



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0019854

(51)⁷ **C07C 229/50, 227/14, A61K 31/197, (13) B**
A61P 31/16, 31/18, 31/22, 35/00, 17/06

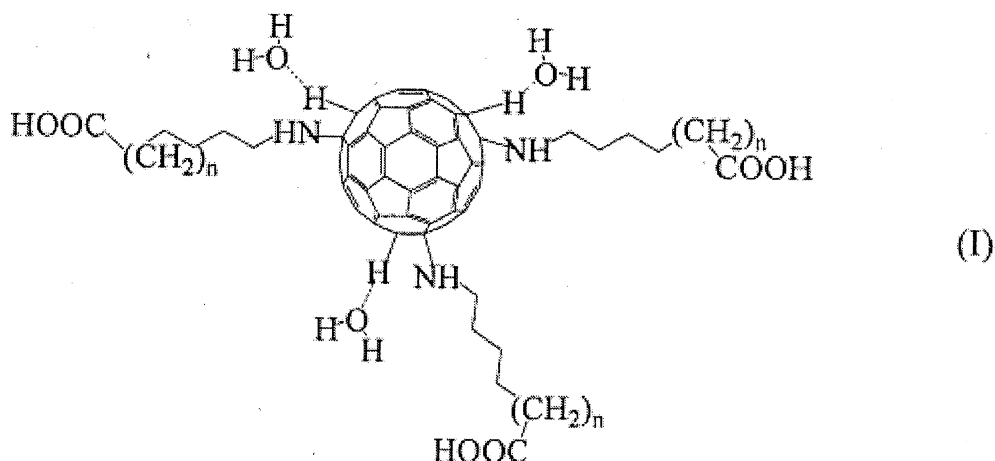
(21)	1-2013-02168	(22)	06.02.2012		
(86)	PCT/RU2012/000063	06.02.2012	(87)	WO2012/105873	09.08.2012
(30)	2011103541	01.02.2011	RU		
(45)	25.09.2018	366	(43)	25.06.2014	315
(71)	RASNETSOV, Lev Davidovich (RU) ul. Gruzinskaya, 15-39, Nizhny Novgorod, 60300, Russia				
(73)	RASNETSOV, Lev Davidovich (RU), SHVARTSMAN, Iakov Yudelevich (RU), SUVOVA, Olga Nikolaevna (RU)				
(74)	Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)				

(54) **HỢP CHẤT N-FULLEREN-AXIT AMIN HYDRAT, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến dẫn xuất axit amin được hydrat hóa của fullerene C_{60} có công thức chung $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOOH\}_3 \times H_2O$, trong đó C_{60} là fullerene, $n = 5, 6, 7, X = 8$ đến 10, và phương pháp điều chế hợp chất này và dược phẩm chứa hợp chất này. N-fulleren axit amin hydrat được tạo ra bằng cách cho fullerene phản ứng với lượng mol dư gấp 15 lần của muối kali khan của axit amin trong môi trường dung môi hữu cơ thơm, bổ sung từ từ chất xúc tác chuyển pha vào huyền phù thu được và trộn và gia nhiệt đến nhiệt độ không vượt quá 60°C cho đến khi dung dịch mất màu hoàn toàn và cặn rắn được tạo ra, sau đó cặn này được tách ra, và dung dịch nước 0,8M chứa muối kali của dẫn xuất fullerene axit amin được xử lý với dung dịch axit hữu cơ hoặc vô cơ, sau đó ly tâm, rửa và làm khô cặn thu được. Dược phẩm theo sáng chế có hoạt tính kháng virus herpes, nhiều chủng virus cúm và HIV, và có hoạt tính chống khối u và chống bệnh vẩy nến, chứa hoạt chất là N-fulleren axit amin hydrat với lượng hữu hiệu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất axit amin được hydrat hóa mới của fulleren C_{60} có công thức (I), và phương pháp điều chế hợp chất này và được phẩm chứa hợp chất này.



Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ứng dụng của fulleren làm hợp chất có hoạt tính về mặt sinh học đã thúc đẩy sự phát triển mạnh đối với các dẫn xuất được tạo chức của fulleren, đặc biệt là sau khi phát hiện được là một số fulleren tan trong nước có hoạt tính kháng virus cao (xem Partha, R., và Conyers, J.L., "Biomedical Applications of Functionalized Fulleren-Based Nanomaterials," Int. J. Nanomedicine, 2009 (4), 261-75; Sáng chế 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; và Z. Zhu, D. I. Schuster, và M. Tuckermann, "Molecular Dynamics Study of the Connection between Flap Closing và Binding of Fulleren Based Inhibitors of the HIV-1 Protease", Biochemistry, 2003, vol. 42, 1326-1333).

Ứng dụng y tế của các dẫn xuất fulleren là dựa trên tính chất ưa chất béo của nhân fulleren, nhân này làm cho dẫn xuất fulleren có thể xuyên qua màng tế bào, và dựa trên khả năng tạo ra oxy nguyên tử với hiệu suất lượng tử cao của

fulleren, oxy nguyên tử này phân cắt các ADN. Các tính chất này khiến cho dẫn xuất fulleren được tạo chức có tính độc hại đối với tế bào, kháng virut, và các tính chất khác (xem Bedrov, D., Smith, G.D., Davande, H., "Passive transport of fulleren through a lipid membrane," J. Phys. Chem., B, 2008, Vol. 12, trang 2078-84; Qiao, R., và Roberts A.E., "Translocation of fulleren and its derivatives across a lipid bilayer", Nano Lett., 2007, Vol. 7, trang 614-9; Nelsen, G.D., et al., "In vivo biology and toxicology of fulleren and their derivatives", Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2008, Vol. 103, trang 197-208.

Các chất fulleren hydrat có hoạt tính sinh học cao như các chất chống oxy hóa sinh học, điều này là do sự tạo thành các cấu trúc hoạt tính của các cụm phân tử nước phối trí với cầu fulleren (xem Andrievsky, G.V., Brushkov, V.L, Tykhonov, A.A., và Gudkov S.V., "Peculiarities of the Antioxidant and Radioprotective Effects of Hydrate C₆₀ Fulleren Nanostructures in vitro và in vivo," Free Radical Biology and Medicine, 2009, vol. 47, pp. 786-793).

Vấn đề chính cản trở các nghiên cứu sinh học về dẫn xuất fulleren và tạo ra được phẩm chứa chúng là việc khó hòa tan hệ fulleren trong các dung dịch nước.

Phương pháp nhiều triển vọng để bào chế được phẩm fulleren tan trong nước là cải biến hóa học khối cầu fulleren bằng các phối tử hòa tan ưa nước.

Hiện đã điều chế được rất nhiều fulleren được tạo chức, trong đó các gốc ưa nước có mặt ở các mạch bên của các phối tử gắn với fulleren (loại phức chất tẩy rửa), cũng như các dẫn xuất hình cầu trong đó các nhóm có cực được sắp xếp trên khắp khối cầu fulleren (loại này bao gồm các fullerenol và các sản phẩm cộng amino).

Các dẫn xuất axit amin của fulleren có tiềm năng ứng dụng lớn nhất.

Các axit amin không tự nhiên của hợp chất thô béo chứa nhiều hơn hoặc bằng sáu nhóm metylen có một số tính chất đặc hiệu về khả năng hydrat hóa và hoạt tính sinh hóa. Các nghiên cứu phổ học về cấu trúc nước trong các dung

dịch nước chứa các axit amin chỉ ra rằng việc gia tăng số nhóm metylen giãn cách nhóm amino và nhóm carboxy làm gia tăng sự phá hủy của các nhóm phân tử nước. Các nghiên cứu được động học về các dẫn xuất của nhiều chuỗi axit amin $R-(CH)_nCOOH$ chỉ ra rằng hệ này có hoạt tính cao nếu n bằng hoặc lớn hơn sáu.

Các dẫn xuất axit amin hình cầu của fullerene C_{60} được điều chế bằng phản ứng cộng ái nhân giữa các axit amin và cầu fullerene ở nhóm amino đã được mô tả trong các sáng chế Nga số 2196602, 2124022, và 2236852, và các sáng chế này có thể là các tài liệu đối chứng gần nhất của sáng chế.

Sáng chế Nga số 2196602 đề cập đến phương pháp ức chế sự sao chép của HIV và sự nhiễm CMV bằng cách dùng hợp chất trên cơ sở dẫn xuất fullerene axit amin và dipeptit. Các dẫn xuất fullerene axit amin được sử dụng trong sáng chế này là các muối natri của fullerene axit aminocaproic và fullerene axit aminobutiric.

Trong sáng chế Nga số 2124022, để điều chế fullerene axit aminocaproic, dung dịch nước chứa muối kali của axit aminocaproic và 18-crown-6 được bổ sung vào dung dịch chứa fullerene trong o-diclobenzen. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 6 đến 8 giờ ở $60^\circ C$. Sau đó dung môi được cất loại, phần còn lại được xử lý với dung dịch kali clorua bão hòa, và phần còn lại chứa dẫn xuất fullerene được rửa bằng nước. Sản phẩm đích thu được với lượng định lượng. (Monohydro)N-fullerene axit aminocaproic thu được tan trong dimetyl sulfoxit, dimetylformamit, và pyridin. Điều kiện để tách sản phẩm cuối cùng không được xác định trong phương pháp tổng hợp theo sáng chế này.

Nhược điểm chính của các hợp chất là các sản phẩm bổ sung một lần được điều chế như nêu trên là chúng không tan trong nước. Một nhược điểm nữa của các sáng chế nêu trên là chất xúc tác chuyển pha được sử dụng trong quy trình tổng hợp là ete crown, là chất khó tách khỏi các sản phẩm phản ứng.

Sáng chế Nga số 2236852 đề cập đến chất ức chế sự sao chép của virus có vỏ, chất này là các anion fullerene axit polycarboxylic có công thức chung

$C_{60}H_n[NH(CH_2)_mC(O)O^-]_n$ được điều chế bằng cách cho fulleren phản ứng với muối của axit amin trong môi trường dung môi hữu cơ với sự có mặt của poly(alkylen oxit).

Để điều chế các hợp chất này, bổ sung axit amin dưới dạng muối (muối kali hoặc natri) vào dung dịch chứa fulleren trong o-diclobenzen (hoặc toluen, hoặc dung môi hữu cơ khác), và sau đó bổ sung chất làm hòa tan vào đó. Thứ tự bổ sung axit amin và chất làm hòa tan là không quan trọng; chúng có thể được bổ sung dưới dạng phức chất được trộn sơ bộ. Các chất làm hòa tan hữu dụng là các poly(alkylen oxit) (các polyetylen glycol có trọng lượng phân tử từ 150 đến 400 hoặc cao hơn 400 (ví dụ, PEG-1500), cũng như các polyetylen glycol có các nhóm cuối tự do, và cả các polyetylen glycol có các nhóm cuối được thế (ví dụ, polyetylen glycol dimetyl este có trọng lượng phân tử là 500). Để gia tăng tốc độ phản ứng, chất khử mạnh bất kỳ (kim loại kiềm) được bổ sung. Tỷ lệ fulleren:axit amin được gia tăng khoảng trên 50 lần. Việc chuyển hóa thành muối được dụng mong muốn, đặc biệt là muối natri hoặc kali, được thực hiện bằng cách xử lý axit này với bazơ thích hợp hoặc bằng cách bổ sung muối của axit yếu dễ bay hơi. Cụ thể là, fulleren axit polycarboxylic không tan trong nước được chuyển hóa thành muối tan trong nước được dụng được ưu tiên hơn, ví dụ, muối natri. Việc bổ sung muối của axit yếu dễ bay hơi được thực hiện qua việc xử lý dung dịch với muối kim loại kiềm của axit yếu dễ bay hơi. Khi cô dung dịch bằng cách bay hơi hoặc làm khô lạnh, axit yếu được loại bỏ và các fulleren axit polycarboxylic trộn lẫn được thu hồi dưới dạng các hỗn hợp của các muối kim loại kiềm của chúng. Sản phẩm đích theo sáng chế này có thành phần không đổi; hàm lượng hợp chất chính trong sản phẩm đích thấp khoảng 87,8%.

Nhược điểm chính của các dẫn xuất fulleren axit amin được điều chế theo phương pháp được thể hiện trong sáng chế được viện dẫn trên đây là việc tạo ra hỗn hợp gồm các anion fulleren carboxylat ở cả dạng muối và dạng axit. Hợp chất riêng biệt không thể điều chế được bằng phương pháp được mô tả trong sáng chế được viện dẫn này. Hơn nữa, fulleren poly(axit amin) điều chế được

bằng phương pháp đã nêu trong lĩnh vực kỹ thuật này ở dạng axit hầu như là không tan trong nước. Cố gắng bào chế được phẩm ổn định chứa các anion fulleren-polycarboxylic đã bị thất bại vì các hợp chất này kết tủa trong quá trình bảo quản.

Các fulleren poly(axit amin) ảnh hưởng đến sự tạo bạch cầu: chúng gây ra sự biến đổi của cấu trúc bạch cầu và làm xuất hiện các dạng non của các bạch cầu trung tính (các hậu tủy bào bạch cầu) ở các con vật thí nghiệm (chuột và thỏ). Về mặt an toàn (vô hại), điều này chỉ ra rằng các hợp chất này có tính độc hại là đặc tính gây ra các biến đổi nêu trên.

Việc trong quy trình tổng hợp cần phải sử dụng lượng dư lớn của muối kali hoặc natri của các axit amin và lượng dư lớn của dung môi làm phát sinh các vấn đề về môi trường trong quá trình tuần hoàn chất thải, và làm gia tăng chi phí của quy trình sản xuất. Vì các lý do công nghệ, các kim loại kiềm không thể được sử dụng để làm gia tăng tốc độ phản ứng nếu các dung môi thơm được clo hóa được sử dụng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế đề cập đến các hợp chất fulleren C_{60} được hydrat hóa riêng biệt với các axit amin, các hợp chất này có hoạt tính kháng virus herpes, virus viêm gan C, nhiều chủng virus cúm, và HIV, và các hoạt tính chống khối u và chống bệnh vẩy nến và không có tác dụng độc hại đối với cơ thể; phương pháp điều chế các hợp chất này; và được phẩm chứa các hợp chất này.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất N-fulleren axit amin hydrat có công thức chung $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOOH\}_3 \times H_2O$, trong đó C_{60} là fulleren; $n = 5, 6$, hoặc 7 ; và $x = 8$ đến 10 .

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế hợp chất này và được phẩm chứa nó.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến hợp chất fullerene C_{60} được hydrat hóa với các axit amino carboxylic có công thức chung (II), trong đó có ba gốc axit amin liên kết cộng hóa trị trên mỗi phân tử fullerene, các gốc này có các vị trí hydrat hóa hoạt tính trong cấu trúc của chúng, nhờ đó dẫn đến việc tạo ra các hydrat tan trong nước, và các chuỗi hydrocarbon mạch dài do vậy các phân tử nước có thể được giữ lại trong cầu phối trí bên trong của các phức chất fullerene.



trong đó C_{60} là fullerene; $n = 5, 6$, hoặc 7 ; và $x = 8$ đến 10 .

Dẫn xuất fullerene axit amin được hydrat hóa có công thức (II) được tạo ra bằng cách cho fullerene phản ứng với lượng mol dư gấp 15 lần của muối kali khan của axit amin trong môi trường dung môi thơm, bổ sung từ từ chất xúc tác chuyển pha vào huyền phù thu được trong điều kiện khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ không lớn hơn $60-80^\circ C$ cho đến khi dung dịch hoàn toàn mất màu và cặn rắn được tạo ra, sau đó cặn này được tách ra, sau đó xử lý với dung dịch nước $0,8M$ chứa muối kali của fullerene axit amin với dung dịch axit hữu cơ hoặc vô cơ $0,1N$ và sau đó ly tâm, rửa, và làm khô phần cặn.

