загальної формули $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOOH\}_3 \cdot xH_2O$, де C_{60} - фулерен, $n=5, 6, 7$, $x=8-10$, а також способу їх одержання й створення фармацевтичних композицій на їх основі. Гідратовані N-фулерен-амінокислоти утворюються при взаємодії фулерену з 15-разовим мольним надлишком безводних калієвих солей амінокислот у середовищі органічного ароматичного розчинника при повільному додаванні до отриманої суспензії міжфазного каталізатора при перемішуванні й нагріванні до температури не вище $60^\circ C$ до повного знебарвлення розчину й формування твердого осаду, який потім виділяють, після чого здійснюють обробку 0,8 М водних розчинів калієвих солей фулерен-амінокислот 0,1Н розчином органічних або мінеральних кислот з наступним центрифугуванням, промиванням і висушуванням осаду. Фармацевтична композиція, яка проявляє активність проти вірусу

UA 110033 C2

герпесу, вірусів грипу різної природи, ВІЛ, а також протипухлинну й протипсоріатичну активність, і яка містить як активну речовину гідратовані N-фулерен-амінокислоти в ефективній кількості.

Галузь техніки

Винахід відноситься до фармацевтичної промисловості й медицини і стосується нових гідратованих амінокислотних похідних фулерену C_{60} формули (I), а також способу їх одержання й створення фармацевтичних композицій на їхній основі.



(I)

5 Попередній рівень техніки

Можливість використання фулеренів, як біологічно активних сполук викликав інтенсивний розвиток хімії функціональних похідних фулерену, особливо після того, як було показано, що ряд водорозчинних похідних фулерену проявляють високу антивірусну активність (Partha R, Conyers JL, "Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials" Int.J.Nanomedicine, 2009, 4, 261-75 Pat US 6204391, 2005, "Water soluble fullerenes with antiviral activity", R.Bakry et al., "Medicinal application of fullerenes" International Journal of Nanomedicine, 2007 (4) 639-649, Z.Zhu, D.I.Schuster, M.Tuckermann, "Molecular Dynamics Study of the Connection between Flap Closing and Binding of Fullerene-Based Inhibitors of the HIV-1 Protease", Biochemistry, 2003, v.42, 1326-1333).

Застосування похідних фулерену в медицині засноване на ліпофільних властивостях фулеренового ядра, які дозволяють фулереновим похідним проникати крізь клітинні мембрани, і здатності фулерену з високим квантовим виходом генерувати синглетний кисень, який розщеплює ДНК. Ці властивості зумовлюють цитотоксичні, антивірусні та інші властивості функціональних похідних фулерену (Bedrov D., Smith G.D., Davande H., "Passive transport of fullerenes through a lipid membrane." J.Phys.Chem., B, 2008, v.112., p.2078-84, Qiao R., Roberts A.E., "Translocation of fullerene and its derivatives across a lipid bilayer", Nano Lett., 2007, v.7, p.614-9. Nelsen G.D., і ін., "In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives", Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2008, v.103, p.197-208).

Гідратовані форми фулерену проявляють високу біологічну активність як біоантиоксиданти, що зумовлене утворенням активних структурних форм водних кластерів, координованих на сфері фулерену (Andrievsky G.V., Brushkov V.I., Tykhonov A.A., Gudkov S.V. "Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C_{60} fullerene nanostructures in vitro and in vivo". Free Radical Biology and Medicine, 2009, v.47, p.786-793).

Основною проблемою, яка ускладнює біологічні дослідження фулеренів та їх похідних і створення лікувальних препаратів на їхній основі, є складність введення фулеренових систем у водні розчини.

Перспективним методом одержання водорозчинних фулеренових композицій є хімічна модифікація сфери фулерену введенням гідрофільних солюбілізуючих лігандів. На даний час отриманий широкий ряд функціоналізованих фулеренів, які містять гідрофільні фрагменти, як у бічному ланцюзі приєднаних до фулерену лігандів (детергентний тип комплексів), так і сферичний тип похідних, коли є полярні групи, розміщені на фулереновій сфері (такий тип включає фулереноли, аміноадукти).

Найбільш перспективними для використання є амінокислотні похідні фулерену.

Неприродні амінокислоти аліфатичного ряду, які містять 6 і більше метиленових груп, проявляють ряд особливостей, що проявляються в процесах їх гідратації та їх біохімічної активності. Спектральні дослідження структури води у водних розчинах амінокислот показують, що збільшення числа метиленових груп між аміно- і карбоксильною групами призводить до збільшення деструкції водних кластерів. Дослідження фармакологічних властивостей похідних амінокислот широкого ряду $R-(CH)_nCOOH$ показали більш високу активність систем з n більше або рівним 6.

Похідні фулерену C_{60} сферичного типу з амінокислотами, отримані шляхом реакції

нуклеофільного приєднання амінокислот за аміногрупою до сфери фулерен описані в патентах РФ №№ 2196602, 2124022, 2236852, які можна запропонувати як аналоги даного винаходу.

У патенті РФ № 2196602 запропонований спосіб інгібування репродукції ВІЛ і ЦМВ-інфекцій за допомогою сполук на основі амінокислотних і дипептидних похідних фулерену. Як амінокислотну похідну фулерену використовують натрієві солі фулеренамінокапронової і фулеренаміномасляної кислот.

У патенті РФ № 2124022 для одержання фулеренамінокапронової кислоти до розчину фулерену в о-дихлорбензолі додають водний розчин калієвої солі амінокапронової кислоти й 18-краун-6. Реакційну масу перемішують 6-8 годин при 60°C. Потім розчинники відганяють, залишок обробляють насиченим розчином хлористого калію й залишок фулеренового похідного промивають водою. Вихід цільового продукту кількісний. Отримана (моногідро)N-фулеренамінокапронова кислота розчинна в диметилсульфоксиді, диметилформаміді, піридині. У заявленому методі синтезу не визначені умови виділення кінцевого продукту.

Основним недоліком отриманих сполук, які є продуктами моноприєднання, є їхня нерозчинність у воді. Іншим недоліком винаходу є використання в їхньому синтезі краун-ефіру як міжфазного каталізатора, який складно відділити від одержаних продуктів реакції.

У патенті РФ № 2236852 захищається засіб для інгібування репродукції оболонкових вірусів, який представлений фулеренполікарбоновими аніонами загальної формули $C_{60}H_n[NH(CH_2)_mC(O)O^-]_n$, отримані в результаті взаємодії фулерену із сіллю амінокислоти в середовищі органічного розчинника в присутності поліалкілененоксида.

Для одержання цих сполук до розчину фулерену в о-дихлорбензолі (толуолі або будь-якому іншому органічному розчиннику) вносять амінокислоту у вигляді солі (калієвої або натрієвої), потім додають солюбілізатор. Порядок внесення в реакційне середовище амінокислоти й солюбілізатора не важливий, можна вносити їх у вигляді комплексу, попередньо змішавши. Як солюбілізатор використовують різні поліалкілененоксиди: поліетиленгліколі мол. маси від 150 до 400, і вище 400 (наприклад, ПЕГ-1500), а також поліетиленгліколі, які мають вільні кінцеві групи, але й із заміщеними (наприклад, диметиловий ефір поліетиленгліколю мол. маси 500). Для збільшення швидкості реакції додають будь-який сильний відновник (лужні метали). Співвідношення фулерену й амінокислоти збільшене більше ніж в 50 разів. Перетворення на бажану фармацевтично прийнятну сіль, особливо натрієву або калієву, виконувалося шляхом обробки кислоти придатною основою або шляхом додавання солі слабкої леткої кислоти. Зокрема, не розчинна у воді фулеренполікарбонова кислота перетворюється на більш фармацевтично прийнятні солі, такі як натрієва сіль, які є розчинними у воді. Додавання солі слабкої леткої кислоти відбувається шляхом обробки розчину сіллю лужного металу й слабкої леткої кислоти. При концентруванні розчину шляхом випаровування або ліофілізації слабка кислота видаляється, а суміш фулеренполікарбонових кислот виділяється у вигляді сумішей їх солей лужних металів. Цільовий продукт за даним винаходом характеризується сталістю складу, вміст у цільовому продукті основної речовини становить усього 87,8 %.

Основними недоліками фулеренамінокислотних похідних, отриманих запропонованим у патенті методом одержання є те, що даним способом одержують суміш фулеренкарбоксилатних аніонів, як сольових, так і кислотних форм. Одержати ізольовану сполуку способом, описаним у патенті, не є можливим. Також фулеренполіамінокислоти, отримані запатентованим способом, у кислотній формі практично нерозчинні у воді. Одержати стабільну фармацевтичну композицію з фулеренполікарбоновими аніонами не вдалося, оскільки в процесі зберігання сполуки випадають в осад. Фулеренполіамінокислоти впливають на лейкопоез: викликають зрушення лейкоцитарної формули й індукують появу молодих форм нейтрофілів - нейтрофільних метамієлоцитів у піддослідних тварин (пацюків і кроликів). З погляду безпеки (нешкідливості) це свідчить про наявність у даних субстанцій токсичності, що викликає зазначені зміни. Застосування в синтезі великого надлишку калієвої або натрієвої солей амінокислот і значних надлишків розчинників призводить до виникнення екологічних проблем, пов'язаних з утилізацією відходів виробництва, а також до подорожчання процесу виробництва. Використання лужних металів для збільшення швидкості реакції є технологічно неможливим при використанні хлорованих ароматичних розчинників.

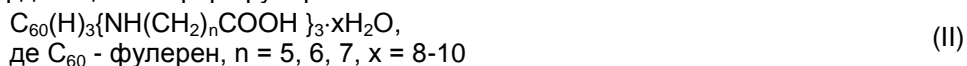
Розкриття винаходу

Завданням заявленого технічного розв'язку є одержання індивідуальних гідратованих сполук фулерену C_{60} з амінокарбоновими кислотами, які проявляють активність проти вірусу герпесу, вірусу гепатиту С, вірусів грипу різної природи, ВІЛ, а також протипухлинну й протипсоріатичну активність, і які не мають токсичної дії на організм; спосіб одержання даних сполук і фармацевтичні композиції, які включають дані сполуки.

Для розв'язання поставленого завдання запропонована група винаходів, об'єднаних єдиним

винахідницьким задумом: сполука, спосіб її одержання та фармацевтичні композиції, які містять зазначену сполуку.

Поставлене завдання вирішується індивідуальною гідратованою сполукою фулерену C_{60} з амінокарбоновими кислотами загальної формули (II), яка характеризується тим, що на одну молекулу фулерену приходить три ковалентно зв'язаних амінокислотних фрагменти, які мають у своїй структурі активні центри гідратації, які призводять до утворення водорозчинних гідратів, і довгі вуглеводневі ланцюги, які дозволяють утримувати молекули води у внутрішній координаційній сфері фулеренових комплексів.



Зазначене завдання вирішується тим, що гідратовані фулеренові похідні амінокислот формули (II), утворюються при взаємодії фулерену з 15-разовим мольним надлишком безводних калієвих солей амінокислот у середовищі органічного ароматичного розчинника при повільному додаванні до отриманої суспензії міжфазного каталізатора при перемішуванні й нагріванні до температури не вищої від $60-80^\circ C$ до повного знебарвлення розчину й формування твердого осаду, який потім виділяють, після чого здійснюють обробку 0,8 М водних розчинів калієвих солей фулеренамінокислот 0,1Н розчином органічних або мінеральних кислот з наступним центрифугуванням, промиванням і висушуванням осаду.

Також, відповідно до винаходу, безводні калієві солі амінокислот використовують у дрібнодисперсному стані, що дозволяє підвищити реакційну здатність процесу, його ефективність і економічність, а виділення твердого осаду калієвих солей фулеренамінокислот здійснюють фільтруванням, промиванням етиловим спиртом і висушуванням. Як міжфазний каталізатор використовують метилові ефіри поліетиленоксидів молекулярної маси 200, 400, 500, як найбільш доступні й безпечні каталізатори.

Зазначене завдання вирішується також створенням фармацевтичних композицій, які як активну речовину містять водорозчинні гідратовані фулеренамінокислоти формули (II), які проявляють активність проти вірусу герпесу, вірусу гепатиту С, вірусів грипу різної природи, ВІЛ, а також протипухлинну й протипсоріатичну активність.

Фармацевтичні композиції відповідно до запропонованого технічного розв'язку містять сполуку загальної формули (II) у кількості, ефективній для досягнення бажаного результату, і можуть бути введені у вигляді стандартних лікарських форм (наприклад, у твердій, напівтвердій або рідкій формах), які містять сполуку запропонованого технічного розв'язку як активний інгредієнт в суміші з носієм або наповнювачем, придатним для внутрішньом'язового, внутрішньовенного, перорального, сублінгвального, інгаляційного, місцевого, інтраназального й інтаректального введення. Активний інгредієнт може бути включений до композиції разом зі звичайно використовуваними нетоксичними фармацевтично прийнятними носіями, придатними для виготовлення розчинів, таблеток, пігулок, капсул, драже, супозиторіїв, емульсій, суспензій, мазей, гелів і будь-яких інших лікарських форм.

Конкретний рівень дозувань і частота прийому ліків для кожного конкретного пацієнта буде залежати від великого переліку факторів, включаючи активність конкретного похідного фулерену, метаболічну стабільність і тривалість дії, швидкість виділення, вік пацієнта, вага тіла, загальний стан здоров'я, стать, лікарські комбінації, а також важкість захворювання даного індивіда, який потребує лікування.

Для орального застосування у вигляді суспензій композиції готують згідно з методами, широко відомими в галузі приготування фармацевтичних рецептур, і вони можуть містити мікрокристалічну целюлозу або її похідні для забезпечення маси, альгінову кислоту або альгінат натрію як суспендуєчий агент, метилцелюлозу як підсилювач в'язкості і підсолоджуючі агенти та/або віддушки, відомі в цій галузі. У формі таблеток такі композиції можуть містити мікрокристалічну целюлозу, кальцій фосфат, крохмаль, стеарат магнію й лактозу й/або інші ексципієнти, зв'язувальні речовини, розширювачі, дезінтегратори, розріджувачі й змащувальні речовини, відомі в даній галузі.

