

УДК 616.717.61.004.17.616-003

DOI: <https://doi.org/10.17816/phbn267507>

Научная статья



Эффекты фуллерена C₆₀ с антигипоксантами

В.В. Марышева, П.Д. Шабанов

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Совершенствование лекарственных средств часто осуществляется при помощи химических модификаций, обеспечивающих улучшение рецепторного действия или транспорта лекарств к своим тканям-мишеням.

Цель — исследовать влияние комбинаций фуллерена C₆₀ с амтизолом, 2-амино-4-ацетилтиазоло[5,4-*b*]индолом, Метапротом, основанием Метапрота и рутином на антигипоксическую активность в модели острой гипоксии с гиперкапнией.

Материалы и методы. Для работы отобраны несколько соединений, имеющих моно-, би- и трициклическое строение, которые исследовали отдельно или с добавлением фуллерена C₆₀. Все соединения, кроме рутина, синтезированы на кафедре фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, содержат активные аминогруппы, а также атомы азота и серы в циклах: амтизол (3,5-диамино-1,2,4-тиадиазол), ВМ-606 (2-амино-4-ацетилтиазоло[5,4-*b*]индол), Метапрот (2-этилтиобензимидазола гидробромида моногидрат) и основание Метапрота. Всем соединениям присуща антигипоксическая активность. Гипобарическую гипоксию моделировали в проточной барокамере «поднятием» животных на высоту 10 000 м со скоростью 50 м/с и экспозицией в течение 60 мин. Препараты вводили внутривентриально за 60 мин до эксперимента. Оценка защитного действия изучали по средней продолжительности жизни на высоте. Гипоксию с гиперкапнией исследовали на белых мышах-самцах весом 20–22 г, их помещали в стеклянные банки объемом 200 мл с герметичными крышками, которые опускали под воду во избежание подсоса воздуха. Исследуемые препараты и их комплексы с фуллереном в виде тонкой суспензии с твином-80 вводили за 10 мин до гипоксии внутривентриально и регистрировали время жизни животных.

Результаты. Показано, что образование комплекса и его свойства зависят от возможности образования донорно-акцепторной связи между препаратом и фуллереном. Увеличение биодоступности амтизола в виде комплекса с фуллереном C₆₀ на 40 % повышало антигипоксическую активность смеси. Впервые получены динамические кривые активности амтизола и 2-амино-4-ацетилтиазоло[5,4-*b*]индола в зависимости от времени в модели гиперкапнической гипоксии.

Заключение. Фуллерен C₆₀ усиливает антигипоксическую активность исследованных соединений, по-видимому, благодаря повышению биодоступности антигипоксанта, вызванного микропорированием мембран тканей за счет действия фуллерена C₆₀.

Ключевые слова: фуллерен C₆₀; антигипоксантами; амтизол; 2-амино-4-ацетилтиазоло[5,4-*b*]индол; Метапрот; основание Метапрота; рутин; гипоксия с гиперкапнией; биодоступность.

Как цитировать:

Марышева В.В., Шабанов П.Д. Эффекты фуллерена C₆₀ с антигипоксантами // Психофармакология и биологическая наркология. 2022. Т. 13. № 4. С. 65–76. DOI: <https://doi.org/10.17816/phbn267507>

DOI: <https://doi.org/10.17816/phbn267507>

Research Article

Effects of fullerene C₆₀ with antihypoxants

Vera V. Marysheva, Petr D. Shabanov

Military Medical Academy of S.M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

BACKGROUND: Drug improvement is often carried out with the help of chemical modifications that improve the receptor action or transport of drugs to their target tissues.

AIM: The aim of this study was to investigate the effect of combinations of C₆₀ fullerene with amtizol, 2-amino-4-acetylthiazolo[5,4-*b*]indole, metaprot, metaprot base, and rutin on antihypoxic activities in a model of acute hypoxia with hypercapnia.

MATERIALS AND METHODS: Several compounds with mono-, bi-, and tricyclic structures were examined separately or combined with C₆₀ fullerene. All compounds, except for rutin, were synthesized at the Department of Pharmacology of the S.M. Kirov Military Medical Academy and contain active amino groups, nitrogen, and sulfur atoms in the cycles: amtizol (3,5-diamino-1,2,4-thiadiazole), VM-606 (2-amino-4-acetylthiazolo[5,4-*b*]indole), Metaprot (2-ethylthiobenzimidazole hydrobromide monohydrate), and Metaprot base. All compounds demonstrated antihypoxic activity. Hypobaric hypoxia was simulated in a flow pressure chamber by “lifting” animals to a height of 10,000 m at a speed of 50 m/s and exposure for 60 min. The preparations were administered intraperitoneally 60 min before the experiment. The protective effect was evaluated by the average life expectancy at altitude. Hypoxia with hypercapnia was assessed on male white mice weighing 20–22 g, which were placed in 200 mL glass jars with hermetic lids, which were lowered under water to prevent air leakage. The studied preparations and their complexes with fullerene in the form of a thin suspension with Tween-80 were administered intraperitoneally min before hypoxia. The lifespan of the animals was recorded.

RESULTS: The formation of the complex and its properties depend on the development of a donor–acceptor bond between the drug and fullerene. An increase in the bioavailability of amtizol in the form of a complex with C₆₀ fullerene increased the antihypoxic activity of the mixture by 40%. For the first time, dynamic curves of the activities of amtizol and 2-amino-4-acetylthiazolo[5,4-*b*]indole depending on time were obtained in a model of hypercapnic hypoxia.

CONCLUSION: Fullerene C₆₀ enhances the antihypoxic activity of the studied compounds due to an increase in the bioavailability of the antihypoxant caused by the microporation of tissue membranes due to the action of fullerene C₆₀.

Keywords: C₆₀ fullerene; antihypoxants; amtizol; 2-amino-4-acetylthiazolo[5,4-*b*]indole; Metaprot; Metaprot base; rutin; hypoxia with hypercapnia; bioavailability.

To cite this article:

Marysheva VV, Shabanov PD. Effects of fullerene C₆₀ with antihypoxants. *Psychopharmacology and biological narcology*. 2022;13(4):65–76. DOI: <https://doi.org/10.17816/phbn267507>

Received: 15.10.2022

Accepted: 22.11.2022

Published: 28.12.2022

АКТУАЛЬНОСТЬ

Совершенствование лекарственных средств часто осуществляется при помощи химических модификаций, обеспечивающих улучшение рецепторного действия или транспорта лекарств к тканям-мишеням. В последнее время все больше работ посвящено поиску не только ковалентных модификаций лекарств, требующих рутинного синтеза, но и нековалентных модификаций, предусматривающих создание комплексов лекарств с полимерами, наночастицами и другими веществами-носителями. При этом важнейшей задачей становится достижение неизменности транспортируемого лекарства, его фармакологических и биохимических свойств.

Идея данной работы состоит в том, чтобы использовать фуллерен C_{60} в качестве нековалентного модификатора лекарственных соединений. При таком подходе автоматически предотвращается возможность какого-либо необратимого изменения лекарственного соединения, приводящего к утрате его свойств.

Фуллерены ведут себя как электронакцепторные полиалкены и в основном удовлетворяют парадигмам органической химии [13], но все же их следует рассматривать как особый класс органических молекул [11].

