

ПЕРСПЕКТИВНІСТЬ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ З ВИКОРИСТАННЯМ НАНОТЕХНОЛОГІЧНОЇ СИРОВИНИ

С. А. Копил¹, Л. В. Крічковська²

¹Харківська державна зооветеринарна академія

²Національний технічний університет «ХПІ»

Робота присвячена вивченню дії препарату на основі гідратованих фуллеренів і інших наноструктур. Досліди проведено на щурах лінії Вістар. Всього проведено 11 вимірювань. При пероральному щоденному введенні старим щурам препарату «Фулвіт» виявлена достовірна гетеропротекторна дія, що проявилась у підвищенні рухової активності тварин, збільшенні проліферативних процесів у волосяних фолікулах шкіри, зниженні рівня продуктів перекисного окислення ліпідів, збільшення кількості тестостерону, збільшення тривалості життя. На основі отриманих результатів випробуваний препарат може бути віднесено до препаратів з антиоксидантною дією, оскільки гальмує рівень вільно-радикального окислювання, що, очевидно, приводить до зниження смертності й поліпшення фізіологічного стану тварин.

Ключові слова: НАНОТЕХНОЛОГІЧНА СИРОВИНА, ПРЕПАРАТ «ФУЛВІТ», ГІДРАТОВАНИ ФУЛЛЕРЕНИ, БУРШТИНОВА КИСЛОТА, РІВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНУ, ЗНИЖЕННЯ ПОЛ, АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ, ГЕТЕРОПРОТЕКТОРНА ДІЯ

У зв'язку зі скороченням чисельності поголів'я сільськогосподарських тварин та птиці в Україні на внутрішньому ринку спостерігається зниження споживання ветеринарних препаратів. Скорочення виробництва ветеринарних препаратів породжує декілька проблем. Перша проблема полягає у зниженні завантаженості підприємств, що виробляють ветеринарні препарати. Друга проблема — у скороченні випуску вітчизняних препаратів, та збільшенні закупок закордонних препаратів. За останніми прогнозами аналітиків та перспективами розвитку сільського господарства і ринку ветеринарних препаратів в Україні об'єм ринку ветеринарних біопрепаратів для сільськогосподарських тварин буде зростати.

Виходячи з вищевказаного, пропонується використання наноконструктивних матеріалів з метою розробки препаратів нового покоління для використання у ветеринарній практиці.

У 1985 р. була відкрита нова алотропна модифікація вуглецю — бакмінстерфуллерени. У подальшому виявилось, що бакмінстерфуллерен C_{60} є представником цілого класу чисто вуглецевих з'єднань нового типу — фуллеренів, котрі можуть мати у своєму складі від 60 до 240 атомів. Було виявлено, що фуллерени та їх похідні не мають токсичної, канцерогенної та мутагенної дії, здатні у незначних концентраціях (мікромольних) проявляти високу біологічну дію, у тому числі мембрано-стабілізуючу, противірусну, імуномодулюючу та інші. Використання фуллеренів у біології та медицині було обмежено у зв'язку з низькою розчинністю цих з'єднань у воді. Однак, в останній період були отримані водні розчини фуллеренів без їх попередньої хімічної модифікації, що мали початкову концентрацію C_{60} 100 мкмоль/л та були стабільними на протязі більше 12 міс. при збереженні на холоді [1–3].

Експериментально було з'ясовано, що ці структури є довгостроково діючими антиоксидантами, які нормалізують процеси перекисного окислювання ліпідів і ліпідний склад клітинних мембран; підвищуючи їх стійкість до впливу несприятливих факторів і відновлюючи порушене енергопостачання усередині клітин, що сприяє процесам клітинної диференціації й тканинної регенерації. Крім того, водорозчинні або гідратовані

фуллерени попереджують клітинний апоптоз, тобто, так звану запрограмовану загибель клітин. Водорозчинні фуллерени мають адаптогенні й антистресові властивості, що пов'язано з позитивним впливом на функції центральної нервової системи, а також вони здатні захищати нервову тканину від ушкоджуючої дії вільних радикалів, мають протизапальну дію, є високоефективними гепатопротекторами при терапії й при профілактиці патологій печінки різної етіології, у тому числі при цирозі печінки [4-6]. В цілому, гідратовані фуллерени проявляють загальну позитивну дію, спрямовану на підтримку нормально функціонуючого організму й на гальмування розвитку негативних проявів, пов'язаних з віковими змінами.