При застосуванні у вигляді назальних аерозолів або шляхом інгаляції такі композиції готують методами, добре відомими в галузі фармацевтичних рецептур, і вони можуть випускатися у вигляді розчинів у фізіологічному розчині, з використанням бензойної кислоти або інших придатних консервантів, промоторів адсорбції для покращення біологічного застосування, і/або інших солюбілізуючих або диспергуючих агентів, відомих у даній галузі.

Розчини або суспензії для ін'єкцій можуть формуватися згідно з відомими методами, з використанням нетоксичних, придатних для парентерального застосування розріджувачів або розчинників, таких як маніт, 1,3-бутандіол, вода, розчин Рінгера або ізотонічний розчин хлористого натрію або придатних диспергуючих або змочувальних і суспендуєчих агентів, таких

як стерильні, м'які, стійкі олії, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди, або жирні кислоти, включаючи олеїнову кислоту.

При ректальному застосуванні у вигляді свічок такі композиції можуть готуватися шляхом змішування ліків з таким не подразнюючим ексципієнтом, як масло какао, синтетичними гліцеридними складними ефірами або поліетиленгліколями, які є твердими речовинами за звичайних температур, але скраплюються й/або розчиняються в ректальній порожнині з виділенням ліків.

При місцевому застосуванні у вигляді мазей, гелів, кремів, лініментів тощо такі композиції можуть готуватися шляхом змішування активних інгредієнтів із прийнятною мазевою основою.

Як мазеві основи можуть бути використані жирові, вуглеводневі або гідрофільні основи, наприклад вазелін, вазелінове масло, парафін, віск, ланолін, поліетиленгліколь та ін.

Як основи для гелів можуть бути використані метилцелюлоза, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, оксипропілцелюлоза, поліетиленгліколь або поліетиленоксид, карбопол, полівінілпіролідон, полівініловий спирт тощо.

Запропонований винахід стосується сполук, способу одержання цих сполук та їх фармацевтично прийнятних асоціатів з полярними реагентами. Отримані сполуки не впливають на лейкопоез: не викликають зрушення лейкоцитарної формули й не індують появу молодих форм нейтрофілів - нейтрофільних метамієлоцитів у піддослідних тварин (пацюків і кроликів). З погляду безпеки (нешкідливості) це свідчить про відсутність у даних сполук токсичності, яка викликає зазначені зміни. Заявлений спосіб дозволяє одержати різні за складом композиції на основі фулеренамінокислот залежно від співвідношення реагентів і умов проведення процесу, а саме: водорозчинні гідратовані фулеренамінокислоти загальної формули (II).

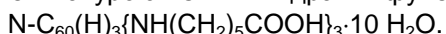
Спосіб заснований на використанні в стадії синтезу оптимальних співвідношень вихідних реагентів, мінімальних кількостей органічного розчинника й міжфазного каталізатора, з наступним виділенням заявлених сполук, з використанням концентрованих розчинів органічних і мінеральних кислот, що призводить до кількісного одержання фулеренамінокислотних композицій певного складу й можливості застосування заявленого способу для їхнього промислового синтезу, який відрізняється ефективністю й екологічністю.

Технічний результат запропонованого технічного розв'язку полягає в одержанні стійких індивідуальних водорозчинних гідратованих сполук фулерену C_{60} з амінокарбоновими кислотами, мають токсичного впливу на організм. Розроблений ефективний спосіб одержання індивідуальних стійких гідратованих похідних фулерену, які проявляють противірусну, протипухлинну й протипсоріатичну активність.

Заявлений винахід проілюстровано наступними прикладами.

Варіанти здійснення винаходу

Приклад 1. Одержання гідрату N-фулерен-(трис-ε-амінокапронової кислоти) (за номенклатурою ІЮПАК - гідрат N-фулерен-(трис-6-аміногексанової кислоти) формули:



До розчину 60 г (0,08 моля) фулерену C_{60} в 4,5 л о-дихлорбензолу додають 204 г (1,2 молей) тонко подрібненої безводної калійної солі ε-амінокапронової кислоти. До отриманої суспензії при перемішуванні й нагріванні не вище 60°C додають протягом 2-х годин суміш о-дихлорбензолу й метилового ефіру поліетиленгліколю 500 у співвідношенні 5:1. Реакційну суміш перемішують за температури не вище 60°C протягом 5 годин до повного знебарвлення розчину й формування твердого осаду. Потім суміш фільтрують, осад на фільтрі промивають декількома порціями етилового спирту й висушують у вакуумі за температури не вище 60°C. Виділену суміш калієвих солей фулеренаміногексанової кислоти й аміногексанової кислоти розчиняють в 100 л дистильованої води. У розчин повільно при перемішуванні додають 0,1N розчин соляної кислоти до pH 5,1. Суміш відстоюють до повного осаджування продукту, потім водний шар декантують. Осад, який представляє собою тонку суспензію твердого продукту у воді, центрифугують і промивають водою до pH 6. Осад висушують за температури не вище 60°C у вакуумній сушильній шафі.

Вихід продукту кількісний і становить 115 г.

Сполука є темно-коричневою твердою речовиною, розчинною у воді, розчинною в сумішах $CH_3CN:H_2O$ - 1:10 і ДМФА: H_2O - 1:100.

За даними термогравіметричного аналізу отримана сполука містить 10 молей H_2O . За температури 350°C відбувається інтенсивне руйнування комплексу. Залишок після розкладання містить фулерен і продукти його окиснення.

ІЧ-спектр продукту (I) має смуги поглинання, характерні для N-заміщених амінокислот: група -COOH- 1704 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} , N-H-валентні коливання 3400 cm^{-1} , N-H-деформаційні-1552 cm^{-1} , смуги поглинання C_{60} -NH-R- 1104 cm^{-1} , 930 cm^{-1} , 830 cm^{-1} .

Електронний спектр поглинання не має смуги поглинання вільного фулерену.

Елементний аналіз сполуки показує наступні співвідношення елементів: %C=72,75; %H=4,70; %N=2,32; розраховане для брутто-формули $C_{78}H_{39}O_6N_3 \cdot 10H_2O$: %C=72,38, %H=4,3, %N=3,24.

5 Кількість карбоксильних груп у продукті визначалася за реакціями із солями металів і амінами. За реакцією з азотнокислим сріблом кількісно виділений комплекс сполуки $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_5COOAg\}_3 \cdot 10H_2O$. (Встановлено: %Ag=20,88, %C=57,80, %N=2,51, %H=3,32; розраховано для: $C_{78}H_{36}O_6N_3Ag_3(10H_2O)$ - %Ag=20,00, %C=57,88, %N=2,60, %H=3,46).

10 За реакцією із трисаміном отриманий водорозчинний комплекс сполуки $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOO^-NH_3^+C(CH_2OH)_3\}_3$ (встановлено %C=64,88, %H=4,56, %N=5,08, розраховано для $C_{90}H_{72}O_{15}N_6 \cdot 10H_2O$: %C=65,2, %H=4,34, %N=5,10).

Приклад 2. Одержання гідрату N-фулерен-(трис- ω -аміноенантової кислоти) (за номенклатурою ІЮПАК - гідрат N-фулерен-(трис-7-аміногептанової кислоти) формули: $N-C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_6COOH\}_3 \cdot 8H_2O$.

15 До розчину 72 г (0,1 моля) фулерену C_{60} в 4 л о-дихлорбензолу додають 182 г (1,2 молей) тонко подрібненої безводної калійної солі ω -аміноенантової кислоти. До отриманої суспензії при перемішуванні й нагріванні не вище 80°C додають протягом 3-х годин суміш о-дихлорбензолу й метилового ефіру поліетиленгліколю 500 у співвідношенні 5:1. Реакційну суміш перемішують за температури не вище 80°C протягом 8 годин до повного знебарвлення розчину й формування
20 твердого осаду. Потім суміш фільтрують, осад на фільтрі промивають декількома порціями етилового спирту й висушують у вакуумі за температури не вище 60°C. Виділену суміш калієвих солей фулеренаміноенантової та аміноенантової кислот розчиняють в 120 л дистильованої води. До розчину повільно при перемішуванні додають 0,1Н розчин соляної кислоти до pH 5,1. Суміш відстоюють до повного осаджування продукту, потім водний шар декантують. Осад, який
25 представляє собою тонку суспензію твердого продукту у воді, центрифугують і промивають водою до pH 6. Осад висушують за температури не вище 60°C у вакуумній сушильній шафі.

Вихід продукту кількісний і становить 130 г.

Сполука є темно-коричневою твердою речовиною, розчинною у воді, розчинною у сумішах $CH_3CN:H_2O$ - 1:10 і ДМФА: H_2O - 1:100.

30 За даними термогравіметричного аналізу отримана сполука містить 8 молей H_2O . За температури 450°C відбувається інтенсивне руйнування комплексу. Залишок після розкладання містить фулерен і продукти його окиснення.

ІЧ-спектр продукту має смуги поглинання, характерні для N-заміщених амінокислот: група -COOH- 1707 cm^{-1} 1650 cm^{-1} , N-H-вал. коливання - 3400 cm^{-1} , N-H-деформаційні - 1552 cm^{-1} , смуги поглинання C_{60} -NH-R- 1104 cm^{-1} , 930 cm^{-1} , 830 cm^{-1} .

Електронний спектр поглинання має смугу поглинання при 260 нм.

Елементний аналіз продукту показує наступні співвідношення елементів: %C=73,55; %H=4,60; %N=3,18; розраховані значення для брутто-формули $C_{81}H_{45}O_6N_3(8H_2O)$ - %C=74,82, %H=4,69, %N=3,23.

40 За реакцією з азотнокислим сріблом виділена срібна сіль фулеренамінокислоти, що кількісно доводить наявність трьох амінокислотних фрагментів у складі отриманого продукту.

Приклад 3. Одержання гідрату N-фулерен-(трис-8-амінооктанової кислоти) формули: $N-C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_7COOH\}_3 \cdot 10H_2O$.

45 Проводять аналогічно до прикладу 1 тільки замість тонко подрібненої безводної калійної солі ϵ -амінокапронової кислоти (ω -аміноенантової кислоти) використовують калієву сіль амінооктанової кислоти. Аналіз отриманої сполуки доводить склад представленого комплексу.

Була вивчена противірусна активність сполуки у відношенні ВІЛ, ВПГ, вірусу грипу, а також протипухлинна активність. Сполука має високу протипухлинну й противірусну активність у відношенні всіх названих вірусів. Нижче наведені кращі приклади здійснення винаходу. У
50 наведених нижче прикладах сполука, отримана способом, описаним у прикладі 1, названа за текстом препарат № 1 (фулерен-трис-амінокапронової кислоти гідрат).

Приклад 4. Вивчення активності фулерен-трис-амінокапронової кислоти щодо вірусу імунодефіциту людини.

Дослідження проводилися в ГУ НДІ вірусології ім. Д.І.Івановського РАМН, м. Москва. До
55 завдань дослідження входило вивчення активності препарату щодо вірусу імунодефіциту людини.

До клітин додавали досліджуваний препарат та інфікували вірусом у дозі 0,01 TCID₅₀/клітину. Інкубували культури клітин при 37°C в атмосфері з 5% CO₂ і 98% вологості 4-5 днів. Результати підраховували фарбуючи клітини за допомогою барвника й світлової
60 мікроскопії: дослідження цитопатичної дії вірусу (ЦПД) і вірусіндукованого синцитійутворення

(синцитій - конгломерат декількох клітин із спільною клітинною оболонкою, яка утворилася в результаті злиття їх мембран).

Ступінь цитодеструкції оцінювали під мікроскопом за загальноприйнятою чотирехрестовою системою знаками + або - відповідно до кількості загиблених клітин у кожній із чотирьох комірок, які відповідають одному досліджуваному показнику.

++++ - 100%^a загибель клітин у чотирьох комірках, використаних у досліді на одне розведення

+++ - 75%^a загибель клітин у кожній із чотирьох комірок,

++ - 50%^a загибель клітин у кожній із чотирьох комірок,

+ - 25%^a загибель клітин у кожній із чотирьох комірок,

+- - початок дегенерації,

- - відсутність цитодеструкції.

Результати дослідження представлені в таблицях 1-2.

Отримані дані (таблиця 1, 2) показали, що препарат № 1 проявляє протівірусну активність щодо вірусу імунodefіциту людини типу 1 у концентрації 1-10 мкг/мл. ЕК₅₀ (50%-ефективна концентрація) запропонованого препарату 5,0 мкг/мл.

Приклад 5. Вивчення активності фулерен-трис-амінокапронової кислоти у відношенні до вірусу грипу.

Дослідження проводилися в ГУ НДІ вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН, м. Москва. До завдань дослідження входило вивчення протівірусної активності препарату в культурі клітин MDCK щодо вірусу грипу A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl.

Препарат розводили в диметилсульфоксиді (ДМСО) (5 мг субстанції + 0,5 мл ДМСО) з наступним додаванням 4,5 мл середовища для культур клітин MEM, одержуючи таким чином стік у концентрації 1,0 мкг/мл. Надалі проводили розведення стоків середовищем MEM до робочих концентрацій 6,5 мкг/мл - 12,5 - 25,0 - 50,0 - 100 мкг/мл.

Визначення протівірусної активності речовини проводили за зниженням репродукції вірусу грипу в культурі клітин MDCK, яка виявляється ІФА.