Несмотря на большое количество атомов, молекулы фуллеренов компактны (рис. 1). Диаметр молекулы C_{60} , представляющей собой сферу, равен 0,714 нм, что сравнимо с размерами обычных органических молекул и меньше, нежели размеры сложных органических молекул. Отсюда следует, что по своим размерам фуллерены вполне совместимы с обычными биологическими мишенями [11].

Известно, что для любого лекарственного вещества наиболее важными характеристиками являются эффективность и избирательность фармакологического действия. При рекомендации к практическому применению учитываются такое его свойство, как токсичность, и фармакокинетические параметры: абсорбция (всасывание), распределение, метаболизм и выведение, обозначаемые аббревиатурой ADME (absorbance, distribution, metabolism, extinction).

Фуллерен — высокоактивное соединение с системой из 60 несопряженных π -электронов, что делает факт его взаимодействия с лекарственными веществами любой природы практически не требующим обоснования.

Фуллерены могут оказывать в биологических системах как антиоксидантное действие, улавливая активные формы кислорода (АФК), так и окислительное, придавая фуллерену фотосенсибилизирующие свойства. Обладающие мембранотропным действием липофильные молекулы фуллеренов взаимодействуют с различными биологическими структурами и могут изменять функции этих структур, увеличивая липофильность активной молекулы (аминокислот, нуклеиновых кислот, белков и др.) [3].



Рис. 1. Молекула фуллерена C_{60}

Fig. 1. C_{60} fullerene molecule

Гипоксия представляет собой универсальный патологический процесс, сопровождающий и определяющий развитие самых разнообразных патологий. Она приводит к комплексной модификации функций биологических мембран, затрагивающей как липидный бислой, так и мембранные ферменты. Повреждаются или модифицируются главные функции мембран: барьерная, рецепторная, каталитическая.

Кафедра фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации является пионером в разработке антигипоксантов не только в нашей стране, но и в мире. Еще в 1960-х годах под руководством профессора В.М. Виноградова были созданы первые антигипоксанты, в том числе амтизол [7]. Позже были синтезированы многие другие соединения аминотиолового ряда, перспективные для применения в качестве антигипоксантов и используемые в медицинской практике, например Метапрот (Бемитил). Четко установлено положительное поливалентное влияние этих соединений на энергетику клетки. Проникая в митохондрии, эти препараты стабилизируют митохондриальные мембраны, уменьшают угнетение дегидрогеназ цикла Кребса, предотвращают разобщение окисления и фосфорилирования, увеличивая тем самым продукцию АТФ на единицу потребляемого дефицитного кислорода. Активируя продукцию энергии в процессе гликолиза, рассматриваемые антигипоксанты не только не усугубляют метаболический ацидоз при гипоксии, но, напротив, ослабляют его проявления и обеспечивают восстановление углеводных источников энергии. Некоторое значение в их антигипоксическом эффекте может иметь и способность этих препаратов тормозить определенные энергопотребляющие процессы, не играющие решающей роли в поддержании жизнеспособности клетки при критической гипоксии [10].

Известно, что фуллерен является хорошим акцептором электронов [17] и, соответственно, склонен к взаимодействию с соединениями — донорами электронов, в частности с веществами, содержащими аминогруппы [13]. К таким веществам относится большинство представителей аминотиоловых антигипоксантов.

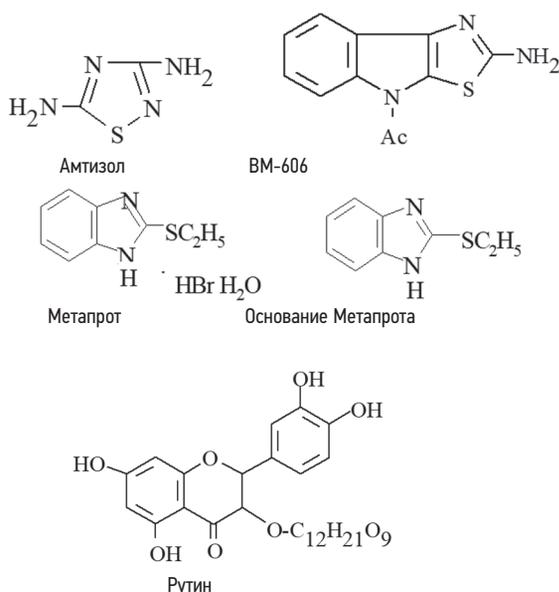


Рис. 2. Структурные формулы исследованных препаратов
Fig. 2. Structural formulas of the studied preparations

Для настоящей работы нами были отобраны несколько соединений, имеющих моно-, би- и трициклическое строение; их структурные формулы приведены на рис. 2. Все соединения, кроме рутина, синтезированы на кафедре фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, содержат активные аминогруппы, а также атомы азота и серы в циклах: амтизол (3,5-диамино-1,2,4-триадиазол), BM-606 (2-амино-4-ацетилтиазоло[5,4-*b*]индол), Метапрот (2-этилтиобензимидазол гидробромид гидрат) и основание Метапрота. Всем соединениям присуща антигипоксическая активность. Амтизол в 1990-е годы считался эталонным антигипоксантом [9], к сожалению, его внедрение в медицинскую практику застопорилось на уровне промышленного апробирования из-за экономических причин. BM-606 представляет собой оригинальное соединение, превосходящее амтизол по ряду антигипоксических активностей и обладающее также комплексом фармакологически полезных свойств [8]. Антигипоксические свойства Метапрота близки к таковым у амтизола, хотя несколько уступают ему.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фармакологические исследования выполнены на 493 беспородных мышак-самцах массой 20–22 г, полученных из питомника «Рапполово». Содержание и уход за животными осуществлялись в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014). Животные содержались в условиях конвенционального вивария кафедры фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова.

Исследуемые препараты имеют различную растворимость в воде: амтизол и Метапрот гидрофильны, BM-606, основание Метапрота, рутин и фуллерен C₆₀ — гидрофобны.

По этой причине в случае использования гидрофобных препаратов или композиций для возможности проведения биологических экспериментов они применялись в виде тонких суспензий препаратов с твином-80.

Спектроскопия. Снимали инфракрасные (ИК) спектры чистых веществ: фуллерена, амтизола, BM-606, а также смесей фуллерена с означенными лекарственными препаратами. Пробы подготавливали основным и наиболее универсальным способом, который применим и для наших объектов исследования, — прессования таблеток с галогенидами щелочных металлов, в частности с хлоридом натрия (NaCl). В агатовой ступке тщательно перемешивали исследуемый образец в порошкообразном виде и порошок NaCl. После смесь прессовалась в пресс-форме, в результате чего получалась прозрачная или полупрозрачная таблетка, которую помещали в спектрометр. Исследуемые образцы перед измерениями просушивали в духовом шкафу при температуре 60 °С, которая не оказывала разрушительного воздействия на исследуемые вещества, а во время непосредственного эксперимента пробы продували при комнатной температуре во избежание получения на спектре широких полос адсорбированной воды в областях 3450 и 1630 см⁻¹. Экспериментально было подобрано оптимальное соотношение проб фуллерена, амтизола и BM-606 в порошке NaCl, оно составляло по весу 1,4 %. При приготовлении одной таблетки использовали 250 мг NaCl и, соответственно, 3,5 мг исследуемого вещества или смеси веществ [1].

