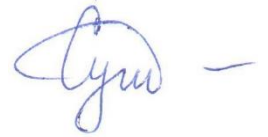


На правах рукописи



Сушко Екатерина Сергеевна

**ТОКСИЧЕСКИЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ФУЛЛЕРЕНОЛОВ.
ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВЫХ СИСТЕМ**

1.5.2. Биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2024

Работа выполнена в Институте биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск

Научный руководитель: **Кудряшева Надежда Степановна**, доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Празднова Евгения Валерьевна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной генетики микробных консорциумов Академии биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»

Камнев Александр Анатольевич, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 года в __ часов __ минут на заседании Диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на сайте:

https://biochemphysics.ru/assets/uploads/Dissertaciya_Sushko.pdf

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Д 002.039.01, кандидат химических наук



Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Разработка, производство и применение фуллеренов и их водорастворимых производных намного опережают изучение их свойств, важных для современной медицины и фармакологии. Водорастворимые полигидроксилированные фуллерены (фуллеренолы) характеризующиеся высокой биосовместимостью и биологической активностью, могут использоваться в производстве фармакологических и медицинских препаратов – антиоксидантов, радиопротекторов, противоопухолевых, противовирусных, противогрибковых и бактерицидных агентов, препаратов для адресной доставки лекарств в организме. Специфические пути и механизмы, определяющие токсические или активационные (в частности, антиоксидантные) эффекты фуллеренолов в организмах изучаются на различных живых объектах в несопоставимых условиях, исключающих их сравнительный анализ. Поэтому возникает острая необходимость оценки свойств фуллеренолов в сопоставимых условиях. Необходимым является выявление связи между структурными характеристиками водорастворимых производных фуллеренов (размером молекул, характером модификации поверхности, природой металла-заместителя, типом его включения) с характеристиками их биологической активности (токсичности и антиоксидантной активности). Это направление является перспективной областью использования биолюминесцентных биотестов, основанных на морских бактериях. В этих биотестах тестируемым параметром физиологической активности является интенсивность биолюминесценции, которая легко регистрируется с помощью простых физических приборов.

Известно, что токсичность определяется как угнетение физиологических функций организма. При биолюминесцентном тестировании токсичность фуллеренолов оценивается по подавлению интенсивности свечения, а их антиоксидантную активность удобно оценивать по смягчению ими токсических эффектов модельных окислителей. Простота биолюминесцентных биотестов и высокая скорость процедуры тестирования позволяют анализировать одновременно большое число образцов в сопоставимых условиях, что обеспечивает достоверную статистическую обработку результатов. Возможность применения биолюминесцентных систем разной сложности (люминесцентных бактерий и выделенных из них ферментов) позволяет оценивать вклад биохимических процессов в откликах клеток на внешнее воздействие. Выявлять роль активных форм кислорода в токсических и антиоксидантных эффектах фуллеренолов позволяет хемилюминесцентный люминольный метод.

Степень разработанности темы исследования. В данной работе мы впервые использовали люминесцентные системы (клеточные и ферментативные) для выявления и сравнения биологической активности ряда водорастворимых фуллеренов (фуллеренолов). Работа (1) развивает приложения биолюминесцентных систем в токсикологических исследованиях, (2) оценивает структурно-обусловленные свойства фуллеренолов – токсичность и антиоксидантную активность.

Биотест, основанный на люминесцентных морских бактериях, является классическим; он уже более 60 лет используется для мониторинга токсичности различных сред (S. Girotti и соавторы; A. Roda и соавторы). В Красноярске с 70-х годов работает большая группа ученых, использующая биолюминесценцию морских организмов; исследуются механизмы биолюминесцентных процессов, ведется разработка биолюминесцентных технологий для медицины и экологии. Предложены и развиваются биотесты, основанные на

люминесцентных ферментативных системах морских бактерий (В. А. Кратасюк и соавторы; Е. Н. Есимбекова и соавторы). На основе широкого набора экспериментальных данных разработана классификация экзогенных соединений, выявляющая связь их структурных и физико-химических характеристик (окислительно-восстановительных, гидрофильно-гидрофобных) и параметрами их воздействия на ферментативную систему (Н. С. Кудряшева и соавторы). Биологическая активность фуллеренолов активно исследуется в России в таких организациях, как Научно-исследовательский институт гриппа (М. Ю. Еропкин и соавторы), Научный центр медицинской генетики, Институт проблем химической физики РАН, Инновационный центр Сколково (В. Сергеева и соавторы), Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (Т. Ф. Субботина и соавторы), Южно-Уральский государственный медицинский университет (Н. В. Тишевская и соавторы), Московский государственный университет (О. И. Яблонская и соавторы). Из зарубежных центров можно назвать Европейский институт мембран, Франция (S. Foley и соавторы); Лодзинский университет, Польша (J. Grebowski и соавторы); Военно-медицинскую академию (V. Dragojevic-Simic и соавторы), Университет Нови-Сада (D. Petrovic и соавторы), Сербия; Китайскую академию наук (X. Cai и соавторы), Китай; Институт терапии, Украина (Г. Андриевский и соавторы) и др.

Цель работы – оценка и сравнение токсических и антиоксидантных эффектов фуллеренолов, различающихся количеством кислородосодержащих заместителей, размером углеродного каркаса, включением атома металла – с использованием биолюминесцентных морских бактерий *Photobacterium phosphoreum*.

Задачи исследования:

1. Определить и сравнить токсические характеристики рядов фуллеренолов с использованием биолюминесцентных морских бактерий *P. phosphoreum*. Связать токсичность фуллеренолов с их структурой (количеством кислородосодержащих групп, размером углеродного каркаса, включением атома металла).

2. Охарактеризовать и сравнить антиоксидантные свойства фуллеренолов в условиях модельного окислительного стресса (в растворах органического и неорганического окислителей) с помощью биолюминесцентных морских бактерий и выделенных из них ферментов.

3. Выявить роль биолюминесцентной ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза и активных форм кислорода (АФК) в токсических и антиоксидантных эффектах фуллеренолов.

4. Определить роль НАДН-зависимых ферментативных и неферментативных реакций в ингибировании и активации биолюминесценции фуллеренолами.

Научная новизна. Исследование направлено на выявление эффективности и механизмов воздействия ряда фуллеренолов на клеточную систему (морские люминесцентные бактерии) на основе связей между структурными характеристиками фуллеренолов и параметрами их биологической активности – токсичностью и антиоксидантной активностью. Изучено влияние фуллеренолов как на интегральную физиологическую функцию бактерий – интенсивность биолюминесценции, так и на скорость ферментативных процессов и содержание активных форм кислорода в бактериальной суспензии. Для изучения биологической активности фуллеренолов впервые были применены биолюминесцентные тестовые системы различной сложности (морские бактерии *P. phosphoreum* и ферментативная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза). Использование этих двух типов систем позволяет выявить и сравнить клеточные и

биохимические процессы, ответственные за антиоксидантные и токсические эффекты фуллеренолов разного строения.

Теоретическая и практическая значимость работы:

1. Разработанные биолюминесцентные методы и подходы могут использоваться в экологии, фармакологии и медицине для определения и сравнения антиоксидантной активности и токсических свойств биологически активных веществ. Разработанная методология включает комплекс методов: биолюминесцентные – с использованием бактерий и их ферментативных систем, хемилюминесцентный – для мониторинга содержания активных форм кислорода, спектрофотометрический – для контроля условий эксперимента и определения участия НАДН-зависимых окислительно-восстановительных процессов.

2. Полученные результаты формируют базу данных для подбора фуллеренолов с заданными токсическими и антиоксидантными характеристиками, что поможет биологам и медикам снизить количество экспериментов на животных.

3. Фундаментальные результаты исследований могут быть использованы в образовательном процессе студентов-медиков, фармакологов, биологов.

Методология и методы исследования. Работа производилась с клетками люминесцентных бактерий и их ферментами, что обеспечивало выявление и сравнение эффектов фуллеренолов на клеточном и биохимическом уровнях. С помощью биолюминесцентного метода определяли изменение интенсивности биолюминесценции в бактериальной и ферментативной системах при варьировании концентраций фуллеренолов. Токсичность фуллеренолов оценивали по подавлению интенсивности свечения, а антиоксидантную активность – по смягчению токсических эффектов модельных окислителей. С помощью спектрофотометрического метода оценивали влияние наночастиц на активность НАДН-зависимых ферментативных и неферментативных процессов. С помощью хемилюминесцентного люминольного метода определяли содержание АФК в условиях биолюминесцентных экспериментов, выявляли корреляции с характеристиками токсичности и антиоксидантной активности наночастиц, делали вывод о роли АФК в этих процессах.

Положения, выносимые на защиту:

1. В ряду фуллеренолов с одинаковым углеродным каркасом, но разным количеством кислородосодержащих групп, наименьшей токсичностью и наибольшей антиоксидантной активностью характеризуются фуллеренолы, в структуре которых количество кислородосодержащих групп примерно в 2 раза меньше количества атомов углерода в каркасе фуллеренола («гипотеза $\frac{1}{2}$ »), что связано с оптимальным соотношением полярных и неполярных фрагментов.

2. Токсичность и антиоксидантная активность фуллеренолов определяются уменьшением содержания АФК в бактериальных суспензиях и в растворах ферментов.

3. Антиоксидантный эффект фуллеренолов связан с амфифильными характеристиками среды; он максимален в растворах органического окислителя – 1,4-бензохинона.

4. Фуллеренолы влияют на скорости НАДН-зависимых процессов (ферментативных и неферментативных), что приводит к изменению выхода биолюминесценции.