З цією метою клітини MDCK вирощували в 96-коміркових планшетах до повного моношару, відмивали від ростового середовища й вносили речовини у дворазовій концентрації в 100 мкл середовища MEM. Інфікування вірусом у робочій дозі 100-1000 TCID₅₀ проводили у двох режимах: через 2 години після внесення речовин і одномоментно. Планшети інкубували в термостаті із CO₂ протягом 24 годин при 37°C. Після інкубації середовище видаляли й клітини фіксували 80% ацетоном в PBS протягом 15 хвилин, добре висушували й здійснювали постановку ІФА, проводячи послідовно адсорбцію специфічних реагентів - моноклональних антитіл, кон'югату й субстрату (ортофенілендіамін). Реакцію враховували за оптичною щільністю при 492 нМ на спектрофотометрі фірми «Біоком». Кожне розведення вірусу досліджували в 3-х повторях, для яких обчислювали середнє значення оптичної щільності (ОЩ). Відсоток інгібування визначали, як відношення між різницею ОЩ досліді й ОЩ клітинного контролю, розділене на різницю ОЩ вірусного контролю й ОЩ клітинного контролю, помножене на 100%. Виходячи із отриманих даних були визначені значення мінімальної концентрації речовини, яка викликає 50,0% інгібування вірусної репродукції (MIK₅₀).

Оцінку придушення репродукції вірусу грипу A(H1N1) проводили в 3-х дослідіах за різної множинності зараження. Результати представлені в табл. 3 (протоколи 3-х дослідів) і табл. 4 (середні значення отриманих результатів 3-х дослідів).

Як видно з таблиці 4, найбільшу активність із зниження репродукції вірусу грипу в культурі клітин MDCK виявила серія препарату 1. Чітко прослідковується залежність ступеня репродукції й концентрації препарату: з підвищенням концентрації - знижується репродукція вірусу. Крім того, значних відмінностей у показниках за різних режимів інфікування (через 2 години після внесення препарату або одномоментно) не було відзначено. При цьому показники мінімальної інгібуючої репродукції вірусу в 2 рази концентрації (MIK₅₀), склали: у режимі внесення препарату за 2 год. - 9,5 мкг/мл і при одномоментному внесенні - 12,5 мкг/мл. Розрахунки проведені за графічною побудовою отриманих даних.

Таким чином, отримані результати вивчення активності різних серій препарату № 1 щодо вірусу грипу A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl виявили високу активність придушення його репродукції в культурі клітин MDCK серією 1, з середньою активністю - серії 2. При цьому режими внесення препаратів за 2 години до інфікування або одночасно з інфікуванням не впливали на їхню активність у культурі клітин MDCK.

Приклад 6. Вивчення протівірусної активності фулерен-трис-амінокапронової кислоти на моделі грипозної пневмонії мишей.

Дослідження виконувалися в центрі хімії лікарських засобів (ЦХЛЗ - ВНИХФІ), м. Москва.

У роботі використовували препарат № 1 у вигляді темно-коричневого порошку. Для перорального застосування готували необхідні дози препарату, розчиняючи наважку в 1% розчині крохмалю, звареного на воді. Для внутрішньоочеревинно й внутрішньом'язового застосування наважку препарату № 1 розчиняли в 1,5% розчині диметилсульфоксиду.

У роботі був використаний вірус грипу A/Aichi/2/69 (H3N2), адаптований до мишей. Даний вірус широко використовується для визначення ефективності протівірусних препаратів на моделі грипозної пневмонії мишей і був отриманий з музею вірусних штамів і клітинних культур ГУ НДІ вірусології РАМН. Для підготовки інфікуючого матеріалу мишей заражали інтраназально алантоїсним вірусом, після того, як з'являлись ознаки хвороби їх забивали й за стерильних умов одержували гомогенат легеневої тканини. Далі цей гомогенат використовували для зараження 10-денних ембріонів курчат, з яких одержували алантоїсний вірус і після титрування на мишах його використовували для інфікування тварин.

Білих безпородних мишей (самки) масою 12-14 г одержували з розплідника «Андрєєвка» (Московська обл.) і розміщували на стандартному раціоні за регламентованих умов віварію.

Попередньо зважені миші (самки нелінійні, середня вага 12-14 г) інфікувалися інтраназально під легким ефірним наркозом вірусом грипу A/Aichi/2/69 (H3N2) (10ЛД₅₀ в 100 мкл). У попередньому досліді було проведено визначення ЛД₅₀ шляхом титрування алантоїсного вірусу на таких же мишах, які потім були використані в основному досліді. Була використана наступна схема лікування досліджуваним препаратом: за 24 години до інфікування, за 1 годину до інфікування, через 24 години й далі 1 раз на день через 24 години протягом 5 днів. Для перорального введення використовували одноразовий інсуліновий шприц зі спеціальною голкою (лаваж), кожну дозу вводили в об'ємі 100 мкл. Для внутрішньоочеревинного й внутрішньом'язового лікування також кожну дозу вводили в об'ємі 100 мкл. Група вірусного контролю складалась із 10 мишей, інфікованих вірусом, але яких не лікували препаратами. Також у досліді були дві групи по 10 неінфікованих мишей, яким вводили внутрішньоочеревинно й внутрішньом'язово по 100 мкл 1,5% DMSO, який використовувався як розчинник препаратів. В інших групах також початково було по 10 тварин. За пролікованими й контрольними тваринами велось щоденне спостереження, у перші 5 днів після інфікування миші зважувалися щодня, далі - через день. Хіміотерапевтичну активність препарату № 1 на моделі грипозної пневмонії мишей оцінювали за трьома критеріями: показник захисту від смертельної вірусної інфекції, збільшення середньої тривалості життя й зменшення втрати ваги в групах тварин, які були проліковані препаратом у порівнянні з контрольною групою.

Лікування препаратом № 1 було ефективним, зменшуючи смертність мишей від грипозної пневмонії й втрату ними ваги, і збільшуючи середню тривалість життя у порівнянні з вірусним контролем. Ефективність даного лікування залежала від дози препарату й способу лікування. Ефективність перорального лікування фулерен-трис-амінокапроною кислотою гідрат збільшувалася зі збільшенням дози препарату. Пероральне лікування препаратом № 1 було ефективним, збільшуючи середню тривалість життя в 1,6-1,7 разів. Найбільш ефективним за всіма трьома параметрами (показник захисту від смертності, середня тривалість життя й втрата ваги) було лікування фулерен-трис-амінокапроною кислотою гідрат внутрішньом'язово, яке в дозах 100 і 200 мг/кг/день запобігало загибелі 70-80% заражених тварин і втрату ними ваги, а також збільшувало тривалість їх життя майже в 2 рази.

Внутрішньоочеревинне лікування фулерен-трис-амінокапроною кислотою було ефективним тільки в дозах 50 і 100 мг/кг/день. Загибель тварин, значне зниження середньої тривалості життя й ваги мишей при внутрішньоочеревинному лікуванні їх препаратом № 1 у дозі 200 мг/кг/день дають підставу вважати, що дана доза при цьому способі введення є токсичною для інфікованих мишей. Результати представлені в таблицях 5-6.

Приклад №7. Вивчення протективної активності фулерен-трис-амінокапроною кислоти при експериментальній летальній грипозній інфекції в білих мишей, викликаних вірусами різного походження.

Дослідження виконувалися в науково-дослідному інституті грипу, м. Санкт-Петербург.

У роботі використовували препарат № 1 у вигляді чорного дрібнодисперсного порошку. Наважки препарату були розчинені в середовищі для клітинних культур Ігла MEM (Біолот, Санкт-Петербург, кат. № 1.3.3). З отриманого розчину були приготовлені серії розведень на середовищі MEM для визначення протівірусної активності зразків у досліді на тваринах.

Як референс-препарати використовували Ремантадин (1-(1-адамантил)-аміноетил гідрохлорид, Aldrich Chem. Co., Milw., WI, cat. № 39.059-3) і Таміфлю (Етил(3R,4R,5S)-4-ацетамідо-5-аміно-3-(1-етилпропокси)-1-карбоксилат фосфат, Hoffmann Laroche, Швейцарія).

Віруси. У роботі були використані адаптовані для мишей віруси грипу наступних штамів:

-A/Swine/1976/31 (H1N1) - свинячого походження;

-A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) - людського походження (ремантадин-стійкий);

-A/Владивосток/2/09 (H1N1) - людського походження (Таміфлю-стійкий). Віруси пасерували в алантоїсні порожнини 10-12 денних ембріонів курчат протягом 48 годин при 36°C. Штам A/Владивосток/2/09 (H1N1) попередньо адаптували для мишей шляхом трьох пар почергових пасажів на тваринах і в ембріонах курчат.

Для зараження тварин була використана алантоїсна рідина ембріонів курчат, яка утримує вірус. З неї готували серію 10-разових розведень на фізіологічному розчині, після чого інфекційна активність вірусу в матеріалі, яким проводили зараження, була визначена в окремому експерименті за допомогою титрування за летальністю на тваринах. Титр вірусу розраховували методом Ріда й Менча (Am.J.Hyg., 1938, 27:493-497).

Білих безпородних мишей (самки) масою 14-16 г одержували з розплідника «Раполово» (Ленінградська обл.) і розміщували на стандартному раціоні за регламентованих умов віварію НДІ грипу РАМН. Відбір тварин у групи дослідів проводили методом випадкової вибірки. До початку дослідів тварини перебували під спостереженням 2 тижня.

Досліджувані препарати вводили тваринам внутрішньоочередово в об'ємі 0,2 мл у наступних дозах: Препарат №1 - 300, 100 і 30 мг/кг, Ремантадин - 50 мг/кг, Таміфлю - 20 мг/кг ваги тварин. Препарати вводили за лікувально-профілактичною схемою: за 24 години й 1 годину до зараження й через 24, 48 і 72 годин після зараження. Як плацебо контрольній групі тварин вводили фізіологічний фосфатний буфер. Як негативний контроль використовували інтактних тварин, які утримувалися за тих же умов, що й дослідні групи.

Віруси вводили тваринам інтраназально під легким ефірним наркозом в дозах 1 і 10 LD₅₀. У кожну групу спостереження брали по 25 мишей. На 3 день після зараження 10 тварин з кожної групи забивали, розтинали й ізолювали легені. Із цих 10 легенів 5 використовували для виділення вірусу (заморожували й зберігали при - 20°C до постановки відповідних експериментів), решту 5 фіксували 10% формаліном і використовували для гістологічного аналізу (див. нижче).

Спостереження за тваринами, які залишилися, здійснювали протягом 14 днів, тобто строку, протягом якого при експериментальному грипі відбувається смертність тварин. Щодня фіксували смертність тварин у контрольних і дослідних групах. Виходячи із отриманих показників смертності в кожній групі розраховували відсоток смертності (М, відношення числа тварин, які загинули за 14 днів до загального числа заражених тварин у групі), індекс захисту (ІР, відношення різниці відсотків смертності в контрольній і дослідній групах до відсотка смертності в контрольній групі) і середню тривалість життя тварин (DL) з розрахунку 14 днів спостереження.

Проводили розтин тварин, які вижили до 15 доби після інфікування й візуально оцінювали величину вогнищ постгрипозної пневмонії в легенях. Розмір вогнищ виражали у відсотках від загальної поверхні легенів.

Клінічні ознаки захворювання були типовими для грипозної інфекції й включали ускладнене дихання, атаксію, тремор, а також зниження споживання корму й води і як наслідок, ваги тварин.

Дані щодо динаміки смертності тварин у контрольних і дослідних групах приведені в табл. 7-9.

Як видно із представлених результатів, вірус грипу викликав летальну інфекцію в білих мишей, яка супроводжується загибеллю тварин починаючи з 3-4 доби після інфікування залежно від дози вірусу. Такий показник, як тривалість життя тварин, був пов'язаний з використаною дозою вірусу оберненою залежністю. Ремантадин, який використовували у досліді як референс-препарат, виявляв при цій інфекції досить помірну протективну дію, яка проявлялась деяким зниженням смертності в дослідних групах у порівнянні з контролем (індекс захисту 13-29 %) і незначним збільшенням тривалості життя (на 1,1-1,6 доби залежно від дози вірусу). Отримані дані, таким чином, узгоджуються з раніше отриманими результатами експериментів *in vitro* та *in vivo*, які свідчать про нечутливість використаного штаму вірусу до ремантадину. Деякий протективний ефект у цьому випадку можна пояснити антитоксичною дією препарату.

У той же час препарат порівняння Таміфлю проявляв виражений захисний ефект, як знижуючи смертність у групах мишей, які одержували лікування (приблизно на 70% у порівнянні з контролем), так і збільшуючи середній строк життя тварин (на 2-6 доби). Таким чином, використаний вірус виявився стійким до ремантадину, однак чутливим до Таміфлю.

При аналізі отриманих даних було виявлено, що досліджений зразок препарату за своїми протективними властивостями наближався до препарату порівняння - Таміфлю (таблиця 7).

Отримані результати були підтверджені при використанні моделі грипозної пневмонії, спричиненої двома іншими штамми вірусу грипу. Дані цих дослідів приведені в таблицях 8-9.

Як видно з наведених даних, активність хіміопрепаратів відносно використаних вірусів суттєво різнилася. Так, відносно штаму грипу A/Владивосток/2/09 етиотропний препарат Таміфлю виявився неактивним. Таким чином, раніше отримані дані про стійкість цього ізоляту до Таміфлю були підтверджені у дослідах на тваринах. У той же час активність досліджуваного

препарату проти цього штаму виявилася досить високою, що, безсумнівно, слід розглядати як перевагу препарату.

Показник активності досліджуваного препарату (індекс захисту - продовження тривалості життя) склав - 21-72 % і 0,8 - 4,4 доби., залежно від використаного штаму вірусу, інфікуючої дози та дози препарату.

Для дослідження впливу препарату № 1 на реплікативну активність вірусів грипу в тканині легень інфікованих тварин на 3 добу після зараження з легень тварин були приготовлені гомогенати, в яких потім визначали інфекційний титр вірусу в культурі клітин. Дані про рівень реплікації модельних вірусів грипу в організмі тварин наведені в табл. 10.