Спектры смесей лекарственных веществ с фуллереном измеряли в том же диапазоне: 400–4000 см⁻¹. Основные параметры измерений, устанавливаемые на приборе Specord-80, — ширина щели и время интегрирования. Ширина щели определялась равной 12, это значение подобрано экспериментально как оптимальное для измерений образцов, приготовленных по использованной нами методике.

Обзорные спектры, к которым относятся спектры чистых веществ, снимались с временем интегрирования, равным 0,5 с. Для смесей лекарственных препаратов с фуллереном время интегрирования составляло 1 с, а также было запрограммировано накопление спектральных данных, то есть некоторое количество повторных измерений, которые позволяют получить итоговый спектр с минимальным уровнем шумов.

Полученные с помощью спектрометров данные обрабатывали с использованием пакета Origin 7.0 (Origin Lab, США).

Гипобарическая гипоксия. Гипобарическую гипоксию моделировали в проточной барокамере «поднятием» животных на высоту 10 000 м со скоростью 50 м/с и экспозицией в течение 60 мин. Препараты вводили внутривенно за 60 мин до эксперимента. Оценку защитного действия изучали по средней продолжительности жизни и по выживаемости белых беспородных мышак самцов массой 20–22 г после гипоксического эпизода в сравнении

с контролем. Контролем служил 0,9 % раствор натрия хлорида. В каждой группе находилось от 6 до 8 мышей.

Гиперкапническая гипоксия. Гипоксию с гиперкапнией [12] исследовали на белых беспородных мышках-самцах массой 20–22 г. Животных помещали в стеклянные банки объемом 200 мл с герметичными крышками, которые опускали под воду во избежание подсоса воздуха. Исследуемые препараты и их комплексы с фуллереном в виде тонкой суспензии с твином-80 вводили перед гипоксией внутривенно, в случае амтизола, Метапрота использовали водный раствор. Регистрировали время жизни животных. Контролем служил 0,9% раствор натрия хлорида. Эксперименты проводили через 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 мин и спустя 1 сут после введения препаратов и регистрировали продолжительность жизни животных после помещения в стеклянную банку. В каждой экспериментальной группе находилось по 7–9 особей.

Амтизол и ВМ-606 сравнивали в эквимольных дозах, которые были подобраны ранее [6]. Для Метапрота доза для антигипоксических исследований была известна [15], основание Метапрота и рутин сравнивали в эквимольных дозах с Метапротом. Фуллерен C_{60} использовали в эквимольной дозе к препарату (табл. 1). В работе использовали фуллерен C_{60} , предоставленный ЗАО «ИЛИП» (Санкт-Петербург, Россия), сертификат качества приведен в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбранный диапазон волновых чисел в измерениях ИК-спектров $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ полностью соответствовал поставленным задачам. Известно, что амтизол имеет 16 характеристических полос на 3429, 3303, 3205, 3125, 1636, 1554, 1530, 1417, 1309, 1132, 1111, 1023, 840, 710, 590, 480 см^{-1} [14].

Благодаря высокой симметрии для молекулы C_{60} характерны 46 нормальных колебаний, из которых 4 являются активными в ИК-спектрах, что нашло подтверждение в полученных нами данных. ИК-спектр фуллерена C_{60} содержит все характеристические полосы в области «отпечатков пальцев» ($1500\text{--}500\text{ см}^{-1}$): 1429, 1182, 576, 527 см^{-1} [5].

Как видно на рис. 3, ИК-спектры амтизола и фуллерена имеют значимые различия как по положению характеристических полос, так и по их относительной интенсивности. На результирующем спектре смеси 2 (фуллерена и амтизола) компонентов явно виден сдвиг полос в область более низких волновых чисел, а также их видоизменение.

Достаточно явно видна сильная деформация характеристических полос амтизола в области $1100\text{--}700\text{ см}^{-1}$, что соответствует поглощению колебаний атомов азота в кольце молекулы. Также наблюдается исчезновение характеристических полос в области маленьких волновых чисел, где поглощаются колебания свободных аминогрупп. Значительное изменение положения и формы

Таблица 1. Дозы исследованных препаратов

Table 1. Doses of studied drugs

Препарат	Доза, мг/кг
Амтизол	25
ВМ-606	50
Фуллерен	156
Смесь амтизола и фуллерена	25/156
Смесь ВМ-606 и фуллерена	50/156
Метапрот	50
Основание Метапрота	32
Рутин	110
Смесь Метапрота и фуллерена	50/130
Смесь основания Метапрота и фуллерена	32/130
Смесь рутина и фуллерена	110/130

Таблица 2. Сертификат качества на порошок фуллерена C_{60}

Table 2. Quality certificate for C_{60} fullerene powder

Продукт	Фуллерен C_{60} , мас. %
Чистота	>99,5
Примеси:	
растворители (о-ксилен)	<0,05
фуллерен C_{70}	<0,2
Высокие фуллерены	<0,1
Эпоксиды	<0,1

определенных характеристических полос означает ограничение свободы колебаний соответствующих групп атомов, это, в свою очередь, означает, что во взаимодействии молекулы амтизола с фуллереном задействованы именно они.

Разная высота спектров, скорее всего, вызвана различиями между приготовленными для каждого из измерений таблетками. К особенностям измерений также относится и образование «пьедестала» в области волновых чисел от 400 до 600 см^{-1} . С учетом этих условий можно заключить, что добавление фуллерена C_{60} к амтизолу не является индифферентным и между ними имеется достаточно значимое взаимодействие, которое нашло отражение в итоговом спектре.

На рис. 4 приведен ИК-спектр препарата ВМ-606, комбинации ВМ-606 с фуллереном и фуллерена C_{60} в таблетках NaCl. В области «отпечатков пальцев» отсутствуют значимые различия между спектрами препарата и его смеси с фуллереном, однако на интервале волновых чисел $4000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ видны существенные изменения характеристических полос ВМ-606 в спектре его смеси с фуллереном. Наблюдается их заметное расширение, а также изменение относительной высоты. В данной области значений волновых чисел поглощают колебания конденсированных колец ВМ-606 (см. рис. 2). Все характеристические полосы от 4000 до 3000 см^{-1} отражают различные комбинации колебаний молекулы ВМ-606, которые затрагивают ароматические кольца.