Theo sáng chế, các muối kali của axit amin khan được sử dụng ở trạng thái được phân tán mịn để tăng cường độ phản ứng của quy trình và hiệu quả và tính thuận lợi của nó, và việc tách phần cặn rắn của muối kali của các fullerene axit amin được thực hiện bằng cách lọc, rửa etanol, và làm khô. Các chất xúc tác chuyển pha hữu dụng là các metyl ete của poly(etylen oxit) có trọng lượng phân tử $200, 400$, hoặc 500 , là các chất xúc tác an toàn và sẵn có nhất.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa hoạt chất là các fullerene axit amin được hydrat hóa có công thức (II) có hoạt tính kháng virus herpes, virus viêm gan C, nhiều chủng virus cúm, và HIV và có hoạt tính chống khối u và chống bệnh vẩy nến.

Dược phẩm theo sáng chế chứa hợp chất có công thức chung (II) với lượng đủ để đạt được kết quả mong muốn, và có thể được dùng dưới các dạng liều chuẩn (ví dụ, dưới dạng liều rắn, bán rắn, hoặc lỏng), chứa hợp chất theo sáng chế làm hoạt chất, được bào chế với chất mang hoặc tá dược thích hợp để dùng trong bắp, dùng trong tĩnh mạch, dùng qua đường miệng, dưới lưỡi, dùng bằng cách hít, dùng khu trú, dùng qua đường mũi, hoặc dùng qua đường trực tràng. Hoạt chất có thể được bào chế cùng với các chất mang dược dụng không độc thông thường thích hợp để sản xuất các dạng liều dung dịch, viên nén, viên tròn, viên nang, giọt, viên đạn, nhũ tương, hỗn dịch, thuốc mỡ, gel, và các dạng liều khác.

Liều lượng dùng thuốc cụ thể và chu kỳ dùng liều đối với bệnh nhân cụ thể sẽ tùy thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm hoạt tính của dẫn xuất fulleren cụ thể, độ ổn định chuyển hóa và thời gian tác dụng của hoạt chất; tốc độ bài tiết, tuổi tác, thể trọng, sức khỏe nói chung và giới tính của bệnh nhân; các kết hợp thuốc; và độ nặng của bệnh được điều trị.

Để dùng qua đường miệng ở dạng hỗn dịch, dược phẩm được bào chế theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực bào chế dược phẩm, và chúng có thể chứa xenluloza vi tinh thể hoặc các dẫn xuất của nó để tạo trọng lượng mong muốn, axit alginic hoặc natri alginat làm chất tạo hỗn dịch, methylxenluloza làm chất tăng cường độ nhớt, và các chất làm ngọt và/hoặc các hương liệu đã biết trong lĩnh vực này. Nếu được bào chế ở dạng viên nén, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa xenluloza vi tinh thể, canxi phosphat, tinh bột, magie stearat, và lactoza và/hoặc các tá dược khác, các chất kết dính, các chất độn, các chất gây rã, các chất pha loãng và các chất làm trơn đã biết trong lĩnh vực này.

Nếu dự tính là để dùng dưới dạng khí dung cho mũi hoặc bằng cách hít, dược phẩm theo sáng chế được bào chế bằng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực bào chế dược phẩm, và chúng có thể được bào chế dưới dạng dung dịch trong nước muối sinh lý sử dụng axit benzoic hoặc các chất bảo quản

thích hợp khác, các chất xúc tác hấp thụ để tăng cường sinh khả dụng, và/hoặc các chất làm hòa tan hoặc các chất phân tán khác đã biết trong lĩnh vực này.

Dung dịch hoặc hỗn dịch để tiêm có thể được bào chế theo các phương pháp đã biết bằng cách sử dụng các chất pha loãng hoặc dung môi không độc, có thể dùng ngoài đường tiêu hóa như manitol, 1,3-butandiol, nước, dung dịch Ringer, hoặc các dung dịch natri clorua đẳng trương; hoặc các chất làm phân tán hoặc làm ẩm và tạo hỗn dịch thích hợp, như các dầu vô trùng, mềm và ổn định, bao gồm các mono- hoặc diglyxerit tổng hợp, hoặc các axit béo, bao gồm axit oleic.

Nếu dự tính là để dùng qua đường trực tràng ở dạng viên thuốc đạn thì được phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách trộn dược chất với tá dược không kích ứng như bơ ca cao, các este glyxerit tổng hợp, hoặc các polyetylen glycol, các tá dược này ở dạng rắn ở nhiệt độ thường nhưng hóa lỏng và/hoặc hòa tan trong cơ thể để giải phóng dược chất.

Nếu được dùng khu trú dưới dạng thuốc mỡ, gel, kem, thuốc xoa, v.v., thì được phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách trộn các thành phần hoạt tính với chất nền thuốc mỡ được dụng.

Chất nền thuốc mỡ hữu dụng là các chất nền dầu mỡ, dầu mỡ hoặc các chất nền ưa nước, như mỡ khoáng, dầu khoáng, parafin, sáp ong, lanolin, polyetylen glycol, và các chất khác.

Chất nền cho gel hữu dụng là metyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, oxypropyl xenluloza, polyetylen glycol hoặc polyetylen oxit, carbopol, polyvinylpyrrolidon, rượu polyvinyl, v.v..

Sáng chế đề cập đến các hợp chất, phương pháp điều chế các hợp chất này, và các kết hợp dược dụng của hợp chất này với các chất phân cực. Các hợp chất theo sáng chế không ảnh hưởng đến sự tạo bạch cầu: chúng không gây ra sự biến đổi của cấu trúc bạch cầu và cũng không làm xuất hiện các dạng non của các bạch cầu trung tính (các hậu tủy bào bạch cầu) ở các con vật thí nghiệm (chuột và thỏ). Về mặt an toàn (vô hại), điều này chỉ ra rằng các hợp chất này

không có tính độc hại là đặc tính gây ra các biến đổi nêu trên. Phương pháp theo sáng chế điều chế các chế phẩm khác nhau chứa các fullerene axit amin tùy thuộc vào tỷ lệ chất phản ứng và các thông số quy trình, cụ thể là: các fullerene axit amin hydrat tan trong nước có công thức chung (II).

Phương pháp theo sáng chế sử dụng, trong bước tổng hợp, tỷ lệ chất phản ứng tối ưu và lượng tối thiểu dung môi hữu cơ và chất xúc tác chuyển pha, sau đó thu hồi hợp chất theo sáng chế bằng cách sử dụng các dung dịch axit hữu cơ hoặc vô cơ đặc, từ đó tạo ra lượng định lượng các chế phẩm fullerene axit amin và khiến cho phương pháp theo sáng chế thích hợp để tổng hợp các chế phẩm này trên quy mô lớn, hiệu quả và an toàn đối với môi trường.

Phương pháp theo sáng chế điều chế được các hợp chất fullerene C_{60} hydrat, tan trong nước, ổn định, riêng biệt, với các axit aminocarboxylic, các hợp chất này không gây tách dụng có hại đối với cơ thể. Phương pháp hiệu quả đã được phát triển để điều chế các dẫn xuất fullerene hydrat, riêng biệt, ổn định, có hoạt tính kháng virus, chống khối u, và chống bệnh vẩy nến.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa thêm bằng các ví dụ sau.

Ví dụ 1. Điều chế N-fullerene tris(axit 6-aminocaproic) hydrat (theo quy tắc danh pháp quốc tế IUPAC: N-fullerene tris(axit 6-aminoheptanoic) hydrat có công thức $N-C_{60}(H_3)\{NH(CH_2)_5COOH\}_3 10H_2O$.

Bổ sung 204g (1,2mol) muối kali khan của axit ϵ -aminocaproic vào dung dịch chứa 60g (0,08mol) fullerene C_{60} trong 4,5L o-diclobenzen. Bổ sung hỗn hợp gồm o-diclobenzen và methyl polyetylen glycol ete 500 theo tỷ lệ 5:1 vào huyền phù thu được trong 2 giờ trong điều kiện khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ không cao hơn $60^\circ C$. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ không cao hơn $60^\circ C$ trong 5 giờ cho đến khi dung dịch hoàn toàn mất màu và kết tủa rắn được tạo ra. Sau đó, hỗn hợp này được lọc; kết tủa được rửa trên bộ lọc bằng vài phần ethanol và làm khô trong chân không ở nhiệt độ không cao hơn $60^\circ C$. Hỗn hợp các muối kali của fullerene axit aminoheptanoic được hòa tan trong 100mL

nước cất. Bổ sung từ từ trong điều kiện khuấy dung dịch axit clohydric 0,1N vào dung dịch này cho đến khi độ pH bằng 5,1. Hỗn hợp này được để yên cho đến khi sản phẩm được kết tủa hoàn toàn. Sau đó lớp nước được gạn bỏ. Phần cặn là huyền phù mịn của sản phẩm rắn trong nước được ly tâm và rửa bằng nước đến độ pH bằng 6. Cặn này được làm khô ở nhiệt độ không cao hơn 60°C trong tủ làm khô chân không.

Thu được sản phẩm với lượng định lượng (115g).

Hợp chất thu được là chất rắn màu nâu sẫm tan trong nước và trong các hỗn hợp $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}(1:10)$ và $\text{DMF}-\text{H}_2\text{O}(1:100)$.

Phân tích nhiệt trọng chỉ ra rằng hợp chất này chứa 10mol H_2O . Ở 350°C, việc phá hủy phức chất này diễn ra rất mạnh. Phần còn lại sau khi phân hủy chứa fulleren và các sản phẩm oxy hóa của nó.

Phổ IR của sản phẩm (I) mô tả các dải hấp thụ đặc trưng của các axit amin được thể N: đối với nhóm $-\text{COOH}-$, ở 1704cm^{-1} và 1658cm^{-1} ; đối với các dao động mở N-H-, ở 3400cm^{-1} ; đối với các dao động uốn N-H, ở 1552cm^{-1} ; và đối với $\text{C}_{60}\text{-NH-R-}$, các dải hấp thụ xuất hiện ở 1104cm^{-1} , 930cm^{-1} , và 830cm^{-1} .

Phổ hấp thụ điện tử của sản phẩm không có các dải hấp thụ của fulleren tự do.

Phân tích nguyên tố thể hiện các tỷ lệ nguyên tố như sau: %C=72,75; %H=4,70; %N=2,32; đối với công thức chính $\text{C}_{78}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ tính toán được: %C=72,38, %H=4,3, %N=3,24.

Số nhóm carboxy trong sản phẩm thu được từ các phản ứng với các muối kim loại và các amin. Trong phản ứng với bạc nitrat phức chất có công thức $\text{C}_{60}(\text{H})_3\{\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{COOAg}\}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ được tách ra một cách định lượng (phát hiện thấy: %Ag=20,88, %C=57,80, %N=2,51, %H=3,32; đối với $\text{C}_{78}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_3\text{Ag}_3 (10\text{H}_2\text{O})$ tính toán được: %Ag=20,00, %C=57,88, %N=2,60, %H=3,46).

Phản ứng với trisamin thu được phức chất tan trong nước có công thức $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOO^- NH_3^+C(CH_2OH)_3\}_3$ (phát hiện thấy: %C=64,88, %H=4,56, %N=5,08, đối với $C_{90}H_{72}O_{15}N_6 \cdot 10H_2O$ tính toán được: %C=65,2, %H=4,34, %N=5,10).

Ví dụ 2. Điều chế N-fulleren axit tris- ω -aminoenanthic hydrat (theo quy tắc danh pháp quốc tế IUPAC: N-fulleren-(axit tris-7-aminoheptanoic) hydrat có công thức $N-C_{60}(H_3)\{NH(CH_2)_6COOH\}_3 \cdot 8H_2O$.

Bổ sung 182g (1,2mol) muối kali khan được nghiền mịn của axit ω -aminoenanthic vào dung dịch chứa 72g (0,1mol) fullerene C_{60} trong 4L o-diclobenzen. Bổ sung hỗn hợp gồm o-diclobenzen và metyl polyetylenglycol ete 500 với tỷ lệ 5:1 vào huyền phù thu được trong 3 giờ trong điều kiện khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ không cao hơn $80^\circ C$. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ không cao hơn $80^\circ C$ trong 8 giờ cho đến khi dung dịch mất màu hoàn toàn và kết tủa rắn được tạo ra. Sau đó, hỗn hợp này được lọc; kết tủa được rửa trên bộ lọc bằng vài phần ethanol và làm khô trong chân không ở nhiệt độ không cao hơn $60^\circ C$. Hỗn hợp các muối kali của fullerene axit aminoenanthic và axit aminoenanthic tách ra được hòa tan trong 120 mL nước cất. Bổ sung từ từ dung dịch axit clohydric 0,1N vào dung dịch này trong điều kiện khuấy cho đến khi độ pH bằng 5,1. Hỗn hợp này được để yên cho đến khi sản phẩm được kết tủa hoàn toàn. Sau đó, lớp nước được gạn bỏ. Phần cặn thu được là huyền phù mịn của sản phẩm rắn trong nước được ly tâm và rửa bằng nước cho đến khi độ pH bằng 6. Cặn này được làm khô ở nhiệt độ không cao hơn $60^\circ C$ trong tủ làm khô chân không.

Thu được sản phẩm với lượng định lượng (130g).

Hợp chất thu được là chất rắn màu nâu sẫm tan trong nước và tan trong các hỗn hợp $CH_3CN:H_2O$ (1:10) và $DMF-H_2O$ (1:100).

Phân tích nhiệt trọng chỉ ra rằng hợp chất này chứa 8 mol H_2O . Ở $450^\circ C$, phức chất này bị phá hủy mạnh. Phần còn lại sau khi phân hủy chứa fullerene và các sản phẩm oxy hóa của nó.

Phổ IR của sản phẩm mô tả các dải hấp thụ đặc trưng của các axit amin được thể N: đối với nhóm -COOH- , ở 1707cm^{-1} và 1650cm^{-1} ; đối với các dao động mở N-H, ở 3400cm^{-1} ; đối với các dao động uốn N-H, ở 1552cm^{-1} ; và đối với $\text{C}_{60}\text{-NH-R-}$, các dải hấp thụ xuất hiện ở 1104cm^{-1} , 930cm^{-1} , và 830cm^{-1} .

Phổ hấp thụ điện tử mô tả dải hấp thụ ở 260nm .

Phân tích nguyên tố thể hiện tỷ lệ nguyên tố sau: $\%C=72,75$; $\%H=4,70$; $\%N=2,32$; đối với công thức chính: $\%C=73,55$; $\%H=4,60$; $\%N=3,18$; đối với công thức chính $\text{C}_{81}\text{H}_{45}\text{O}_6\text{N}_3 (8\text{H}_2\text{O})$ tính toán được: $\%C=74,82$, $\%H=4,69$, $\%N=3,23$.

Phản ứng với bạc nitrat tạo ra muối bạc của fullerene axit amin, điều này chứng minh một cách định lượng sự có mặt của ba gốc axit amin trong sản phẩm.

Ví dụ 3. Điều chế N-fulleren tris(axit 8-aminooctanoic) hydrat có công thức $\text{N-C}_{60}(\text{H}_3)\{\text{NH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}\}_3 10\text{H}_2\text{O}$

Phương pháp điều chế hợp chất nêu trên là tương tự như phương pháp nêu trong ví dụ 1, chỉ khác biệt ở chỗ muối kali của axit aminooctanoic được sử dụng thay cho muối kali được nghiền mịn của axit ϵ -aminocaproic (axit ω -aminoenanthic). Phân tích hợp chất thu được chứng minh phức chất có công thức nêu trên.

Hoạt tính kháng virus của hợp chất này được thử nghiệm đối với HIV, HSV, và virus cúm; hoạt tính chống khối u của nó cũng được thử nghiệm. Hợp chất này có hoạt tính chống khối u và kháng virus cao đối với tất cả các chủng virus nêu trên. Các phương án ví dụ được ưu tiên của sáng chế được nêu dưới đây. Trong các ví dụ dưới đây, hợp chất được điều chế bằng phương pháp được nêu trong Ví dụ 1 sẽ được gọi là hợp chất 1 fullerene tris(axit aminocaproic) hydrat.

Ví dụ 4. Hoạt tính kháng HIV của fullerene tris(axit aminocaproic).