Як можна бачити із представлених результатів, усі три використані віруси були здатні ефективно реплікуватися в легеневій тканині мишей, досягаючи до 3 доби титрів 3,4-6,4 $\log_{10} \text{EID}_{50}/20 \text{ мг}$ залежно від використаного штаму вірусу та інфікуючої дози. Застосування хіміопрепаратів - досліджуваного препарату й препаратів порівняння - обмежувало розмноження вірусу в різному ступені. Так, ремантадин не суттєво (на 2-3 порядки) знижував інфекційну активність чутливих вірусів A/Swine/1976/31 і A/Владивосток/2/09, однак не проявляв достовірної інгібуючої активності у відношенні ремантадин-стійкого штаму A/Puerto Rico/8/34. Таміфлю виявився активним проти вірусів A/Swine/1976/31 і A/Puerto Rico/8/34. У той же час при тестуванні його на моделі стійкого штаму A/Владивосток/2/09 було виявлене деяке зниження інфекційних титрів вірусу, однак відмінності від контролю були недостовірними.

Препарат дослідження проявляв істотну інгібуючу активність проти всіх досліджених вірусів. Проте її рівень не перевищував, а виявився співрозмірним з активністю препаратів порівняння - Ремантадину й Таміфлю. При використанні вірусів, стійких до хіміопрепаратів, активність досліджуваного препарату була значно вищою, ніж активність Таміфлю проти озельтамівір-стійкого штаму A/Владивосток/2/09, і вищою, ніж активність ремантадину проти ремантадин-стійкого штаму A/PR/8/34.

При вивченні особливостей морфогенезу експериментальної грипоної інфекції при лікувально-профілактичному введенні препарату № 1 у дозі 300 мг/кг було відзначено, що морфогенез інфекційного процесу в легенях тварин, які одержували препарат, багато в чому відрізнявся від морфологічних змін у легенях контрольних тварин. Основна відмінність на 3 добу після інфікування стосувалася характеру запального ексудату і полягала в тому, що за однакової його інтенсивності в ньому практично не відзначалося клітин у стадії розпаду, характерних для гострої стадії грипоної пневмонії. Клітинний компонент ексудату був представлений винятково інтактними нейтрофілами, лімфоцитами й макрофагами. Крім того, серозний і геморагічний компоненти ексудату були також виражені слабше. Клітини бронхіального епітелію виглядали менш пошкодженими, ніж у контрольних тварин. Самі вогнища запалення займали меншу в порівнянні з контролем площу.

Ті ж тенденції відзначалися й на стадії постгрипоної пневмонії. Вогнища ураження легень були більш суттєво локалізовані за розмірами, при морфологічному дослідженні була виявлена помірна метаплазія епітелію й інфільтрація інтерстицію інтактними нейтрофілами й круглоклітинними елементами. Слід зазначити, що ефект препарату спостерігався при зараженні тварин кожним із трьох досліджених вірусів незалежно від їхньої чутливості або стійкості до препаратів порівняння.

Додатковим критерієм протективної дії препарату № 1 служила оцінка розмірів вогнищ хронічних уражень легень у тварин. Результати цього тесту наведені в табл. 11.

Як видно з наведених результатів, усі три віруси індукували формування в легенях стійких вогнищ хронічних уражень, які виявляються візуально у тварин, що вижили, на 15 добу після інфікування. Препарати порівняння ремантадин і Таміфлю - вірогідно знижували розміри вогнищ постгрипоної пневмонії, спричиненої чутливими до них вірусами, і були неактивними у випадку стійких штамів. У той же час препарат № 1 вірогідно знижував цей показник незалежно від використаного вірусу.

Таким чином, показано, що за досліджуваних концентрацій (300-30 мг/кг) препарат № 1 проявляє дозозалежну протективну активність на використаних моделях. Ця активність проявлялася в наступних показниках:

- 6-200-разове зниження інфекційних титрів вірусу в тканині легень інфікованих тварин;
- продовження тривалості життя заражених тварин (на 0,1-4,4 доби залежно від використаного штаму, дози вірусу, партії синтезу й дози препарату);

- зниження специфічної смертності в групах досліду на 7-72 % залежно від використаного штаму, дози вірусу, партії синтезу й дози препарату;
 - зниження в 2-4 рази середнього розміру вогнищ хронічної постгрипозної пневмонії.

За сукупністю показників протективна активність препарату № 1 за деяких доз виявилася співрозмірною з активністю препарату порівняння - ремантадином.

Отримані дані свідчать про наявність у препараті № 1 високої протигрипозної активності, у тому числі відносно штамів свинячого походження, а також відносно вірусів, стійких до застосовуваних у клініці протигрипозних препаратів Ремантадину й Таміфлю.

Приклад 8. Дослідження протипухлинної активності препарату фулерен-трис-амінокапронової кислоти на моделях солідної й асцитної форм карциноми Ерліха у білих мишей.

Завданнями даного дослідження були:

- дослідження впливу препарату № 1 на динаміку росту асцитної пухлини при внутрішньоочеревинному введенні ракових клітин;
- дослідження дії препарату № 1 на динаміку росту солідної пухлини, дослідження впливу препаратів на морфологію й морфометричні показники солідної форми карциноми Ерліха;
- дослідження дії препарату № 1 на апоптотичну активність клітин асцитної форми карциноми Ерліха.

У роботі використовували водний розчин препарату № 1 у двох дозах - у концентраціях 30 і 10 мг/кг. Тваринам вводили підшкірно 0,2 мл розчину кожної з концентрацій за 24 години до інокуляції й далі щодня протягом усього строку експерименту. Кінцеві концентрації препарату склали 300 і 100 мг/кг ваги.

Як препарату порівняння використовували Цисплатин - протипухлинний препарат, який застосовують у практиці онкологічної терапії людини. Цисплатин вводили одноразово на 2 добу після перевивання пухлини, враховуючи його високу токсичність. Кінцева концентрація Цисплатину становила 5 мг/кг ваги.

Експерименти проводилися на білих безпородних мишах середньою вагою 20 ± 3 г (тваринницька ферма Раполово, Лен. область).

Клітини карциноми Ерліха були отримані з музею клітинних ліній НДІ онкології й культивовані в черевній порожнині білих мишей. Для цього 0,2 мл клітинної суспензії вводили тваринам внутрішньоочеревинно. Через 7-10 днів після інокуляції тварин забивали, асцитну рідину збирали через прокол очеревини, розводили фізіологічним розчином в 10 разів і поміщали на лід.

З метою моделювання солідної форми карциноми Ерліха тваринам вводили підшкірно в область правого стегна 0,2 мл клітинної суспензії протягом 40 хвилин після збору асцитної рідини, поміщеної на лід. У ході досліду протягом 28 днів, двічі на тиждень починаючи з 8 доби після інокуляції, проводили вимірювання пухлинних вузликів за допомогою мікрометра. Розмір пухлини вираховували множенням половини довжини вузлика на квадрат ширини й виражали в мм^3 . Фіксували також смертність тварин у контрольних і дослідних групах. На 29 день після перевивання тварин забивали.

Для вивчення впливу препаратів на асцитну форму пухлини тваринам вводили внутрішньоочеревинно 0,2 мл клітинної суспензії протягом не більше ніж 40 хвилин після збору вихідної асцитної рідини. У ході досліду контролювали вагу мишей як показник нагромадження асцитної рідини в черевній порожнині. Спостереження за тваринами здійснювали протягом 16 днів. На 17 день після перевивання тварин забивали.

Дані про динаміку росту пухлин й смертності тварин з асцитною формою карциноми в контрольній і дослідних групах представлені в таблиці 12.

Як видно з наведених результатів, інокуляція клітин пухлин у черевну порожнину тварин викликала швидке нагромадження в порожнині асцитної рідини. Використання лікувальних препаратів мало виражений терапевтичний ефект і призводило до гальмування нагромадження асциту.

Лікування тварин запропонованим препаратом і препаратом порівняння - Цисплатином - призводило до істотного гальмування динаміки збільшення ваги тварин. На пізніх стадіях розвитку процесу ці відмінності досягали статистично значимих величин.

Вплив препарату на процеси апоптозу в клітинах середнього розміру й гранулярності асцитної форми карциноми Ерліха в білих мишей наведено в таблицях 13-14.

Як впливає з представлених результатів, лише невелика частина клітин в обох пухлинних субпопуляціях перебувала в стадії зворотного або незворотного апоптозу в контрольних тварин. Застосування цисплатину приводило до різкого зростання частки клітин у ранній стадії апоптозу серед імунних клітин (табл. 13) і пізнього апоптозу й некрозу - серед клітин пухлин (табл. 14).

Препарат № 1 діяв на рівні Цисплатину: подібно до препарату порівняння, він стимулював ранній апоптоз в імунних клітинах і пізній апоптоз - у субпопуляції клітин пухлин. Живих (AnV 7AAD) серед клітин пухлин після впливу препарату практично не залишалося. За рівнем індукції некрозу в клітинах пухлини він навіть перевершував Цисплатин (30,2 % проти 26,6 % для Цисплатину). Механізм протипухлинної дії препарату № 1, як і дії Цисплатину, полягав в індукуванні апоптотичних процесів у пухлинних і імунних клітинах, які утворюють асцит. Процес апоптозу йшов вибірково й вірогідно швидше в клітинах пухлини, ніж в нейтрофілах та лімфоцитах, які знаходяться в асцитній рідині.

Результати цитофлюорометричного аналізу дозволяють говорити про вибірковість дії препарату порівняння - Цисплатину - на клітини пухлини в порівнянні з нормальними лейкоцитами, також присутніми в складі асцитної рідини. Через той же самий термін після введення препарату нормальні клітини, які становлять фракцію середнього розміру й гранулярності - нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити тощо - перебували в стадії раннього апоптозу, а пухлинні клітини - пізнього (необоротного) апоптозу або некрозу.

Дані про динаміку розвитку солідної пухлини під дією досліджуваного препарату й препарату Цисплатин у порівнянні з контрольною групою тварин представлені в таблиці 15.

Як видно із представлених результатів, усі використані препарати тією чи іншою мірою гальмували ріст пухлини протягом усього досліджу. У цілому, найбільш вираженою протипухлинну дію проявляв Цисплатин. Достовірне інгібування росту пухлини відзначалося при його застосуванні аж до 17 доби після перевивання.

У той же час обидві серії препарату також проявляли дозозалежний антитуморогенний ефект. Достовірне зниження розмірів пухлини й гальмування її росту відзначалося до 8 доби експерименту. Надалі препарати також стримували ріст пухлини на всіх строках дослідження, хоча відмінності з контролем і не досягали статистичної вірогідності. У цілому слід зазначити препарат № 1 у дозі 100 мг/кг ваги як найбільш близький за ефективністю до Цисплатину практично на всіх строках експерименту.

Отримані результати не дозволяють розглядати препарат № 1 як провідний препарат для спрямованої терапії онкологічної патології. Однак виходячи з цих даних можна говорити про нього як про перспективний для подальшої розробки засіб комплексної терапії для спільного застосування з іншими протипухлинними препаратами, особливо при асцитних формах пухлин.

Фармацевтичні готові форми запропонованого препарату можуть застосовуватися орально, парентерально (включаючи підшкірні ін'єкції, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньосідничні ін'єкції або вливання), шляхом інгаляційного розпилення або ректально для терапії або профілактики вірусних інфекцій таких, як ВІЛ, герпес, грип різного походження, а також як протипухлинних препаратів для проведення комплексної терапії.

Сполуки змішують зі звичайними фармацевтичними носіями й ексципієнтами й використовують у формі таблеток, капсул, свічок, мазей, емульсій, розчинів, спреїв. Слід зазначити, що для приготування розчинів, спреїв, а також м'яких лікарських форм (мазей, свічок) сполуки попередньо розбавляють у суміші ДМСО з водою.

Лікування інфекційних захворювань шляхом впливу фармацевтично прийнятних доз сполук формули II, який здійснюється одночасно на кілька вірусів (у випадку мікст-інфекцій) і торкається різних стадій реплікації вірусу. Показано, що лікування супроводжується зниженням стресового ефекту на введення препарату, посиленням антиоксидантного захисту організму від інфекцій, виведенням з організму токсинів. Інтоксикація організму характерна для протікання ряду вірусних інфекцій і визначає тяжкість захворювання.

Можливі комбінації сполук формули II з іншими антивірусними агентами, імуномодуляторами, протиінфекційними агентами або вакцинами в різних комбінаціях з будь-якими фармацевтичними сполуками, призначеними для лікування.