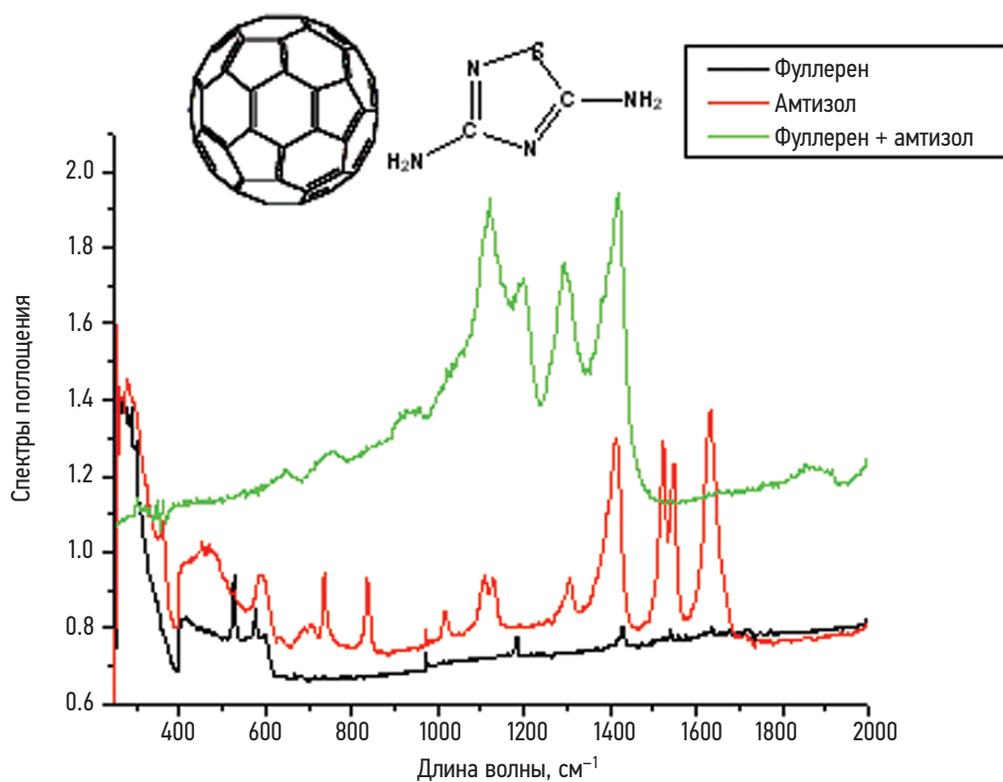


Рис. 3. Инфракрасные спектры амтизола, фуллерена C₆₀ и их смеси в таблетках хлорида натрия
 Fig. 3. Infrared spectra of amtizol, C₆₀ fullerene, and their mixture in sodium chloride tablets

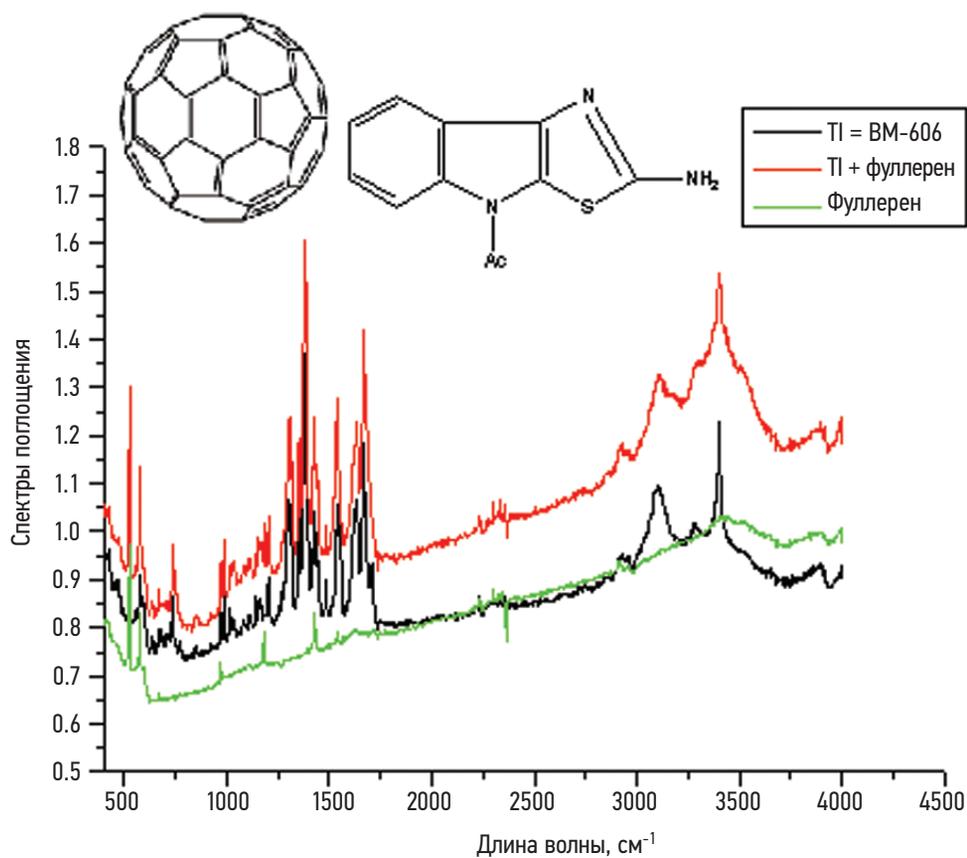


Рис. 4. Инфракрасные спектры VM-606, фуллерена C₆₀ и их смеси в таблетках хлорида натрия
 Fig. 4. Infrared spectra of VM-606, C₆₀ fullerene, and their mixture in sodium chloride tablets

Полученные с помощью спектроскопии данные позволяют заключить, что между изучаемыми препаратами и фуллереном имеет место значительное взаимодействие, которое не ведет к образованию ковалентных комплексов, однако является достаточно существенным, чтобы его можно было обнаружить на спектрометре.

Характеристические полосы чистых лекарственных средств, которые изменяются в спектре их смеси с фуллереном, отражают те или иные колебания ароматических колец, включающих как атомы углерода, так и атомы азота или серы, а также свободных аминогрупп. Известно, что перечисленные элементы молекулы являются хорошими донорами электронов, в свою очередь фуллерен обладает в основном свойствами акцептора *n*- и *p*-электронов. Следовательно, полученные результаты показывают,

что между исследуемыми лекарственными соединениями и фуллеренами существуют взаимодействия.

Фуллерены, являясь *n*- и *p*-акцепторами, могут образовывать различные нековалентные соединения донорно-акцепторного типа, существующие за счет слабых, по сравнению с обычными ковалентными химическими связями, вандерваальсовых взаимодействий и переноса заряда с донора на акцептор. Перенос заряда играет очень важную роль и обуславливает появление качественно новых физико-химических свойств полученных соединений, что мы и собирались проверить в опытах на животных.

Исследование антигипоксической активности амтизола, ВМ-606, их смесей с фуллереном и самого фуллерена в модели гиперкапнической гипоксии в различные временные отрезки (5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 мин и спустя

Таблица 3. Продолжительность жизни мышей в модели гиперкапнической гипоксии через различные временные значения от введения препаратов и их ассоциатов с фуллереном (*M + m*)

Table 3. Life expectancy of hypercapnic hypoxia mouse model through various time values from the administration of drugs and their combinatoinis with fullerene (*M + m*)