Các thử nghiệm này được thực hiện ở Viện nghiên cứu Ivanovsky về virus học, Học viện y khoa Nga, Matxcova. Nhiệm vụ là thử nghiệm hoạt tính kháng HIV của hợp chất.

Các tế bào được bổ sung hợp chất thử nghiệm và được gây nhiễm bằng virus với liều 0,01 TCD₅₀/tế bào. Các môi trường tế bào được ủ ở 37°C trong môi trường khí CO₂ 5% và độ ẩm 98% trong 4 đến 5 ngày. Kết quả được xác định bằng cách nhuộm tế bào bằng thuốc nhuộm và bằng cách dùng kính hiển vi quang học: thử nghiệm tác dụng trên tế bào (cytopathic effect: CPE) của virus và sự tạo thành hợp bào do virus (hợp bào là khối kết tụ của nhiều tế bào có màng tế bào bao toàn bộ bên ngoài được tạo thành qua sự kết hợp màng).

Mức độ phá hủy tế bào được đánh giá dưới kính hiển vi theo hệ thống bốn cộng thường được chấp nhận sử dụng các ký hiệu "+" và "-" tùy thuộc vào số lượng tế bào chết trong mỗi lỗ trong số bốn lỗ tương ứng với một thông số thử nghiệm.

++++ chỉ 100% số tế bào bị chết trong bốn lỗ được sử dụng trong thử nghiệm pha loãng đơn;

+++ chỉ 75% số tế bào bị chết trong bốn lỗ;

++ chỉ 50% số tế bào bị chết trong mỗi lỗ trong số bốn lỗ;

+ chỉ 25% số tế bào bị chết trong mỗi lỗ trong số bốn lỗ;

+ - chỉ sự bắt đầu thoái hóa; và

- chỉ không có sự phá hủy tế bào.

Kết quả của các thử nghiệm này được biểu thị trên các bảng 1 và 2.

Kết quả này (xem bảng 1 và 2) chỉ ra rằng hợp chất 1 có hoạt tính kháng virus đối với virus gây suy giảm miễn dịch ở người typ 1 với nồng độ từ 1 đến 10mcg/mL. Trị số EC₅₀ (50% nồng độ hữu hiệu) của hợp chất này là 5,0 mcg/mL.

Ví dụ 5. Hoạt tính kháng virus của fullerene tris(axit aminocaproic) đối với virus cúm.

Các thử nghiệm này được thực hiện ở Viện nghiên cứu Ivanovsky về virus học, Học viện y khoa Nga, Matxcova. Nhiệm vụ là nghiên cứu hoạt tính kháng virus của hợp chất trong môi trường tế bào MDCK đối với virus cúm A A/IV-Matxcova/01/2009(H1N1)swl.

Hợp chất theo sáng chế được pha loãng bằng DMSO (5mg hợp chất + 0,5mL DMSO), sau đó bằng cách bổ sung 4,5mL môi trường nuôi cấy tế bào MEM để thu được dung dịch gốc với nồng độ 1,0mg/mL. Sau đó, dung dịch gốc được pha loãng bằng môi trường MEM để thu được chuỗi nồng độ thử nghiệm sau: 6,5mcg/mL - 12,5mcg/mL - 25,0mcg/mL - 50,0mcg/mL - 100 mcg/mL.

Hoạt tính kháng virus được xác định từ việc giảm sự sao chép virus cúm trong môi trường tế bào MDCK, như được xác định bằng thử nghiệm ELISA.

Nhằm mục đích này, các tế bào MDCK được phát triển trên các đĩa 96 lỗ để thu được đơn lớp hoàn toàn, rửa khỏi môi trường phát triển, và bổ sung hợp chất với nồng độ gấp đôi trong 100mcL môi trường MEM. Việc gây nhiễm bằng virus với liều thử nghiệm nằm trong khoảng từ 100 đến 1000 TCD₅₀ được thực hiện theo hai phương thức: 2 giờ sau khi bổ sung hợp chất và đồng thời với việc bổ sung hợp chất. Các đĩa được ủ trong tủ ôn nhiệt nạp CO₂ trong 24 giờ ở 37°C. Sau khi ủ, môi trường được loại bỏ và các tế bào được cố định bằng 80% axeton trong PBS trong 15 phút và sau đó được làm khô, và thử nghiệm ELISA được thực hiện bằng cách hấp thụ liên tục các tác nhân đặc trưng, cụ thể là, các kháng thể đơn dòng, liên hợp, và cơ chất (orthophenylendiamin). Mức độ phản ứng được giám sát bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 492nm trên quang phổ kế Biokom. Mỗi dịch pha loãng virus được thử nghiệm lặp lại ba lần, và trị số mật độ quang (OD) trung bình được tính toán. Phần trăm ức chế được xác định dưới dạng thương số của phép chia của chênh lệch giữa OD thử nghiệm và OD của dung dịch đối chứng tế bào cho chênh lệch giữa OD của dung dịch đối chứng virus và OD của dung dịch đối chứng tế bào, nhân với 100%. Số liệu nhận

được theo cách này được sử dụng để xác định nồng độ tối thiểu của hợp chất tạo mức ức chế 50,0% đối với sự sao chép virus (MIC_{50}).

Khả năng ức chế sự sao chép của virus cúm A(H1N1) được xác định trong ba thử nghiệm với nhiều mức gây nhiễm khác nhau. Kết quả được biểu thị trên bảng 3 (dưới dạng các phương thức của ba thử nghiệm này) và trên bảng 4 (dưới dạng kết quả trung bình của ba thử nghiệm này).

Có thể thấy từ bảng 4 là chuỗi hợp chất 1 thể hiện hoạt tính cao nhất trong việc giảm sự sao chép virus cúm trong môi trường tế bào MDCK. Có sự tương quan rõ ràng giữa mức độ sao chép và nồng độ của hợp chất: nếu nồng độ này gia tăng thì sự sao chép virus giảm. Hơn nữa, không có khác biệt đáng kể về các trị số bất kể phương thức gây nhiễm nào được sử dụng (2 giờ sau khi bổ sung hợp chất hoặc đồng thời với việc bổ sung hợp chất). Nồng độ tối thiểu của hợp chất gây ra mức ức chế 50,0% đối với sự sao chép virus (MIC_{50}) là 9,5mcg/mL theo phương thức trong đó hợp chất được bổ sung 2 giờ trước khi gây nhiễm và 12,5mcg/mL theo phương thức trong đó hợp chất được bổ sung đồng thời với việc gây nhiễm. Các tính toán được thực hiện bằng cách xử lý số liệu đồ họa.

Do đó, trị số hoạt tính thu được của hợp chất 1 với chuỗi nồng độ khác nhau đối với virus cúm A/IV Matxcova/01/2009 (H1N1)swl chứng minh hoạt tính ức chế sao chép cao trong môi trường tế bào MDCK đối với chuỗi 1, hoạt tính trung bình đối với chuỗi 2. Phương thức bổ sung hợp chất (2 giờ trước khi gây nhiễm hoặc đồng thời với việc gây nhiễm) không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của hợp chất trong môi trường tế bào MDCK.

Ví dụ 6. Thử nghiệm hoạt tính kháng virus của fulleren tris(axit aminocaproic) đối với bệnh viêm phổi do cúm ở chuột.

Các thử nghiệm này được thực hiện ở Trung tâm hóa học trị liệu (TsKhLS-VNIKhFI), Matxcova.

Hợp chất 1 được sử dụng trong các thử nghiệm này là bột màu nâu sẫm. Liều hợp chất cần thiết để dùng qua đường miệng được chuẩn bị bằng cách hòa tan các phần đã xác định trọng lượng của hợp chất này trong dung dịch tinh bột

1% được nấu với nước. Để dùng trong màng bụng hoặc trong bắp, các phần đã xác định trọng lượng của hợp chất 1 được hòa tan trong dung dịch dimetyl sulfoxit 1,5%.

Virut được sử dụng là virut cúm A/Aichi/2/69 (H3N2) được làm thích ứng với chuột. Virut này được sử dụng rộng rãi để xác định hiệu lực của các hợp chất kháng virut trong mô hình bệnh viêm phổi do cúm ở chuột và được mua từ Bảo tàng các chủng virut và nuôi cấy tế bào của Viện nghiên cứu Ivanovsky về virut học, Học viện y khoa Nga. Để chuẩn bị nguyên liệu gây nhiễm, chuột được gây nhiễm trong mũi bằng dịch virut niệu nang; khi các triệu chứng của bệnh đã phát triển, chuột được giết và dịch treo mô phổi đồng thể được chuẩn bị trong điều kiện vô trùng. Sau đó, dịch treo mô đồng thể này được sử dụng để gây nhiễm cho các phôi gà 10 ngày tuổi, từ đó virut niệu nang thu được được sử dụng để gây nhiễm cho các con vật sau khi chuẩn độ nó ở chuột.

Chuột (cái) không huyết thống, màu trắng cân nặng từ 12 đến 14g được mua từ trại ươm Andreevka (vùng Matxcova) và được duy trì khẩu phần chuẩn trong điều kiện nuôi dưỡng được điều chỉnh.

Chuột trước khi cân nặng (chuột cái không tuyến tính cân nặng trung bình 12g đến 14g) được gây nhiễm trong mũi trong điều kiện gây mê bằng ete nhẹ, bằng virut cúm A/Aichi/2/69 (H3N2) ($10LD_{50}$ trong 100mcL). LD_{50} được xác định trong thử nghiệm sơ bộ bằng cách chuẩn độ dịch virut niệu nang trong chính con chuột mà sau đó được sử dụng trong thử nghiệm chính. Kế hoạch điều trị bằng hợp chất thử nghiệm là như sau: 24 giờ trước khi gây nhiễm, 1 giờ trước khi gây nhiễm, 24 giờ sau khi gây nhiễm, và sau đó một lần mỗi ngày 24 giờ trong 5 ngày. Để dùng qua đường miệng, bơm tiêm insulin với kim tiêm đặc biệt (lavage) được sử dụng; mỗi liều được dùng với lượng 100mcL. Để dùng trong màng bụng và trong bắp, mỗi liều cũng được tiêm với lượng 100mcL. Nhóm đối chứng virut bao gồm 10 con chuột đã được gây nhiễm bằng virut này nhưng không được điều trị bằng hợp chất theo sáng chế. Trong thử nghiệm này, còn có hai nhóm, mỗi nhóm có 10 con chuột không được gây nhiễm, mỗi con chuột này

được tiêm 100mcL DMSO 1,5% trong màng bụng và trong bắp, dung dịch này được dùng làm dung môi cho hợp chất theo sáng chế. Các nhóm khác ban đầu cũng bao gồm 10 con chuột mỗi nhóm. Các con chuột được điều trị và các con chuột đối chứng được giám sát hàng ngày; trong năm ngày đầu tiên sau khi gây nhiễm, các con chuột được xác định trọng lượng mỗi ngày, và sau đó là tất cả các ngày tiếp theo. Hoạt tính hóa liệu pháp của hợp chất 1 trong mô hình bệnh viêm phổi do cúm được xác định theo ba tiêu chuẩn, cụ thể là: chỉ số bảo vệ khỏi bệnh nhiễm virus gây tử vong, mức gia tăng thời gian sống trung bình, và mức giảm hao hụt thể trọng ở các nhóm chuột được điều trị bằng hợp chất theo sáng chế so với nhóm đối chứng.

Việc điều trị bằng hợp chất 1 là hữu hiệu trong việc giảm tỷ lệ tử vong do viêm phổi do cúm ở các con chuột và giảm hao hụt thể trọng ở các con chuột này và gia tăng thời gian sống trung bình so với nhóm đối chứng virus. Hiệu quả của việc điều trị này tùy thuộc vào liều hợp chất và kế hoạch điều trị. Hiệu quả của việc điều trị dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat qua đường miệng gia tăng khi liều hợp chất gia tăng. Việc điều trị bằng hợp chất 1 qua đường miệng là hiệu quả, làm gia tăng thời gian sống trung bình khoảng từ 1,6 đến 1,7 lần. Việc điều trị bằng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat trong bắp là hiệu quả nhất xét trên tất cả ba thông số (chỉ số bảo vệ tránh tử vong, thời gian sống trung bình, và hao hụt thể trọng); nếu được dùng với liều 100 và 200mg/kg/ngày, việc điều trị này ngăn ngừa sự tử vong từ 70% đến 80% cho các con vật được gây nhiễm và ngăn ngừa sự hao hụt thể trọng của chúng, và còn gia tăng thời gian sống của chúng gấp gần hai lần.

Việc điều trị bằng fulleren tris(axit aminocaproic) trong màng bụng chỉ hữu hiệu với các liều 50 và 100 mg/kg/ngày. Tỷ lệ tử vong, mức giảm đáng kể về thời gian sống trung bình và thể trọng ở các con chuột khi điều trị bằng hợp chất 1 trong màng bụng với liều 200 mg/kg/ngày ngụ ý rằng liều này với phương pháp điều trị này là độc hại đối với các con chuột được gây nhiễm. Kết quả được biểu thị trên bảng 5 và 6.

Ví dụ 7. Thử nghiệm hoạt tính bảo vệ của fulleren tris(axit aminocaproic) trong mô hình bệnh cúm gây tử vong ở chuột bạch do các virus có nguồn gốc khác nhau.

Các thử nghiệm này được thực hiện ở Viện nghiên cứu bệnh cúm, St. Petersburg.

Hợp chất 1 được sử dụng trong các thử nghiệm này là bột màu đen được nghiền mịn. Các mẫu hợp chất đã được xác định trọng lượng được hòa tan trong môi trường nuôi cấy tế bào Igla MEM (BioloT, St. Petersburg, cat. 20 No. 1.3.3). Dung dịch thu được được sử dụng để chuẩn bị dãy pha loãng trong môi trường MEM để xác định hoạt tính kháng virus của các mẫu trong các mô hình động vật.

Các chất đối chứng được sử dụng là Remantadine (1-(1-adamantyl)-aminoethyl hydroclorua, Aldrich Chem. Co., 25 Milw., WI, cat. No. 39,059-3) và Tamiflu (etyl(3R,4R,5S)-4 axetamido-5-amino-3-(1-etylpropoxy)-1-cyclohexen-1-carboxylat phosphat, Hoffmann LaRoche, Switzerland).

Virut. Các virus được sử dụng trong thử nghiệm này là các virus cúm được làm thích ứng với chuột thuộc các chủng sau:

- A/lợn/1976/31 (H1N1) (thu từ lợn);
 - A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (thu được từ người và kháng Remantadine);
- và
- A/Vladivostok/2/09 (H1N1) (thu được từ người và kháng Tamiflu).

Các virus này được truyền vào các khoang niệu nang của phôi gà 10 đến 12 ngày tuổi trong 48 giờ ở 36°C. Chủng virus A/Vladivostok/2/09 (H1N1) được làm thích ứng sơ bộ đối với chuột bằng cách truyền qua ba lần ở các con chuột và các phôi gà.

Dịch niệu nang chứa virus của phôi gà được sử dụng để gây nhiễm cho các con chuột. Dịch này được sử dụng để chuẩn bị chuỗi dịch pha loãng 10 lần trong nước muối sinh lý, sau đó khả năng gây nhiễm của virus trong nguyên liệu

gây nhiễm được xác định trong thử nghiệm riêng biệt bằng cách chuẩn độ các con vật với khả năng tử vong. Độ chuẩn virut được tính toán bằng phương pháp Reed-Muench (xem Am.J.Hyg., 1938,27:493-497).

Chuột (cái) không huyết thống, màu trắng cân nặng từ 14 đến 16g được mua từ trại ươm Rappolovo (vùng Leningrad) và được duy trì khẩu phần chuẩn trong điều kiện nuôi dưỡng được điều chỉnh ở Viện nghiên cứu bệnh cúm, Học viện y khoa Nga. Việc chọn các con chuột trong các nhóm thử nghiệm được thực hiện bằng cách lấy mẫu ngẫu nhiên. Trước khi thử nghiệm, các con chuột được theo dõi cẩn thận trong hai tuần.