Достоверность и обоснованность результатов подтверждается использованием стандартных методик, калибровкой измерительной аппаратуры, воспроизводимостью результатов, согласием полученных экспериментальных результатов с данными других авторов. При проверке достоверности результатов экспериментов и обоснованности выводов

по этим результатам, различия между показателями независимых выборок оценивали в соответствии с критерием Стьюдента (t). Значения считали достоверными при уровне значимости более 95% ($p < 0,05$).

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на международных и российских конференциях: VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, 2019); XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной Международному году Периодической таблицы химических элементов Д.И. Менделеева «Перспектив Свободный – 2019» (Красноярск, Россия, 2019); VI и VII Съездах биофизиков России (Сочи, Россия, 2019; Краснодар, Россия, 2023); VII Международной конференции по радиации в различных областях исследований (Конференция RAD 2019) (Тиват, Черногория, 2019); 30-ом и 31-ом ежегодных собраниях европейского отделения Международного общества экологической токсикологии и химии окружающей среды (SETAC Europe) (онлайн, 2020, 2021); 10-ой встрече молодых ученых-экологов SETAC Europe (онлайн, 2021); XXVIII и XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (онлайн, 2021, 2022); Международной сателлитной конференции «Экологический мониторинг: методы и подходы» (Красноярск, Россия, 2021); III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи-Дагомыс, Россия, 2021); Международной научно-практической конференции «Горная медицина и экстремальная экология человека» (санаторий «Иссык-Куль Аврора», Кыргызская Республика, 2022); XXVI Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых (ВНКСФ-26) (онлайн, 2022); Молодежной международной научной конференции «Современные тенденции развития функциональных материалов» (Адлер, Россия, 2022); Международной конференции молодых ученых ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXVI) (Красноярск, Россия, 2023); X Съезде Российского фотобиологического общества и Всероссийской конференции «Современные проблемы фотобиологии» (п. Шепси, Краснодарский край, Россия, 2023).

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (далее – РФФИ), Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки № 20-44-243001 р_мол_а_Красноярск. «Анализ биологической активности фуллеренолов с использованием клеточных и ферментативных люминесцентных тестовых систем» (2021–2022, Руководитель); Отраслевой программы Роспотребнадзора (фундаментальные исследования) «Научные основы гормезиса биологических, физических и химических факторов среды обитания с обоснованием системы оценки рисков» (2021–2023, Исполнитель); РФФИ № 18-29-19003 мк. «Структурно-функциональные характеристики эндодральных фуллеренолов с Gd как основа их химической и биологической активности» (2018–2020, Исполнитель); Бюджетного проекта № 0356-2018-0001 «Программа фундаментальных исследований РАН № 32» Наноструктуры: физика, химия, биология. Основы технологии» (тема: «Токсические и антиоксидантные свойства углеродных наноструктур-фуллеренов») (2018–2020, Исполнитель); РФФИ № 15-03-06786 А. «Теоретическое и экспериментальное исследование механизма взаимодействия водорастворимых фуллеренолов с активными формами кислорода в растворах модельных окислителей». (2015–2017, Исполнитель); РФФИ № 15-43-04377 р_сибирь_а. «Биолюминесцентные системы как инструмент оценки антиоксидантной активности физиологически-активных веществ» (2015–2016, Исполнитель).

Работа удостоена государственных премий Красноярского края в сфере профессионального образования за высокие результаты в научных разработках, направленные на социально-экономическое развитие края, достигнутые в 2020 и 2021 годах; стипендий Правительства Российской Федерации (2020/2021 учебный год) и Президента Российской Федерации (2021/2022 учебный год) аспирантам, обучающимся по направлениям подготовки, соответствующим приоритетным направлениям модернизации и технологического развития российской экономики.

Публикации. По материалам диссертации имеется 8 статей, опубликованных в журналах ВАК, и тезисы 24 докладов.

Личный вклад автора является определяющим в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке экспериментальных данных, их анализе и интерпретации, подготовке и написании научных статей, тезисов конференций. Часть экспериментальных результатов была получена совместно с Кичеевой А. Г. и Степиным Е. А. Вклад соавторов отражен в публикациях. Автор благодарит всех коллег за участие в совместных исследованиях и в обсуждении результатов.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы с изложением результатов работы, заключения, раздела с выводами, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (219 источников). Работа изложена на 131 странице машинописного текста, проиллюстрирована 8 таблицами, 28 рисунками и 2 приложениями.

Обозначения:

| | |
|-----------------------|--|
| EC_{50} | – эффективная концентрация, ингибирующая биолюминесценцию бактериальной тестовой системы на 50% |
| I | – интенсивность биолюминесцентного или хемилюминесцентного сигналов |
| IC_{50} | – концентрация, ингибирующая биолюминесценцию ферментативной системы на 50% |
| K_{GT} | – коэффициент антиоксидантной активности, рассчитанный по изменению общей токсичности раствора модельного окислителя в бактериальной или ферментативной системах |
| K_{OxT} | – коэффициент антиоксидантной активности, рассчитанный по изменению окислительной токсичности раствора модельного окислителя в ферментативной системе |
| <i>P. phosphoreum</i> | <i>Photobacterium phosphoreum</i> |
| РСНО | – альдегид (тетрадеканаль) |
| $T_{0,5}$ | – время достижения половины максимального значения интенсивности биолюминесценции |
| $I_{0,5}$ | – половина максимального значения интенсивности биолюминесценции |
| АФК | – активные формы кислорода |
| КРАБ | – комплект реактивов аналитической биолюминесценции |
| НАД(Ф)Н | – никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный |
| НАДН | – никотинамиддинуклеотид восстановленный |
| ФМН | – флавиномононуклеотид |

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении представлена актуальность проблемы, обоснованы цели и задачи, определена научная и практическая новизна научного исследования.

В главе 1 рассмотрены наиболее распространенные биотесты, строение и принципы функционирования бактериальных биолюминесцентных систем. Описаны возможные механизмы воздействия модельных окислителей на биолюминесценцию. Описаны преимущества и характерные особенности использования: 1) биолюминесцентных биотестов, основанных на люминесцентных бактериях и их ферментах для мониторинга состояния водной среды и оценки биологической активности веществ; 2) хемилюминесцентного люминольного метода для выявления содержания и роли АФК в процессах изменения токсичности водных растворов под действием фуллеренолов.

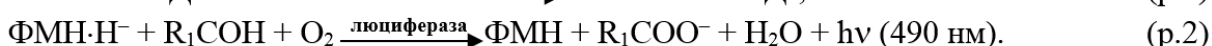
Показаны преимущества использования фуллеренолов в качестве антиоксидантного агента, описаны их химические, биологические свойства. Показано, что механизм биологической активности (токсичности и антиоксидантной активности) фуллеренолов требует дальнейшего внимания и новых подходов. Рассмотрены свойства и основные источники модельных окислителей (феррицианида калия, 1,4-бензохинона). Описаны наиболее известные антиоксиданты и активные формы кислорода, а также их функции в организмах.

Глава 2 диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. В работе использовали три биолюминесцентные тестовые системы:

(1) Интактные бактерии – клеточная суспензия культуры бактерий *P. phosphoreum* 1883 IBSO из коллекции Института биофизики СО РАН;

(2) Биолюминесцентный «Микробиосенсор-677Ф», основанный на лиофильно высушенных люминесцентных бактериях *P. phosphoreum*, производимый в Институте биофизики СО РАН (Красноярск);

(3) Система двух сопряженных ферментативных реакций, катализируемых бактериальной люциферазой и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой:



Для конструирования данной системы использовали комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ), который включает лиофилизированные препараты люциферазы *Photobacterium leiognathi* (0,5 г/л) и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* (0,15 ед. активности), изготовленные в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск).

В качестве модельного неорганического и органического окислителей использовали комплексную соль железа – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Химреактив, Россия) и 1,4-бензохинон (Sigma-Aldrich, США), соответственно.

В качестве биологически активных веществ использовали препараты фуллеренолов различного строения: $\text{C}_{60,70}\text{O}_y(\text{OH})_x$, где $x = 10-12$; $\text{Gd}@C_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$, где $x+y = 20-24$; $\text{C}_{60}\text{O}_y(\text{OH})_x$, $\text{C}_{60,70}\text{O}_y(\text{OH})_x$, где $x+y = 24-28$; $\text{Gd}@C_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$, $\text{Fe}_{0,5}\text{C}_{60}\text{O}_y(\text{OH})_x$ и $\text{C}_{60,70}\text{O}_y(\text{OH})_x$, где $x+y = 40-42$, которые были получены в Институте физики им. Л. В. Киренского СО РАН (Красноярск, Россия). На Рисунке 1 в качестве примера приведена структура простейшего фуллеренола, состоящая из 60 атомов углерода. Препараты фуллеренолов были охарактеризованы методом инфракрасной (оценено присутствие кислородосодержащих

групп) и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (оценено количество кислородосодержащих групп).

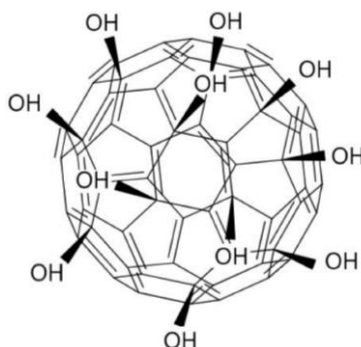


Рисунок 1 – Модель молекулы фуллеренола C_{60}

Регистрировали максимальную интенсивность свечения бактериальной и ферментативной систем, I , растворов. Исследовали контрольные (без модельных окислителей или фуллеренолов, I_0) и опытные (в присутствии модельных окислителей или фуллеренолов, I). Отношение $I^{rel} = I / I_0$ использовали для характеристики воздействия окислителей или фуллеренолов на биолюминесценцию. Снижение интенсивности биолюминесценции (I/I_0) определяет «общую» токсичность раствора. «Общая» токсичность основана на комплексе процессов, включающих окислительно-восстановительные и полярные/неполярные взаимодействия в бактериальной системе. Определяли концентрации модельных окислителей или фуллеренолов, ингибирующие биолюминесценцию бактериальной и ферментативной систем до 50%-го остаточного свечения (EC_{50} и IC_{50} , соответственно). Величины EC_{50} и IC_{50} фуллеренолов использовали для сравнения их ингибирующей способности, а EC_{50} и IC_{50} модельных окислителей – для создания модельного окислительного стресса в бактериальной и ферментативной системах.