Таблиця 1

Дослідження цитотоксичності запропонованого препарату на моделі лімфобластоїдних клітин людини

Умови досліджу, концентрація, мкг/мл		Життєздатність клітин, %	Кількість клітин $\times 10^3$ /мл
Контроль клітин		96	833
Препарат № 1	0,5	95	633
	1,0	94	599
	5,0	96	530
	10,0	92	500
	100	70	433

Таблиця 2

Дослідження протівірусної активності препарату № 1 на моделі клітин людини, інфікованих ВІЛ-1

Умови досліджу	Концентрація, мкг/мл	Життєздатність клітин, %	Кількість клітин $\times 10^3$ /мл	ЦПЕ/синцитії(+)
Контроль клітин	0	96	833	0
Контроль вірусу	0	20	83,5	4,0
Препарат № 1	0,5	27	133,2	4,0
	1,0	75	320,4	2,0
	5,0	92	480,0	0
	10	95	529,3	0

Таблиця 3

Результати вивчення активності препарату № 1 щодо вірусу грипу A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl

Концентрації препаратів (мкг/мл)	Внесення препарату	Зниження (%) репродукції вірусу грипу в культурі клітин MDCK стосовно контролю в присутності серій запропонованого препарату
6,25	за 2 години до інфікування	24,0 - 80,0 - 0
	одномоментно з інфікуванням	54,0 - 21,0
12,5	за 2 години до інфікування	45,0 - 100 - 6,0
	одномоментно з інфікуванням	78,0 - 37,0
25,0	за 2 години до інфікування	40,0 - 100 - 43,0
	одномоментно з інфікуванням	88,0 - 35,0
50,0	за 2 години до інфікування	47,0 - 77,0 - 69,0
	одномоментно з інфікуванням	96,0 - 43,0
100,0	за 2 години до інфікування	72,0 - 88,0 - 66,0
	одномоментно з інфікуванням	69,0 - 76,0

Таблиця 4

Результати вивчення активності препарату № 1 щодо вірусу грипу A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, середні показники

Концентрації препаратів (мкг/мл)	Внесення препарату	Зниження (%) репродукції вірусу грипу в культурі клітин MDCK стосовно контролю в присутності серій пропонованого препарату
6,25	за 2 години до інфікування	35,0
	одномоментно з інфікуванням	38,0
12,5	за 2 години до інфікування	50,0
	одномоментно з інфікуванням	58,0
25,0	за 2 години до інфікування	61,0
	одномоментно з інфікуванням	62,0
50,0	за 2 години до інфікування	64,0
	одномоментно з інфікуванням	70,0
100,0	за 2 години до інфікування	75,0
	одномоментно з інфікуванням	73

Таблиця 5

Ефективність фулерен-трис-амінокапронової кислоти гідрат на моделі грипозної інфекції в мишей

Доза препарату	Дані на 16 день спостереження			Середня тривалість життя (дні)**
	Вживання абсолютне (які вижили/загальне)	Смертність (%)	Показник захисту від смертності (%)	
Фулерен-трис-амінокапронової кислоти гідрат перорально				
100 мг/кг/день	5/10	50	40	10,4 (2-7 д., 1-9 д., 1-10 д.)
200 мг/кг/день	7/10	30	60	13,0 (1-7 буд., 1-10 д., 1-11 д.)
Фулерен-трис-амінокапронової кислоти гідрат внутрішньом'язово				
50 мг/кг/день	6/10	40	50	12,4 (1-7 д., 1-9 д., 2-11 д.)
100 мг/кг/день	8/10	20	70	13,5 (1-8 д., 1-9 д.)
200 мг/кг/день	9/10	10	80	14,4 (1-10 д.)
1,5% розчин DMSO	10/10	0		>16
Фулерен-трис-амінокапронової кислоти гідрат внутрішньоочеревинно				
50 мг/кг/день	5/10	50	40	11,5 (1-5 д., 1-7 д., 3-11 д.)
100 мг/кг/день	5/10	50	40	11,0 (3-7 д., 1-8 д., 1-11 д.)
1,5% розчин DMSO	10/10	0		>16
Вірусний контроль (10 LD ₅₀)	1/10	90		7,3 (5-7 д., 4-8 д.)

Примітка:

5 * - схема лікування: за 24 і 1 години до зараження, далі через 24, 48, 72 і 96 годин після зараження

** Середню тривалість життя визначали за формулою $\sum f(d-1)/n$, де f-кількість мишей, які загинули на день d (миші, які вижили, включені в f і d у цьому випадку дорівнює 16), n-кількість мишей у групі

Таблиця 6

Зміна ваги тварин, заражених вірусом грипу A/Aісі/2/69, яких лікували препаратом № 1

Доза препарату	Зміна ваги в % по днях після інфікування								
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	7 день	9 день	11 день	13 день
Фулерен-трис-амінокапронова кислота перорально									
100 мг/кг/день	+12	+17	+23	+25	+24	+21	+23	+34	+44
200 мг/кг/день	+15	+20	+23	+25	+24	+22	+25	+45	+57
Фулерен-трис-амінокапронова кислота внутрішньом'язово									
50 мг/кг/день	+9	+14	+21	+26	+30	+27	+38	+64	+74
100 мг/кг/день	+13	+17	+23	+28	+31	+39	+65	+71	+82
200 мг/кг/день	+11	+20	+26	+35	+39	+43	+51	+62	+70
Фулерен-трис-амінокапронова кислота внутрішньоочеревинно									
50 мг/кг/день	+11	+17	+22	+25	+28	+35	+41	+67	+77
100 мг/кг/день	+9	+15	+19	+21	+21	+27	+37	+50	+82
Вірусний контроль	+18	+16	+9	+1	-8	+3	+56	+72	+74

Таблиця 7

Протективна активність фулерен-трис-амінокапронової кислоти на моделі експериментальної летальної грипозної пневмонії, спричиненої ремантадин-стійким вірусом грипу A/Puerto Rico/8/34(H1N1)

Препарат, доза	Доза вірусу, LD ₅₀	Кількість тварин у групі	Кількість тварин, що вижили	Середня тривалість життя (СТЖ), діб.	Смертність, %	Індекс захисту, %	Збільшення СТЖ, діб.
1	2	3	4	5	6	7	8
Препарат № 1, 300 мг/кг	10	14	8	11,3	42,9	49,4	3,2
	1	15	12	13,7	20,0	57,1	1,3
	Сума доз	29	20	12,5	31,0	51,7	2,2
Препарат № 1, 100 мг/кг	10	15	6	11,3	60,0	29,1	3,2
	1	15	12	13,9	20,0	57,1	1,6
	Сума доз	30	18	12,6	40,0	37,8	2,2
Препарат № 1, 30 мг/кг	10	15	4	10,4	73,3	13,3	2,3
	1	14	9	13,3	35,7	23,5	1,0
	Сума доз	29	13	11,8	55,2	14,2	1,4
Ремантадин	10	15	4	9,7	73,3	13,3	1,6
	1	15	10	13,5	33,3	28,6	1,1
	Сума доз	30	14	11,6	53,3	17,0	1,2
Таміфлю	10	15	11	13,5	26,7	68,5	5,5
	1	13	11	14,4	15,4	67,0	2,1
	Сума доз	28	22	13,9	21,4	66,7	3,6
Контроль вірусу	10	13	2	8,1	84,6	---	0,0
	1	15	8	12,3	46,7	---	0,0
	Сума доз	28	10	10,4	64,3	---	0,0

Таблиця 8

Протективна активність фулерен-трис-амінокапронової кислоти на моделі експериментальної летальної грипоznої пневмонії, спричиненої вірусом грипу A/swine/1976/31 (H1N1)

Препарат, доза	Доза вірусу, LD ₅₀	Кількість тварин у групі	Кількість тварин, що вижили	Середня тривалість життя (СТЖ), діб	Смертність, %	Індекс захисту, %	Збільшення СТЖ, діб.
1	2	3	4	5	6	7	8
Препарат № 1, 300 мг/кг	10	14	8	11,0	42,9	53,8	4,4
	1	14	11	13,6	21,4	59,8	3,0
	Сума доз	28	19	12,3	32,1	55,6	3,7
Препарат № 1, 100 мг/кг	10	13	6	10,3	53,8	42,0	3,7
	1	15	11	13,1	26,7	50,0	2,5
	Сума доз	28	17	11,8	39,3	45,7	3,1
Препарат № 1, 30 мг/кг	10	15	4	8,9	73,3	21,0	2,4
	1	15	9	12,3	40,0	25,0	1,7
	Сума доз	30	13	10,6	56,7	21,7	1,9
Реман-тадин	10	15	9	11,8	40,0	56,9	5,2
	1	15	13	14,3	13,3	75,0	3,7
	Сума доз	30	22	13,1	26,7	63,2	4,4
Таміфлю	10	13	8	11,0	38,5	58,6	4,4
	1	13	11	13,5	15,4	71,2	2,9
	Сума доз	26	19	12,2	26,9	62,8	3,6
Контроль вірусу	10	14	1	6,6	92,9	---	0,0
	1	15	7	10,6	53,3	---	0,0
	Сума доз	29	8	8,7	72,4	---	0,0

Таблиця 9

Протективна активність фулерен-трис-амінокапронової кислоти на моделі експериментальної летальної грипоznої пневмонії, спричиненої озельтамівір-стійким вірусом грипу A/Владивосток/02/09 (H1N1)

Препарат, доза	Доза вірусу, LD ₅₀	Кількість тварин у групі	Кількість тварин, що вижили	Середня тривалість життя (СТЖ), діб.	Смертність, %	Індекс захисту, %	Збільшення СТЖ, діб.
1	2	3	4	5	6	7	8
Препарат № 1, 300 мг/кг	2	13	10	13,8	23,1	61,5	2,4
	0,4	13	12	14,5	7,7	71,8	1,4
	Сума доз	26	22	14,2	15,4	64,1	1,8
Препарат № 1, 100 мг/кг	2	12	8	13,3	33,3	44,4	1,9
	0,4	10	8	14,0	20,0	26,7	0,8
	Сума доз	22	16	13,6	27,3	36,4	1,3
Препарат № 1, 30 мг/кг	2	12	7	13,2	41,7	30,6	1,8
	0,4	13	11	14,2	15,4	43,6	1,0
	Сума доз	25	18	13,7	28,0	34,7	1,4
Таміфлю	2	10	5	11,7	50,0	16,7	0,3
	0,4	9	7	13,4	22,2	18,5	0,3
	Сума доз	19	12	12,5	36,8	14,0	0,2
Ремантадин	2	13	12	14,6	7,7	87,2	3,2
	0,4	13	13	15,0	0,0	100,0	1,8
	Сума доз	26	25	14,8	3,8	91,0	2,5
Контроль вірусу	2	10	4	11,4	60,0	---	0,0
	0,4	11	8	13,2	27,3	---	0,0
	Сума доз	21	12	12,3	42,9	---	0,0

Таблиця 10

Інфекційна активність вірусів грипу в тканині легень білих мишей за умов застосування хіміопрепаратів

Препарат, доза	Інфекційний титр вірусу ($\log_{10} \text{EID}_{50}/20$ мг тканини) при дозі вірусу (LD_{50})					
	A/Swine/1976/31 (H1N1)		A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)		A/Владивосток/2/09 (H1N1)	
	1	5	1	5	0,4	2
Препарат № 1, 300 мг/кг	3,7±0,3	4,1±0,2	3,2±0,3	4,1±0,2	1,8±0,2	2,9±0,2
Ремантадин	2,9±0,2	3,4±0,3	4,5±0,2	5,1±0,3	1,2±0,2	2,0±0,3
Таміфлю	3,1±0,1	3,8±0,3	2,2±0,4	2,4±0,3	2,5±0,2	3,1±0,3
Контроль вірусу	6,0±0,0	6,4±0,2	4,9±0,3	5,5±0,2	3,4±0,4	4,0±0,3

Примітка: * - відмінності від контролю достовірні при $p < 0,05$

Таблиця 11

Інфекційна активність вірусів грипу в тканині легень білих мишей за умов застосування хіміопрепаратів

Препарат	Розмір вогнищ хронічної постгрипозної пневмонії (% від загальної площі легенів) при зараженні вірусом (менша з використаних доз)		
	A/Swine/1976/31 (H1N1)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	A/Владивосток/2/09 (H1N1)
Препарат № 1, 300 мг/кг	25±7	13±3	7±2
Ремантадин	16±5	32±7	10±2
Таміфлю	20±5	15±4	15±5
Контроль вірусу	54±7	41±6	27±8

5

Примітка: * - відмінності від контролю достовірні при $p < 0,05$

Таблиця 12

Динаміка ваги тварин з асцитною формою карциноми Ерліха при лікуванні препаратами

Строк після перевивання пухлини, діб.	Вага тварин (г)		
	Застосований препарат		
	Препарат № 1	Цисплатин	Контроль без препаратів
1	18,6±2,3	19,1±2,5	19,2±2,7
3	18,8±2,2	19,3±2,7	19,3±2,7
5	18,8±1,9	19,4±2,5	19,5±2,8
8	19,4±1,7	19,8±2,2	20,0±2,7
10	19,9±1,7	20,7±2,4	20,8±2,7
13	20,4±1,5	21,4±1,5	21,9±2,6
15	20,4±1,4*	21,8±1,6	23,8±2,2

Примітка: * - відмінності від контролю без препарату на відповідному строку достовірні при $p < 0,05$

10

Таблиця 13

Препарат	Відсоток клітин з фенотипом							
	AnV-7AAD ⁻ (живі клітини)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁻ (ранній апоптоз)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁺ (пізній апоптоз)	p	AnV-7AAD ⁺ (некроз)	p
Препарат № 1	6,1±6,2	0,00	31,1±10,4	0,02	4,2±2,4	0,17	0,4±0,4	0,11
Цисплатин	55,2±11,0	0,00	41,1±11,3	0,00	3,5±2,4	0,07	0,1±0,2	0,03
Контроль без препаратів	82,6±7,7	-	9,7±6,3	-	6,6±2,9	-	1,0±0,8	-

Таблиця 14

Вплив препаратів на процеси апоптозу в клітинах великого розміру й гранулярності асцитної форми карциноми Ерліха в білих мишей

Препарат	Відсоток клітин з фенотипом							
	AnV-7AAD ⁻ (живі клітини)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁻ (ранній апоптоз)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁺ (пізній апоптоз)	p	AnV-7AAD ⁺ (некроз)	p
Препарат № 1	0,3±0,1	0,00	0,1±0,1	0,02	69,5±5,8	0,00	30,2±5,9	0,00
Цисплатин	0,4±0,2	0,00	0,3±0,3	0,02	72,8±10,9	0,00	26,6±11,1	0,01
Контроль без препаратів	89,6±7,3	-	3,6±2,8	-	6,7±4,8	-	0,2±0,2	-

Таблиця 15

Динаміка розміру солідної пухлини карциноми Ерліха у білих мишей при лікуванні їх досліджуваними препаратами

Препарат, доза (мг/кг ваги)	Розмір пухлини (мм ³), доба після перевивання					
	8	13	17	21	24	28
Контроль	156,6	711,7	1250,3	1902,1	2296,5	2888,2
Препарат № 1, 300	72,7	416,3	1224,6	1703,4	2048,5	2525,7
Препарат № 1, 100	72,5	544,3	693,6	1250,8	1654,3	2239,8
Цисплатин	56,5	249,2	464,3	1071,9	1743,3	1269,4

5 Примітка: * - відмінності від контролю без препарату достовірні при p<0,05

Приклад 9. Дослідження хронічної токсичності фулерен-(трис-амінокапронової кислоти) гідрат на пацюках при внутрішньом'язовому введенні протягом 30 днів.