Các chất thử nghiệm được dùng trong màng bụng cho các con chuột với lượng 0,2mL theo liều sau: đối với hợp chất 1: 300, 100, và 30 mg/kg; đối với Remantadine: 50 mg/kg; và đối với Tamiflu: 20 mg/kg thể trọng. Các chất này được dùng theo kế hoạch điều trị dự phòng như sau: 24 giờ và 1 giờ trước khi gây nhiễm và 24, 48, 72 giờ sau khi gây nhiễm. Nhóm đối chứng giả được được tiêm bằng dung dịch đệm nước muối phosphat. Đối chứng âm tính là các con chuột nguyên vẹn được giữ trong điều kiện giống như điều kiện đối với các nhóm thử nghiệm.

Virut được cấp vào trong mũi các con chuột trong điều kiện gây mê nhẹ bằng ete với liều 1 và 10 LD₅₀. Hai mươi nhăm con chuột được dùng cho mỗi nhóm quan sát. Vào ngày thứ 5 sau khi gây nhiễm, 10 con chuột từ mỗi nhóm được giết và mổ, và phổi được lấy ra. Trong số 10 phổi này, năm phổi được dùng để phân lập virut (chúng được làm đông và bảo quản ở -20°C cho đến khi thực hiện các thử nghiệm có liên quan); năm phổi còn lại được cố định bằng formalin và sau đó được sử dụng trong phân tích mô (xem dưới đây).

Các con chuột khác được giám sát trong 14 ngày, nghĩa là, trong khoảng thời gian mà tỷ lệ tử vong của các con chuột được phát hiện do cúm. Tỷ lệ tử vong của các con chuột trong nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm được ghi lại hàng ngày. Tỷ lệ tử vong thu được theo cách này được sử dụng để tính toán phần trăm tử vong (M: tỷ lệ các con chuột bị chết trong 14 ngày so với tổng số

các con chuột được gây nhiễm trong nhóm), chỉ số bảo vệ (IP: tỷ lệ phần trăm tử vong trong nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm so với phần trăm tử vong trong nhóm đối chứng), và thời gian sống trung bình của các con chuột (DL) ở tốc độ 14 ngày quan sát.

Các con vật mà sống đến ngày thứ 15 sau khi gây nhiễm được mổ khám tử thi, và vùng tổn thương viêm phổi sau cúm ở phổi được đánh giá bằng mắt. Kích thước tổn thương được biểu hiện dưới dạng phần trăm so với tổng diện tích bề mặt của phổi.

Các dấu hiệu lâm sàng của bệnh là điển hình đối với bệnh nhiễm cúm và bao gồm hơi thở ngắn, mất điều vận, run, giảm ăn uống, và do đó giảm thể trọng.

Số liệu động lực tốc độ tử vong ở các con chuột trong nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm được tổng kết trên các bảng từ 7 đến 9.

Như có thể thấy từ kết quả này, virus cúm gây ra bệnh nhiễm tử vong đối với chuột bạch, kèm theo là sự tử vong của các con chuột bắt đầu từ các ngày thứ 3, 4 sau khi gây nhiễm, tùy thuộc vào liều virus. Thời gian sống của các con chuột tỷ lệ nghịch với liều virus. Remantadine được sử dụng trong thử nghiệm làm chất đối chứng có tác dụng bảo vệ rất nhẹ đối với bệnh nhiễm này như được chứng minh bởi một số mức giảm tốc độ tử vong trong nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng (chỉ số bảo vệ là từ 13 đến 29%) và bởi mức tăng thời gian sống không đáng kể (khoảng từ 1,1 đến 1,6 ngày tùy thuộc vào liều virus). Do đó, các số liệu này phù hợp với kết quả trước đây trong các thử nghiệm in vitro và in vivo, điều này chứng minh rằng chủng virus được sử dụng là không nhạy với Remantadine. Tác dụng bảo vệ nhẹ quan sát được trong trường hợp này có thể được giải thích là do tác dụng tiêu độc của chất này.

Trong khi đó, Tamiflu (chất đối chứng) thể hiện tác dụng bảo vệ được xác định rõ, cả trong việc làm giảm tốc độ tử vong trong nhóm chuột được điều trị (khoảng 70% so với nhóm đối chứng), và trong việc làm gia tăng thời gian sống

trung bình của các con chuột (khoảng từ 2 đến 6 ngày). Do đó, virus được sử dụng là kháng Remantadine, nhưng nhạy với Tamiflu.

Trong quá trình phân tích số liệu, đã phát hiện được rằng mẫu hợp chất thử nghiệm theo sáng chế có tính chất bảo vệ gần như chất đối chứng Tamiflu (Bảng 7).

Kết quả này được khẳng định bằng cách sử dụng mô hình bệnh viêm phổi do cúm gây ra bởi hai chủng virus cúm khác. Số liệu của các thử nghiệm này được tổng kết trên các bảng 8 và 9.

Như có thể thấy từ số liệu này, hoạt tính của các chất điều trị hóa học đối với các chủng virus được sử dụng là khác biệt rất lớn. Ví dụ, thuốc Tamiflu điều trị bệnh là vô hoạt đối với chủng virus cúm A/Vladivostok/2/09. Do đó, các số liệu đã có trước đây rằng chủng này kháng Tamiflu được xác nhận trong các thử nghiệm trên động vật. Trong khi đó, hoạt tính của hợp chất theo sáng chế đối với chủng này lại rất cao, và điều này rõ ràng là ưu điểm của hợp chất theo sáng chế.

Chỉ số hoạt tính của hợp chất theo sáng chế (chỉ số bảo vệ, cụ thể là, khả năng kéo dài thời gian sống) là 21 đến 72% và 0,8 đến 4,4 ngày tùy thuộc vào chủng được sử dụng, liều virus gây nhiễm, và liều hợp chất.

Để thử nghiệm tác dụng của hợp chất 1 đối với hoạt tính sao chép của các virus cúm trong mô phổi của con vật được gây nhiễm, vào ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm, các dịch đồng thể được chuẩn bị từ phổi của các con vật, sau đó các dịch này được sử dụng để xác định độ chuẩn nhiễm của virus trong môi trường tế bào. Các trị số sao chép đối với các mẫu virus cúm trong cơ thể con vật được biểu hiện trên bảng 10.

Như có thể suy ra được từ kết quả này, tất cả ba chủng virus được sử dụng đều có thể sao chép một cách hiệu quả trong phổi của chuột, độ chuẩn vào ngày thứ 3 là từ 3,4 đến 6,4 $\log_{10} \text{EID}_{50}/20\text{mg}$ tùy thuộc vào chủng được sử dụng và liều virus gây nhiễm. Các chất điều trị hóa học được sử dụng, cụ thể là hợp chất theo sáng chế và chất đối chứng, làm hạn chế sự tăng bội của virus với các mức độ khác nhau. Ví dụ, Remantadine làm giảm không đáng kể (khoảng hai đến ba

bậc độ lớn) khả năng gây nhiễm của các chủng virus A/lợn/1976/31 và A/Vladivostok/2/09, nhưng không thể thiện hoạt tính ức chế đáng tin cậy đối với chủng kháng Remantadine A/Puerto Rico/8/34. Tamiflu thì nhạy với các chủng A/lợn/1976/31 và A/Puerto Rico/8/34. Nhưng mặt khác, nếu Tamiflu được thử nghiệm ở mô hình chủng kháng A/Vladivostok/2/09 thì thấy một số mức giảm độ chuẩn virus gây nhiễm; tuy nhiên khác biệt so với đối chứng lại không đáng kể.

Hợp chất theo sáng chế thể hiện hoạt tính ức chế đáng kể đối với tất cả các chủng virus được thử nghiệm. Mức hoạt tính không vượt trội nhưng là cân xứng với hoạt tính của các chất đối chứng (Remantadine và Tamiflu). Xét về hoạt tính đối với các chủng virus kháng các chất điều trị hóa học, hợp chất theo sáng chế có hoạt tính đối với chủng kháng Oseltamivir A/Vladivostok/2/09 cao hơn nhiều so với Tamiflu và có hoạt tính sỏi với chủng kháng Remantadine A/PR/8/34 cao hơn so với Remantadine.

Trong quá trình thử nghiệm, sự tạo hình thái mô tả bệnh nhiễm cúm thử nghiệm với liều điều trị dự phòng của hợp chất 1 là 300mg/kg, lưu ý rằng sự tạo hình thái trong quá trình nhiễm ở phổi của con vật nhận hợp chất theo sáng chế là rất khác với các thay đổi hình thái ở phổi của các con vật đối chứng. Khác biệt chính vào ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm là ở bản chất của dịch rỉ viêm, cụ thể là với cùng cường độ, các tế bào trong giai đoạn phân hủy hầu như không được quan sát thấy, các tế bào này là đặc hiệu đối với pha cấp của bệnh viêm phổi cúm. Thành phần tế bào của dịch rỉ này được biểu hiện riêng biệt bằng các bạch cầu trung tính nguyên vẹn, các lympho bào và các đại thực bào. Ngoài ra, các thành phần huyết thanh và xuất huyết của dịch rỉ này cũng kém rõ ràng. Các tế bào biểu mô phế quản thể hiện là nguyên vẹn hơn so với ở các con vật đối chứng. Bản thân các vị trí viêm cũng chiếm diện tích nhỏ hơn so với ở các con vật đối chứng.

Xu hướng tương tự được quan sát thấy ở bệnh phổi sau cúm. Các vị trí tổn thương ở phổi được hạn chế một cách đáng kể về kích cỡ; các nghiên cứu hình

thái học thể hiện sự dị sản biểu mô nhẹ và sự thâm nhiễm kẽ mô của các bạch cầu trung tính nguyên vẹn và các thành phần tế bào tròn. Cần lưu ý rằng tác dụng của hợp chất theo sáng chế được quan sát thấy khi các con vật được gây nhiễm bằng chủng bất kỳ trong số ba chủng virus được thử nghiệm, bất kể tính nhạy hay tính kháng của chúng đối với các chất đối chứng.

Tiêu chuẩn bổ sung đối với tác dụng bảo vệ của hợp chất 1 là kích cỡ các vị trí tổn thương phổi mãn tính ở các con vật. Kết quả của thử nghiệm này được biểu hiện trên bảng 11.

Như thấy được từ kết quả này, tất cả ba chủng virus làm hình thành các thương tổn mãn tính dai dẳng ở phổi phát hiện được bằng mắt ở các con vật sống sót vào ngày thứ 15 sau khi gây nhiễm. Các chất đối chứng (Remantadine và Tamiflu) làm giảm một cách đáng tin cậy mức độ của các thương tổn viêm phổi sau cúm do các chủng virus nhạy với các chất này, và không có hoạt tính đối với các chủng kháng. Trong khi đó, hợp chất 1 làm giảm một cách đáng tin cậy mức độ các thương tổn này bất kể chủng virus được sử dụng.

Do đó, với nồng độ được nghiên cứu (300 đến 30mg/kg), hợp chất 1 thể hiện là có hoạt tính bảo vệ tùy thuộc liều ở các mô hình được sử dụng. Hoạt tính này được chứng minh bằng các trị số sau:

- mức giảm độ chuẩn virus nhiễm từ 6 đến 200 lần ở mô phổi của các con vật được gây nhiễm;
- kéo dài thời gian sống của các con vật được gây nhiễm (khoảng 0,1 đến 4,4 ngày tùy thuộc chủng, liều virus, mẻ tổng hợp, và liều hợp chất);
- giảm mức độ tử vong đặc trưng ở các nhóm thử nghiệm khoảng 7 đến 72% tùy thuộc vào chủng, liều virus, mẻ tổng hợp và liều hợp chất; và
- giảm phạm vi trung bình của thương tổn viêm phổi sau cúm mãn tính từ 2 đến 4 lần.

Kết hợp các trị số này với nhau, hoạt tính bảo vệ của hợp chất 1 ở một số liều là xứng với hoạt tính của chất đối chứng Remantadine.

Các số liệu này chỉ ra rằng hợp chất 1 có hoạt tính chống cúm cao, đặc biệt là đối với các chủng có nguồn gốc từ lợn, và đối với các chủng virus mà kháng các chất chống cúm Remantadine và Tamiflu đang được sử dụng trên lâm sàng.

Ví dụ 8. Thử nghiệm hoạt tính chống khối u của fulleren tris(axit aminocaproic) trên mô hình caxinom Ehrlich cổ trướng và rắn ở chuột bạch.

Nhiệm vụ của các thử nghiệm này là như sau:

- nghiên cứu tác dụng của hợp chất 1 đối với động lực phát triển khối u cổ trướng với việc cấy trong màng bụng các tế bào ung thư;
- nghiên cứu tác dụng của hợp chất 1 đối với động lực phát triển khối u rắn và nghiên cứu tác dụng của các chất đối với hình thái học và các đặc điểm đo lường hình thái của caxinom Ehrlich rắn; và
- nghiên cứu tác dụng của hợp chất 1 đối với hoạt tính chết theo chương trình của tế bào của các tế bào caxinom cổ trướng Ehrlich.

Dung dịch hợp chất 1 được sử dụng trong thử nghiệm này ở hai mức liều: nồng độ 30 và 10 mg/kg. Mỗi con vật được tiêm dưới da 0,2mL dung dịch này với mỗi nồng độ nêu trên 24 giờ trước khi cấy truyền và sau đó được tiêm hàng ngày trong toàn bộ thời gian thử nghiệm. Nồng độ cuối cùng của hợp chất là 300 và 100 mg/kg thể trọng.

Chất đối chứng được sử dụng là Cisplatin (chất chống khối u được sử dụng trên thực tế cho liệu pháp điều trị bệnh ung thư ở người). Cisplatin được dùng một lần vào ngày thứ 2 sau khi cấy khối u vì độc tính của nó cao. Nồng độ cuối cùng của Cisplatin là 5 mg/kg thể trọng.

Các thử nghiệm được thực hiện trên các con chuột bạch không huyết thống có thể trọng trung bình 20 ± 3 g (được mua từ nông trại động vật Rapolovo, vùng Leningrad).

Các tế bào caxinom Ehrlich được mua từ Museum of Cellular Lines của Research Institute for Oncology và được nuôi cấy trong các khoang màng bụng

của chuột bạch. Nhằm mục đích này, 0,2 mL huyền phù tế bào được cấp vào trong màng bụng của các con vật. Trong 7 đến 10 ngày sau khi cấy truyền, các con vật được giết; dịch cổ trướng được thu gom qua lỗ chọc ở bụng, pha loãng 10 lần bằng nước muối, và đặt trên đá.

Để gây caxinom Ehrlich rắn, 0,2mL huyền phù tế bào được tiêm vào dưới da mỗi con vật ở vùng hông phải trong 40 phút, sau đó thu gom dịch cổ trướng của các con vật và đặt trên đá. Trong quá trình thử nghiệm, các cục khối u được đo bằng vi kế trong 28 ngày, hai lần mỗi tuần bắt đầu từ ngày thứ 8 sau khi cấy truyền. Kích cỡ khối u được tính bằng cách nhân nửa chiều dài cục với bình phương chiều rộng và được biểu hiện dưới đơn vị là milimet khối. Tỷ lệ tử vong của các con vật được ghi lại đối với nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm. Các con vật được giết vào ngày 29 sau khi cấy ghép.

Để nghiên cứu tác dụng của các chất đối với khối u cổ trướng, các con vật được tiêm 0,2ml huyền phù tế bào vào trong màng bụng trong tối đa 40 phút sau khi thu gom dịch cổ trướng ban đầu.

Thể trọng của các con chuột được giám sát trong thử nghiệm là chỉ báo sự tích tụ dịch cổ trướng trong khoang màng bụng. Các con chuột được quan sát trong 16 ngày. Vào ngày 17 sau khi cấy truyền, các con chuột được giết.

Động lực phát triển khối u và tỷ lệ tử vong của các con chuột bị caxinom cổ trướng trong nhóm đối chứng và các nhóm thử nghiệm được biểu hiện trên bảng 12.

Như thấy được từ kết quả này, việc cấy truyền các tế bào khối u vào khoang màng bụng của các con chuột gây ra sự tích tụ nhanh chóng dịch cổ trướng trong khoang này. Việc sử dụng các chất điều trị có tác dụng điều trị rõ rệt và làm ức chế sự tích tụ cổ trướng.