«Окислительную» токсичность растворов моделировали с использованием ферментативной системы и характеризовали величиной задержки свечения, $T_{0,5}$, которая соответствует полувысоте S-образной кинетической кривой. Эту величину определяли по методу второй производной. «Окислительная» токсичность зависит от окислительно-восстановительных свойств среды (концентрации окислителя и его редокс-потенциала).

Рисунок 2 схематически демонстрирует особенности биолюминесцентной кинетики бактериальной (А) и ферментативной (Б) систем в растворах модельных окислителей.

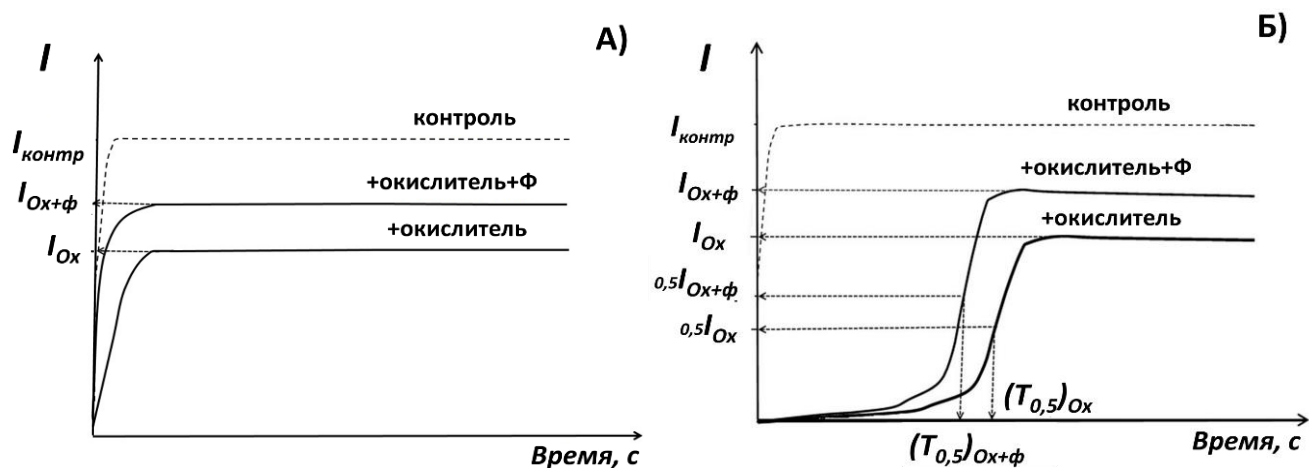


Рисунок 2 – Кинетика биолюминесценции А) бактериальной и Б) ферментативной тестовых систем в растворах модельного окислителя (Ох) в отсутствии и присутствии фуллеренола (Ф)

Изменение общей токсичности растворов модельных окислителей под действием фуллеренолов оценивали с помощью коэффициентов антиоксидантной активности K_{GT} : $K_{GT} = I_{(Ox+\phi)} / I_{Ox}$, где $I_{(Ox+\phi)}$ и I_{Ox} – интенсивность биолюминесценции в растворе модельного окислителя в присутствии и отсутствии фуллеренола, соответственно. Изменение окислительной токсичности растворов модельных окислителей определяли с помощью коэффициентов K_{OxT} ($K_{OxT} = (T_{0,5})_{Ox} / (T_{0,5})_{Ox+\phi}$, где $(T_{0,5})_{Ox+\phi}$ и $(T_{0,5})_{Ox}$ – период задержки свечения в растворе модельного окислителя в присутствии и отсутствии фуллеренола, соответственно). Величины коэффициентов $K_{GT} > 1$ и $K_{OxT} > 1$ соответствуют уменьшению токсичности модельного окислителя (антиоксидантной активности фуллеренола), $K_{GT} = 1$, $K_{OxT} = 1$ – отсутствию эффекта. Погрешность для K_{GT} и K_{OxT} не превышала 10%.

Для определения содержания активных форм кислорода (АФК) в исследуемых растворах использовали калибровочную зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола (I_{max}) от концентрации H_2O_2 . Относительное содержание АФК в исследуемых растворах, $АФК^{rel}$, рассчитывали по формуле: $АФК^{rel} = I / I_0$, где I_0 и I – максимальная интенсивность хемилюминесценции в контрольном и опытном образцах, соответственно. Значения $АФК^{rel}$ были определены в тех же самых образцах бактерий и ферментов, которые использовали для определения интенсивности биолюминесценции.

Биолюминесценцию и хемилюминесценцию регистрировали на планшетных биолюминометрах TriStar Multimode Microplate Reader LB 941 (Berthold technologies, Германия) и Luminoskan Ascent (Thermo Electron Corporation, США).

Для выявления роли АФК в токсических и антиоксидантных эффектах фуллеренолов были выявлены корреляции между концентрационными зависимостями I^{rel} , K_{GT} , K_{OxT} и содержания АФК ($АФК^{rel}$), рассчитаны коэффициенты корреляции r . Анализ основывался на статистической зависимости между ранжированием двух переменных.

Скорости окисления НАДН определяли по изменению оптической плотности раствора, D , на длине волны 340 нм в спектре поглощения НАДН на спектрофотометре UVIKON-943 (KONTRON Instruments, Italy). Погрешность измерения V не превышала 10^{-8} М/мин.

В третьей главе диссертации приведены экспериментальные результаты; глава включает 3 раздела.

Раздел 3.1 посвящен определению и сравнению токсичности фуллеренолов разной структуры, а также выявлению молекулярных механизмов токсичности фуллеренолов, связанных с ферментативными процессами и ролью АФК

3.1.1 Характеристики токсичности фуллеренолов

Под токсичностью фуллеренолов мы понимаем их способность ингибировать физиологическую функцию бактерий – биолюминесценцию. Исследованы зависимости интенсивности биолюминесценции бактерий от концентрации фуллеренолов (Рисунок 3). Из рисунка видно, что все фуллеренолы токсичны при концентрациях более 10^{-3} г/л.

Рассчитаны эффективные концентрации (EC_{50}) фуллеренолов, ингибирующие биолюминесценцию бактерий на 50% (Рисунок 3). Аналогичные данные получены и для ферментативной тестовой системы (IC_{50}). Результаты приведены в Таблице 1.

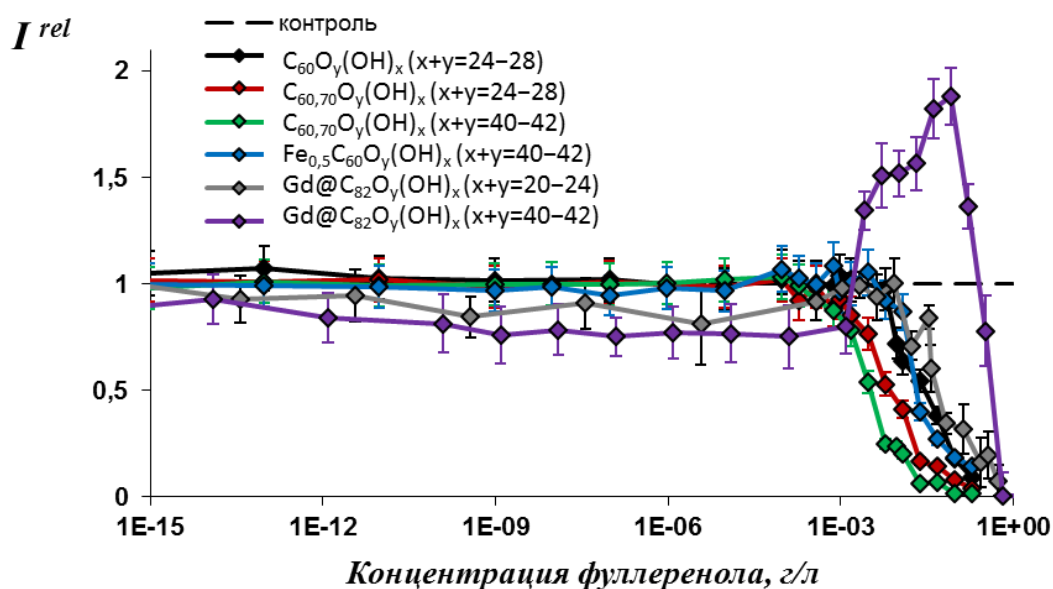


Рисунок 3 – Зависимости относительной интенсивности биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum*, I^{rel} , от концентрации фуллеренолов

Таблица 1 – Концентрации фуллеренолов, ингибирующие биолюминесценцию бактериальной и ферментативной систем на 50% (EC_{50} , IC_{50}). Группы фуллеренолов, отличающиеся только количеством кислородосодержащих заместителей, выделены синим и зелёным цветом

| Фуллеренолы | Концентрации, ингибирующие биолюминесценцию на 50%, г/л | |
|---|---|------------------------|
| | Бактериальная система | Ферментативная система |
| | EC_{50} | IC_{50} |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | 0,003 | 0,007 |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) | 0,008 | 0,021 |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 10-12$) | 0,003 | 0,006 |
| $C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) | 0,031 | 0,092 |
| $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | 0,021 | 0,007 |
| $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | 0,458 | 1,400 |
| $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 20-24$) | 0,053 | 0,027 |