10 Експеримент проводився у ФГУН «Науково-дослідному центрі токсикології й гігієнічної регламентації біопрепаратів» (ФГУН НДЦ ТБП ФМБА Росії), м. Серпухов.

Мета дослідження полягала в експериментальній оцінці рівня й характеру можливого шкідливого впливу фулерен-(трис-амінокапронової кислоти) гідрат на організм пацюків при внутрішньом'язовому введенні протягом 30 днів.

15 Досліди проводили на пацюках лінії Вістар, придбаних у розпліднику ГУ НЦБТ РАМН (філія «Столбовая»). Утримання тварин відповідало санітарним правилам, затвердженим МОЗ СРСР 06.07.73 р., щодо облаштування, утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв). Годували тварин натуральними й брикетованими кормами відповідно до норм, затверджених наказом МОЗ СРСР № 755 від 12.08.77 р. Тварини пройшли карантин і акліматизацію до умов віварію протягом 5 днів.

20 Експериментальні групи тварин формували методом випадкової вибірки з урахуванням маси тіла як вирішального показника.

25 Досліджувану субстанцію вводили пацюкам внутрішньом'язово щодня протягом 30 днів у дозах 3, 9 або 20 мг/кг у вигляді розчинів різних концентрацій в 20 % розчині диметилсульфоксиду (ДМСО). Тваринам контрольних груп вводили 20 % розчин ДМСО. Робочі розчини субстанції й ДМСО готували щодня безпосередньо перед застосуванням. Об'єми

введених доз корегували з урахуванням індивідуальної маси тіла тварин після кожного зважування. Кожна доза була випробувана на 20 тваринах (10 самок і 10 самців).

Для оцінки токсичної дії фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату, через 24 години після закінчення курсу введення субстанції, половину тварин з кожної групи вивели з експерименту для проведення гематологічних, біохімічних і патоморфологічних досліджень. Другу половину дослідних тварин вивели з експерименту після терміну скасування введення субстанції й провели аналогічні дослідження.

У період уведення субстанції й протягом 14 днів після її скасування щодня оцінювали загальний стан і клінічні симптоми інтоксикації тварин. Загальний стан тварин оцінювали за їхньою руховою активністю, споживанням корму й води, станом хутра й видимих слизових оболонок, масою тіла.

Гематологічний аналіз проводили за допомогою напівавтоматичного двоканального кондуктометричного лічильника клітин Nema-screen 13 (Hospitex Diagnostics, Італія), а також за допомогою світлової мікроскопії.

Біохімічні показники сироватки крові визначали за допомогою напівавтоматичного аналізатора «Stat Fax 3300».

Біохімічні показники сечі визначали за допомогою напівавтоматичного аналізатора «Urisys 1100».

Морфологічний стан внутрішніх органів тварин визначали візуально під час патологоанатомічного розтину та шляхом мікроскопічного вивчення гістологічних препаратів (парафінові зрізи 4-5 мкм, пофарбовані гематоксиліном та еозином).

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики за критерієм Ст'юдента.

Результати досліджень.

1.1. Результати клінічного спостереження.

Пацюкам щодня протягом місяця внутрішньом'язово вводили фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрат у дозах 3, 9 або 20 мг/кг. На всіх дозах клінічні симптоми отруєння були відсутні, загальний стан тварин дослідних і контрольних груп не відрізнявся. Приріст маси тіла пацюків протягом усього досліду в експериментальних групах вірогідно не відрізнявся від контролю (табл. 16).

Таблиця 16

Маса тіла пацюків у період уведення й скасування фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Дні спостереження	Контроль ДМСО	фулерен-(трис-амінокапронової кислота) гідрат, мг/кг		
		3	9	20
	Самці (M ± m)			
0	196,6±3,3	193,6±3,4	196,6±4,2	193,4±4,1
7	231,8±4,4	224,6±5,2	233,6±7,4	227,0±5,0
14	271,4±5,3	255,6±6,9	270,4±10,6	266,6±5,7
21	291,0±5,3	273,6±7,6	290,0±14,4	288,2±6,8
28	314,4±5,9	291,2±9,5	307,6±15,9	306,6±8,1
35	336,0±10,2	307,2±14,9	346,4±13,7	333,6±8,7
42	342,8±13,2	315,6±16,8	360,4±12,1	349,6±9,5
Самці (M ± m)				
0	176,0±3,2	179,6±3,6	180,4±3,4	175,4±4,0
7	192,4±4,9	192,6±4,5	197,0±4,9	192,8±4,0
14	212,4±6,0	210,8±4,9	215,2±6,0	213,0±3,7
21	222,4±6,7	223,8±5,1	227,4±5,7	221,6±3,8
28	237,6±6,6	234,4±4,0	240,2±6,1	234,4±4,4
35	250,0±12,7	251,6±6,0	254,4±12,7	246,8±7,2
42	252,8±13,3	258,8±5,1	260,4±12,3	253,6±5,6

1.2. Результати біохімічного аналізу сироватки крові

Після закінчення введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату в самців пацюків показане достовірне зниження рівня сечовини на максимальній випробуваній дозі (табл. 17). Показані зміни концентрації холестерину на мінімальній і середній дозі не пов'язані з дією

досліджуваної субстанції й не виходять за межі фізіологічної норми. У самок пацюків показане незначне, але достовірне підвищення активності аланінамінотрансферази на максимальній випробуваній дозі. Виявлені зміни рівня глюкози на мінімальній дозі, концентрації загального білка й холестерину на середній дозі субстанції не мають дозової залежності й не виходять за межі фізіологічної норми.

Таблиця 17

Біохімічні показники сироватки крові пацюків після закінчення введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Параметр, од. вимірювання	Контроль (ДМСО)	фулерен-(трис-амінокапронової кислота) гідрат, мг/кг		
		3	9	20
Самці (M ± m)				
1	2	3	4	5
Загальний білок, г/л	95,6±9,59	86,88±5,28	102,1±34,65	82,08±9,28
Глюкоза, ммоль/л	6,28±0,29	6,88±0,73	6,4±1,02	7,0±1,26
Сечовина, ммоль/л	12,94±1,77	10,66±2,89	11,36±2,71	9,22±1,56*
Холестерин, ммоль/л	5,42±0,71	4,17±0,68*	3,88±0,75*	4,96±1,03
Білірубін, мкмоль/л	8,96±2,84	9,98±1,67	9,16±1,4	8,76±1,54
Креатинін, мкмоль/л	75,36±8,81	85,58±17,46	82,06±21,99	75,6±15,51
АлАТ, Е/л	15,52±3,17	17,12±1,2	14,62±4,22	14,04±3,01
АсАТ, Е/л	28,56±5,94	25,18±3,95	29,34±3,8	24,44±5,48
Лужна фосфатаза, Е/л	343±89	333±48	300±56	283±67
Самки (M ± m)				
Загальний білок, г/л	79,0±7,18	81,64±11,03	68,94±2,97*	83,16±11,75
Глюкоза, ммоль/л	5,64±0,72	7,64±1,56*	6,36±0,67	6,46±0,51
Сечовина, ммоль/л	9,88±1,8	8,0±4,04	10,02±1,46	9,48±1,86
Холестерин, ммоль/л	3,66±0,34	4,11±0,45	4,42±0,56*	4,16±0,88
Білірубін, мкмоль/л	7,52±2,86	10,96±2,14	9,46±2,26	7,18±0,95
Креатинін, мкмоль/л	70,1±16,19	56,44±3,3	52,46±5,77	53,78±8,31
АлАТ, Е/л	10,52±1,01	10,7±1,57	12,52±2,11	13,52±1,4*
АсАТ, Е/л	22,75±1,37	27,51±5,11	24,02±2,64	21,47±3,09
Лужна фосфатаза, Е/л	227±191	143±47	159±28	248±107

Примітка: «*» - статистично вірогідно за t-критерієм Ст'юдента

Достовірне зниження концентрації креатиніну на максимальній випробуваній дозі показане після закінчення періоду скасування фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату в самців і самок пацюків. На цій же дозі показана зміна активності аспартатамінотрансферази й у самців і в самок пацюків, однак, у випадку самців - це зниження активності, а в самок - підвищення активності (табл. 18).

Таблиця 18

Біохімічні показники сироватки крові паціюків після скасування введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Параметр, од. вимірювання	Контроль (ДМСО)	фулерен-(трис-амінокапронової кислота) гідрат, мг/кг		
		3	9	20
		Самці (M ± m)		
1	2	3	4	5
Загальний білок, г/л	70,08±7,11	67,20±7,60	68,06±7,27	66,58±2,67
Глюкоза, ммоль/л	6,04±0,56	6,54±1,03	7,18±0,80*	6,40±0,93
Сечовина, ммоль/л	7,52±0,74	7,96±1,05	7,14±1,59	8,52±0,99
Холестерин, ммоль/л	4,70±0,88	4,06±0,25	4,25±0,72	4,57±0,54
Білірубін, мкмоль/л	15,72±7,74	20,32±5,19	16,06±2,72	17,30±2,11
Креатинін, мкмоль/л	57,46±12,35	51,10±7,11	48,12±10,16	41,86±4,09*
АлАТ, Е/л	22,44±2,31	21,18±5,54	21,52±2,68	24,38±2,22
АсАТ, Е/л	19,53±2,04	18,18±1,39	18,08±2,64	16,18±1,83*
Лужна фосфатаза, Е/л	258±46	263±71	255±48	238±61
Самки (M ± m)				
Загальний білок, г/л	70,92±10,67	71,12±6,66	78,48±8,94	72,76±8,11
Глюкоза, ммоль/л	6,82±1,32	7,62±0,69	6,78±0,97	6,90±1,23
Сечовина, ммоль/л	8,46±1,15	7,20±2,43	7,94±1,25	9,4±2,93
Холестерин, ммоль/л	4,49±0,95	4,26±1,04	5,02±1,7	5,67±1,2
Білірубін, мкмоль/л	11,9±5,65	13,0±3,07	11,8±1,18	11,28±1,91
Креатинін, мкмоль/л	74,14±18,21	63,76±16,67	55,84±9,94	50,26±5,04
АлАТ, Е/л	16,52±3,23	14,36±5,02	14,44±2,86	17,82±3,11
АсАТ, Е/л	14,29±2,5	16,84±1,27	17,68±2,87	18,41±2,85*
Лужна фосфатаза, Е/л	219±58	168±54	218±44	221±36

Примітка: «*» - статистично вірогідно за t-критерієм Ст'юдента

5 Оцінюючи результати аналізу біохімічних показників сироватки крові паціюків, у період уведення субстанції й після періоду скасування введення, слід зазначити, що величини вищеписаних змін показників сироватки крові в самок і самців паціюків не виходять за межі фізіологічного діапазону для даного виду тварин.

1.3. Результати гематологічного аналізу крові

10 Після закінчення введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату не виявлені зміни гематологічних показників, пов'язані з досліджуваною субстанцією. Так у самок паціюків установлене незначне зниження середнього об'єму еритроцитів на середній дозі й деяке збільшення частки ретикулоцитів на мінімальній дозі (табл. 19). Дані зміни не виходять за межі фізіологічної норми й не мають дозової залежності.

15

Таблиця 19

Гематологічні показники крові паціюків після закінчення введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Параметр, од. вимірювання	Контроль (ДМСО)	фулерен-(трис-амінокапронової кислоти) гідрат, мг/кг		
		3	9	20
	Самці (M ± m)			
Гемоглобін, моль/дм ³	8,4±0,8	7,8±0,3	8,1±1,6	8,0±1,0
Еритроцити, млн/мм ³	5,7±1,0	6,0±0,6	6,0±0,9	6,3±0,7
Гематокрит, %	32,3±7,1	35,4±3,4	35,0±5,3	35,3±4,3
Порівн. об'єм еритроц., мкм ³	57,0±5,1	59,0±2,7	58,2±4,5	55,6±1,5
Ретикулоцити, %	3,8±0,8	4,0±0,6	3,8±0,9	4,4±0,8
Тромбоцити, тис.	692,6±93,7	692,6±98,2	699,8±181,2	766,2±85,1
Лейкоцити, тис./мм ³ , у т.ч.:	22,9±4,1	22,8±1,5	24,6±5,2	23,3±3,8
Базофіли, %	0	0	0	0
Еозинофіли, %	0,8±1,1	0,8±1,1	1,0±1,2	0,8±1,1
Ювенільні, %	0	0	0	0
Палочкоядерні, %	1,6±1,7	1,6±0,9	1,0±1,2	1,2±1,1
Сегментоядерні, %	24,4±3,6	28,4±7,8	21,5±4,4	24,4±3,8
Лімфоцити, %	67,6±5,0	64,8±5,8	71,0±2,6	68,0±5,1
Моноцити, %	5,6±2,2	4,8±2,3	5,5±1,9	5,6±0,9
Самки (M ± m)				
Гемоглобін, моль/дм ³	8,0±0,2	7,7±0,6	7,8±0,9	8,1±1,0
Еритроцити, млн/мм ³	5,4±0,6	6,0±0,8	6,3±0,7	6,3±0,8
Гематокрит, %	32,0±2,3	32,8±5,2	34,4±3,2	35,7±4,0
Порівн. об'єм еритроц., мкм ³	59,6±3,1	57,8±5,0	55,0±1,9*	57,4±3,6
Ретикулоцити, %	5,1±0,5	6,6±0,5*	4,9±0,3	4,8±0,3
Тромбоцити, тис.	538,4±126,8	439,0±104,0	505,0±75,7	542,4±91,2
Лейкоцити, тис./мм ³ , у т.ч.:	21,7±8,4	21,4±4,7	20,4±8,8	19,7±3,2
Базофіли, %	0	0	0	0
Еозинофіли, %	1,6±1,7	2,0±2,0	2,0±2,4	1,2±1,1
Ювенільні, %	0	0	0	0
Палочкоядерні, %	2,0±1,4	1,2±1,1	0,8±1,1	1,6±0,9
Сегментоядерні,%	21,2±5,0	20,8±5,4	18,8±5,0	18,4±3,6
Лімфоцити, %	69,8±3,3	70,4±4,6	72,4±5,2	73,2±4,1
Моноцити, %	5,4±0,9	5,6±1,7	6,0±1,4	5,6±0,9

Примітка: «*» - статистично вірогідно за t-критерієм Ст'юдента

- 5 Вивчення гематологічних показників паціюків після закінчення періоду скасування фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату не виявило достовірних відмінностей між контрольними й дослідними тваринами (табл. 20).