Все вищезазначене спонукало нас застосувати гідратовані фуллерени при розробці нових сучасних препаратів для використання у ветеринарній практиці. Крім того, для створення наноконструкції було використано БК — бурштинову кислоту (синонім — 1,2-дікарбонова кислота — ауксиноподібна речовина) емпірична формула: $C_4H_6O_4$, що вказує на нанорозмірність (до 1–3 нм) цього продукту — потужного джерела електронів, що обумовлює забезпечення енергією мітохондрій. Це, в свою чергу, дозволяє їм здійснювати синтез АТФ. Структурна формула бурштинової кислоти: $HOOC-CH_2-CH_2-COOH$. Це порошок білого кольору або прозорі кристали. Загально відома дія цієї речовини на посилення рухової й функціональної активності, забезпечення енергообміну на клітинному рівні. Як наслідок, вона є потужним стимулятором вироблення енергії й стимулятором багатьох функцій організму, має виняткову відбудовну потужність, підсилює клітинний подих, сприяє засвоєнню кисню клітинами, тканинами, органами. Наприклад, приріст швидкості споживання кисню клітинами печінки при додаванні БК збільшується в 60 разів, знешкоджує вільні радикали, володіє потужними антиоксидантними властивостями.

За рахунок перерахованих вище ефектів БК істотно продовжує життя, захищає від багатьох захворювань, а деякі виліковує. Все це доведено в численних експериментах. БК збільшує виживаємість тварин при впливі на них більшості стресових факторів [7].

Пошук механізмів організму, що впливають на швидкість старіння, вивчення їхньої взаємодії з найважливішими компонентами клітини дозволить з'ясувати провідні закономірності старіння й на основі цих знань розробити засоби збільшення тривалості життя. Труднощі, які дотепер виникають при визначенні рівня старіння або при вимірі його швидкості, говорять про існування великих пробілів у цій області знання.

Матеріали і методи

Було розроблено комбінований розчин на основі гідратованих фуллеренів та бурштинової кислоти. Теоретичний аналіз розчину дозволяє припустити, що бурштинова кислота увійшла як складова до структурованої фуллеренами води і набула лікувальних властивостей. Препарат отримав умовну назву «Фулвіт».

В експериментах використовували самців щурів породи Вістар різного віку. У 1-й й 2-у групи були включені тварини у віці 2,5 роки, в 3-ю у віці 5 місяців (для порівняння контролю досліджуваних процесів у молодому й старому віці). Першій групі щурів (вік 2,5 роки) щодня на протязі 2 місяців перорально вводили «Фулвіт» (1,0 мл/кг). Контролем були тварини того ж віку й молоді статевозрілі п'ятимісячні щури, що утримувалися у тих же умовах.

Впродовж дослідів фіксували фізіологічний стан тварин оцінювали по зовнішньому вигляду, динаміці поведінки, стану шерстного покриву). Враховували такі показники як виживаємість. Після закінчення дослідів щурів декапітували під наркозом, від кожної особини відбирали пробу крові, печінку перфузували, кишечник промивали охолодженим ізотонічним розчином $NaCl$. У сироватці крові, гомогенатах печінки й слизовій кишечника визначали вміст малонового діальдегіда (МДА) — продукту розпаду гідропероксидів жирних кислот, що характеризують активність процесів перекисного окислювання ліпідів

(ПОЛ). Рівень тестостерону у сироватці крові визначали з використанням стандартного набору для радіоімунного аналізу. Отримані дані обробляли статистично.