Величины EC_{50} и IC_{50} (Таблица 1) были использованы для сравнения ингибирующей способности растворов фуллеренолов разного строения (с разным количеством кислородосодержащих заместителей, размером углеродного каркаса и присутствием экзогенного или эндогенного атома металла – железа или гадолиния, соответственно). Из Таблицы 1 видно, что фуллеренолы эффективнее ингибируют биолюминесценцию бактериального биотеста, чем ферментативной системы. Это можно объяснить способностью фуллеренолов нарушать структурную организацию липидного бислоя клеточной мембраны, вызывая изменение текучести мембран гидрофобных фрагментов, что может привести к гибели клетки. Исключение – металлосодержащие фуллеренолы $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 20-24$) и $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$). Это исключение можно объяснить большим размером углеродного каркаса фуллеренолов (первый включает 82 атома углерода; второй же состоит из двух каркасов фуллеренола $C_{60}O_y(OH)_x$, соединенных между собой одним атомом железа). Помимо этого: 1) атомы железа фуллеренола $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$, вероятно, специфически влияют на метаболизм бактериальных клеток, в частности, на мембранно-транспортный процесс, в соответствии со свойствами железа как микроэлемента; 2) эндофуллерен

$Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ обладает более высокой реакционной способностью, а также большим сродством к электрону за счет неравномерного распределения электронной плотности фуллеренового каркаса, которое возникает из-за присутствия атома Gd внутри каркаса C_{82} . Кроме того, этот фуллеренол склонен к агрегации, которая может препятствовать его интенсивному взаимодействию с клеточными мембранами или с водорастворимыми ферментами.

Следует также подчеркнуть, что наименьшей токсичностью (наибольшей величиной EC_{50}) обладают два Gd-содержащих фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 20-24$ и $x+y = 40-42$), что, вероятно, связано с большим размером их углеродного каркаса и склонностью к агрегации.

Из Рисунков 3 и 4А также видно, что $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y = 40-42$, в отличие от остальных фуллеренолов, активирует биолюминесценцию бактерий. При этом зависимость I^{rel} бактериальных суспензий от концентрации этого фуллеренола соответствует общепринятой модели «гормезиса» и включает три стадии биологического отклика: (I) умеренное ингибирование – распознавание стресса ($I^{rel} < 1$) при $10^{-14} - 10^{-3}$ г/л, (II) физиологическая активация (адаптивный отклик, перекомпенсация) ($I^{rel} > 1$) при $10^{-3} - 3 \times 10^{-1}$ г/л и (III) ингибирование (угнетение физиологических функций, токсичность) ($I^{rel} < 1$) при $3 \times 10^{-1} - 3$ г/л. Стадия II – благоприятные биологические реакции на низкие воздействия стрессоров (активация бактериальной биолюминесценции почти до 100% по сравнению с контролем). Активация биолюминесценции, вероятно, связана с более высокой электронно-донорной (акцепторной) способностью фуллеренола.

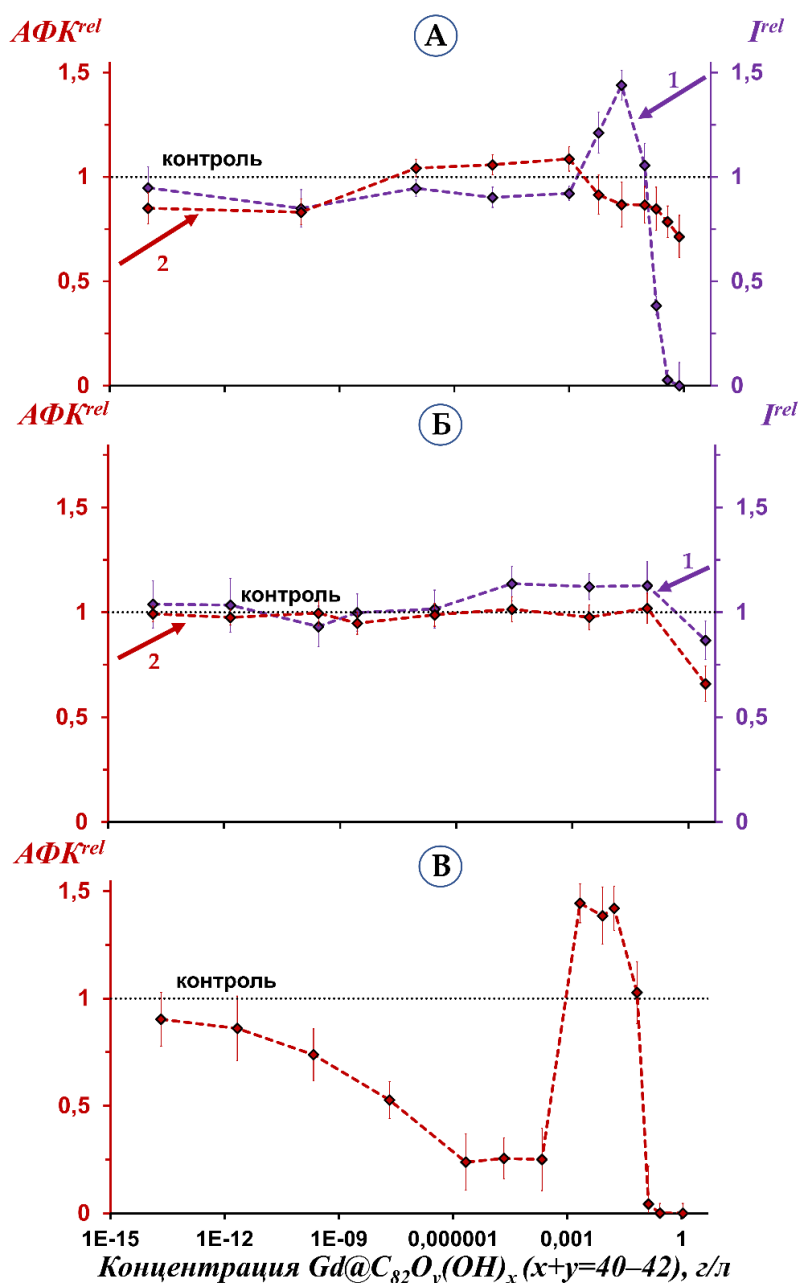


Рисунок 4 – Относительная интенсивность билюминесценции, I^{rel} , (1) и относительное содержание АФК, $AФК^{rel}$, (2) при различных концентрациях $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) в: (А) бактериальной суспензии, (Б) ферментативной системе и (В) небиологической среде. Концентрация АФК в контрольной бактериальной суспензии составляла $\sim 4,5 \times 10^{-6}$ М, в контрольной ферментативной системе – $1,9 \times 10^{-5}$ М, в дистиллированной воде – 3×10^{-7} М. «Контроль» соответствует отсутствию фуллеренола в экспериментальных растворах.

Анализируя две группы фуллеренолов, различающихся только количеством кислородосодержащих групп (Таблица 1), мы отметили, что *меньшей токсичностью (ингибирующей способностью) обладают фуллеренолы, у которых количество кислородосодержащих групп близко половине количества атомов углерода в каркасе фуллеренолов («половинное соотношение»)*. Ниже представлены результаты, подтверждающие это утверждение:

А) Зависимость токсичности фуллеренолов от количества кислородосодержащих групп:

В группах фуллеренолов, отличающихся только количеством кислородосодержащих заместителей (Таблица 1, две группы выделены синим и зеленым цветом) наибольшими величинами EC_{50} и IC_{50} , т.е. наименьшей ингибирующей способностью, обладают фуллеренолы $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) и $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$), для которых указанное соотношение близко $\frac{1}{2}$.

Диаграмма на Рисунке 5 иллюстрирует правило «половинного соотношения» на

примере группы из трех фуллеренолов, выделенной в Таблице 1 синим цветом. Из Рисунка 5 видно, что в группе трех сравниваемых фуллеренолов $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 10-12$; $24-28$; $40-42$) степень ингибирования билюминесцентных систем 2-ым фуллеренолом минимальна (т.е. величины EC_{50} и IC_{50} максимальны). При этом соотношение количества кислородосодержащих групп к количеству атомов углеродного каркаса у этого фуллеренола равно $\frac{1}{2}$.

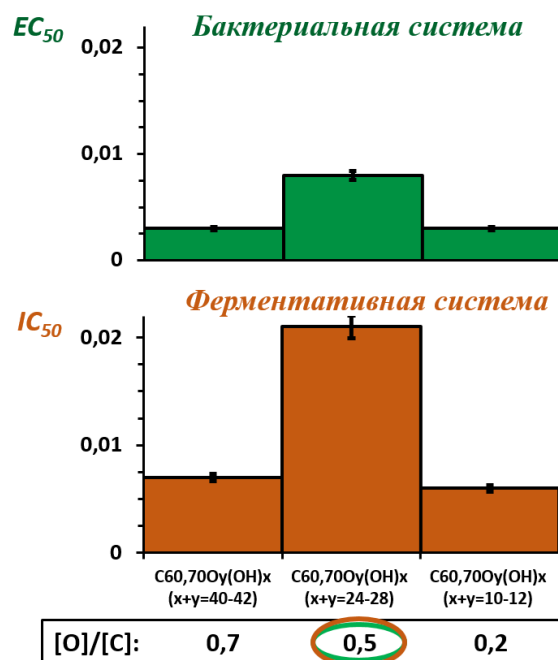


Рисунок 5 – Величины EC_{50} и IC_{50} группы фуллеренолов с различным содержанием кислородосодержащих групп, г/л

Таким образом, ингибирование билюминесценции фуллеренолами не является простой функцией количества кислородосодержащих групп. Возможно, оно зависит и от их растворимости в воде.