Группа (интервал после введения)	Контроль	А	А + Ф	ВМ-606	ВМ-606 + Ф	Ф
5 мин	18,89 ± 3,60	28,83 ± 5,59	29,43 ± 4,86	26,35 ± 4,95	34,89 ± 8,67	19,73 ± 1,73
15 мин	22,97 ± 2,22	33,13 ± 5,10	30,25 ± 4,56	40,91 ± 7,15*	42,89 ± 7,02*	24,29 ± 5,31
30 мин	18,45 ± 2,73	26,02 ± 3,14	32,41 ± 5,78*	29,81 ± 7,66	—	23,51 ± 4,62
45 мин	24,14 ± 4,41	32,34 ± 6,02	29,83 ± 4,70	42,25 ± 8,55	39,85 ± 10,52	28,75 ± 4,84
60 мин	21,04 ± 3,73	32,57 ± 9,85	28,79 ± 6,16	40,66 ± 7,22*	39,26 ± 6,19*	20,13 ± 3,17
90 мин	20,16 ± 3,34	28,10 ± 4,72	33,67 ± 7,88	46,86 ± 11,51*	36,59 ± 8,22	25,05 ± 3,55
120 мин	19,58 ± 3,32	23,95 ± 3,93	29,72 ± 13,27	30,81 ± 9,65	29,17 ± 15,78	—
240 мин	19,58 ± 3,32	22,65 ± 4,69	22,91 ± 2,63	20,97 ± 4,34	24,00 ± 4,69	—
24 ч	19,58 ± 3,32	22,43 ± 2,07	20,12 ± 2,56	21,38 ± 2,94	21,37 ± 4,07	—

Примечание. А — амтизол; Ф — фуллерен; ВМ-606 — производное тиазолиндола; А + Ф — смесь амтизола и фуллерена; ВМ-606 + Ф — смесь ВМ-606 с фуллереном; «—» — данные отсутствуют. **p* < 0,05 по отношению к контролю.

Note. А — amtizol; F — fullerene; VM-606 — thiazoloindole derivative; А + F — mixture of amtizol and fullerene; VM-606 + F — mixture of VM-606 with fullerene; “—” — no data. **p* < 0.05 relative to the control group.

Таблица 4. Увеличение продолжительности жизни (в %) в исследуемых группах по отношению к контролю

Table 4. Increase in life expectancy (%) in the studied groups relative to the control group

Группа (интервал после введения)	Контроль	А	А + Ф	ВМ-606	ВМ-606 + Ф	Ф
5 мин	100	153	156	139	185	104
15 мин	100	144	132	178*	187*	106
30 мин	100	141	175*	162	—	127
45 мин	100	134	124	176	165	119
60 мин	100	155	142	193*	187	96
90 мин	100	139	167	232*	181	124
120 мин	100	122	152	157	149	—
240 мин	100	116	117	107	123	—
24 ч	100	115	103	109	109	—

Примечание. А — амтизол; Ф — фуллерен; ВМ-606 — производное тиазолиндола; А + Ф — смесь амтизола и фуллерена; ВМ-606 + Ф — смесь ВМ-606 с фуллереном; «—» — данные отсутствуют. **p* < 0,05 по отношению к контролю.

Note. А — amtizol; F — fullerene; VM-606 — thiazoloindole derivative; А + F — mixture of amtizol and fullerene; VM-606 + F — mixture of VM-606 with fullerene; “—” — no data. **p* < 0.05 relative to the control group.

24 ч) позволило нам подробно изучить кинетику препаратов и их комбинаций с фуллереном.

Результаты опытов по определению антигипоксической активности представлены в табл. 3, где указаны среднее время жизни мышей в условиях гипоксии для каждой из исследуемых групп. Количество животных в опытных группах от 7 до 9 особей.

В табл. 4 представлены экспериментальные данные, сходные со значениями из табл. 3, но выраженные в виде долевого соотношения (в процентах) по отношению к контролю.

По данным табл. 4 для амтизола и его эквимольной смеси с фуллереном построены динамические графики по изменению активности препаратов от 5 до 240 мин после внутрибрюшинного введения, которые приведены на рис. 5.

Временная динамическая кривая амтизола (А) представляет собой кривую с двумя максимумами (точки 5 и 60 мин) и плато (15–30 мин), минимум при 45 мин. После 60 мин начинается падение активности препарата до 120 мин и далее после 240 мин сохраняется фоновая активность 15–16 %, которая регистрируется через сутки после введения.

Динамическая кривая для эквимольной смеси амтизола и фуллерена (А+Ф) состоит из 3 максимумов в точках 5, 30 и 90 мин, по своим величинам превосходящих и фуллерен и амтизол. Очевидно появление у гибридного препарата большого максимума активности для точки 30 мин,

смещение максимума для амтизола при 60 мин до 90 мин с увеличением роста активности. Для точек 30 и 90 мин можно говорить не просто о суммировании эффектов амтизола и фуллерена, а об их превышении.

Приведенные данные свидетельствуют об отсутствии эффекта прямого сложения активностей 2 компонентов при применении смеси амтизола и фуллерена (не суммационный, а потенцирующий эффект). Более того, наблюдается менее резкое падение активности через 120 мин после введения смеси, чем после амтизола. Интегрирование данных под кривой амтизола и его смеси с фуллереном говорит об увеличении биодоступности препарата в смеси на 40 % (по проявлению биологического эффекта и расчету площади под кривой).

Таким образом, фуллерен C_{60} потенцирует антигипоксическое действие амтизола в первые 4 ч после введения, по-видимому, за счет увеличения биодоступности амтизола.

Впервые изучена антигипоксическая активность препарата ВМ-606 в зависимости от времени введения препарата (рис. 6). Кривая ВМ-606 имеет 2 максимума, как и амтизол, но в других временных точках: через 15 и 90 мин. Это связано с гидрофобностью препарата ВМ-606. Добавление фуллерена значительно увеличивает биодоступность препарата в первые 5 и 15 мин после введения. Так, через 5 мин после введения ВМ-606 и эквимольной смеси с фуллереном происходит изменение (увеличение) активности с 39 до 85 % соответственно,