Результати й обговорення

Вивчення стану старих щурів контрольної групи виявило його відповідність біологічному віку: тварини адинамічні, шерсть скуйовджена, відсутній підшерсток (волосяний покрив рідкий). За час експерименту загинуло $50 \pm 3,8$ % щурів (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив фулвіту на летальність серед щурів і їх шерстний покрив

Вік, умови дослідів	Усього голів	Виживаність		Наявність підшерстку у щурів, %
		Загибло, %	Вижило, %	
5 місяців	9	0	100	100
2,5 роки	12	50*	50*	0
2,5 роки + «Фулвіт»	10	20**	80**	65**

Примітка: * — $p < 0,05$ — до молодих, ** — $p < 0,05$ — до старих

У групі старих тварин, що одержували препарат, смертність була вірогідно нижче, ніж у контролі й становила 20 % ($p < 0,01$). Значно поліпшувався стан шерстного покриву щурів, які отримували «Фулвіт». Так, у 65 % щурів відзначена поява підшерстя, що свідчить про збільшення проліферативних процесів у волосяних фолікулах шкіри тварин (табл. 1). Спостерігалось також підвищення рухової активності у тварин цієї групи. Певним чином змінювався вміст продуктів ПОЛ в органах і сироватці крові старих тварин. (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив фулвіту на вміст малонового діальдегіду у різних органах щурів

Вік і умови дослідів	Кишечник, (нмоль/г)			Печінка			Сироватка крові, (нмоль/л)		
	n	нмоль/г M±m	%	n	нмоль/г M±m	%	n	нмоль/г M±m	%
	5 місяці	10	26,2±1,6	100,0	10	68,4±5,9	100,0	8	4,5±0,15
2,5 роки	6	22,5±2,3	89,6	6	107,0±11,2*	157,3	6	4,7±0,33	104,4
2,5 роки+Фулвіт	10	19,4±0,9*	74,0	10	69,9±4,8**	102,2	7	4,2±0,23	93,7

Примітка: * — $p < 0,05$ — до молодих, ** — $p < 0,05$ — до старих

Дані, наведені у таблиці 2, свідчать про достовірне, у порівнянні з 5-місячними щурами, збільшення вмісту малонового діальдегіду у печінці до $157,3 \pm 24,0$ %, та не значному його зниженні у слизовій оболонці кишечника (на 10,4 %), відсутності виражених змін у сироватці крові старих тварин ($102,2 \pm 7,4$ %).

Звертає на себе увагу різноспрямованість вікових змін у печінці й кишечнику щурів. Якщо зріст МДА у старих тварин може, в певній мірі, свідчити про посилення інтенсивності вільно-радикальних процесів за рахунок зниження активності біологічно активної системи, то для кишечника характерна, що очевидно, інша тенденція процесів.

Проведений на протязі 2 місяців курс введення препарату старим тваринам сприяв: зниженню у печінці рівня МДА до значень у молодих щурів і вірогідно від нього не відрізнявся ($102,2 \pm 7,1$ %), незначному зменшенню кількості цього продукту в слизовій кишечника (на 15 %) у порівнянні з вихідним станом у старих щурів і практично не впливав на його вміст у сироватці крові ($93,7 \pm 5,1$ %) від рівня у молодих.

Наведені дані свідчать про виражену фізіологічну дію препарату «Фулвіт» на рівень ПОЛ у печінці. Це також проявлялося у поліпшенні фізичного стану щурів, (на руховій активності), стану шерстного покриву, зменшенню природної смертності, що вказує на певну геропротекторну дію препарату. Підтвердженням цьому є і результати визначення рівня тестостерону у крові старих тварин, що одержували препарат (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив фулвіту на вміст тестостерону (нмоль/л) у сироватці крові щурів різного віку

n	Вік щурів і показники дослідів					
	5 міс.		2,5 роки		2,5 роки+Фулвіт	
	нмоль/л	%	нмоль/л	%	нмоль/л	%
9	7,82±1,37	100,0	1,21±0,19*	15,5	4,15±0,33**	53,1

Примітка: * — $p < 0,05$ — до молодих, ** — $p < 0,05$ — до старих

Дані таблиці зазначають, що вміст тестостерону у сироватці крові старих щурів значимо знижений й становить усього близько $15,5 \pm 2,4$ % від його концентрації в крові молодих тварин. Введення нового препарату викликає збільшення кількості тестостерону до значень, що вірогідно перевищують вміст гормону у старих щурів ($53,1 \pm 9,2$ %), хоча його рівень все ж таки не досягає показників у молодих статевозрілих особин (табл. 3).