Б) Зависимость токсичности фуллеренолов от размера углеродного каркаса:

Величины EC_{50} и IC_{50} фуллеренола $C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) больше, чем у $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$), следовательно, смесь фуллеренолов $C_{60,70}$ для тестовых систем токсичнее и обладает большей ингибирующей активностью, чем фуллеренол с каркасом из 60 атомов углерода. Возможно, что тестовые системы чувствительны к размеру углеродного каркаса фуллеренолов, так как больший по размеру фуллеренол ($C_{60,70}O_y(OH)_x$), связываясь с гидрофобными фрагментами ферментов билюминесцентной системы или клеточных мембран бактерий, инактивирует их активнее, чем фуллеренол с меньшим размером – $C_{60}O_y(OH)_x$.

3.1.2 Роль АФК в токсических эффектах фуллеренолов

АФК являются эндогенными частицами, которые постоянно образуются в клетках и межклеточном пространстве живых организмов как естественный побочный, а иногда и как основной продукт нормального метаболизма кислорода. Известно, что 2–5% вдыхаемого организмами кислорода переходит в АФК. В нормально функционирующих клетках организма существует баланс между производством и нейтрализацией радикальных форм АФК, который осуществляется антиоксидантной системой клеток.

Известно, что фуллеренолы влияют на окислительно-восстановительные процессы в биохимических циклах (проявляют антирадикальные свойства). Для выявления роли АФК в токсических эффектах фуллеренола мы определяли содержание АФК в бактериальных

суспензиях, ферментативной системе и небиологической среде; результаты представлены на Рисунке 4 на примере Gd-содержащего фуллеренола $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x+y = 40-42$).

(а) Бактериальная тестовая система

В диапазоне низких концентраций 10^{-7} – 10^{-1} г/л фуллеренола $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x+y = 40-42$) (Рисунок 4А), выявлена отрицательная корреляция ($r = -0,8$) между концентрационными зависимостями I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$ и, следовательно, продемонстрирована обратная зависимость между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК. Мы можем предположить, что активация бактериальной биолюминесценции фуллеренолом ($I^{rel} > 1$, Рисунок 3, 4А) связана с умеренным снижением содержания АФК ($A\Phi K^{rel} < 1$, кривая 2, Рисунок 4А), вероятно, в результате усиления потребления АФК бактериями, индуцированного фуллеренолом.

Более высокий диапазон концентраций фуллеренола, при котором наблюдается токсический эффект ($> 10^{-1}$ г/л), выявил положительную корреляцию ($r = 0,8$) между концентрационными зависимостями I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$, Рисунок 4А. Этот результат указывает на различные молекулярные механизмы влияния этого фуллеренола на бактерии в диапазоне низких и высоких концентраций, что приводит к активации и ингибированию биолюминесценции, соответственно. Вероятно, токсический эффект фуллеренола (при концентрациях $> 10^{-1}$ г/л) связан с уменьшением АФК в бактериальных суспензиях ниже физиологически необходимого для функционирования бактерий в процессах метаболического окисления. Нейтрализация АФК фуллеренолом в водной среде (т.е. проявление его антирадикальной активности), возможно, приводит к смещению равновесия между растворенным молекулярным кислородом O_2 и физиологическими концентрациями АФК, и, следовательно, к подавлению дыхания бактериями.

Уменьшение содержания АФК наблюдалось для всех фуллеренолов при концентрациях $> 0,08$ г/л. Логично предположить, что уменьшение содержания АФК вносит вклад в их токсический эффект (Рисунок 3).

(б) Ферментативная тестовая система

В растворах ферментов не наблюдалось достоверной активации биолюминесценции (кривая 1, Рисунок 4Б). Была обнаружена положительная корреляция ($r = 0,9$) между зависимостями I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$ в диапазоне концентраций фуллеренола ($10^{-7} - 3$ г/л).

(в) Небиологическая система (водные растворы фуллеренолов)

Диапазон низких концентраций фуллеренола $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x+y = 40-42$) ($< 10^{-4}$ г/л, Рисунок 4В) показывают снижение содержания АФК по сравнению с контролем ($A\Phi K^{rel} < 1$); следовательно, этот диапазон демонстрирует антирадикальную активность фуллеренола. Диапазон более высоких концентраций ($10^{-4} - 10^{-1}$ г/л) демонстрирует увеличение содержания АФК ($A\Phi K^{rel} > 1$, Рисунок 4В). Механизм этого явления требует дальнейшего исследования. Однако мы можем предположить, что снижение способности к нейтрализации АФК может быть связано с дипольной природой фуллеренола и образованием агрегатов. Данный диапазон совпадает с диапазоном эффективной активации биолюминесценции бактерий (Рисунки 3, 4А, кривая 1) и с незначительной активацией биолюминесценции ферментов (Рисунок 4Б, кривая 1). Можно предположить, что биологические процессы, клеточные или ферментативные, смягчают отклонения содержания АФК в окружающей среде за счет функции биолюминесценции (детоксикация активного кислорода с помощью реакции бактериальной люциферазы). Данное предположение подтверждается отсутствием таких значительных колебаний содержания АФК в ферментативной системе (см. Рисунки 4Б и 4В), а также упомянутой выше положительной

корреляцией ($r = 0,9$) между зависимостями I^{rel} и $AФK^{rel}$ (Рисунок 4В).

Следует обратить внимание, что активации биолюминесценции и роста содержания АФК не наблюдали для фуллеренолов, не содержащих Gd (Рисунок 3), что может подтверждать роль дипольной природы этих соединений в особых свойствах этого фуллеренола.

Из результатов, представленных на Рисунках 3–4 можно сделать следующие выводы:

1. Токсические эффекты фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) ($I^{rel} < 1$, Рисунки 3, 4А, кривая 1) при высоких концентрациях ($> 10^{-1}$ г/л) могут быть связаны с избыточной нейтрализацией АФК ($AФK^{rel} < 1$, Рисунок 4А, кривая 2) в бактериальной тестовой системе.

2. Активация бактериальной биолюминесценции ($I^{rel} > 1$, Рисунки 3, 4А, кривая 1) при низкой концентрации фуллеренола ($10^{-3} - 2 \times 10^{-1}$ г/л) может быть связана с умеренным снижением АФК в результате усиления потребления АФК бактериями ($AФK^{rel} < 1$, Рисунок 4А, кривая 2).

3. Нейтрализация избытка АФК в водной среде (Рисунок 4В), вызванного присутствием фуллеренола ($10^{-4} - 10^{-1}$ г/л), может происходить с помощью реакции бактериальной люциферазы (реакция 2, глава 2, Рисунок 4Б).

Раздел 3.2 посвящен сравнению антиоксидантной активности фуллеренолов разной структуры.

3.2.1 Коэффициенты антиоксидантной активности фуллеренолов

Антиоксидантная активность фуллеренолов изучена в условиях модельного окислительного стресса, т.е. в растворах модельных окислителей органической и неорганической природы (1,4-бензохинон и феррицианид калия $K_3[Fe(CN)_6]$, соответственно). Для экспериментов с фуллеренолами выбраны концентрации модельных окислителей, ингибирующие биолюминесценцию бактериальной и ферментативной тестовых систем на 50% (EC_{50} и IC_{50} , соответственно, Таблица 2).

Таблица 2 – Концентрации IC_{50} и EC_{50} модельных окислителей

| Соединение | IC_{50} , М | | EC_{50} , М | |
|-----------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|
| | Ферментативная система | Лиофилизированные бактерии | Лиофилизированные бактерии | Интактные бактерии |
| 1,4-бензохинон | 10^{-5} | $2,5 \times 10^{-7}$ | $2,5 \times 10^{-7}$ | 8×10^{-7} |
| $K_3[Fe(CN)_6]$ | 2×10^{-4} | 10^{-2} | 10^{-2} | 10^{-3} |

Рассчитаны коэффициенты антиоксидантной активности фуллеренолов (K_{GT} и K_{OxT}) в растворах модельных окислителей. Для иллюстрации этих эффектов в качестве примера выбраны два препарата фуллеренолов C_{60}, C_{70} , различающиеся количеством кислородосодержащих заместителей: $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) и $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$). На Рисунке 6 приведены зависимости K_{GT} в растворе органического (Рисунок 6А) и неорганического (Рисунок 6Б) окислителей от концентрации фуллеренолов, полученные с помощью бактериального биотеста. Подобные зависимости получены и для ферментативной тестовой системы.