Việc điều trị các con chuột bằng hợp chất theo sáng chế và chất đối chứng (Cisplatin) đã làm chậm đáng kể động lực tăng thể trọng ở các con chuột. Trong giai đoạn sau của quá trình này, các khác biệt này có ý nghĩa thống kê.

Tác dụng của hợp chất theo sáng chế đối với các quá trình chết theo chương trình của tế bào đối với các tế bào caxinom Ehrlich cổ trưởng với kích cỡ vừa phải và tính chất hạt ở các con chuột bạch được thấy trong các bảng 13 và 14.

Theo kết quả này, chỉ một phần nhỏ các tế bào khối u trong các tập hợp con tế bào khối u là ở giai đoạn chết theo chương trình nghịch đảo hoặc không nghịch đảo ở các con chuột đối chứng. Việc sử dụng Cisplatin làm tăng mạnh phần tế bào ở giai đoạn chết theo chương trình sớm trong số các tế bào miễn dịch (Bảng 13) và ở giai đoạn chết theo chương trình muộn và hoại tử trong số các tế bào khối u (Bảng 14).

Hợp chất 1 tác dụng ở mức của Cisplatin là chất đối chứng, nó thúc đẩy sự chết theo chương trình sớm ở các tế bào miễn dịch và sự chết theo chương trình muộn ở các tập hợp con tế bào khối u. Hợp chất này hầu như không cho phép các tế bào khối u sống (AnV7AAD⁻). Liên quan đến khả năng giảm hoại tử ở các tế bào khối u, hợp chất này thậm chí còn vượt trội Cisplatin (30,2% so với 26,6% đối với Cisplatin). Cơ chế tác dụng chống khối u của hợp chất 1, như đối với Cisplatin, là ở chỗ làm giảm các quá trình chết theo chương trình ở các tế bào khối u và các tế bào miễn dịch mà tạo thành cổ trưởng. Quá trình chết theo chương trình diễn ra một cách chọn lọc và đáng tin cậy nhanh chóng hơn ở các tế bào khối u so với ở các bạch cầu trung tính và các lympho bào có trong dịch cổ trưởng.

Kết quả của việc phân tích xác định hàm lượng flo tế bào ám chỉ tác dụng chọn lọc của chất đối chứng (Cisplatin) đối với các tế bào khối u so với các tế bào bạch huyết cầu thông thường cũng có mặt trong dịch cổ trưởng. Đồng thời, sau khi dùng hợp chất theo sáng chế, các tế bào bình thường mà cấu thành thành phần kích cỡ vừa phải và thành phần hạt (các bạch cầu trung tính, đại thực bào, lympho bào và các loại tế bào khác) là ở pha chết theo chương trình sớm trong khi các tế bào khối u lại ở pha chế theo chương trình (không nghịch đảo) muộn hoặc pha hoại tử.

Số liệu về động lực phát triển của khối u rắn đối với hợp chất theo sáng chế và Cisplatin so với nhóm đối chứng được biểu hiện trên bảng 15.

Như thấy được từ kết quả này, tất cả các chất được sử dụng ở mức độ nhất định làm ức chế sự phát triển khối u trong suốt thử nghiệm. Nói chung, Cisplatin có hoạt tính chống khối u rõ ràng nhất. Nếu dùng chất này, sự ức chế một cách đáng tin cậy đối với sự phát triển khối u được thấy cho đến ngày thứ 17 sau khi cấy ghép.

Trong khi đó, chuỗi các hợp chất theo sáng chế cũng thể hiện tác dụng chống khối u tùy thuộc liều. Sự giảm một cách đáng tin cậy đối với kích cỡ khối u và giảm sự phát triển của nó được thấy cho đến ngày thứ 8 trong quá trình thử nghiệm. Sau đó, các hợp chất này cũng ngăn cản sự phát triển của khối u ở tất cả các giai đoạn thử nghiệm, mặc dù khác biệt với đối chứng không đạt độ tin cậy về mặt thống kê. Nói chung, hợp chất 1 với liều 100mg/kg thể trọng có thể được nhận xét là gần với Cisplatin nhất, hầu như ở tất cả các giai đoạn của thử nghiệm.

Kết quả này không cho phép coi hợp chất 1 như là hợp chất chủ đạo đối với liệu pháp đích điều trị các bệnh ung thư. Tuy nhiên, dựa trên các số liệu này, tác giả sáng chế có thể bàn về nó như là hợp chất nhiều triển vọng để phát triển thuốc điều trị phức tạp để sử dụng cùng với các thuốc điều trị chống khối u khác, đặc biệt là đối với các khối u cổ trướng.

Các dạng liều dược phẩm của hợp chất theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa (bao gồm tiêm dưới da, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong bắp, hoặc tiêm ở mông và truyền), bằng cách phun hít hoặc dùng qua trực tràng để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh nhiễm virus như HIV, herpes, và nhiều bệnh cúm, cũng như được dùng làm thuốc chống khối u để sử dụng trong các liệu pháp phức tạp.

Các hợp chất được trộn với các chất mang và các tá dược thông thường và được sử dụng ở dạng viên nén, viên nang, viên thuốc đạn, thuốc mỡ, nhũ tương, dung dịch hoặc thuốc phun. Cần lưu ý rằng để bảo chế các dạng liều dung dịch,

thuốc phun và các dạng liều mềm (thuốc mỡ, thuốc đạn), hợp chất theo sáng chế được pha loãng sơ bộ trong hỗn hợp DMSO và nước.

Việc điều trị các bệnh nhiễm bằng các liệu được dụng của hợp chất có công thức (II) đồng thời tác động đến nhiều hơn một chủng virus (trong trường hợp bị nhiễm phức hợp) và hướng đến các giai đoạn khác nhau của quá trình sao chép virus. Việc điều trị được thể hiện là đi kèm với việc giảm đáp ứng stress của việc dùng hợp chất, tăng cường sự bảo vệ chống oxy hóa của cơ thể đối với bệnh nhiễm, và loại bỏ các độc tố. Sự nhiễm độc là đặc trưng của một số bệnh nhiễm virus và là nguyên nhân của độ nặng của bệnh.

Các hợp chất có công thức (II) có thể được kết hợp với các chất kháng virus khác, các chất điều hòa miễn dịch, các chất chống nhiễm khuẩn, hoặc các vacxin trong nhiều dạng kết hợp với các dược phẩm bất kỳ được dự tính để điều trị.

Bảng 1. Tính độc hại tế bào của hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm trong mô hình tế bào nguyên bào lympho của người

Các thông số thử nghiệm, nồng độ, mcg/ml		Tỷ lệ tế bào sống sót, %	Số lượng tế bào $\times 10^3/\text{ml}$
Đối chứng tế bào		96	833
Hợp chất 1	0,5	95	633
	1,0	94	599
	5,0	96	530
	10,0	92	500
	100	70	433

Bảng 2. Hoạt tính kháng virus của hợp chất 1 được thử nghiệm trên mô hình tế bào người được gây nhiễm HIV-1

Các thông số thử nghiệm	Nồng độ, mcg/ml	Tỷ lệ tế bào sống sót, %	Số lượng tế bào $\times 10^3/\text{ml}$	CPE/hợp bào (+)
-------------------------	-----------------	--------------------------	---	-----------------

Đối chứng tế bào	0	96	833	0
Đối chứng virus	0	20	83,5	4,0
Hợp chất 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

Bảng 3. Trị số hoạt tính của hợp chất 1 đối với virus cúm A/IIV-Matxcova/01/2009 (H1N1)swl

Nồng độ của hợp chất(mcg/mL)	Cách dùng	Mức giảm (%) sự sao chép virus cúm trong môi trường tế bào MDCK so với đối chứng với sự có mặt của chuỗi hợp chất theo sáng chế
6,25	2 giờ trước khi gây nhiễm	24,0 - 80,0 - 0
	đồng thời với việc gây nhiễm	54,0-21,0
12,5	2 giờ trước khi gây nhiễm	45,0-100-6,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	78,0 -37,0
25,0	2 giờ trước khi gây nhiễm	40,0-100-43,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	88,0-35,0

50,0	2 giờ trước khi gây nhiễm	47,0 - 77,0 - 69,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	96,0 - 43,0
100,0	2 giờ trước khi gây nhiễm	72,0 - 88,0 - 66,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	69,0 - 76,0

Bảng 4. Trị số hoạt tính của hợp chất 1 đối với virus cúm A/IV-Matxcova/01/2009 (H1N1)sw1, trị số trung bình

Nồng độ của hợp chất (mcg/mL)	Cách dùng	Mức giảm (%) sự sao chép virus cúm trong môi trường tế bào MDCK so với đối chứng với sự có mặt của chuỗi hợp chất theo sáng chế
6,25	2 giờ trước khi gây nhiễm	35,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	38,0
12,5	2 giờ trước khi gây nhiễm	50,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	58,0
25,0	2 giờ trước khi gây nhiễm	61,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	62,0

50,0	2 giờ trước khi gây nhiễm	64,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	70,0
100,0	2 giờ trước khi gây nhiễm	75,0
	đồng thời với việc gây nhiễm	73

Bảng 5. Hiệu lực của fullerene tris (axit aminocaproic) hydrat đối với bệnh nhiễm cúm ở chuột

Liều hợp chất	Quan sát vào ngày thứ 16			Thời gian sống trung bình (ngày)**
	Sự sống sót (số con sống/tổng số con)	Tỷ lệ tử vong (%)	Khả năng bảo vệ tránh tử vong (%)	
Fulleren tris (axit aminocaproic) hydrat, qua đường miệng				
100 mg/kg/day	5/10	50	40	10,4 (2-7 ngày, 1-9 ngày, 1-10 ngày)
200 mg/kg/day	7/10	30	60	13,0 (1-7 ngày, 1-10 ngày, 1-11 ngày)
Fulleren tris (axit aminocaproic) hydrat, trong bắp				
50 mg/kg/day	6/10	40	50	12,4 (1-7 ngày, 1-9 ngày, 2-11 ngày)
100 mg/kg/day	8/10	20	70	13,5 (1-8 ngày, 1-9 ngày)
200 mg/kg/day	9/10	10	80	14,4 (1-10 ngày)
dung dịch DMSO 1,5%	10/10	0		> 16
Fulleren tris (axit aminocaproic) hydrat, trong màng bụng				
50 mg/kg/day	5/10	50	40	11,5 (1-5 ngày, 1-7 ngày, 3-11 ngày)
100 mg/kg/day	5/10	50	40	11,0 (3-7 ngày, 1-8 ngày, 1-11 ngày)

dung dịch DMSO 1,5%	10/10	0		> 16	
Đối chứng virus (10LD ₅₀)	1/10	90		7,3 (5-7 ngày, 4-8 ngày)	

* Kế hoạch điều trị: 24 giờ và 1 giờ trước khi gây nhiễm, sau đó trong 24, 48, 72 và 96 giờ sau khi gây nhiễm.

** Thời gian sống trung bình được tính theo công thức $\Sigma f(d-1)/n$, trong đó f là số con chuột chết vào d (số con chuột sống tính cả f, và d bằng 16 trong trường hợp này), n là số con chuột trong nhóm.

Bảng 6. Thay đổi thể trọng của các con chuột được gây nhiễm virut cúm Aichi/2/69 và được điều trị bằng hợp chất 1

Liều hợp chất	Mức thay đổi thể trọng (%) trong các ngày sau khi gây nhiễm									
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 7	Ngày 9	Ngày 11	Ngày 13	
Fulleren tris(axit aminocaproic), qua đường miệng										
100 mg/kg/day	+12	+17	+23	+25	+24	+21	+23	+34	+44	
200 mg/kg/day	+15	+20	+23	+25	+24	+22	+25	+45	+57	
Fulleren tris(axit aminocaproic), trong bắp										
50 mg/kg/day	+9	+14	+21	+26	+30	+27	+38	+64	+74	
100	+13	+17	+23	+28	+31	+39	+65	+7	+82	

Bảng 7. Hoạt tính bảo vệ của fulleren tris(axit aminocaproic) đối với bệnh viêm phổi gây tử vong thử nghiệm do virus cúm A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) kháng Remantadine

Hợp chất, liều	Liều virus, LD ₅₀	Số con chuột trong nhóm	Số con sống sót	Thời gian sống trung bình (LD), ngày	Tỷ lệ tử vong, %	Chỉ số bảo vệ, %	Mức tăng thời gian sống trung bình, ngày
1	2	3	4	5	6	7	8
Hợp chất 1, 300 mg/kg	10	14	8	11,3	42,9	49,4	3,2
	1	15	12	13,7	20,0	57,1	1,3
	Liều tổng cộng	29	20	12,5	31,0	51,7	2,2
Hợp chất 1, 100 mg/kg	10	15	6	11,3	60,0	29,1	3,2
	1	15	12	13,9	20,0	57,1	1,6

	Liều tổng cộng	30	18	12,6	40,0	37,8	2,2
Hợp chất 1, 30 mg/kg	10	15	4	10,4	73,3	13,3	2,3
	1	14	9	13,3	35,7	23,5	1,0
	Liều tổng cộng	29	13	11,8	55,2	14,2	1,4
Remantadine	10	15	4	9,7	73,3	13,3	1,6
	1	15	10	13,5	33,3	28,6	1,1
	Liều tổng cộng	30	14	11,6	53,3	17,0	1,2
Tamiflu	10	15	11	13,5	26,7	68,5	5,5
	1	13	11	14,4	15,4	67,0	2,1

	Liều tổng cộng	28	22	13,9	21,4	66,7	3,6
Đối chứng virut	10	13	2	8,1	84,6	--	0,0
	1	15	8	12,3	46,7	--	0,0
	Liều tổng cộng	28	10	10,4	64,3	--	0,0

Bảng 8. Hoạt tính bảo vệ của fulleren tris(axit aminocaproic) đối với bệnh viêm phổi gây tử vong thử nghiệm do virus cúm A/lợn/1976/31 (H1N1)

Hợp chất, liều	Liều virus, LD ₅₀	Số con chuột trong nhóm	Số con sống sót	Thời gian sống trung bình (LD), ngày	Tỷ lệ tử vong, %	Chỉ số bảo vệ, %	Mức tăng thời gian sống trung bình, ngày
1	2	3	4	5	6	7	8
Hợp chất 1, 300 mg/kg	10	14	8	11,5	42,9	53,8	4,4
	1	14	11	13,6	21,4	59,8	3,0
	Liều tổng cộng	28	19	12,3	32,1	55,6	3,7
Hợp chất 1, 100 mg/kg	10	13	6	10,3	53,8	42,0	3,7
	1	15	11	13,1	26,7	50,0	2,5

	Liều tổng cộng	28	17	11,8	39,3	45,7	3,1
Hợp chất 1, 30 mg/kg	10	15	4	8,9	73,3	21,0	2,4
	1	15	9	12,3	40,0	25,0	1,7
	Liều tổng cộng	30	13	10,6	56,7	21,7	1,9
Remantadine	10	15	9	11,8	40,0	56,9	5,2
	1	15	13	14,3	13,3	75,0	3,7
	Liều tổng cộng	30	22	13,1	26,7	63,2	4,4
Tamiflu	10	13	8	11,0	38,5	58,6	4,4
	1	13	11	13,5	15,4	71,2	2,9

	Liều tổng cộng	26	19	12,2	26,9	62,8	3,6
Đối chứng virut	10	14	1	6,6	92,9	--	0,0
	1	15	7	10,6	53,3	--	0,0
	Liều tổng cộng	29	8	8,7	72,4	--	0,0

Bảng 9. Hoạt tính bảo vệ của fullerene tris(axit aminocaproic) đối với bệnh viêm phổi gây tử vong thử nghiệm do virus cúm A/Vladivostok/02/09 (H1N1) kháng Oseltamivir