Спостереження за тваринами показало збільшення статевої активності серед щурів, що одержували препарат, при підсаджуванні до них самок. Група щурів, що не одержувала «Фулвіт» була адинамічна й інтересу до особин протилежної статі не проявляла. Досліджений на основі гідратованого фулерену та бурштинової кислоти препарат «Фулвіт» діяв як геропротектор, що проявлялось у зниженні смертності, поліпшенні фізіологічного стану, зниженні продуктів ПОЛ в організмі.

Процес старіння приводить до нагромадження ушкоджень і дефектів на всіх рівнях організації живого. У роботі була показана принципова можливість збільшення тривалості життя лабораторних тварин при використанні інгібіторів радикальних реакцій.

Порушення фізіологічного рівня вільнорадикального окислювання є, як правило, наслідком зміни концентрації його регуляторів — природних антиоксидантів. Імовірно безперервна токсична дія продуктів вільнорадикального окислювання — один з визначних факторів процесу старіння. Це підтверджується прямим визначенням нагромадження у старіючих мітохондріях роз'єднувального фактора — суми окислених ненасичених жирних кислот.

При старінні спостерігається монотонна зміна величини антиоксидантної активності (АОА) ліпідів, що відображає вікове зменшення кількості природних антиоксидантів у тканинах тварин [2, 5, 8], константа швидкості цього процесу характеризується величиною порядку $2,3 \cdot 10^{-2} \text{ мес}^{-1}$; її значення вдвічі більше для короткоживучих тварин ($4,6 \cdot 10^{-2} \text{ мес}^{-1}$) у порівнянні з довгоживучими. Ефективність захисних систем організму, які контролюють рівень реакцій вільнорадикального окислювання і складовою частиною яких є природні антиоксиданти, з віком зменшується, що приводить до підвищення чутливості організму до ушкоджуючих агентів і зменшенню його адаптаційних можливостей.

Зміна АОА є відбитком складних метаболічних процесів, що відбуваються при старінні в організмі тварини. Не ставлячи знака рівності між концентрацією природних антиоксидантів і антиокисною активністю тканини, що залежить не тільки від складу, але й від взаємодії компонентів (ліпідів і природних антиоксидантів) цілком правомірно говорити про великий ступінь відповідності між цими величинами.

Процеси старіння організму супроводжуються падінням активності біологічної антиоксидантної системи (БАС), що приводить до посилення вільно-радикальних реакцій,

появі підвищеної кількості продуктів перекісного окислювання, гідроперекисів, зміні активності захисних ферментів.

Таким чином, застосований препарат «Фулвіт», що має антиоксидантну дію, яка проявилась у досліді (60 діб) при пероральному щоденному введенні старим щурам (2,5 роки) у дозі 1 мл/кг, знижує рівень продуктів ПОЛ у печінці (основному метаболічному органі тварин) до рівня у молодих, що супроводжується гальмуванням процесів старіння і явищами омолодження, що спостерігаються по фізіологічному стану тварин (рухливість, шерстний покрив, статевий потяг), за рівнем тестостерону у крові, а також по зменшенню природної вікової смертності.

Висновки

Досліджений склад препарату на основі гідратованих фуллеренів виявляє геропротекторну дію, що виражається у зниженні смертності, поліпшенні фізіологічного стану, зниженні продуктів ПОЛ й можуть застосовуватися як антиоксидантні засоби при різних патологіях, що супроводжуються порушенням антиоксидантної рівноваги в організмі тварин.

Перспективи подальших досліджень. З фізіологічної точки зору, оскільки «Фулвіт» створено на основі гідратованих фуллеренів, антиоксидантна дія яких не визиває сумніву, випробуваний препарат може бути віднесено до препаратів з антиоксидантною дією, оскільки гальмує рівень вільно-радикального окислювання, що очевидно приводить до зниження смертності й поліпшення фізіологічного стану тварин.

S. A. Kopyl, L. V. Krichkovska

PERSPECTIVITY OF VETERINARY PREPARATIONS WITH USE OF NANOTECHNOLOGICHESKY RAW MATERIALS

S u m m a r y

Work is devoted to studying of preparation action on a basis of hydrated fullerenes and others nanostructure. Researches were conducted on rats of a line of Wistar. In total 11 measurements are spent. At perorel introduction to old rats of a preparation of «Fulvit» it was established authentic geteroprotective action which was revealed in increase of impellent activity of animals, increase proliferative processes in hair follicles of a skin, decrease in level of products peroxidale oxidations of lipids, quantity increase of testosterone, life expectancy increase. The tested preparation can be carried to preparations with antioxidative action as level of is free-radical oxidation brakes that, obviously, leads to decrease in death rate and improvement of a physiological condition of animals.