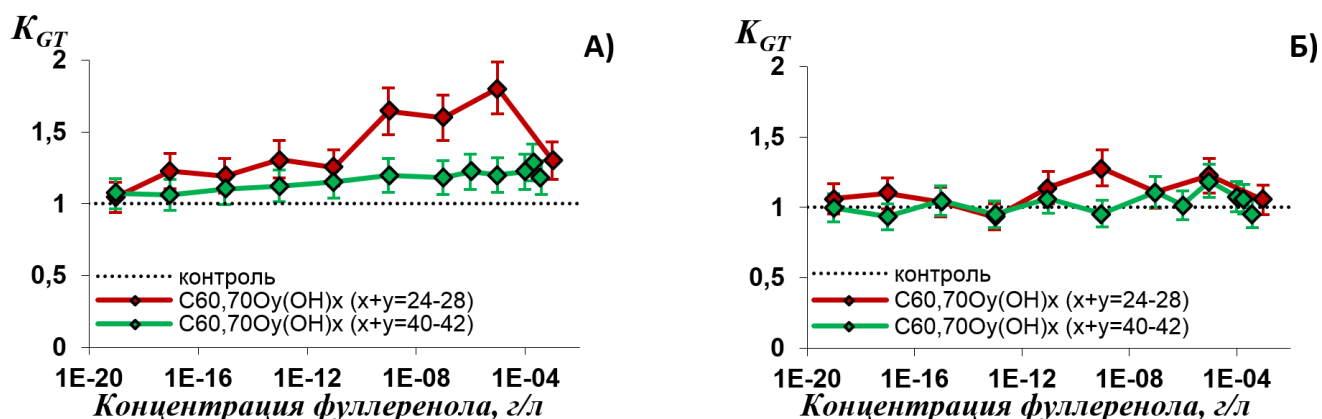


Рисунок 6 – Зависимости коэффициента антиоксидантной активности K_{GT} от концентрации фуллеренолов в растворах модельных окислителей: А) – 1,4-бензохинона ($EC_{50} = 2,5 \times 10^{-7}$ М), Б) – $K_3[Fe(CN)_6]$ ($EC_{50} = 4 \times 10^{-2}$ М). Лиофилизированные бактерии

Определены активные концентрации фуллеренолов, при которых наблюдается антиоксидантный эффект ($K_{GT} > 1$) и максимальные антиоксидантные коэффициенты K_{GT} фуллеренолов. Полученные данные приведены в Таблице 3. Аналогичным образом были получены данные и для антиоксидантного коэффициента K_{OxT} (Таблица 4).

Таблица 3 – Диапазоны активных концентраций фуллеренолов, уменьшающие общую токсичность растворов ($K_{GT} > 1$) модельных окислителей (при IC_{50} для ферментативной системы, EC_{50} для бактериальной системы) и максимальные значения коэффициентов K_{GT} . Группы фуллеренолов, отличающиеся только количеством кислородосодержащих заместителей, выделены зеленым и синим цветом

| Фуллеренол | Диапазон активных концентраций, г/л; Максимальное значение K_{GT} | | | |
|--|--|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | Бактериальная система | | Ферментативная система | |
| | 1,4-бензохинон (EC_{50}) | $K_3[Fe(CN)_6]$ (EC_{50}) | 1,4-бензохинон (IC_{50}) | $K_3[Fe(CN)_6]$ (IC_{50}) |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | $10^{-13}-4 \times 10^{-4}$; 1,2 | нет эффекта 1,0 | $10^{-20}-10^{-10}$; 1,3 | нет эффекта 1,0 |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) | $10^{-19}-10^{-3}$; 1,8 | $10^{-13}-10^{-3}$; 1,3 | $10^{-18}-10^{-12}$; 1,5 | $10^{-18}-10^{-5}$; 1,2 |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 10-12$) | $10^{-7}-10^{-4}$; 1,3 | нет эффекта 1,0 | $10^{-5}-4 \times 10^{-4}$; 1,4 | нет эффекта 1,0 |
| $C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) | $10^{-17}-10^{-11}$; 1,4 | нет эффекта 1,0 | $10^{-19}-10^{-5}$; 2,2 | $10^{-16}-6 \times 10^{-4}$; 1,3 |
| $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | $10^{-19}-6 \times 10^{-2}$; 1,3 | $10^{-6}-10^{-4}$; 1,2 | нет эффекта 1,0 | нет эффекта 1,0 |
| $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | $10^{-14}-2 \times 10^{-1}$; 1,4 | $10^{-7}-10^{-2}$; 1,3 | $10^{-14}-3 \times 10^{-5}$; 1,4 | нет эффекта 1,0 |
| $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 20-24$) | $10^{-14}-5 \times 10^{-2}$; 1,2 | нет эффекта 1,0 | $10^{-12}-10^{-8}$; 1,3 | нет эффекта 1,0 |

Из Таблиц 3–4 видно, что детоксикация раствора 1,4-бензохинона фуллеренолами эффективнее, чем раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, вероятно благодаря гидрофобному взаимодействию амфифильных молекул фуллеренола и 1,4-бензохинона.

При сравнении фуллеренолов, отличающихся только количеством кислородосодержащих заместителей (Таблицы 3–4), было выявлено, что антиоксидантные

коэффициенты (K_{OxT} и K_{GT}) выше у фуллеренолов, в структуре которых количество кислородосодержащих групп приблизительно равно $\frac{1}{2}$ количества атомов углерода в каркасе, а именно $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$), $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$), следовательно, они обладают большей антиоксидантной активностью.

Таблица 4 – Диапазоны концентраций фуллеренолов, уменьшающие окислительную токсичность ($K_{OxT} > 1$) растворов модельных окислителей (при IC_{50}) и максимальные значения коэффициентов K_{OxT} . Ферментативная тестовая система. Группы фуллеренолов, отличающиеся только количеством кислородосодержащих заместителей, выделены зеленым и синим цветом

| Фуллеренол | Диапазон активных концентраций, г/л; Максимальное значение K_{OxT} | |
|---|---|---|
| | 1,4-бензохинон | $K_3[Fe(CN)_6]$ |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | нет эффекта 1,0 | нет эффекта 1,0 |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) | $10^{-18}-10^{-4}$; 1,9 | $10^{-18}-10^{-6}$; 1,3 |
| $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x+y = 10-12$) | $10^{-13}-5 \times 10^{-5}$; 1,2 | нет эффекта 1,0 |
| $C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24-28$) | $10^{-14}-5 \times 10^{-5}$; 2 | $10^{-14}-2 \times 10^{-5}$; 1,3 |
| $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | $10^{-14}-10^{-6}$; 1,3 | нет эффекта 1,0 |
| $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 40-42$) | $10^{-12}-10^{-4}$; 1,1 | $10^{-14}-10^{-9}$; $10^{-7}-10^{-4}$; 1,1 |
| $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y = 20-24$) | нет эффекта 1,0 | нет эффекта 1,0 |

Проиллюстрируем эти результаты на диаграммах (Рисунки 7 и 8). Видно, что антиоксидантные коэффициенты K_{GT} и K_{OxT} выше у фуллеренолов с отношением равным $\frac{1}{2}$.

Механизм снижения токсичности растворов модельных окислителей фуллеренолами может быть связан с образованием короткоживущих комплексов окислитель-фуллеренол с последующей нейтрализацией модельного окислителя.

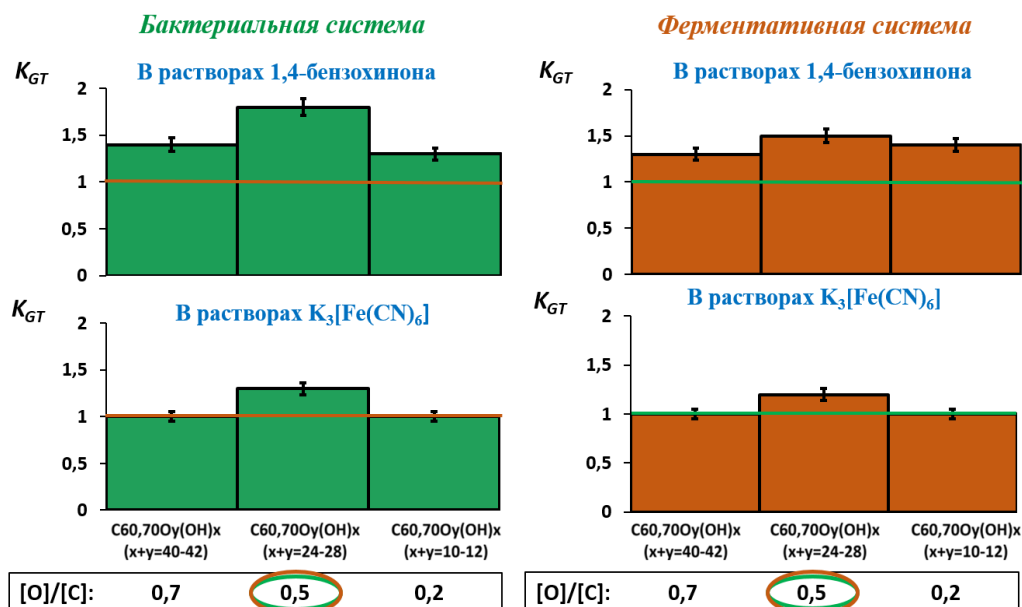


Рисунок 7 – Коэффициенты антиоксидантной активности, K_{GT}

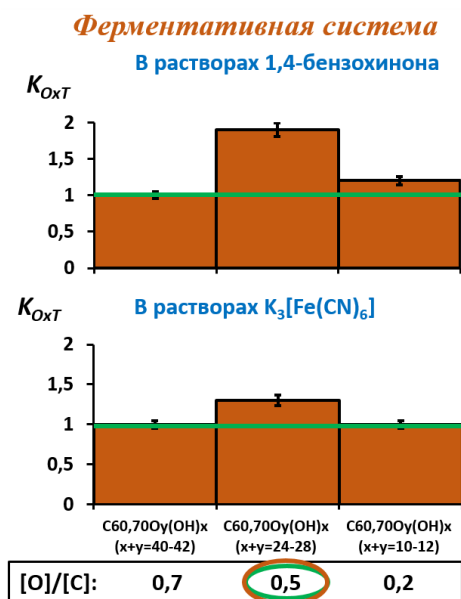


Рисунок 8 –
Коэффициенты
антиоксидантной
активности, K_{OxT}

Таким образом, из анализа данных Таблиц 3 и 4, Рисунков 7 и 8 следует, что оба коэффициента антиоксидантной активности K_{GT} и K_{OxT} соответствуют правилу «половинного соотношения», т.е. максимальная антиоксидантная активность проявляется для фуллеренола, с соотношением количества атомов кислорода и углерода, близким $\frac{1}{2}$.