Hợp chất, liều	Liều virus, LD ₅₀	Số con chuột trong nhóm	Số con sống sót	Thời gian sống trung bình (LD), ngày	Tỷ lệ tử vong, %	Chỉ số bảo vệ, %	Mức tăng thời gian sống trung bình, ngày
1	2	3	4	5	6	7	8
Hợp chất 1, 300 mg/kg	2	13	10	13,8	23,1	61,5	2,4
	0,4	13	12	14,5	7,7	71,8	1,4
	Liều tổng cộng	26	22	14,2	15,4	64,1	1,8
Hợp chất 1, 100 mg/kg	2	12	8	13,3	33,3	44,4	1,9
	0,4	10	8	14,0	20,0	26,7	0,8

	Liều tổng cộng	22	16	13,6	27,3	36,4	1,3
Hợp chất 1, 30 mg/kg	2	12	7	13,2	41,7	30,6	1,8
	0,4	13	11	14,2	15,4	43,6	1,0
	Liều tổng cộng	25	18	13,7	28,0	34,7	1,4
Remantadine	2	10	5	11,7	50,0	16,7	0,3
	0,4	9	7	13,4	22,2	18,5	0,3
	Liều tổng cộng	19	12	12,5	36,8	14,0	0,2
Tamiflu	2	13	12	14,6	7,7	87,2	3,2
	0,4	13	13	15,0	0,0	100,0	1,8

	Liều tổng cộng	26	25	14,8	3,8	91,0	2,5
Đối chứng virus	2	10	4	11,4	60,0	--	0,0
	0,4	11	8	13,2	27,3	--	0,0
	Liều tổng cộng	21	12	12,3	42,9	--	0,0

Bảng 10. Khả năng gây nhiễm của các chủng virus cúm trong mô phổi của chuột bạch trong điều kiện dùng các liệu pháp điều trị hóa học

Hợp chất, liều	Độ chuẩn virus gây nhiễm ($\log_{10}EID_{50}/20\text{mg mô}$) đối với liều virus (LD_{50})					
	A/lợn/1976/31 (H1N1)		A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)		A/Vladivostok/2/09 (H1N1)	
	1	5	1	5	0,4	2
Hợp chất 1, 300 mg/kg	3,7±0,3	4,1±0,2	3,2±0,3	4,1±0,2	1,8±0,2	2,9±0,2
Remantadine	2,9±0,2	3,4±0,3	4,5±0,2	5,1±0,3	1,2±0,2	2,0±0,3
Tamiflu	3,1±0,1	3,8±0,3	2,2±0,4	2,4±0,3	2,5±0,2	3,1±0,3
Đối chứng virus	6,0±0,0	6,4±0,2	4,9±0,3	5,5±0,2	3,4±0,4	4,0±0,3

* Khác biệt so với đối chứng là đáng tin cậy với $p < 0,05$

Bảng 11. Khả năng gây nhiễm của các chủng virus cúm ở mô phổi của chuột bạch trong điều kiện dùng liệu pháp điều trị hóa học

Hợp chất	Kích cỡ vị trí viêm phổi sau khi cúm mãn tính (% theo tổng diện tích bề mặt của phổi) khi gây nhiễm bằng virus (thấp hơn các liệu pháp được sử dụng)		
	A/lợn/1976/31 (H1N1)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	A/Vladivostok/2/09 (H1N1)

Hợp chất 1, 300 mg/kg	25±7	13±3	7±2
Remantadine	16±5	32±7	10±2
Tamiflu	20±5	15±4;	15±5
Đối chứng virus	54±7	41±6	27±8

* Khác biệt so với đối chứng là đáng tin cậy với $p < 0,05$

Bảng 12. Động lực thể trọng ở các con chuột bị caxinom cổ trướng Ehrlich được điều trị bằng các hợp chất điều trị

Thời gian sau khi cấy ghép khối u, ngày	Thể trọng của con chuột (g)		
	Hợp chất điều trị được dùng		
	Hợp chất 1	Cisplatin	Đối chứng không điều trị
1	18,6±2,3	19,1±.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

* Khác biệt so với đối chứng không điều trị bằng hợp chất trong thời gian tương ứng là đáng tin cậy với $p < 0,05$

Bảng 13

Hợp chất	Phân trăm lượng tế bào với kiểu hình						
	AnV7AAD ⁻ (tế bào sống)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁻ (chết theo chương trình sớm)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁺ (chết theo chương trình muộn)	p	AnV7AAD ⁺ (hoại tử)
Hợp chất 1	6,1±6,2	0,00	31,1±10,4	0,02	4,2±2,4	0,17	0,4±0,4
Cisplatin	55,2±11,0	0,00	41,1±11,3	0,00	3,5±2,4	0,17	0,1±0,2
Đối chứng không dùng hợp chất	82,6±7,7	-	9,7±6,3	-	6,6±2,9	-	1,0±0,8
							0,11
							0,03
							-

Bảng 14. Tác dụng của các hợp chất đối với sự chết theo chương trình của tế bào ở các tế bào caxinom cổ trưởng Ehrlich có kích cỡ lớn và tính chất hạt ở chuột bạch

Hợp chất	Phân trăm lượng tế bào với kiểu hình						
	AnV7AAD ⁻ (tế bào sống)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁻ (chết theo chương trình)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁺ (chết theo)	p	AnV7AAD ⁺ (hoại tử)
							p

Bảng 15. Động lực kích cỡ khối u rắn caxinom Ehrlich ở chuột bạch được điều trị bằng hợp chất điều trị bệnh trong thử nghiệm

Hợp chất, liều (mg/kg thể trọng)	Kích cỡ khối u (mm ³), ngày sau khi cấy ghép					
	8	13	17	21	24	28
Đối chứng	156,6	711,7	1250,3	1902,1	2296,5	2888,2
Hợp chất 1, 300 mg/kg	72,7	416,3	1224,6	1703,4	2048,5	2525,7
Hợp chất 1, 100 mg/kg	72,5	544,3	693,6	1250,8	1654,3	2239,8
Cisplatin	56,5	249,2	464,3	1071,9	1743,3	1269,4

* Khác biệt so với đối chứng không dùng hợp chất là đáng tin cậy với $p < 0,05$.

Ví dụ 9. Độc tính mãn của fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat ở chuột với việc dùng liều trong bắp trong 30 ngày.

Thử nghiệm này được thực hiện ở Trung tâm nghiên cứu độc chất học và điều chỉnh vệ sinh đối với các chất sinh học (FGUN NITs TBP FMBA của Nga), thành phố Serpukhov.

Nhiệm vụ của các nghiên cứu này là đánh giá trên thử nghiệm mức và đặc tính của tác dụng có hại có thể có của fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat đối với cơ thể chuột với việc dùng liều trong bắp trong 30 ngày.

Các thử nghiệm được thực hiện trên chuột Wistar, được mua từ vườn ươm của GU NTsBT, Học viện y khoa Nga (chi nhánh Stolbovaya). Việc duy trì các con chuột được vệ sinh được chấp thuận bởi Bộ sức khỏe cộng đồng của Liên bang Xô Viết, 06/07/1973, trên cơ sở tổ chức, thiết bị, và duy trì các điều kiện lâm sàng sinh học và thử nghiệm (điều kiện

vườn thú). Các con chuột được cho ăn thức ăn tự nhiên và thức ăn dạng bánh phù hợp với các tiêu chuẩn được thông qua bởi chỉ thị số 755 của Bộ sức khỏe cộng đồng của Liên bang Xô Viết, 12/081977. Các con chuột này được kiểm dịch và làm thích nghi với vườn thú trong 5 ngày.

Các con chuột thử nghiệm được chia nhóm ngẫu nhiên với thể trọng là dấu hiệu chỉ thị chính.

Các chất thử nghiệm được cho chuột dùng trong bắp hàng ngày trong 30 ngày với liều 3, 9, hoặc 20 mg/kg dưới dạng các dung dịch có nồng độ khác nhau trong dung dịch dimetyl sulfoxit (DMSO) 20%. Các con chuột ở nhóm đối chứng được nhận dung dịch DMSO 20%. Các dung dịch hợp chất thử nghiệm và DMSO được chuẩn bị mỗi ngày ngay trước khi dùng. Liều lượng dùng là được hiệu chỉnh tính đến thể trọng của mỗi con sau mỗi lần cân nặng. Mỗi liều được thử nghiệm cho 20 con (10 con đực và 10 con cái).

Để đánh giá tác dụng độc hại của fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, 24 giờ sau khi kết thúc thời kỳ dùng hợp chất này, một nửa số con chuột trong mỗi nhóm được lấy ra khỏi thử nghiệm để nghiên cứu huyết học, sinh hóa, và bệnh học. Một nửa số con chuột thử nghiệm còn lại được lấy ra khỏi thử nghiệm sau thời kỳ cai hợp chất, và thực hiện các nghiên cứu tương tự.

Trong thời kỳ dùng hợp chất và trong 14 ngày sau khi cai dùng hợp chất, tình trạng chung và các triệu chứng lâm sàng của việc nhiễm độc ở các con chuột được đánh giá hàng ngày. Tình trạng chung của chuột được đánh giá là sự nhanh nhẹn của cơ thể của nó, sự tiêu thụ thức ăn và nước, tình trạng của lông và màng nhầy hữu hình, và thể trọng.

Phân tích huyết học được thực hiện bằng cách sử dụng máy đếm tế bào qua việc đo độ dẫn hai kênh bán tự động Hema-screen 13 (Hospitex Diagnostics, Italy) và sử dụng kính hiển vi quang học.

Các chỉ số sinh hóa của huyết thanh được xác định trên máy phân tích bán tự động Stat Fax 3300.

Các chỉ số sinh hóa của ure được xác định trên máy phân tích bán tự động Urisys 1100.

Trạng thái hình thái học của nội tạng của các con chuột được xác định bằng mắt khi mổ và xét nghiệm mô bằng kính hiển vi đối với các mẫu (các lát parafin 4 đến 5 micron được nhuộm hematoxylin và eosin).

Việc xử lý thống kê kết quả được thực hiện bằng các phương pháp thống kê sử dụng kiểm định Student.

1. Kết quả của các thử nghiệm

1.1. Kết quả của việc quan sát lâm sàng

Các con chuột được tiêm fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat vào trong bắp với liều 3, 9, hoặc 20 mg/kg hàng ngày trong một tháng. Với tất cả các liều, không quan sát thấy dấu hiệu lâm sàng bất kỳ về sự nhiễm độc; các con chuột trong nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng không khác nhau về tình trạng chung của chúng. Sự tăng thể trọng ở các con chuột ở nhóm thử nghiệm trong suốt thử nghiệm không khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng (Bảng 16).

Bảng 16. Thể trọng của các con chuột trong thời kỳ dùng và thời kỳ cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat

Ngày quan sát	Đối chứng DMSO	Fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, mg/kg		
		3	9	20

	Chuột đực (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
	Chuột cái (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. Kết quả của việc phân tích sinh hóa huyết thanh

Sau khi kết thúc việc dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, sự giảm đáng kể lượng ure ở mức liều tối đa được thử nghiệm ở các con chuột đực được biểu thị (Bảng 17). Các thay đổi về nồng độ cholesterol ở các mức liều tối thiểu và trung bình không đi kèm với tác dụng của hợp chất được thử nghiệm và không vượt quá giới hạn sinh lý. Ở các con chuột cái, có sự gia tăng nhẹ nhưng đáng tin cậy về hoạt tính alanin amino transferaza ở liều thử nghiệm tối đa. Các thay đổi về nồng độ glucoza ở mức liều tối thiểu và về nồng độ cholesterol và tổng lượng protein ở mức liều trung bình của hợp chất không có đáp ứng liều và không vượt trên giới hạn sinh lý.

Bảng 17. Các chỉ số sinh hóa của huyết thanh của chuột sau khi dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat

Thông số, đơn vị đo	Đối chứng (DMSO)	Fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, mg/kg		
		3	9	20
Chuột đực (M ± m)				
1	2	3	4	5
Tổng lượng protein, g/L	95,6±9,59	86,88±5,28	102,1±34,65	82,08±9,28
Glucosa, mmol/L	6,28±0,29	6,88±0,73	6,4±1,02	7,0±1,26
Ure, mmol/L	12,94±1,77	10,66±2,89	11,36±2,71	9,22±1,56*
Cholesterol, mmol/L	5,42±0,71	4,17±0,68*	3,88±0,75*	4,96±1,03
Bilirubin, Mcmol/L	8,96±2,84	9,98±1,67	9,16±1,4	8,76±1,54
Creatinin, mcmol/L	75,36±8,81	85,58±17,46	82,06±21,99	75,6±15,51
ALT, đơn vị/L	15,52±3,17	17,12±1,2	14,62±4,22	14,04±3,01
AST, đơn vị/L	28,56±5,94	25,18±3,95	29,34±3,8	24,44±5,48
Phosphataza kiềm, đơn vị/L	343±89	333±48	300±56	283±67
Chuột cái (M ± m)				
Tổng lượng protein, g/L	79,0±7,18	81,64±11,03	68,94±2,97*	83,16±11,75

Glucosa, mmol/L	5,64±0,72	7,64±1,56*	6,36±0,67	6,46±0,51
Ure, mmol/L	9,88±1,8	8,0±4,04	10,02±1,46	9,48±1,86
Cholesterol, mmol/L	3,66±0,34	4,11±0,45	4,42±0,56*	4,16±0,88
Bilirubin, Mcmol/L	7,52±2,86	10,96±2,14	9,46±2,26	7,18±0,95
Creatinin, mcmol/L	70,1±16,19	56,44±3,3	52,46±5,77	53,78±8,31
ALT, đơn vị/L	10,52±1,01	10,7±1,57	12,52±2,11	13,52±1,4*
AST, đơn vị/L	22,75±1,37	27,51±5,11	24,02±2,64	21,47±3,09
Phosphataza kiềm, đơn vị/L	227±191	143±47	159±28	248±107

* đáng tin cậy về mặt thống kê theo kiểm định Student.

Có sự giảm đáng tin cậy về nồng độ creatinin ở liều thử nghiệm tối đa sau thời kỳ cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat ở các con chuột đực và cái. Ở mức liều tương tự, có sự thay đổi hoạt tính aspartat amino transferaza ở cả các con chuột đực và cái; tuy nhiên ở các con đực, đó là sự giảm hoạt tính, trong khi đó ở các con cái thì đó là sự tăng hoạt tính (Bảng 18).

Bảng 18. Các chỉ số sinh hóa của huyết thanh ở các con chuột sau khi cai fulleren tris(axit aminocaproic)hydrat

Thông số, đơn vị đo	Đối chứng (DMSO)	Fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, mg/kg
------------------------	---------------------	---

		3	9	20
	Chuột đực (M ± m)			
1	2	3	4	5
Tổng lượng protein, g/L	70,08±7,11	67,20±7,60	68,06±7,27	66,58±2,67
Glucosa, mmol/L	6,04±0,56	6,54±1,03	7,18±0,80*	6,40±0,93
Ure, mmol/L	7,52±0,74	7,96±1,05	7,14±1,59	8,52±0,99
Cholesterol, mmol/L	4,70±0,88	4,06±0,25	4,25±0,72	4,57±0,54
Bilirubin, mcmol/L	15,72±7,74	20,32±5,19	16,06±2,72	17,30±2,11
Creatinin, mcmol/L	57,46±12,35	51,10±7,11	48,12±10,16	41,86±4,09*
ALT, đơn vị/L	22,44±2,31	21,18±5,54	21,52±2,68	24,38±2,22
AST, đơn vị/L	19,53±2,04	18,18±1,39	18,08±2,64	16,18±1,83*
Phosphataza kiềm, đơn vị/L	258±46	263±71	255±48	238±61
	Chuột cái (M±m)			
Tổng lượng protein, g/L	70,92±10,67	71,12±6,66	78,48±8,94	72,76±8,11
Glucosa, mmol/L	6,82±1,32	7,62±0,69	6,78±0,97	6,90±1,23
Ure, mmol/L	8,46±1,15	7,20±2,43	7,94±1,25	9,4±2,93
Cholesterol, mmol/L	4,49±0,95	4,26±1,04	5,02±1,7	5,67±1,2

mmol/L				
Bilirubin, mcmol/L	11,9±5,65	13,0±3,07	11,8±1,18	11,28±1,91
Creatinin, mcmol/L	74,14±18,21	63,76±16,67	55,84±9,94	50,26±5,04
ALT, đơn vị/L	16,52±3,23	14,36±5,02	14,44±2,86	17,82±3,11
AST, đơn vị/L	14,29±2,5	16,84±1,27	17,68±2,87	18,41±2,85*
Phosphataza kiềm, đơn vị/L	219±58	168±54	218±44	221±36

* Đáng tin cậy về mặt thống kê theo kiểm định t Student.