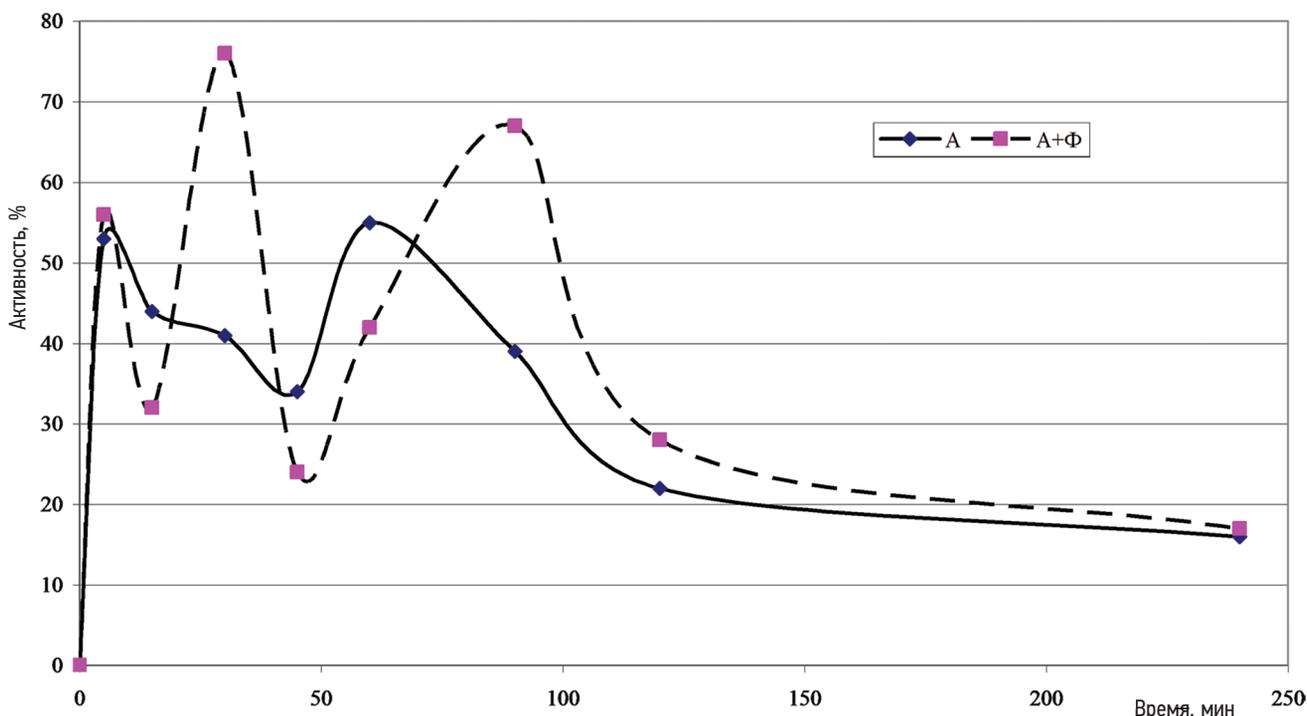


Рис. 5. Динамика активности антигипоксанта амтизола (А) и его эквимольной смеси с фуллереном (А + Ф) в течение 240 мин в модели гиперкапнической гипоксии на мышах относительно контроля

Fig. 5. Dynamics of the activity of the antihypoxic drug amtizol and its equimolar mixture with fullerene for 240 min in the hypercapnic hypoxia mouse model relative to the control

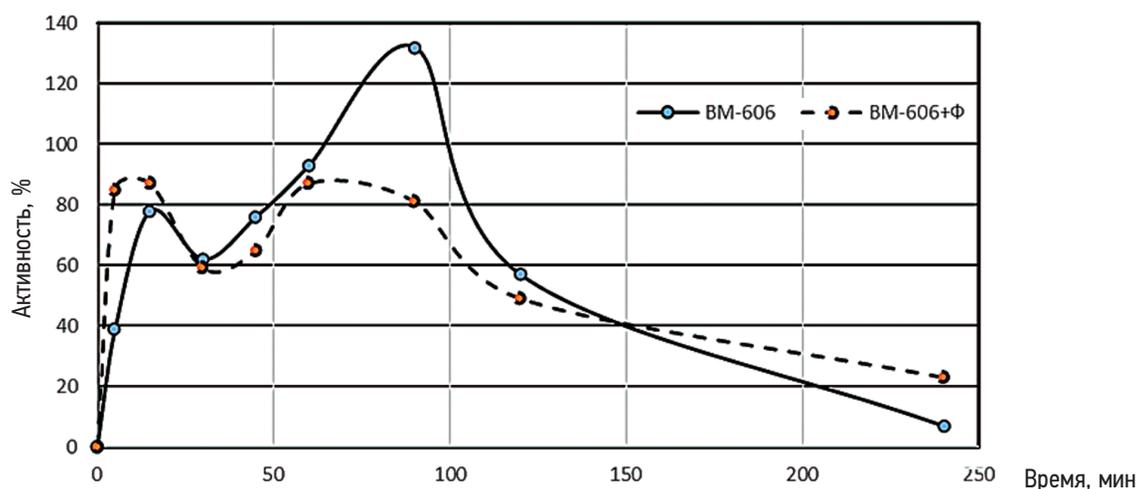


Рис. 6. Динамика активности препарата VM-606 и его эквимольной смеси с фуллереном (VM-606 + Ф) в течение 240 мин в модели гиперкапнической гипоксии на мышах относительно контроля

Fig. 6. Dynamics of the activity of VM-606 and its equimolar mixture with fullerene for 240 min in the hypercapnic hypoxia mouse model relative to the control

то есть более чем в 2 раза. Измерение антигипоксической активности эквимольной смеси VM-606 и фуллерена в промежутке 45–120 мин не приводит к потенцированию активности, происходит сглаживание эффекта VM-606, образуется «плато» при 60–90 мин. К концу суток одинаковая фоновая активность обоих соединений составила 9 %.

Моделирование активности с помощью фуллерена C₆₀ двух активных антигипоксантов аминотиолового ряда различного строения, но с одинаковым набором фармакофорных элементов, обнаружило еще до фармакологических опытов наличие различного взаимодействия гидрофильного амтизола и гидрофобного VM-606 по ИК-спектроскопии. Оказалось, что амтизол взаимодействовал с фуллереном за счет аминогрупп, а VM-606 — за счет гетероциклов. И если в начале работы (5–15 мин) фуллереновая составляющая сильно облегчила доступ препарата, то далее этого не произошло. Возможно, в среде организма произошла трансформация комплекса с уменьшением его растворимости.

Важно отметить, что и для самого фуллерена характерна некая антигипоксическая активность: в интервале от 30 до 90 мин продолжительность жизни опытных животных увеличивалась на 19–27 % (не достоверно).

Интересно было посмотреть, как поведет себя фуллерен в другой модели гипоксии — гипобарической. Для сравнения взяли амтизол, его комплекс с фуллереном и сам фуллерен. Полученные данные приведены в табл. 5.

В контрольной группе продолжительность жизни мышей составила около 8 мин пребывания на «высоте». Применение амтизола не только увеличивает в 2 раза продолжительность жизни опытных животных, но и в 67 % случаев защищает от гибели. Чистый фуллерен уменьшил продолжительность жизни, однако 12,5 % животных защитил от гибели. Комплексный препарат не увеличил время жизни, но защитил от гибели 43 % мышей.

Таким образом, фуллерен C₆₀ обладает некими антигипоксическими свойствами. Возможно, они связаны с его способностью шунтировать биохимические процессы в организме.

На следующем этапе работы мы исследовали влияние фуллерена C₆₀ на антигипоксические препараты другого строения. Для этой цели были отобраны следующие соединения: 2-этилтиобензимидазол, производное бензимидазола, водорастворимый препарат и его водонерастворимое основание (см. рис. 1) и антиоксидант растительного происхождения рутин. Метапрот был разработан в Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова,

Таблица 5. Исследование амтизола, фуллерена C₆₀ и их комплекса в модели гипобарической гипоксии

Table 5. Evaluation of amtizol, C₆₀ fullerene, and their combination in a hypobaric hypoxia mouse model

Группа	Время жизни, мин (M ± m)	Доля по отношению к контрольной группе, %	Число выживших животных, %
Контрольная	7,69 ± 4,15	100	0
Амтизол	15,54 ± 13,14	202	67
Амтизол + фуллерен	8,04 ± 4,68	105	43
Фуллерен	3,55 ± 1,83	46	12,5

Таблица 6. Активность препаратов Метапрота, основания Метапрота, рутина и их эквимольных смесей с фуллереном C_{60} в модели гиперкапнической гипоксии через 5 и 60 мин после внутрибрюшинного введения у белых беспородных мышей

Table 6. Activity of preparations of metaprot, metaprot base, rutin and their equimolar mixtures with C_{60} fullerene in a hypercapnic hypoxia model 5 and 60 min after intraperitoneal administration in white outbred mice

Группа	Время жизни через 5 мин, мин	Доля по отношению к контрольной группе, %	Время жизни через 60 мин, мин	Доля по отношению к контрольной группе, %
Контрольная	18,38 ± 2,68	100	18,27 ± 1,90	100
Метапрот	28,13 ± 8,40	153	22,07 ± 3,12	121
Метапрот + фуллерен	27,81 ± 7,16	151	22,53 ± 2,60	123
Основание Метапрота	29,42 ± 5,64*	160	19,99 ± 1,90	109
Основание Метапрота + фуллерен	29,43 ± 7,05	161	27,87 ± 3,04	153
Рутин	25,16 ± 5,15	137	25,87 ± 3,75	142
Рутин + фуллерен	32,68 ± 2,85**	178	22,80 ± 7,16	125

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ к контролю.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ to control.