3.2.2 Роль АФК в антиоксидантной активности фуллеренолов

Для выявления роли АФК в антиоксидантной активности фуллеренолов нами были предварительно проведены эксперименты в присутствии только модельного окислителя, т.е. без фуллеренолов. Обнаружено, что модельный окислитель (1,4-бензохинон) в бактериальной суспензии при EC_{50} увеличивает содержание АФК в 1,6 раза, а в ферментативной системе при IC_{50} – примерно в 2 раза по сравнению с контрольным значением.

На Рисунке 9 представлены значения K_{GT} и $AФК^{rel}$ в растворах органического окислителя, 1,4-бензохинона, в бактериальной и ферментативной тестовых системах (Рисунок 9А, и 9Б, соответственно) при различных концентрациях фуллеренола.

(а) Бактериальная тестовая система

Из Рисунка 9А видно, что фуллеренол $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y = 40-42$ в диапазоне концентраций $10^{-3} - 2 \times 10^{-1}$ г/л ослабляет окислительный стресс в бактериальной суспензии (кривая 1, Рисунок 9А) ($K_{GT} > 1$; максимальное значение $K_{GT} = 1,75$), при этом наблюдается небольшое уменьшение содержания АФК в бактериальной суспензии в условиях модельного окислительного стресса (Рисунок 9А, кривая 2). Выявлена умеренная отрицательная корреляция ($r = -0,7$) между концентрационными зависимостями K_{GT} и $AФК^{rel}$ в бактериальных суспензиях (Рисунок 9А) во всем исследуемом диапазоне концентраций фуллеренола: $10^{-14} - 2 \times 10^{-1}$ г/л. Эта корреляция демонстрирует обратную зависимость между интенсивностью бактериальной билюминесценции и содержанием АФК в условиях окислительного стресса, аналогичную условиям без окислительного стресса рассмотрено ранее, раздел 3.1, Рисунок 4А). Следовательно, активация билюминесценции на Рисунке 9А (кривая 1) связана с усилением потребления АФК бактериями в условиях избытка АФК при модельном окислительном стрессе.

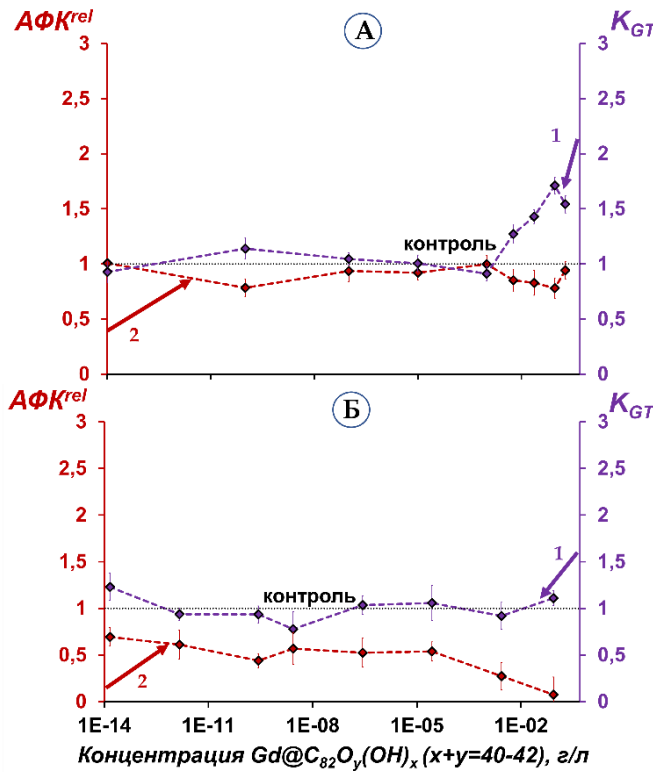


Рисунок 9 – Коэффициенты антиоксидантной активности K_{GT} (1) и относительное содержание АФК, AFK^{rel} , (2) при различных концентрациях $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y = 40-42$.

А) бактериальная суспензия,

Б) ферментативная система.

Время инкубирования 45 мин.

Концентрация АФК в контрольной

бактериальной суспензии (суспензия + 1,4-

бензохинон, $EC_{50} = 8 \times 10^{-7}$ М) составляла

$\sim 5,8 \times 10^{-6}$ М, в контрольной

ферментативной системе (ферменты + 1,4-

бензохинон, $IC_{50} = 10^{-5}$ М) – $4,9 \times 10^{-5}$ М.

«Контроль» соответствует отсутствию

фуллеренола в экспериментальных

растворах

(б) Ферментативная тестовая система

Рисунок 9Б показывает отсутствие заметного антиоксидантного воздействия фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y = 40-42$ ($K_{GT} \approx 1$) в растворе 1,4-бензохинона на интенсивность биолюминесценции ферментативной системы (кривая 1). В отличие от бактериальной системы (Рисунок 9А, кривая 2), ферментативная система продемонстрировала снижение содержания АФК примерно на 50% в широком диапазоне низких концентраций фуллеренола ($10^{-14} - 10^{-4}$ г/л), Рисунок 9Б, кривая 2. Вероятно, фуллеренол при низких концентрациях полностью нейтрализовал вызванный 1,4-бензохиноном избыток АФК в ферментативной тестовой системе. Следует отметить, что данный фуллеренол практически не изменял содержание АФК в бактериальных суспензиях (Рисунок 9А, кривая 2). Полученные результаты подчеркивают сложность процессов, ответственных за антиоксидантный эффект фуллеренолов в ферментативной и клеточной системах.

Раздел 3.3 посвящен изменению скоростей окисления НАДН в растворах модельных окислителей в присутствии фуллеренолов на примере $C_{60}O_y(OH)_x$ (где $x+y = 24-28$) в ферментативном/неферментативном процессах.

НАДН является органическим восстановителем и одним из компонентов биолюминесцентной ферментативной системы двух сопряженных реакций (реакция 2, глава 2). Об окислительной активности фуллеренолов можно судить по их способности увеличивать скорость окисления НАДН. Данные Таблицы 5 демонстрируют, что скорости автоокисления НАДН в отсутствие (1) и в присутствии (1Е) ферментов близки между собой. При этом добавление фуллеренола приводит к увеличению скорости его автоокисления примерно в 1,7 и 2,3 раза, соответственно (система 1 и 1Е). Эти данные свидетельствуют о способности фуллеренола уменьшать восстановительную активность среды. Вероятно, в нашем случае фуллеренол может расходовать эндогенный восстановитель НАДН, удаляя его из процессов 1 и 1Е. Такое ускорение автоокислительных процессов под действием

фуллеренола можно рассматривать как химическую причину уменьшения интенсивности биолюминесценции в присутствии фуллеренолов, которое определяет его токсичность.

Таблица 5 – Скорости окисления НАДН в растворах различного состава в присутствии (V_ϕ) и отсутствии (V) фуллеренола $C_{60}O_y(OH)_x$ (где $x+y = 24-28$)

| № | Компоненты раствора | $V \times 10^8$, М/мин | | V_ϕ / V |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|----------|--------------|
| | | V | V_ϕ | |
| Неферментативные процессы | | | | |
| 1 | НАДН (автоокисление) | 6 | 10 | 1,7 |
| 2 | НАДН + ФМН | 32 | 32 | 1,0 |
| Ферментативные процессы | | | | |
| 1E | НАДН (автоокисление) + E | 4 | 9 | 2,3 |
| 2E | НАДН + ФМН + E | 317 | 374 | 1,2 |

$C_{НАДН} = 1,6 \times 10^{-4}$ М, $C_{ФМН} = 5,4 \times 10^{-5}$ М, $C_\phi = 10^{-8}$ г/л, E – препарат ферментов (КРАБ)

Системы 2 и 2E представляют эндогенные процессы, т.е. окислительно-восстановительные реакции эндогенного восстановителя (НАДН) и окислителя (ФМН) (реакция 1, глава 2) в отсутствии и присутствии ферментов, соответственно. Добавление ФМН к НАДН в неферментативном (2) и ферментативном (2E) процессах приводит к увеличению скорости окисления НАДН (соответственно с 6 до 32 М/мин и с 4 до 317 М/мин), что демонстрирует взаимодействие эндогенных восстановителя и окислителя в системе. Добавление фуллеренола к НАДН + ФМН в ферментативном (2E) процессе дополнительно увеличивает скорости окисления НАДН в 1,2 раза, что может способствовать увеличению скорости сопряженной биолюминесцентной реакции и, следовательно, росту интенсивности биолюминесценции. Вероятно, амфифильность фуллеренолов благоприятствует взаимодействию молекул ФМН и НАДН, которые также являются амфифильными структурами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проанализированы биоэффекты группы фуллеренолов с использованием биолюминесцентных тестовых систем – клеточной и ферментативной. Показано, что токсичность фуллеренолов (подавление интенсивности биолюминесценции бактерий) наблюдается при высоких концентрациях, а антиоксидантная активность (способность смягчать окислительный стресс, вызванный воздействием молекул окислителей на бактерии) – при низких. Мы показали, что эти свойства связаны со следующими особенностями структуры фуллеренолов:

1) Представлена «гипотеза 1/2»: наименьшей токсичностью и наибольшей антиоксидантной активностью обладают фуллеренолы, в структуре которых количество кислородосодержащих групп примерно в 2 раза меньше количества атомов углерода в каркасе фуллеренола. Эта гипотеза связана с соотношением полярных и неполярных фрагментов в структуре фуллеренола.

2) Наименьшую токсичность имеют металлосодержащие фуллеренолы. Самый нетоксичный – эндодральный Gd-содержащий фуллеренол $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y = 40-42$. В его присутствии также наблюдали активацию биолюминесценции бактерий.