Đánh giá kết quả của việc phân tích sinh hóa huyết tương của chuột trong thời kỳ dùng hợp chất và sau thời kỳ cai dùng hợp chất thấy rằng các chỉ số thay đổi nêu trên trong huyết tương của chuột đực và cái là trong giới hạn sinh lý của loài này.

1.3. Kết quả của việc phân tích huyết học

Sau khi kết thúc việc dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, không thấy có thay đổi bất kỳ về các chỉ số huyết học đi kèm với việc dùng hợp chất thử nghiệm. Ở các con chuột cái, thấy có sự giảm không đáng kể về thể tích hồng cầu trung bình ở mức liều trung bình và có sự tăng nhất định về phần hồng cầu lưới ở mức liều tối thiểu (Bảng 19). Các thay đổi này không vượt quá khoảng sinh lý và không có đáp ứng liều.

Bảng 19. Các chỉ số huyết học của máu chuột sau khi kết thúc việc dùng tris(axit aminocaproic) hydrat

Thông số, đơn vị	Đối chứng	Fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat,
------------------	-----------	--

đo	(DMSO)	mg/kg		
		3	9	20
	Chuột đực (M ± m)			
1	2	3	4	5
Hemoglobin, mol/dm ³	8,4±0,8	7,8±0,3	8,1±1,6	8,0±1,0
Hồng cầu, Mln/mm ³	5,7±1,0	6,0±0,6	6,0±0,9	6,3±0,7
Hematocrit, %	32,3±7,1	35,4±3,4	35,0±5,3	35,3±4,3
Thể tích hồng cầu trung bình, mcm ³	57,0±5,1	59,0±2,7	58,2±4,5	55,6±1,5
Hồng cầu lưới, %	3,8±0,8	4,0±0,6	3,8±0,9	4,4±0,8
Tiểu cầu, ths	692,6±93,7	692,6±98,2	699,8±181,2	766,2±85,1
Bạch cầu, ths/mm, bao gồm:	22,9±4,1	22,8±1,5	24,6±5,2	23,3±3,8
Bạch cầu ưa bazo, %	0	0	0	0
Bạch cầu ưa eosin, %	0,8±1,1	0,8±1	1,0±1,2	0,8±1,1
Young, %	0	0	0	0
Stabnuclear, %	1,6±1,7	1,6±0,9	1,0±1,2	1,2±1,1
Segmentonuclear, %	24,4±3,6	28,4±7,8	21,5±4,4	24,4±3,8
Lympho bào, %	67,6±5,0	64,8±5,8	71,0±2,6	68,0±5,1
Bạch cầu đơn nhân to, %	5,6±2,2	4,8±2,3	5,5±1,9	5,6±0,9
	Chuột cái (M ± m)			

Hemoglobin, mol/dm ³	8,0±0,2	7,7±0,6	7,8±0,9	8,1±1,0
Hồng cầu, Mln/mm	5,4±0,6	6,0±0,8	6,3±0,7	6,3±0,8
Hematocrit, %	32,0±2,3	32,8±5,2	34,4±3,2	35,7±4,0
Thể tích hồng cầu trung bình, mcm ³	59,6±3,1	57,8±5,0	55,0±1,9*	57,4±3,
Hồng cầu lưới, %	5,1±0,5	6,6±0,5*	4,9±0,3	4,8±0,3
Tiểu cầu, ths	538,4±126,8	439,0±104,0	505,0±75,7	542,4±91,2
Bạch cầu ths/mm ³ , bao gồm:	21,7±8,4	21,4±4,7	20,4±8,8	19,7±3,2
Bạch cầu ưa bazơ, %	0	0	0	0
Bạch cầu ưa eosin, %	1,6±1,7	2,0±2,0	2,0±2,4	1,2±1,1
Young, %	0	0	0	0
Stabnuclear, %	2,0±1,4	1,2±1,1	0,8±1,1	1,6±0,9
Segmentonuclear, %	21,2±5,0	20,8±5,4	18,8±5,0	18,4±3,6
Lympho bào, %	69,8±3,3	70,4±4,6	72,4±5,2	73,2±4,1
Bạch cầu đơn nhân to, %	5,4±0,9	5,6±1,7	6,0±1,4	5,6±0,9

* Đáng tin cậy về mặt thống kê theo kiểm định T- Student.

Các nghiên cứu về chỉ số huyết học ở chuột sau khi kết thúc thời kỳ cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat không thể hiện khác biệt đáng tin cậy giữa các con chuột nhóm đối chứng và các con chuột nhóm thử nghiệm (Bảng 20).

Bảng 20. Các chỉ số huyết học của máu chuột sau khi cai tris(axit aminocaproic) hydrat

Thông số, đơn vị đo	Đối chứng (DMSO)	Fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, mg/kg		
		3	9	20
		Chuột đực (M ± m)		
1	2	3	4	5
Hemoglobin, mol/dm ³	7,9±0,7	8,3±3,7	7,9±0,3	7,4±0,8
Hồng cầu, Mln/mm	6,3±0,6	6,5±1,2	6,4±0,5	6,3±0,8
Hematocrit, %	33,0±2,6	33,7±1,7	34,1±2,1	31,2±3,5
Thể tích hồng cầu trung bình, mcm	52,8±2,5	52,0±1,6	53,4±4,6	50,4±1,5
Hồng cầu lưới, %	4,0±0,6	4,3±1,1	4,0±0,3	4,2±0,5
Tiểu cầu, ths	496,6±48,9	445,6±55,8	479,8±43,8	447,0±86,9
Bạch cầu, ths/mm ³ , bao gồm:	22,5±3,6	22,0±6,8	19,6±2,5	24,8±6,2
Bạch cầu ưa bazơ, %	0	0	0	0
Bạch cầu ưa eosin, %	0,8±1,1	0,8±1,1	0,8±1,1	0,8±1,1
Young, %	0	0	0	0
Stabnuclear, %	1,6±1,7	1,6±0,9	1,6±1,7	1,2±1,1
Segmentonuclear, %	24,4±3,6	28,4±7,8	21,6±3,8	24,4±3,8
Lympho bào, %	67,6±5,0	64,8±5,	71,0±2,2	68,0±5,1

Bạch cầu đơn nhân to, %	5,6±2,2	4,8±2,3	5,0±2,0	5,6±0,9
	Chuột cái (M±m)			
Hemoglobin, mol/dm ³	8,1±0,6	7,7±0,7	8,2±0,3	8,5±0,6
Hồng cầu, Mln/mm ³	5,9±0,7	5,8±0,3	6,3±0,5	6,4±0,6
Hematocrit, %	31,7±3,8	32,3±3,2	32,9±2,0	32,9±2,2
Thể tích hồng cầu trung bình, Mcm	54,4±1,7	55,2±4,6	52,4±1,5	52,2±3,4
Hồng cầu lưới, %	4,6±0,6	4,4±0,5	4,3±0,5	4,5±0,4
Tiểu cầu, ths	459,8±86,0	462,4±95,1	453,0±67,3	470,8±34,8
Bạch cầu, ths/mm, bao gồm:	21,6±2,6	17,8±4,0	20,1±3,5	8,1±2,5
Bạch cầu ưa bazơ, %	0	0	0	0
Bạch cầu ưa eosin, %	2,0±1,4	1,8±1,8	1,8±1,8	2,0±1,4
Young, %	0	0	0	0
Stabnuclear, %	1,4±1,3	1,6±1,7	1,2±1,1	1,4±1,3
Segmentonuclear, %	20,8±3,3	22,0±2,4	22,0±3,2	22,8±3,8
Lympho bào, %	70,6±3,7	69,2±3,	69,4±4,4	68,4±4,1
Bạch cầu đơn nhân to, %	5,2±1,3	5,4±0,9	5,6±1,1	5,4±0,9

1.4. Phân tích nước tiểu

Sau khi kết thúc thời kỳ dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, thấy có sự tăng độ pH của nước tiểu ở nhóm chuột đực ở mức liều 9mg/kg (Bảng 21). Các chỉ số mới này là trong khoảng sinh lý; không quan sát thấy sự phụ thuộc liều.

Sau thời kỳ cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, thấy có sự giảm tỷ trọng nước tiểu tương đối ở nhóm chuột cái dùng mức liều 20,0mg/kg so với các con chuột ở nhóm đối chứng. Ở nhóm chuột đực, có các thay đổi đáng tin cậy về mặt thống kê trong cùng thời kỳ này so với nhóm đối chứng, cụ thể là ở mức liều 3,0mg/kg, có sự gia tăng độ pH; và ở mức liều 9,0mg/kg, có sự gia tăng tỷ trọng nước tiểu tương đối. Các chỉ số này đều nằm trong giới hạn sinh lý và không có đáp ứng liều (Bảng 22).

Bảng 21. Các chỉ số nước tiểu của chuột sau khi kết thúc thời kỳ dùng fulleren tris(axít aminocaproic) hydrat

Liều (mg/kg)	Tỷ trọng tương đối	pH	Số lượng con chuột có chỉ số vượt ngoài giới hạn							
			Bạch cầu, số tế bào/mcl	Nitrit, mcmol/l	Protein g/l	Glucosa mmol/l	Chất tạo xeton mmol/l	Urobilinogen, mcmol/l	Bilirubin, mcmol/l	Hồng cầu, số tế bào/mcl
Chuột đực										
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
Chuột cái										
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

* Đáng tin cậy về mặt thống kê theo kiểm định t Student

Bảng 22. Các chỉ số nước tiểu của chuột sau khi cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat

Liều (mg/kg)	Tỷ trọng tương đối	pH	Số lượng con chuột có chỉ số vượt ngoài giới hạn					Chất tạo xeton mmol/l	Urobilinogen, mcmol/l	Bilirubin, mcmol/l	Hồng cầu, số tế bào/mcl
			Bạch cầu, số tế bào/mcl	Nitrit, mcmol/l	Protein g/l	Glucosa mmol/l					
Chuột đực											
0	1,019±0,005	6,0±0,0	1	0	2	0	0	0	0	0	4
3,0	1,001±0,005	6,6±0,4 [*]	3	0	2	0	0	0	0	0	5
9,0	1,025±0,001 [*]	5,6±0,5	4	0	5	0	4	4	0	0	5
20,0	1,027±0,014	6,0±0,6	4	0	3	0	2	2	0	0	5
Chuột cái											
0	1,020±0,007	6,2±1,3	1	0	3	0	0	0	0	0	1
3,0	1,011±0,005	7,2±0,4	2	0	1	0	0	0	0	0	3
9,0	1,019±0,008	6,1±1,0	2	0	1	0	2	0	0	0	2
20,0	1,008±0,002 [*]	7,0±0,0	1	0	0	0	0	0	0	0	4

* Đáng tin cậy về mặt thống kê theo kiểm định t Student

1.5. Các phát hiện của việc nghiên cứu hình thái bệnh học

Thực hiện việc mổ xác sau khi kết thúc thời kỳ dùng fullerene tris(axit aminocaproic) hydrat trong bắp, nghiên cứu và xét nghiệm bên ngoài không thấy có khác biệt giữa các con chuột nhóm thử nghiệm và các con chuột nhóm đối chứng: lông mềm và bóng; da đàn hồi và cơ động; mô dưới da bình thường; màng nhầy hữu hình tái nhợt, tinh khiết, không có vết loét và lượng gia lạ; và không có chất thải bất thường từ các lỗ của cơ thể. Khi mở khoang ngực và ổ bụng, thấy vị trí của các cơ quan bên trong chính xác về mặt giải phẫu. Không thấy có các dấu hiệu bệnh lý học khác biệt về mặt vĩ mô của nội tạng. Khi cơ xương của nhóm xương đùi sau (vị trí tiêm) của các con chuột dùng fullerene tris(axit aminocaproic) hydrat với liều thử nghiệm bất kỳ được giải phẫu, thấy mô cơ, mạc, và các lớp chất béo có màu hơi nâu. Ở các con chuột nhóm đối chứng, các mô nêu trên không có màu này.

Khi phân tích hệ số trọng lượng của nội tạng của các con chuột sau thời kỳ dùng fullerene tris(axit aminocaproic) hydrat trong bắp, không có khác biệt giữa các con chuột nhóm thử nghiệm và các con chuột nhóm đối chứng (Bảng 23).

Bảng 23. Hệ số trọng lượng của nội tạng của các con chuột sau thời kỳ dùng fullerene tris(axit aminocaproic) hydrat trong bắp

Liều, mg/kg	Hệ số trọng lượng của nội tạng, g/kg thể trọng						
	Tim	Phổi	Gan	Lách	Thận	Tuyến ức	Tinh hoàn
Chuột đực							
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
Chuột cái							
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	-

Xét nghiệm bằng kính hiển vi để đánh giá so sánh hình ảnh mô bệnh học của các cơ quan và các mô của các con chuột dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat ở mức liều tối đa và các con chuột nhóm đối chứng. Trong xét nghiệm này, các thay đổi bệnh học khác nhau được phát hiện chủ yếu ở phổi, gan và thận (Bảng 24). Có sự biến đổi nhẹ về mức độ thay đổi phát hiện được trong các nhóm, nhưng nói chung là yếu hoặc vừa phải. Không có phản ứng tăng sinh hoặc phản ứng khác bất kỳ ở các vùng có các thay đổi phát hiện được trong các cơ quan này, và một số lượng lớn các trường hợp đa huyết cấp trong các mạch máu của các cơ quan này rất có khả năng là do các phản ứng riêng lẻ của các con chuột đối với việc gây mê nói chung và việc hít cacbon dioxit trong quá trình làm chết êm ái. Dựa vào tần xuất xuất hiện các thương tổn thấy được đại khái như nhau ở nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng, có thể kết luận rằng không có sự cảm ứng do hợp chất thử nghiệm đối với các con chuột. Do đó, các thay đổi này được xem như là nền phụ.

Ở vị trí tiêm fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat (cơ xương), thấy có các thay đổi viêm (các điểm xuất huyết nhỏ, các điểm sợi cơ bị bóp nghẹt và sưng phồng, sự thâm nhiễm của các tế bào bạch huyết vào khoảng trống giữa các sợi cơ riêng biệt và các bó sợi) và cả các thay đổi phục hồi (các vùng mô liên kết dày đặc hoặc lỏng với các mạch mới được tạo thành). Các thay đổi này cũng xảy ra với các con chuột nhóm đối

chúng. Hình ảnh nêu trên là đặc trưng của các tổn thương kép do sự tiêm nhiều lần trong bắp trong thử nghiệm này bất kể hợp chất nào được dùng.