Таблиця 20

Гематологічні показники крові пацюків після скасування введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Параметр, од. виміру	Контроль (ДМСО)	фулерен-(трис-амінокапронової кислота) гідрат, мг/кг		
		3	9	20
		Самці (M ± m)		
1	2	3	4	5
Гемоглобін, моль/дм ³	7,9±0,7	8,3±3,7	7,9±0,3	7,4±0,8
Еритроцити, млн/мм ³	6,3±0,6	6,5±1,2	6,4±0,5	6,3±0,8
Гематокрит, %	33,0±2,6	33,7±1,7	34,1±2,1	31,2±3,5
Порівн. об'єм еритроц., мкм ³	52,8±2,5	52,0±1,6	53,4±4,6	50,4±1,5
Ретикулоцити, %	4,0±0,6	4,3±1,1	4,0±0,3	4,2±0,5
Тромбоцити, тис.	496,6±48,9	445,6±55,8	479,8±43,8	447,0±86,9
Лейкоцити, тис./мм ³ , у т.ч.:	22,5±3,6	22,0±6,8	19,6±2,5	24,8±6,2
Базофіли, %	0	0	0	0
Еозинофіли, %	0,8±1,1	0,8±1,1	0,8±1,1	0,8±1,1
Ювенільні, %	0	0	0	0
Палочкоядерні, %	1,6±1,7	1,6±0,9	1,6±1,7	1,2±1,1
Сегментоядерні, %	24,4±3,6	28,4±7,8	21,6±3,8	24,4±3,8
Лімфоцити, %	67,6±5,0	64,8±5,8	71,0±2,2	68,0±5,1
Моноцити, %	5,6±2,2	4,8±2,3	5,0±2,0	5,6±0,9
Самки (M ± m)				
Гемоглобін, моль/дм ³	8,1±0,6	7,7±0,7	8,2±0,3	8,5±0,6
Еритроцити, млн/мм ³	5,9±0,7	5,8±0,3	6,3±0,5	6,4±0,6
Гематокрит, %	31,7±3,8	32,3±3,2	32,9±2,0	32,9±2,2
Порівн. об'єм еритроц., мкм ³	54,4±1,7	55,2±4,6	52,4±1,5	52,2±3,4
Ретикулоцити, %	4,6±0,6	4,4±0,5	4,3±0,5	4,5±0,4
Тромбоцити, тис.	459,8±86,0	462,4±95,1	453,0±67,3	470,8±34,8
Лейкоцити, тис./мм ³ , у т.ч.:	21,6±2,6	17,8±4,0	20,1±3,5	18,1±2,5
Базофіли, %	0	0	0	0
Еозинофіли, %	2,0±1,4	1,8±1,8	1,8±1,8	2,0±1,4
Ювенільні, %	0	0	0	0
Палочкоядерні, %	1,4±1,3	1,6±1,7	1,2±1,1	1,4±1,3
Сегментоядерні, %	20,8±3,3	22,0±2,4	22,0±3,2	22,8±3,8
Лімфоцити, %	70,6±3,7	69,2±3,6	69,4±4,4	68,4±4,1
Моноцити, %	5,2±1,3	5,4±0,9	5,6±1,1	5,4±0,9

1.4. Результати аналізу сечі

Після закінчення періоду введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату виявлене підвищення рН сечі в групі самців при дозі 9 мг/кг (табл. 21). Рівень показника, який змінився, не виходить за межі фізіологічної норми, дозова залежність відсутня.

Після періоду скасування введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату в групі самок при дозі 20,0 мг/кг відзначене зниження відносної щільності сечі в порівнянні з контрольною групою тварин. У групах самців у цей же період спостерігаються статистично достовірні зміни в порівнянні з контрольною групою: при дозі 3,0 мг/кг - підвищення показника рН, при дозі 9,0 мг/кг - підвищення відносної щільності сечі. Обидва показники не виходять за межі фізіологічної норми й не мають дозової залежності (табл. 22).

Таблиця 21

Показники сечі пацієнтів після закінчення введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Доза (мг/кг)	Відносна щільність	рН	Кількість тварин з показником, який виходить за межі норми							
			Лейкоцити кл./мкл	Нітрити мкмоль/л	Білок г/л	Глюкоза ммоль/л	Кетонові тіла ммоль/л	Уробіліноген мкмоль/л	Білірубін мкмоль/л	Еритроцити кл./мкл
Самці										
0	1,023±0,005	6,3±0,4	2	1	4	0	4	2	1	5
3,0	1,024±0,005	6,3±0,7	3	3	5	0	4	4	1	5
9,0	1,016±0,006	6,9±0,2*	4	1	3	1	2	0	0	5
20,0	1,023±0,004	6,3±0,7	5	1	4	0	2	2	0	5
Самки										
0	1,019±0,006	6,6±0,2	3	2	2	0	0	0	0	4
3,0	1,020±0,003	6,6±0,2	3	1	1	0	1	1	0	4
9,0	1,017±0,007	6,8±0,2	2	3	3	0	0	1	1	4
20,0	1,016±0,008	6,4±0,5	2	1	1	0	1	0	0	5

Примітка: «*» - статистично вірогідно за t-критерієм Ст'юдента

Таблиця 22

Показники сечі пацієнтів після скасування введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Доза (мг/кг)	Відносна щільність	рН	Кількість тварин з показником, що виходять за межі норми							
			Лейкоц ити кл./мкл	Нітрити мкмоль/л	Білок г/л	Глюкоза ммоль/л	Кетонові тіла ммоль/л	Уробіліног ен мкмоль/л	Білірубін мкмоль/л	Еритроцити кл./мкл
Самці										
0	1,019±0,005	6,0±0,0	1	0	2	0	0	0	0	4
3,0	1,001±0,005	6,6±0,4*	3	0	2	0	0	0	0	5
9,0	1,025±0,001*	5,6±0,5	4	0	5	0	4	4	0	5
20,0	1,027±0,014	6,0±0,6	4	0	3	0	2	2	0	5
Самки										
0	1,020±0,007	6,2±1,3	1	0	3	0	0	0	0	1
3,0	1,011±0,005	7,2±0,4	2	0	1	0	0	0	0	3
9,0	1,019±0,008	6,1±1,0	2	0	1	0	2	0	0	2
20,0	1,008±0,002*	7,0±0,0	1	0	0	0	0	0	0	4

5

Примітка: «*» - статистично вірогідно за t-критерієм Ст'юдента

1.5. Результати патоморфологічного дослідження

Під час патологоанатомічного розтину, проведеному після закінчення періоду внутрішньом'язового введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату при зовнішньому огляді й дослідженні не було встановлено відмінностей між пацієнтами піддослідних і контрольних груп: хутряний покрив був гладеньким, блискучим, шкіра еластична, рухлива, підшкірна клітковина помірно виражена, видимі слизові оболонки бліді, чисті, без виразок і сторонніх нашарувань, патологічні виділення із природних отворів тіла були відсутні. При розтині грудної і черевної порожнини відзначалося анатомічно правильне розташування внутрішніх органів. Макроскопічно помітних ознак патології внутрішніх органів не виявлено. При розсіченні кістякових м'язів задньостегнової групи (місце введення) у тварин, які одержували фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрат у всіх досліджуваних дозах, відзначали коричнюватий колір м'язової тканини, фасцій і жирових прошарків. У тварин контрольної групи такого кольору зазначених тканин не було виявлено.

При аналізі масових коефіцієнтів внутрішніх органів тварин після періоду внутрішньом'язового введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату не було встановлено відмінностей між пацієнтами піддослідних і контрольної груп (табл. 23).

Таблиця 23

Масові коефіцієнти внутрішніх органів пацюків після періоду внутрішньом'язового введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Доза, мг/кг	Масові коефіцієнти органів, г/кг маси тіла тварину						
	серце	легені	печінка	селезінка	нирки	тимус	сім'яники
Самці							
0	4,3±0,4	8,9±1,3	36,5±3,3	6,1±1,6	7,1±0,2	1,8±0,2	11,1±1,0
3,0	4,0±0,7	8,3±1,7	35,8±1,8	6,0±0,7	7,1±0,7	1,6±0,4	10,4±1,3
9,0	3,8±0,6	8,3±1,4	36,6±4,8	6,3±0,7	7,2±0,3	1,3±0,5	9,7±1,1
20,0	4,3±0,3	8,6±0,3	39,8±4,4	5,8±1,8	7,6±0,4	1,4±0,4	11,1±0,9
Самки							
0	3,8±0,5	9,3±1,0	39,9±2,1	6,3±1,8	7,3±0,5	2,2±0,6	-
3,0	3,9±0,7	9,4±1,0	37,9±2,5	6,7±1,0	7,8±0,5	1,9±0,3	-
9,0	3,8±0,6	9,9±0,7	39,8±2,9	6,6±0,8	7,8±0,5	1,6±0,5	-
20,0	3,8±0,6	10,1±1,5	43,0±4,1	6,6±1,3	8,6±0,8	1,6±0,7	-

При мікроскопічному дослідженні проводили порівняльну оцінку гістопатологічної картини органів і тканин тварин, які одержували фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрат у максимальній дозі та пацюків контрольної групи. При аналізі в обох групах були виявлені окремі патологічні зміни, які були виявлені в основному в легенях, печінці й нирках (табл. 24). Ступінь виявлених змін незначно варіював в межах груп, але в основному класифікувався як слабкий або помірний. Враховуючи відсутність якої-небудь альтернативної або проліферативної реакції в ділянках виявлених змін в органах, а також велику кількість випадків гострого повнокрів'я

кровоносних судин у них, найбільш імовірною причиною їх появи є індивідуальна реакція тварин на загальну анестезію й інгаляцію вуглекислого газу при евтаназії. Виходячи з того, що встановлені патологічні зміни у піддослідній і контрольній групах зустрічались з приблизно однаковою частотою, можна зробити висновок про відсутність індукування цих змін досліджуваною субстанцією. У зв'язку із цим, зазначені зміни розглядалися нами як фонові.

У місці введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату - в скелетному м'язі - були виявлені зміни як запального характеру (невеликі вогнища крововиливів, вогнища здавлених і набряклих м'язових волокон, інфільтрація лімфоїдними клітинами простору між окремими м'язовими волокнами й пучками волокон), так і регенеративного (ділянки пухкої або щільної сполучної тканини зі новоутвореними судинами). Дані зміни виявилися властивими й контрольній групі пацюків. Описана картина характерна для багаторазово повторюваної травми в результаті внутрішньом'язових ін'єкцій, у даному дослідженні - не залежно від уведеної речовини.

Таблиця 24

Результати мікроскопічного аналізу морфологічних змін в органах і тканинах пацюків після 30 днів внутрішньом'язового введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрат

Речовина		Розчинник				Фулерен-(трис-аміно-капронова кислота) гідрат			
Доза (мг/кг)		0				20			
Стать		Самці		Самки		Самці		Самки	
Кількість тварин у групі		5		5		5		5	
Кількість тварин, що вижили		5		5		5		5	
Орган/ тканина	Морфологічні зміни	Тварини зі змінами							
		Інд. №	Кіль- сть	Інд. №	Кіль- сть	Інд. №	Кіль- сть	Інд. №	Кіль- сть
легені	Потовщення міжальвеолярних перегородок (тотальне)	11,12	2	2,5	2	-	-	-	-
	Потовщення міжальвеолярних перегородок (вогнища)	14,15	2	4	1	72,74	2	61,62	2
	Вогнища інфільтрації міжальвеолярних перегородок лімфоїдними клітинами, макрофагами	11	1	-	-	72	1	61,62	2
	Звуження просвіту бронхів	11,12,13,14,15	5	2,4,5	3	74	1	-	-
	Повнокрів'я кровоносних судин	12,13,14,15	4	1	-	72,73,74,75	4	62,64,65	3
	Повнокрів'я альвеолярних капілярів	12,13,14,15	4	-	-	74,75	2	61	1
	Перисудинна лімфоїдна інфільтрація	11,13	2	2	1	71	1	63,64, 65	3
печінка	Повнокрів'я синусоїдних капілярів	11,12,13,14,15	5	2,3,4,5	4	71,72,73,74,75	5	61,63,64,65	4
	Повнокрів'я венозних судин	11,12,13,14,15	5	2,3,4,5	4	71,72,73,74,75	5	61,63,64,65	4
	Лімфоїдна інфільтрація портальних трактів	-	-	-	-	-	-	-	-
нирка	Дрібні вогнища міжканальцевої лімфоїдної інфільтрації	12	1	1,2	2	-	-	61	1
	Повнокрів'я венозних судин	11,12,13	3	3,5	2	71,72,73	3	65	1

- При патологоанатомічному розтині після періоду скасування введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату при зовнішньому огляді й дослідженні не було виявлено відмінностей між пацюками піддослідних і контрольних груп. Коричневого кольору тканин у місці попередніх ін'єкцій фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату не виявлено. При статистичному аналізі масових коефіцієнтів органів не було встановлено значимих відмінностей між піддослідними й контрольними тваринами (табл. 25).