3) Фуллеренолы, не модифицированные атомами металлов, эффективнее ингибируют биолюминесценцию бактерий, чем биолюминесценцию ферментативных реакций, что

вероятно связано с их воздействием на гидрофобные фрагменты клеточной мембраны бактерий.

Продемонстрированы следующие механизмы токсичности, активации и антиоксидантной активности фуллеренолов:

1) Токсический эффект фуллеренолов связан со следующими процессами:

i) снижением содержания АФК, что объясняется избыточной антирадикальной активностью концентрированных растворов фуллеренолов и последующим замедлением метаболических окислительных процессов в биологических системах;

ii) увеличением скорости автоокисления НАДН, что способствует росту окислительной токсичности раствора;

2) Активация биолюминесценции бактерий в присутствии $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y = 40-42$, сопровождается умеренным снижением АФК, что вероятно, связано с усилением потребления АФК бактериями. Такой эффект фуллеренола объясняется его дипольной природой, высоким сродством к электрону и, как следствие, высокой реакционной способностью.

3) Антиоксидантный эффект фуллеренолов связан с:

i) гидрофильно-гидрофобными характеристиками среды: эффект больше в растворах амфифильного органического окислителя – 1,4-бензохинона, чем неорганического – феррицианида калия;

ii) потреблением АФК бактериями;

iii) ускорением окисления НАДН эндогенным окислителем ФМН в ферментативной реакции, что увеличивает конкурентоспособность биолюминесцентной реакции.

Полученные результаты формируют базу данных для подбора фуллеренолов с заданными токсическими и антиоксидантными характеристиками, что поможет биологам и медикам снизить количество экспериментов на животных. В дальнейшем планируется расширить группу исследуемых фуллеренолов, а также сравнить их воздействия на ферментативном, клеточном, органном и организменном уровнях, что потребует проведения дополнительного цикла исследований с использованием организмов и выделенных из них органов.

Методология оценки, сравнения и прогнозирования токсичности и антиоксидантной активности веществ была разработана в этой работе на примере фуллеренолов. Она включает комплекс методов и может быть использована для исследования других биологически активных веществ для различных областей экологии, фармакологии и медицины.

ВЫВОДЫ

1. Продемонстрировано, что фуллеренолы токсичны при высоких концентрациях ($> 10^{-3}$ г/л) и проявляют антиоксидантную активность при низких концентрациях ($< 10^{-3}$ г/л). Токсичность и антиоксидантная активность фуллеренолов связаны с уменьшением содержания АФК в бактериальных суспензиях и растворах ферментов.

2. Показано, что меньшей токсичностью и большей антиоксидантной активностью обладают фуллеренолы, в структуре которых количество кислородосодержащих групп примерно в 2 раза меньше количества атомов углерода в каркасе фуллеренола («гипотеза $\frac{1}{2}$ »), что связано с оптимальным соотношением размера фрагментов гидрофобной π -системы и количества полярных кислородосодержащих групп.

3. Продемонстрировано, что фуллеренолы, не модифицированные металлами, интенсивнее ингибируют биолюминесценцию бактериальной системы, чем ферментативной (IC_{50} в 2–3 раза превышают EC_{50}), что объясняется наличием дополнительных путей воздействия на гидрофобные фрагменты клеточной мембраны.

4. Показано, что антиоксидантный эффект фуллеренолов зависит от амфифильных характеристик среды. Он максимален в растворах органического окислителя – 1,4-бензохинона – и достигает 220%.

5. На примере $C_{60}O_y(OH)_x$ ($x+y = 24–28$) показано, что фуллеренолы ускоряют автоокисление НАДН в ферментативном и неферментативном процессе, а также окисление НАДН эндогенным окислителем ФМН в ферментативном процессе, что вносит вклад соответственно в уменьшение и увеличение скорости биолюминесцентной реакции.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей, опубликованных автором по теме диссертации:

1. Stepin, E. A. Effects of Endohedral Gd-Containing Fullerenols with a Different Number of Oxygen Substituents on Bacterial Bioluminescence / E. A. Stepin, **E. S. Sushko**, N. G. Vnukova, G. N. Churilov, A. V. Rogova, F. N. Tomilin, N. S. Kudryasheva // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – V. 25, № 2 – P. 708.

2. Sushko, E. S. Endohedral Gd-Containing Fullerenol: Toxicity, Antioxidant Activity and Regulation of Reactive Oxygen Species in Cellular and Enzymatic Systems / **E. S. Sushko**, N. G. Vnukova, G. N. Churilov, N. S. Kudryasheva // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23, № 9. – P. 5152.

3. Kovel (Sushko), E. S. Toxicity and Antioxidant Activity of Fullerenol $C_{60,70}$ with Low Number of Oxygen Substituents / **E. S. Kovel (Sushko)**, A. G. Kicheeva, N. G. Vnukova, G. N. Churilov, E. A. Stepin, N. S. Kudryasheva // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22, № 12. – P. 6382.

4. Kudryasheva, N. S. Monitoring of Low-Intensity Exposures via Luminescent Bioassays of Different Complexity: Cells, Enzyme Reactions, and Fluorescent Proteins / N. S. Kudryasheva, **E. S. Kovel (Sushko)** // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V. 20, № 18. – P. 4451.

5. Kovel (Sushko), E. S. Antioxidant activity and toxicity of fullerenols via bioluminescence signaling: Role of oxygen substituents / **E. S. Kovel (Sushko)**, A. S. Sachkova, N. G. Vnukova, G. N. Churilov, E. M. Knyazeva, N. S. Kudryasheva // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V. 20, № 9. – P. 2324.

6. Sachkova, A. S. Biological activity of carbonic nano-structures – comparison via enzymatic bioassay / A. S. Sachkova, **E. S. Kovel (Sushko)**, G. N. Churilov, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // Journal of Soils and Sediments. – 2018. – V. 19, № 6. – P. 2689–2696.

7. Sachkova, A. S. On mechanism of antioxidant effect of fullerenols / A. S. Sachkova, **E. S. Kovel (Sushko)**, G. N. Churilov, O. A. Guseynov, A. A. Bondar, I. A. Dubinina, N. S. Kudryasheva // Biochemistry and Biophysics Reports. – 2018. – V. 9. – P. 1–8.

8. Kudryasheva, N. S. Bioluminescent Enzymatic Assay as a Tool for Studying Antioxidant Activity and Toxicity of Bioactive Compounds / N. S. Kudryasheva, **E. S. Kovel (Sushko)**, A. S. Sachkova, A. A. Vorobeva, V. G. Isakova, G. N. Churilov // Photochemistry and Photobiology. – 2017. – V. 93, № 2. – P. 536–540.

Материалы конференций, входящие в Web of Science:

1. Sachkova, A. S. Antioxidant Activity of Fullerenols. Bioluminescent Monitoring in vitro / A. S. Sachkova, **E. S. Kovel (Sushko)**, A. A. Vorobeva, N. S. Kudryasheva // BIOSENSORS. – 2017. – V. 27. – P. 230–231.

2. Tarasova, A. Use of bioluminescent enzyme system to detect antioxidant activity of fulleranol $C_{60}O_y(OH)_x$ / A. Tarasova, N. Kudryasheva, **E. Kovel (Sushko)**, G. Churilov, N. Vnukova, V. Isakova, I. Osipova // Luminescence. – 2014. – V. 29 (S1). – P. 100–101.

Материалы конференций, входящие в РИНЦ:

1. Ковель (Сушко), Е. С. Токсичные, прооксидантные и антиоксидантные свойства наночастиц. Биолюминесцентный мониторинг in vitro / **Е. С. Ковель (Сушко)**, Л. С. Бондаренко, К. А. Кыдралиева, Г. И. Джардималиева, Э. Илия, Э. Томбач, А. С. Сачкова, Н. Г. Внукова, Г. Н. Чурилов, А. Г. Кичеева, Н. С. Кудряшева // Сборник материалов Международной сателлитной конференции «Экологический мониторинг: методы и подходы» и XX Международного симпозиума «Сложные системы в экстремальных условиях» / Сибирский федеральный университет. – Красноярск, 2021. – С. 113–114.

2. Ковель (Сушко), Е. С. Токсичность и антиоксидантная активность фуллеренолов. Биолюминесцентный мониторинг / **Е. С. Ковель (Сушко)**, Н. С. Кудряшева, А. С. Сачкова // Биофизика : сборник тезисов VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов / АНО «Иннов. Центр Кольцово». – Новосибирск, 2019. – С. 276–278.

3. Ковель (Сушко), Е. С. Токсичность и антиоксидантная активность фуллеренолов. Роль кислородосодержащих заместителей. Биолюминесцентный мониторинг / **Е. С. Ковель (Сушко)**, Н. С. Кудряшева, А. С. Сачкова // Действие физико-химических факторов на биологические системы : сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России. В 2 томах. Т. 2 / Полиграфическое объединение «Плехановец». – Краснодар, 2019. – С. 41.

4. Kudryasheva, N. S. Toxic and adaptive effects via luminescent assay of different complexity: bacterial cells, enzyme reactions, and fluorescent proteins / N. S. Kudryasheva, R. R. Alieva, T. V. Rozhko, A. S. Petrova, A. A. Lukonina, **E. S. Kovel**, A. S. Sachkova // Материалы XIX Всероссийского симпозиума с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях» / ФГБНУ «ФИЦ «КНЦ СО РАН». – Красноярск, 2018. – С. 124–126.

5. Kovel (Sushko), E. S. Use of bioluminescent assay systems to detect antioxidant activity of fullerenols / **E. S. Kovel (Sushko)**, A. S. Sachkova, G. N. Churilov, N. S. Kudryasheva // Химия: Сборник научных трудов XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук». В 7 томах. Т. 2 / Томский политехнический университет. – Томск 2016. – С. 217–219.