обладает целым комплексом полезных лекарственных свойств: антигипоксической, антиоксидантной, ноотропной, регенеративной и иммуномодулирующей активностью [15]. Рутину и его агликону дигидрокверцетину также присуща поливалентная фармакологическая активность, базирующаяся на мощных антиоксидантных свойствах, известна антигипоксическая активность [2, 4, 16].

Основываясь на опытах с амтизолом и ВМ-606, для Метапрота, его основания и рутина изучали комплексы с фуллереном C_{60} в виде эквимольных смесей с применением твина-80 в модели гиперкапнической гипоксии. Исследовали их активность в наиболее, на наш взгляд, информативных точках — через 5 и 60 мин после внутрибрюшинного введения. Полученные данные представлены в табл. 6. В каждой группе находилось от 6 до 8 опытных животных.

Исходя из представленных данных, Метапрот через 5 мин после введения увеличивал продолжительность жизни опытных животных на 53 % относительно

контроля. Через 60 мин после введения этот показатель составлял лишь 21 %. Комбинирование Метапрота с фуллереном не привело к изменению результатов, фуллерен никоим образом не повлиял на активность препарата. Основание Метапрота через 5 мин после введения достоверно увеличивало продолжительность жизни опытных животных на 60 % относительно контроля, что даже несколько выше Метапрота (53 %). Для мышей, вступивших в опыт через 60 мин после внутрибрюшинного введения основания Метапрота, увеличение продолжительности жизни составило всего лишь 9 %. Действие комбинации основания с фуллереном через 5 мин после введения не отличалось от активности чистого препарата. Однако эта комбинация через 60 мин значительно увеличила продолжительность жизни опытных животных на 53 % по отношению к контролю.

Основание Метапрота, в отличие от Метапрота, существующего в виде соли и гидрата, имеет возможность за счет атомов азота в гетероцикле отдать электрон

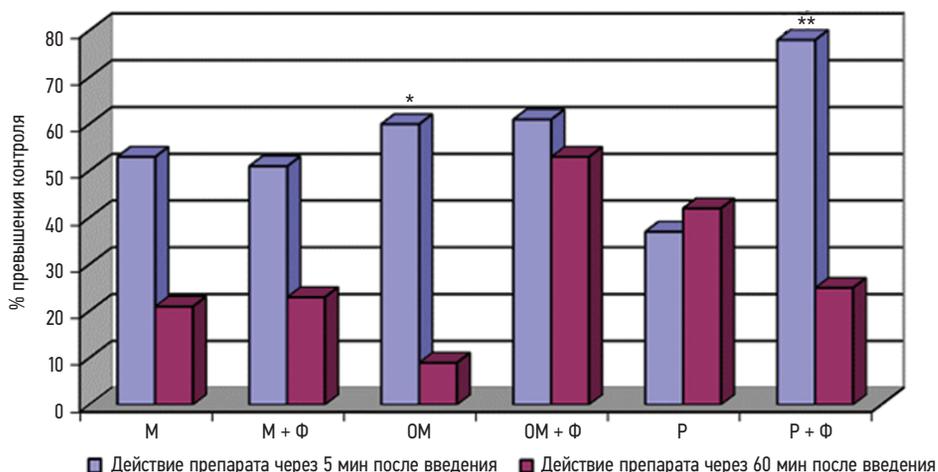


Рис. 7. Диаграмма антигипоксической активности Метапрота (М), основания Метапрота (ОМ), рутина (Р) и их комбинаций с фуллереном C_{60} (Ф) в модели гиперкапнической гипоксии через 5 и 60 мин после внутрибрюшинного введения

Fig. 7. Diagram of the antihypoxic activity of metaprot (M), metaprot base (MB), rutin (R), and their combinations with C_{60} fullerene in a hypercapnic hypoxia model 5 and 60 min after intraperitoneal administration

(см. рис. 2). В комбинации с фуллереном, вероятно, образует донорно-акцепторную связь, такое взаимодействие позволяет пролонгировать активность препарата, что весьма похоже на поведение комбинации амтизола с фуллереном C_{60} .

Рутин через 5 мин после внутривенного введения препарата увеличивал продолжительность жизни опытных животных на 37 % относительно контроля. Через 60 мин после введения это увеличение составило 42 %, то есть активность препарата за 1 ч не упала. Интересно в этой связи поведение рутина в эквимольной смеси с фуллереном C_{60} . Их комбинация через 5 мин после введения увеличивала продолжительность жизни опытных животных достоверно на 78 % относительно контроля. Осуществляется явное потенцирование активности рутина, а не суммация эффектов. Через 60 мин после введения комплекса активность упала и составила всего лишь 25 % по отношению к контролю. Действие комбинации рутина с фуллереном напоминает таковое в этих точках у препарата ВМ-606 (рис. 7). Это свидетельствует о существовании донорно-акцепторного взаимодействия фуллерена C_{60} и рутина.

ВЫВОДЫ

Фуллерен C_{60} обладает некоторой антигипоксической активностью в моделях гипобарической и гиперкапнической гипоксии, осуществляющейся, возможно, за счет его способности шунтировать биоэнергетические химические процессы в организме.

Фуллерен C_{60} образует донорно-акцепторные комплексы с препаратами, способными «дать займы» электрон. Комплекс с амтизолом, в котором, по данным ИК-спектроскопии задействованы и аминогруппы и гетероатомы кольца, увеличивает биодоступность амтизола на 40 %.

Для препаратов, осуществляющих взаимодействие с фуллереном за счет гетероатомов или ароматики колец, таких как ВМ-606 и рутин, потенцирование кратковременно и хорошо заметно в самом начале действия (первые

5–10 мин). Затем под влиянием биологических процессов в организме возможна диссоциация комплекса. На примере Метапрота, являющегося гидробромидом гидратом, и основания Метапрота четко выявлена способность образования комплекса за счет гетероцикла.

Для амтизола и соединения ВМ-606 впервые получены динамические кривые активности во времени в модели гиперкапнической гипоксии.