Bảng 24. Kết quả của việc xét nghiệm bằng kính hiển vi đối với các thay đổi hình thái trong các cơ quan và các mô của chuột sau 30 ngày tiêm fullerene tris(axit aminocaproic) hydrat vào trong bắp

Hợp chất		Dung môi		Fulleren tris(axit aminocaproic)			
Liều (mg/kg)		0		20			
Giới tính		Chuột đực		Chuột cái		Chuột đực	
Số con chuột trong nhóm		5		5		5	
Số con sống sót		5		5		5	
Cơ quan/mô		Thay đổi hình thái		Các con chuột có thay đổi			
Phổi	Độ dày đặc của các vách liên phế nang (tổng cộng)	Ind. No	Số con	Ind. No	Số con	Ind. No	Số con
		11,12	2	2,5	2	-	-
		14,15	2	4	1	72,74	2
		11	1	-	-	72	1
		11,12,13,14,15	5	2,4,5	3	74	1
Tình trạng đa huyết của các mạch máu		12,13,14,15	4	1	-	72,73,74,75	4
						62,64,65	3

	Tình trạng đa huyết của các mao mạch phế nang	12,13,14,15	4	-	-	-	74,75	2	61	1
	Sự thâm nhiễm tế bào bạch huyết quanh mạch	11,13	2	2	2	1	71	1	63,64,65	3
Gan	Tình trạng đa huyết của các mao mạch phế nang	11,12,13,14,15	5	2,3,4,5	4	4	71,72,73,74,75	5	61,63,64,65	4
	Tình trạng đa huyết của các tĩnh mạch	11,12,13,14,15	5	2,3,4,5	4	4	71,72,73,74,75	5	61,63,64,65	4
	Sự thâm nhiễm bạch huyết vào các đường cửa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ổ thâm nhiễm bạch huyết liên kênh nhỏ	12	1	1,2	2	2	-	-	61	1
Thận	Tình trạng đa huyết của các tĩnh mạch	11,12,13	3	3,5	2	2	71,72,73	3	65	1

Thực hiện mổ xác sau thời kỳ cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat, nghiên cứu và xét nghiệm bên ngoài không thấy có khác biệt giữa các con chuột nhóm thử nghiệm và các con chuột nhóm đối chứng. Không thấy có mô màu nâu ở các vị trí tiêm fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat trước đây. Khi phân tích thống kê các hệ số trọng lượng của các cơ quan, không thấy có khác biệt đáng kể giữa các con chuột nhóm thử nghiệm và các con chuột nhóm đối chứng (Bảng 25).

Bảng 25. Hệ số trọng lượng của các cơ quan của chuột sau thời kỳ cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat

Liều mg/kg	Hệ số trọng lượng của các cơ quan, g/kg thể trọng						
	Tim	Phổi	Gan	Lách	Thận	Tuyến ức	Tinh hoàn
Chuột đực							
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
Chuột cái							
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	-

Xét nghiệm bằng kính hiển vi các mẫu mô của các cơ quan thấy có các thay đổi về đặc tính và độ nặng hầu như được mô tả sau thời kỳ dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat và là bản chất, với mức độ gần như nhau đối với các con chuột nhóm thử nghiệm và các con chuột nhóm đối chứng (Bảng 26). Vì lý do này, trường hợp này cũng được kết luận rằng các thay đổi xác định được không được gây cảm ứng bởi hợp chất thử nghiệm.

Ở vị trí tiêm hợp chất thử nghiệm và hợp chất đối chứng (cơ xương), thấy có các thay đổi tương tự ở cả các con chuột nhóm thử nghiệm và các con chuột nhóm đối chứng: một số ít vùng thon dài mỏng của mô liên kết sợi đặc được tạo thành một cách đầy đủ nằm dọc theo các sợi cơ, hoặc ở góc nhọn đối với chúng. Hình ảnh hình thái học cho thấy không có khác biệt về tốc độ và bản chất của quy trình làm lành vết thương ở các vị trí tiêm dung môi và fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat.

Do đó, kết quả của nghiên cứu sau khi chết là không thấy có các dấu hiệu hình thái học đi kèm với việc dùng hoặc cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat.

Bảng 26. Kết quả của việc xét nghiệm bằng kính hiển vi các thay đổi hình thái ở các cơ quan và mô của chuột sau thời kỳ cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat

Hợp chất	Dung môi	Fulleren tris(axit aminocaproic)					
Liều (mg/kg)	0	20					
Giới tính		Chuột đực	Chuột cái	Chuột đực	Chuột cái		
Số con chuột trong nhóm		5	5	5	5		
Số con sống sót		5	5	5	5		
Cơ quan/mô	Các thay đổi hình thái	Các con chuột có thay đổi					
		Ind. No	Số con	Ind. No	Số con	Ind. No	Số con
Phổi	Độ dày đặc của các vách liên phế nang (tổng cộng)	17,18,20	3	-	-	79	1
	Độ dày đặc của các vách liên phế nang (số vị trí)	19	1	9	1	76,77,78, 80	4
	Tình trạng đa huyết của các mạch máu	16,18,19	3	6,7,8, 9,10	5	76,77,78	3
	Tình trạng đa huyết của các mao mạch phế nang	18,19	2	7,8,9	3	-	-
	Sự thu hẹp của các ống phế quản	17,18,19, 20	4	-	-	78,79,80	3
						66,67, 68,69, 70	5
						66,70	2
						-	-

	Các vùng giãn nở tràn khí của phệ nang	17,20	2	-	-	-	-	-	-	-
	Sự thâm nhiễm tế bào bạch huyết quanh mạch	-	-	8	1	-	-	69	1	-
Gan	Tình trạng đa huyết của các mao mạch hình sin	16,17,18, 19,20	5	6,7,8, 9,10	5	76,77,78, 79,80	5	66,67, 68,69, 70	5	
	Tình trạng đa huyết của các tĩnh mạch	16,17,18, 19,20	5	6,7,8, 9,10	5	76,77,78, 79,80	5	66,67, 68,69, 70	5	
Thận	Ổ thâm nhiễm bạch huyết liên kênh nhỏ	16,17,18, 19	4	7,9,10	3	76,77,79, 80	4	70	1	

Kết luận: Qua thời kỳ dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat cho chuột và thời kỳ cai dùng hợp chất này, không có dấu hiệu thay đổi bất kỳ về tình trạng lâm sàng của các con chuột. Việc dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat không ảnh hưởng đến hành vi, tình trạng của lông bao phủ, các màng nhầy hữu hình, và mức tăng thể trọng ở các con chuột thử nghiệm.

Việc cho chuột dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat kéo dài (1 tháng) không ảnh hưởng đến các chỉ số xét nghiệm máu ngoại vi. Tương tự, việc cai dùng hợp chất thử nghiệm cũng không làm thay đổi các chỉ số xét nghiệm máu.

Sau khi kết thúc việc dùng fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat thấy có sự giảm đáng tin cậy của trị số ure trong khoảng sinh lý ở mức liều thử nghiệm tối đa (20 mg/kg) ở các con chuột đực, trong khi đó ở các con chuột cái, thấy có sự tăng không đáng kể nhưng đáng tin cậy về nồng độ alanin amino transferaza. Sau khi kết thúc thời kỳ dùng hợp chất thử nghiệm ở chuột đực và chuột cái thấy có sự giảm nồng độ creatinin ở mức liều thử nghiệm tối đa.

Phân tích kết quả xét nghiệm nước tiểu của chuột sau thời kỳ cai fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat thấy có sự giảm tỷ trọng tương đối của nước tiểu ở nhóm chuột cái ở mức liều 20mg/kg so với các con chuột nhóm đối chứng.

Kết quả của các nghiên cứu sau khi chết là không thấy có dấu hiệu về tác hại của fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat đối với cơ thể chuột sau một tháng dùng trong bắp với liều 20mg/kg thể trọng.

Do đó, các thử nghiệm này thể hiện là không có các dấu hiệu đáng kể về tác hại của fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat đối với cơ thể

chuột cả sau 30 ngày dùng trong với liều tối đa 20mg/kg thể trọng hoặc sau khi kết thúc thời kỳ cai.

Ví dụ 10. Thử nghiệm độc tính cấp của fullerene tris(axit aminocaproic) hydrat trên các con vật trong phòng thí nghiệm sau khi tiêm liều đơn trong bắp.

Thử nghiệm này được thực hiện ở Trung tâm nghiên cứu độc chất học và điều chỉnh vệ sinh đối với các chất sinh học (FGUN NITs TBP FMBA của Nga), thành phố Serpukhov.

Nhiệm vụ của thử nghiệm này là xác định liều có thể dung nạp được và liều độc hại và nghiên cứu tác hại có thể có của hợp chất trên các con vật ở phòng thí nghiệm sau khi dùng trong bắp.

Các thử nghiệm được thực hiện trên chuột và chuột bạch Wistar không huyết thống, được mua từ vườn ươm của GU NTsBMT, Học viện y khoa Nga. Việc duy trì các con chuột được vệ sinh được chấp thuận bởi Bộ sức khỏe cộng đồng của Liên bang Xô Viết, 06/07/1973, trên cơ sở tổ chức, thiết bị, và duy trì các điều kiện lâm sàng sinh học và thử nghiệm (điều kiện vườn thú). Các con chuột được cho ăn tùy ý hỗn hợp cỏ khô PK-120-1 được đun, được chế biến theo GOST 50258-92. Các con chuột này được kiểm dịch và làm thích nghi trong vườn thú trong ít nhất 10 ngày.

Các con chuột thử nghiệm được chia nhóm ngẫu nhiên với thể trọng là dấu hiệu chỉ thị chính.

Chuẩn bị trước dung dịch chứa hợp chất thử nghiệm trong dung dịch nước DMSO 20% để tiêm vào các con chuột trong điều kiện vô trùng. Các dung dịch này được rót vào các chai được dán nhãn thích hợp và bảo quản cho đến khi sử dụng ở nhiệt độ 2 đến 6°C trong khoảng thời gian không quá 2 giờ.

Hợp chất được tiêm vào trong bắp cho chuột nhắt và chuột với liều 5, 50, và 500mg/kg. Liều thử nghiệm tối đa được giới hạn bởi thể tích cho phép tối đa để tiêm trong bắp cho chuột nhắt và chuột. Các con vật thuộc nhóm đối chứng được tiêm dung dịch nước 20% với lượng giống như liều hợp chất tối đa.

Liều lượng dùng được hiệu chỉnh tính đến thể trọng của từng cá thể.

Trong thời kỳ quan sát (trong 14 ngày sau khi dùng), tình trạng chung của con vật được đánh giá là sự nhanh nhẹn của cơ thể của nó, sự tiêu thụ thức ăn và nước, tình trạng của lông và màng nhầy hữu hình, và thể trọng.

Sau khi kết thúc thời kỳ quan sát, các con chuột nhắt và chuột được nhận hợp chất với liều 500mg/kg và hợp chất đối chứng (dung môi) được mổ xác. Các con vật được làm chết êm ái bằng cách cho hít cacbon dioxit. Xét nghiệm sau khi chết được thực hiện trong vòng một giờ sau khi làm chết êm ái. Tình trạng hình thái của nội tạng được xác định bằng mắt khi mổ xác.

Việc xử lý thống kê kết quả được thực hiện bằng các phương pháp thống kê khác nhau sử dụng kiểm định Student.

Kết quả của thử nghiệm: Với tất cả các liều thử nghiệm, không thấy có triệu chứng nhiễm độc lâm sàng ở các con vật. Không xảy ra tử vong trong suốt thời kỳ quan sát; không có khác biệt về tình trạng chung của các con vật giữa nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng. Các con vật dễ dàng ăn thức ăn và tăng trọng như nhau; không thấy có khác biệt đáng tin cậy về mặt thống kê giữa thể trọng trung bình của nhóm thử nghiệm và thể trọng trung bình của nhóm đối chứng (Bảng 27, 28).

Bảng 27. Thể trọng của chuột nhắt

Liều hợp chất, mg/kg	Thể trọng con vật, g (M±SD)		
	ngày 0	ngày 7	ngày 14
chuột đực			
0 (dung môi)	22,7±1,4	24,3±1	25,9±1,
5	23,0±2,9	24,1±2	25,4±2,
50	22,4±2,1	23,7±2	25,4±2,
500	22,6±2,2	24,2±1	26,2±1,
chuột cái			
0 (dung môi)	19,1±1,	20,8±1	23,3±1,
5	19,1±2,	20,6±2	22,8±2,
50	18,6±1,	19,9±	21,9±1,
500	18,9±1,	20,7±0	22,8±1,

LD₅₀ của hợp chất để tiêm trong bắp cho chuột nhắt và chuột với cả hai giới tính đều vượt quá liều thử nghiệm tối đa (500mg/kg).

Bảng 28. Thể trọng của các con chuột

Liều hợp chất, mg/kg	Thể trọng con vật, g (M±SD)		
	ngày 0	ngày 7	ngày 14
Chuột đực			
0 (dung môi)	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
Chuột cái			
0	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

Việc mổ xác được thực hiện đối với các con chuột nhắt và chuột 14 ngày sau khi tiêm liều đơn hợp chất vào trong bắp. Vì không thấy có tử vong ở nhóm con vật bất kỳ trong thời kỳ quan sát bất kể liều được dùng nên chỉ các con chuột nhắt và chuột dùng hợp chất với liều tối đa (500mg/kg) được đem mổ xác, cũng như các con vật ở nhóm đối chứng. Các con vật được làm chết êm ái bằng cách cho hít cacbon dioxit.

Trong quá trình xét nghiệm bên ngoài các con chuột nhắt và chuột trong nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng, hình ảnh chung được lưu ý: lông mềm và bóng; da đàn hồi và cơ động; mô dưới da bình thường; màng nhầy hữu hình tái nhợt, không có vết loét và lượng gia lỵ; và không có chất thải bất thường từ các lỗ của cơ thể.

Tương tự, khi mổ xác không thấy có khác biệt giữa các con chuột nhắt và chuột trong các nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng. Các cơ quan của khoang ngực và ổ bụng có vị trí chính xác về mặt giải phẫu và có cấu trúc vĩ mô bình thường; không thấy có các thay đổi bệnh lý học. Ở vị trí tiêm hợp chất (đùi), không thấy có dấu hiệu thương tổn.

Do đó, xét nghiệm sau khi chết đã không phát hiện được các dấu hiệu về tác hại của hợp chất sau khi tiêm liều đơn hợp chất vào trong bắp của các con chuột nhắt và chuột với liều tối đa 500mg/kg.

Kết luận. Tất cả các liều hợp chất được thử nghiệm đều được phát hiện là không gây nhiễm độc và tử vong cho các con vật thử nghiệm. Trị số LD₅₀ của fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat đối với các con chuột nhắt và chuột vượt quá liều thử nghiệm tối đa (500mg/kg) và do đó vượt

quá liều điều trị cho người tối đa trước đây (2,9mg/kg) khoảng trên 170 lần.

Không thấy có khác biệt về loài và giới tính về độ nhạy với hợp chất với liều tối đa gấp 170 lần liều điều trị. Hợp chất theo sáng chế không làm kích thích cục bộ sau khi tiêm liều đơn trong bắp.

Do đó, fulleren tris(axit aminocaproic) hydrat có chỉ số điều trị bệnh cao và không gây độc hại khi tình cờ dùng quá liều.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất N-fulleren axit amin hydrat có công thức chung $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOOH\}_3 \times H_2O$, trong đó C_{60} là fulleren; $n = 5, 6$, hoặc 7 ; và $x = 8$ đến 10 .
2. Phương pháp điều chế hợp chất theo điểm 1, khác biệt ở chỗ fulleren được cho phản ứng với lượng dư mol gấp 15 lần của muối kali khan của axit amin có công thức chung $NH_2(CH_2)_nCOOH$, trong đó $n = 5, 6$, hoặc 7 , trong môi trường dung môi thơm, bổ sung từ từ chất xúc tác chuyển pha vào huyền phù thu được trong điều kiện khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ không cao hơn $60^\circ C$ đến $80^\circ C$ cho đến khi dung dịch mất màu hoàn toàn và cặn rắn được tạo ra, trong đó cặn này là các muối kali của các dẫn xuất fulleren axit amin thu được, sau đó tách cặn này và hòa tan trong nước để thu được dung dịch nước $0,8M$, xử lý dung dịch này bằng dung dịch axit vô cơ hoặc hữu cơ $0,1N$, sau đó ly tâm, rửa và làm khô cặn thu được.
3. Phương pháp theo điểm 2, khác biệt ở chỗ muối kali khan của axit amin được sử dụng ở trạng thái phân tán mịn và việc tách cặn rắn chứa muối kali của dẫn xuất fulleren axit amin được thực hiện bằng cách lọc, rửa bằng etanol, và làm khô.
4. Phương pháp theo điểm 2 hoặc 3, khác biệt ở chỗ chất xúc tác chuyển pha là metyl polyetylen glycol ete có trọng lượng phân tử là 400 hoặc 500 .
5. Dược phẩm chứa hoạt chất là hợp chất theo điểm 1 với lượng hữu hiệu có hoạt tính kháng virus herpes, nhiều chủng virus cúm, và HIV và có hoạt tính chống khối u và chống bệnh vẩy nến.