S. A. Kopyl, L. V. Krichkovska

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СЫРЬЯ

А н н о т а ц и я

Работа посвящена изучению действия препарата на основе гидратированных фуллеренов и других наноструктур. Исследования проведены на крысах линии Вистар. Всего проведено 11 измерений. При пероральном введении старым крысам препарата «Фулвит» установлено достоверное гетеропротекторное действие, которое проявилось в повышении двигательной активности животных, увеличении пролиферативных процессов

в волосяных фолликулах кожи, снижении уровня продуктов перекисного окисления липидов, увеличении количества тестостерона, увеличении продолжительности жизни. Испытанный препарат может быть отнесен к препаратам с антиоксидантным действием, так как тормозит уровень свободно-радикального окисления, что, очевидно, приводит к снижению смертности и улучшению физиологического состояния животных.

1. *Bogdanovic V.* Fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line / V. Bogdanovic, K. Stankov, I. Icevic et al// J. Radiat. Res. — 2008. — Vol. 49. — P. 321–327.

2. *Росляков А. Д.* Цитотоксические и антиоксидантные свойства водных растворов нативных фуллеренов в системах *in vitro* / А. Д. Росляков, Г. В. Андриевский, А. Ю. Петренко, Л. Т. Малая. // Журнал академії медичних наук України. — 1999. — Т. 5, № 2. — С. 338–345.

3. *Тихомиров А. А.* Антиоксидантный и адаптогенный эффект гидратированных C_{60} фуллеренов ($C_{60}HyFn$) в условиях оксидативного стресса, индуцированного ионами алюминия : Сб. тезисов: 10-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология- наука XXI века» 17–21 апреля, 2006. / А. А. Тихомиров, Г. В. Андриевский, В. К. Ключков и др. — Россия : Пущино. — С. 95–96 .

4. *Тихомиров А. А.* Гидратированные фуллерены: Использование в качестве лечебно-профилактических средств : сб. тез : 1У Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії, 29–2 червня, 2006, Дніпропетровський Національний Університет / А. А. Тихомиров, Г. В. Андриевский, В. С. Недзвецкий. — Дніпропетровськ. — С. 133.

5. *Тихомиров А. О.* Вплив гідратованих фулеренів ($HyFn$) на процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та астрогліозу у щурів за умов інтоксикації іонами алюмінію та етиловим спиртов : 1X з'їзд Українського Біохімічного Товариства, 24–27 жовтня 2006 р. Харківський національний Університет ім. В. Н. Каразіна / А. О. Тихомиров, Г. В. Андриєвський, В. С. Недзвецкий, В. К. Ключков. — Харків. — Т. 2. — С. 226–227.

6. *Andrievsky G. V.* Hydrated fullerenes as prototypes of new class of drugs, which can be applied as powereul and «Wise» antioxidants, adjuvants, homeopathic remedies, food supplements and cosmetic ingredients : Book of Abstr. : Ukrainian-German Simposium on Nanobiotechnology, December 14–16, 2006, Kyiv, Ukraine / G. V. Andrievsky, V. K. Kloochkov.

7. *Андриевский Г. В.* Уникальные биологические свойства гидратированных фуллеренов и перспективы применения их в пищевой промышленности : Всеукраинская научно-практическая конференция «Современный рынок Товаров и проблемы здорового питания», ХГУПиТ МОН Украины, 21–22 октября 2009, Харьков, Украина / Г. В. Андриевский

8. *Tykhomyrov A. A.* Hydrated C_{60} fullerene treatment Protects filament protein level in hippocampal neurons and glia of rats chronically exposed to ethanol 6-th forum of European neuroscience 2008, Geneva (Switzerland), July 12–16 th, 2008 / А. А. Tykhomyrov, V. S. Nedzvetsky, V. K. Klochkov, G. V. Andrievsry.

Рецензент: зав. відділом біофізики мембран НДІ біології ХНУ ім. В. Н. Каразіна. Никитченко Юрій Вікторович