Фуллерен C_{60} способен модулировать активность антигипоксантов при возможности образования донорно-акцепторной связи.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: В.В. Марышева — написание статьи, анализ данных; В.В. Марышева, П.Д. Шабанов — редактирование статьи, разработка общей концепции.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. The contribution of each author: V.V. Marysheva — manuscript drafting, writing and pilot data analyses; V.V. Marysheva, P.D. Shabanov — paper reconceptualization and general concept discussion.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев А.В., Гриненко Е.В., Щукин А.О., Федупина Т.Г. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений. Санкт-Петербург: СПбГЛТА, 2007. С. 4.
2. Думпис М.А., Прокопенко В.М., Литасова Е.В., и др. Антиоксидантные свойства композиции фуллерен C_{60} /ДГКЦ // Химико-фармацевтический журнал. 2017. Т. 51, № 10. С. 30–32. DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-10-30-32
3. Думпис М.А., Николаев Д.Н., Литасова Е.В., и др. Биологическая активность фуллеренов - реалии и перспективы // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2018. Т. 16, № 1. С. 4–20. DOI: 10.17816/RCF1614-20
4. Ковальский И.В., Краснюк И.И., Краснюк И.И. (мл.), и др. Механизмы фармакологического действия рутина // Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48, № 2. С. 3–6. DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-2-3-6
5. Конарев Д.В., Любовская Р.Н. Донорно-акцепторные комплексы и ион-радикальные соли на основе фуллеренов // Успехи химии. 1999. Т. 68, № 1. С. 39.
6. Марышева В.В., Шабанов П.Д. Антигипоксическая активность в гомологическом ряду 2-аминотиазола // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2005. Т. 68, № 1. С. 67–70.
7. Марышева В.В. Антигипоксанты аминотиолового ряда // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2007. Т. 5, № 1. С. 17–26.
8. Марышева В.В., Гаврев А.И., Торкунов П.А., и др. Синтез и фармакологическая активность производных тиазоло[5,4-b]-индола // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2007. Т. 5, № 2. С. 2–19.
9. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения

в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д. Лукьянова. Москва, 1990.

10. Оковитый С.В. Клиническая фармакология антигипоксантов // ФАРМиндекс-Практик. 2004. № 6-1. С. 30–39.

11. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. Санкт-Петербург: Росток, 2006. 336 с.

12. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. В.П. Фисенко. Москва, 2000. С. 153–158.

13. Соколов В.И. Химия фуллеренов — новых аллотропных модификаций углерода // Известия Академии Наук. Серия химическая. 1999. № 7. С. 1211–1218.

14. Томчин А.Б., Виноградов В.М. Разработка способов получения,

очистки и анализа амтизола. Ленинград: ВМА им. Кирова, 1982. С. 20–22.

15. Шабанов П.Д. Клиническая фармакология метапрота: Методические рекомендации для врачей. Санкт-Петербург: ВМедА, 2010. 96 с.

16. Яковенко Д.В., Сазонова Е.Н., Симанкова А.А., и др. Влияние дигидрокверцетина на пролиферативные и анаболические процессы в различных клеточных популяциях новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2019. Т. 82, № 4. С. 41–44. DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-4-41-44

17. Sygula A.A., Fronczek F.R., Sygula R., et al. A double concave hydrocarbon buckycatcher // J Am Chem Soc. 2007. Vol. 129, No. 13. P. 3842–3843. DOI: 10.1021/ja070616p

REFERENCES

1. Vasil'ev AV, Grinenko EV, Shchukin AO, Fedulina TG. *Infrakrasnaya spektroskopiya organicheskikh i prirodnikh soedinenii*. Saint Petersburg: SPBGLTA, 2007. P. 4. (In Russ.)

2. Dumpis MA, Prokopenko VM, Litasova EV, et al. Antioxidant properties of fullerene C₆₀/dihydroquercetin composition. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(10):30–32. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-10-30-32

3. Dumpis MA, Nikolayev DN, Litasova EV, et al. Biological activity of fullerenes – reality and prospects. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2018;16(1):4–20. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF1614-20

4. Koval'skii IV, Krasnyuk II, Krasnyuk II Jr, et al. Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action: mechanisms of rutin pharmacological action (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;48(2):3–6. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-2-3-6

5. Konarev DV, Lyubovskaya RN. Donorno-aktseptornye komplekсы i ion-radikal'nye soli na osnove fullerenov. *Uspekhi Khimii*. 1999;68(1):39. (In Russ.)

6. Marysheva VV, Shabanov PD. Antihypoxant activity in a series of 2-aminothiazole homologs. *Experimental and clinical pharmacology*. 2005;68(1):67–70. (In Russ.)

7. Marysheva VV. Antigipoksanty aminotiolovogo ryada. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2007;5(1):17–26. (In Russ.)

8. Marysheva VV, Gavrev AI, Torkunov PA, et al. Sintez i farmakologicheskaya aktivnost' proizvodnykh tiazolo[5,4-b]indola. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug*. 2007;5(2):2–19. (In Russ.)

9. Luk'yanov LD, editor. *Metodicheskie rekomendatsii po ehksperimental'nomu izucheniyu preparatov, predlagaemykh dlya klinicheskogo izucheniya v kachestve antigipoksicheskikh sredstv*. Moscow, 1990. (In Russ.)

10. Okovityi SV. Klinicheskaya farmakologiya antigipoksantov. *FARMindeks-Praktik*. 2004;(6-1):30–39. (In Russ.)

11. Piotrovskii LB, Kiselev OI. *Fullereny v biologii*. Saint Petersburg: Rostok, 2006. 336 p. (In Russ.)

12. Fisenko VP, editor. *Rukovodstvo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv*. Moscow, 2000. P. 153–158. (In Russ.)

13. Sokolov VI. Khimiya fullerenov — novykh allotropnykh modifikatsii ugleroda. *Izvestiya akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 1999;(7):1211–1218. (In Russ.)

14. Tomchin AB, Vinogradov VM. *Razrabotka sposobov polucheniya, ochistki i analiza amtizola*. Leningrad: VMA im. Kirova, 1982. P. 20–22. (In Russ.)

15. Shabanov PD. *Klinicheskaya farmakologiya metapota: Metodicheskie rekomendatsii dlya vrachei*. Saint Petersburg: VMeDA, 2010. 96 p. (In Russ.)

16. Yakovenko DV, Sazonova EN, Simankova AA, et al. The effect of dihydroquercetin on the proliferative and anabolic processes in various cell populations of newborn albino rats exposed to antenatal hypoxia. *Experimental and clinical pharmacology*. 2019;82(4):41–44. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-4-41-44

17. Sygula AA, Fronczek FR, Sygula R, et al. A double concave hydrocarbon buckycatcher. *J Am Chem Soc*. 2007;129(13):3842–3843. DOI: 10.1021/ja070616p

ОБ АВТОРАХ

***Вера Васильевна Марышева**, д-р биол. наук, преподаватель кафедры фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, Россия. E-mail: vvmarysheva@jandex.ru

Петр Дмитриевич Шабанов, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1464-1127>;
eLibrary SPIN: 8974-7477. E-mail: pdshabanov@mail.ru

AUTHORS INFO

***Vera V. Marysheva**, Dr. Biol. Sci. (Pharmacology), assistant professor, lecturer; 6, Akademika Lebedeva st., Saint Petersburg, 194044, Russia; E-mail: vvmarysheva@yandex.ru

Petr D. Shabanov, Dr. Med. Sci. (Pharmacology), professor and head of the Department of Pharmacology.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1464-1127>;
eLibrary SPIN: 8974-7477. E-mail: pdshabanov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author