Таблиця 25

Масові коефіцієнти внутрішніх органів пацюків після періоду скасування введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Доза, мг/кг	Масові коефіцієнти органів, г/кг маси тіла тварину						
	серце	легені	печінка	селезінка	нирки	тимус	сім'яники
Самці							
0	3,9±0,4	7,5±1,9	38,5±3,8	4,8±0,6	6,5±0,5	1,7±0,3	9,5±1,0
3,0	4,1±0,4	7,1±0,5	32,2±1,8	5,2±0,7	6,5±0,4	1,2±0,4	9,7±1,2
9,0	4,0±0,6	7,0±0,5	38,6±4,0	5,3±1,1	7,1±0,4	1,6±0,5	9,8±1,0
20,0	3,3±0,4	7,8±0,6	37,6±1,4	5,1±0,6	7,0±0,6	1,3±0,5	10,5±1,5
Самки							
0	3,7±0,4	8,7±1,8	35,0±4,2	5,5±1,6	6,7±0,7	1,7±0,4	-
3,0	3,5±0,7	8,7±0,7	33,9±3,9	4,7±0,5	7,2±0,5	1,7±0,3	-
9,0	4,1±0,3	8,6±0,7	36,9±2,0	5,7±1,4	8,0±1,1	1,4±0,4	-
20,0	3,8±0,9	8,1±0,9	38,2±3,8	5,6±0,4	6,8±0,2	1,3±0,3	-

- При мікроскопічному дослідженні гістологічних препаратів органів виявлені зміни за характером й ступенем вираженості в основному відповідали описаним після курсу введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату, і також, приблизно у тій же мірі, були властиві тваринам піддослідних і контрольної груп (табл. 26). Тому й у цьому випадку був зроблений висновок про відсутність індукування виявлених змін досліджуваною субстанцією.
- У місці введення досліджуваної й контрольної речовин - у скелетному м'язі - установлені однотипні для піддослідних і контрольних тваринних зміни: нечисленні тонкі витягнуті ділянки повністю сформованої щільної волокнистої сполучної тканини, розташовані або уздовж м'язових волокон, або - під гострим кутом до них. Така морфологічна картина свідчить про відсутність відмінностей у швидкості й характері процесу загоєння в місцях ін'єкцій розчинника й фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату.
- Таким чином, у результаті проведеного патологоанатомічного дослідження морфологічних ознак, пов'язаних із впливом або скасуванням фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату, не виявлено.

Таблиця 26

Результати мікроскопічного аналізу морфологічних змін в органах і тканинах пацюків після періоду скасування введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату

Речовина		розчинник				фулерен-(трис-аміно-капронова кислота) гідрат			
Доза (мг/кг)		0				20			
Стать		Самці		Самки		Самці		Самки	
Кількість тварин у групі		5		5		5		5	
Кількість тварин, що вижили		5		5		5		5	
Орган/ тканина	Морфологічні зміни	Тварини зі змінами							
		Інд. №	Кіль- сть	Інд. №	Кіль- сть	Інд. №	Кіль- сть	Інд. №	Кіль- сть
легені	Потовщення міжальвеолярних перегородок (тотальне)	17,18,20	3	-	-	79	1	-	-
	Потовщення міжальвеолярних перегородок (вогнища)	19	1	9	1	76,77,78,80	4	66	1
	Повнокрів'я посудин	16,18,19	3	6,7,8,9,10	5	76,77,78	3	66,67,68,69,70	5
	Повнокрів'я альвеолярних капілярів	18,19	2	7,8,9	3	-	-	66,70	2
	Звуження просвіту бронхів	17,18,19,20	4	-	-	78,79,80	3	-	-
	Ділянки емфізематозного розширення альвеол	17,20	2	-	-	-	-	-	-
	Перисудинна лімфоїдна інфільтрація	-	-	8	1	-	-	69	1
печінка	Повнокрів'я синусоїдних капілярів	16,17,18,19,20	5	6,7,8,9,10	5	76,77,78,79,80	5	66,67,68,69,70	5
	Повнокрів'я венозних посудин	16,17,18,19,20	5	6,7,8,9,10	5	76,77,78,79,80	5	66,67,68,69,70	5
нирка	Дрібні вогнища міжканальцевої лімфоїдної інфільтрації	16,17,18,19	4	7,9,10	3	76,77,79,80	4	70	1

Висновок. Протягом усього періоду введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату пацюкам і періоду скасування введення субстанції не було відзначено ознак зміни клінічного стану тварин. Уведення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату не позначалося на поведінці, стані хутряного покриву, видимих слизових оболонок і приросту маси тіла піддослідних тварин.

Тривале протягом 1 місяця внутрішньом'язове введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату пацюкам не впливало на показники периферійної крові. Скасування введення досліджуваної субстанції також не викликало змін показників крові.

Після закінчення введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату в самців пацюків показане достовірне в межах фізіологічної норми зниження рівня сечовини на максимальній випробуваній дозі (20 мг/кг), а в самок пацюків показане незначне, але достовірне підвищення активності аланінамінотрансферази. Зниження концентрації креатиніну на максимальній

випробуваній дозі показане після закінчення періоду скасування досліджуваної субстанції в самців і самок пацюків.

При аналізі результатів дослідження сечі пацюків після періоду скасування введення фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату в групі самок на дозі 20 мг/кг відзначене
5 зниження відносної щільності сечі в порівнянні з контрольною групою тварин.

У результаті проведеного патологоанатомічного дослідження не встановлено ознак шкідливого впливу фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату на організм пацюків після одного місяця внутрішньом'язового введення в дозах 20 мг/кг маси тіла.

Таким чином, у результаті проведеного дослідження не встановлено істотних ознак шкідливого впливу фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату на організм пацюків як після
10 30 днів внутрішньом'язового введення в дозах до 20 мг/кг тіла, так і після закінчення періоду скасування.

Приклад 10. Дослідження гострої токсичності фулерен-(трис-амінокапронової кислоти) гідрат на лабораторні тварин при одноразовому внутрішньом'язовому уведенні.

Експеримент проводився у ФГУН «Науково-дослідному центрі токсикології й гігієнічної
15 регламентації біопрепаратів» (ФГУН НИЦ ТБП ФМБА Росії), м. Серпухов.

Завдання дослідження полягало у визначенні допустимих і токсичних доз, а також вивчення характеру можливого шкідливого впливу на організм лабораторних тварин субстанції при одноразовому внутрішньом'язовому уведенні.

Досліди проводили на білих безпородних мишах і пацюках лінії Вістар з розплідника ГУ НЦБМТ РАМН. Утримання тварин відповідало санітарним правилам, затвердженим МОЗ СРСР 06.07.73 р., щодо облаштування, устаткування й утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв). Годували тварин *ad libitum* екструдованим комбікормом ПК-120-1, виготовленим за ДСТ Р 50258-92. Тварини пройшли карантин і акліматизацію до умов віварію протягом не менш
20 ніж 10 днів.

Експериментальні групи тварин формували методом випадкової вибірки з урахуванням маси тіла як вирішального показника.

Розчини досліджуваної речовини в 20 % водному розчині ДМСО для введення тваринам готували за асептичних умов *ex tempore*. Розчини фасували у флакони з відповідним
30 маркуванням й до введення зберігали за температури 2-6°C не більше 2 годин.

Субстанцію вводили мишам і пацюкам внутрішньом'язово в дозах 5, 50 і 500 мг/кг. Максимальні досліджувані дози були лімітовані максимально припустимими об'ємами внутрішньом'язового введення для мишей і пацюків. Тваринам контрольних груп вводили 20 % водний розчин у такому ж об'ємі, як і максимальні дози субстанції.

Введені об'єми корегували з урахуванням індивідуальної маси тіла тварини.

У період спостереження (протягом 14 днів після введення) оцінювали загальний стан тварин за їхньою руховою активністю, споживанням корму й води, станом хутра й слизових оболонок, масою тіла.

Після закінчення періоду спостереження проводили патологоанатомічний розтин мишей і пацюків, які одержували субстанцію в дозі 500 мг/кг і контрольну речовину (розчинник). Евтаназію тварин проводили інгаляцією вуглекислого газу. Патологоанатомічне дослідження здійснювали протягом 1 години після евтаназії тварин. Морфологічний стан внутрішніх органів тварин визначали візуально під час розтину.

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики за критерієм Ст'юдента.

Результати досліджень. На всіх випробовуваних дозах клінічні симптоми отруєння тварин були відсутні. У період спостереження загибелі не було, загальний стан тварин дослідних і контрольних груп не відрізнявся. Тварини охоче поїдали корм, рівномірно додавали у вазі; статистично достовірних відмінностей середніх за групами значень маси тіла тварин дослідних
50 груп порівняно з контрольними групами не виявлено (табл. 27, 28).

Таблиця 27

Маса тіла мишей

Доза субстанції, мг/кг	Маса тіла тварин, г (M ± SD)		
	0 день	7 день	14 день
самці			
0 (розчинник)	22,7±1,4	24,3±1,5	25,9±1,7
5	23,0±2,9	24,1±2,9	25,4±2,5
50	22,4±2,1	23,7±2,4	25,4±2,5
500	22,6±2,2	24,2±1,8	26,2±1,8
самки			
0 (розчинник)	19,1±1,5	20,8±1,3	23,3±1,3
5	19,1±2,0	20,6±2,0	22,8±2,0
50	18,6±1,5	19,9±1,7	21,9±1,8
500	18,9±1,0	20,7±0,7	22,8±1,1

Встановлено, що ЛД₅₀ субстанції при внутрішньом'язовому введенні для мишей і пацюків обох статей перевищує максимальну досліджувану дозу - 500 мг/кг.

5

Таблиця 28

Маса тіла пацюків

Доза субстанції, мг/кг	Маса тіла тварин, г (M ± SD)		
	0 день	7 день	14 день
самці			
0 (розчинник)	187±21,4	232±30,5	283±33,5
5	188±12,5	228±18,1	276±17,8
50	190±14,3	228±17,0	279±18,3
500	189±14,1	207±19,3	258±24,1
самки			
0 (розчинник)	162±15,3	185±17,4	212±20,6
5	163±15,5	183±15,0	206±17,0
50	165±17,5	177±17,5	201±15,8
500	160±8,1	169±8,0	198±10,3

Патологоанатомічний розтин мишей і пацюків проводили через 14 днів після одноразового внутрішньом'язового введення субстанції. Оскільки в жодній із груп тварин, незалежно від уведеної дози речовини, за період спостереження загибелі не було, некропсії піддавали тільки мишей і пацюків, які одержали субстанцію в максимальній дозі 500 мг/кг, а також тварин контрольних груп. Евтаназію тварин проводили інгаляцією вуглекислого газу.

10

При зовнішньому огляді мишей і пацюків дослідних і контрольних груп відзначали загальну картину: хутряний покрив був гладеньким, блискучим; шкіра еластичною, рухливою, підшкірна клітковина помірковано виражена, видимі слизові оболонки бліді, без виразок і сторонніх нальотів, патологічні виділення із природних отворів тіла були відсутні.

15

При патологоанатомічному розтині також не виявлено відмінностей між мишами й пацюками всіх дослідних і контрольних груп. Органи грудної і черевної порожнини мали анатомічно правильне розташування й нормальну макроструктуру; яких-небудь патологічних змін виявлено не було. У місці введення субстанції - м'яз стегна - ознак ушкодження не виявлено.

20

Таким чином, у результаті проведеного патоморфологічного дослідження не встановлено ознак шкідливого впливу субстанції при одноразовому внутрішньом'язовому введенні мишам і пацюкам у дозах до 500 мг/кг.

Висновок. Встановлено, що всі досліджувані дози субстанції не викликали інтоксикації й загибелі піддослідних тварин. Значення ЛД₅₀ фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрату для мишей і пацюків перевищують максимальну випробувану дозу - 500 мг/кг і, таким чином, перевищують максимальну разову терапевтичну для людини дозу (2,9 мг/кг) більше ніж в 170 разів. Відмінностей видової і статевої чутливості до субстанції в дозах до 170-разових

25

еквітерапевтичних не виявлено. Субстанція не має місцевої подразнюючої дії при одноразовому внутрішньом'язовому введенні.

Таким чином, фулерен-(трис-амінокапронова кислота) гідрат має високий терапевтичний індекс і не може викликати гострі отруєння при випадковому передозуванні.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Гідратована N-фулерен-амінокислота загальної формули $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOOH\}_3 \cdot xH_2O$, де C_{60} - фулерен, $n=5, 6, 7$, $x=8-10$.

10 2. Спосіб одержання сполуки за п. 1, який **відрізняється** тим, що фулерен піддають взаємодії з 15-разовим мольним надлишком безводних калієвих солей амінокислот загальної формули $NH_2(CH_2)_nCOOH$, де $n=5, 6, 7$, у середовищі ароматичного розчинника при повільному додаванні до отриманої суспензії міжфазного каталізатора, при перемішуванні й нагріванні до температури не вище $80^\circ C$ до повного знебарвлення розчину й формування твердого осаду, який представлений калієвими солями отриманих фулеренових похідних амінокислот, з його наступним виділенням, розчиненням у воді для одержання 0,8 М водного розчину, який обробляють 0,1N розчином органічної або мінеральної кислоти з наступним центрифугуванням, промиванням і висушуванням осаду.

15 3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що безводні калієві солі амінокислот застосовують у дрібнодисперсному стані, а виділення твердого осаду калієвих солей фулеренових похідних амінокислот здійснюють фільтруванням, промиванням етиловим спиртом і висушуванням.

20 4. Спосіб за будь-яким із пп. 2, 3, який **відрізняється** тим, що як міжфазний каталізатор використовують метиловий ефір поліетиленгліколю молекулярною масою 400 або 500.

25 5. Фармацевтична композиція, яка проявляє активність проти вірусу герпесу, вірусів грипу різної природи, ВІЛ, а також протипухлинну й протипсоріатичну активність і як активну речовину містить сполуку за п. 1 в ефективній кількості.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601