

Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное
подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

Сушко Екатерина Сергеевна

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

1.5.2. Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Красноярск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1 Люминесцентные процессы в биологических системах и их применение	11
1.1.1 Виды биологической люминесценции	11
1.1.2 Использование биолюминесцентных систем для тестирования токсичности	13
1.1.3 Слабая и сверхслабая биохемилюминесценция и ее применение	20
1.1.4 Активные формы кислорода и антиоксиданты в биологических системах ..	23
1.2 Фуллерены и их производные: структура, получение, свойства и применение ..	29
1.3 Модельные окислители. Свойства и применение	42
1.3.1 Феррицианид калия	42
1.3.2 Пара-бензохинон	43
Глава 2. Материалы и методы	47
2.1 Регистрация интенсивности биолюминесценции и хемилюминесценции	47
2.2 Препараты и реакционные смеси	47
2.2.1 Используемые реагенты.....	47
2.2.2 Приготовление реакционных смесей	50
2.3 Расчет коэффициентов антиоксидантной активности фуллеренолов в биолюминесцентных системах	58
2.4 Определение скорости окисления НАДН в растворах различного состава в присутствии и отсутствии фуллеренолов.....	60
2.5 Статистическая обработка результатов	61
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	62
3.1 Токсичность фуллеренолов.....	62
3.1.1 Характеристики токсичности фуллеренолов	62
3.1.2 Роль активных форм кислорода в токсических эффектах фуллеренолов	69
3.2 Антиоксидантная активность фуллеренолов	75
3.2.1 Модельный окислительный стресс	75
3.2.2 Коэффициенты антиоксидантной активности фуллеренолов в биолюминесцентных системах.....	77
3.2.3 Роль активных форм кислорода в антиоксидантной активности фуллеренолов	85
3.3 Скорости окисления НАДН в ферментативной системе	92

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	99
ПРИЛОЖЕНИЕ А Воздействие фуллеренолов на системы различной сложности	114
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	116
Б.1 Получение и характеристика фуллереновой смеси	116
Б.2 Получение фуллеренолов.....	118
Б.2.1 Синтез фуллеренолов из фуллеренов.....	118
Б.2.2 Синтез фуллеренолов из фуллеренсодержащей сажи	119
Б.3 Подготовка к характеристике фуллеренолов	121
Б.4 Характеристика фуллеренолов.....	121
Б.4.1 Характеристика пустотелых и экзоэдральных фуллеренолов	121
Б.4.2 Характеристика эндоэдральных Gd-содержащих фуллеренолов.....	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ к приложению Б.....	130

ВВЕДЕНИЕ

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 и остаются малоизученными. Поэтому возникает острая необходимость оценки их свойств 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 данных биотестах тестируемый параметр физиологической активности – 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 антиоксидантная активность – по смягчению ими токсических эффектов модельных окислителей. Простота биолюминесцентных биотестов и высокая скорость процедуры тестирования позволяют анализировать одновременно большое число образцов в сопоставимых условиях, а также выполнять 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 хемиллюминесцентный люминольный метод.

Степень разработанности темы исследования. В данной работе мы впервые использовали люминесцентные системы (клеточные и ферментативные) для изучения и сравнения биологической активности ряда водорастворимых фуллеренолов (фуллеренолов). Работа (1) развивает приложения биоллюминесцентных 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 биоллюминесценцию морских организмов; исследуются механизмы биоллюминесцентных процессов, ведется разработка биоллюминесцентных 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*.

В работе поставлены следующие **задачи**:

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, а также оценку роли клеточно-мембранных процессов. 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 № 18-219003 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 и объем работы. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, главу с изложением результатов работы, заключение, раздел с выводами, список сокращений и условных обозначений, список литературы (219 источников). Работа изложена на 131 странице машинописного текста, проиллюстрирована 8 таблицами, 28 рисунками и 2 приложениями.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Люминесцентные процессы в биологических системах и их применение

1.1.1 Виды биологической люминесценции

Хемилюминесценцией называют эмиссию электромагнитного излучения в диапазоне видимого света, сопровождающую химические реакции. Хемилюминесценция часто сопровождает окислительные процессы, протекающие в биологических системах. Хемилюминесценцию в живых системах обычно классифицируют следующим образом [1]:

1. Биолюминесценция – это свечение некоторых организмов, основанное на хемилюминесцентных реакциях, катализируемых биологическими катализаторами – ферментами; эти ферменты принято называть люциферазами [2–5]. Биолюминесценция обычно выполняет биологическую функцию (например, отпугивание хищника или привлечение партнера), и в этом смысле квант света – физиологически главный продукт реакции. Поэтому свечение в этом случае весьма интенсивное и может быть зафиксировано невооруженным глазом. Биолюминесценцией обладают более 700 видов организмов, наиболее изученными из них являются жуки-светляки, морские бактерии и кишечнополостные (полипы, медузы и т.п.), рыбы и др. Но только морские бактерии излучают свет непрерывно; они вносят заметный вклад в свечение океана. Люминесцентные бактерии распространены по всему Мировому океану – от полярных до тропических широт, от поверхности океана до глубины в несколько тысяч метров; концентрация свободноживущих бактерий в морской воде варьируется в зависимости от времени года, места и глубины [5]). Полагают, что свечение бактерий привлекает высокоразвитые организмы (например, рыб, креветок), что дает возможность бактериям заселить их органы в качестве паразитов или симбионтов [3; 5]. Морские формы светящихся бактерий относятся к четырем родам: *Photobacterium*, *Vibrio*, *Aliivibrio* и *Shewanell*, неморские – к *Photorhabdus* [5].

Высокая интенсивность свечения определяется высокой скоростью ферментативных хемилюминесцентных реакций; и это отличает биолюминесценцию от другого вида биологического свечения – слабой и сверхслабой биохемилюминесценции, которая всегда сопровождает жизнедеятельность организмов.

2. Сверхслабая биохемилюминесценция – это собственная хемилюминесценция клеток, связанная с метаболизмом активных форм кислорода (АФК), азота и липидов. Этот вид хемилюминесценции происходит за счет эндогенных химических неферментативных процессов и производит фотоны в качестве побочных продуктов реакций [6]. АФК могут взаимодействовать друг с другом и с другими молекулами с испусканием квантов света. Одним из механизмов этого процесса считают формирование синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ при взаимодействии кислородных радикалов, H_2O_2 и ClO^- , при этом $^1\text{O}_2$ переходит из возбужденного в основное (триплетное) состояние молекулярного кислорода с испусканием кванта света в инфракрасной области спектра. Также хемилюминесценция наблюдается при взаимодействии радикала оксида азота ($\text{NO}\cdot$), супероксид анион-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) и какого-нибудь белка. При реакции $\text{NO}\cdot$ и $\cdot\text{O}_2^-$ образуется пероксинитрит, и видимо, именно реакция пероксинитрита с белками приводит к свечению). Однако основной вклад в собственную хемилюминесценцию клеток и тканей организма вносят реакции цепного окисления липидов в липопротеинах – мембранных структурах клеток. Эти реакции связаны с участием свободных радикалов липидов – липопероксидов ($\text{LOO}\cdot$). Времени от времени эти радикалы взаимодействуют друг с другом и образуют молекулу кетона в электронно-возбужденном состоянии, которая затем переходит в основное состояние с испусканием кванта света. Интенсивность этого типа люминесценции настолько мала, что свечение может быть зарегистрировано только с помощью высокочувствительных приборов (газоразрядных счетчиков, фотоэлектронных умножителей – ФЭУ), квантовый выход хемилюминесценции низок: 10^{-8} – 10^{-10} . Причины низкой интенсивности хемилюминесценции, сопровождающей свободнорадикальные реакции, следующие: во-первых, концентрация радикалов в биологических системах очень мала, благодаря их высокой активности, поэтому скорости реакций, сопровождающихся свечением, тоже малы; во-вторых, не всякое химическое взаимодействие радикалов приводит к образованию электронно-возбужденных продуктов реакции, а, следовательно, высвечивания кванта света может и не быть; в-третьих, при образовании возбужденной молекулы продукта реакции, вероятность того, что высветится квант света, а не произойдет растраты энергии в тепло, тоже обычно мала.

Также этот тип хемилюминесценции называют спонтанной хемилюминесценцией [7].

3. Усиленная хемилюминесценция – свечение клеток и тканей организма, усиленное за счет введения специфических веществ (хемилюминесцентных зондов), которые увеличивают люминесцентный сигнал в результате взаимодействия с определенными формами свободных радикалов-субстратов. Наиболее распространенными хемилюминесцентными зондами являются люминол и люцигенин.

4. Индуцированная хемилюминесценция – свечение клеток организма, вызванное воздействием индукторов, инициирующих специфические метаболические процессы, приводящие к синтезу АФК или органических свободных радикалов, которые являются субстратами хемилюминесцентной реакции. В качестве индукторов применяются: физические факторы (облучение лазером, тепловое или механическое воздействие, электрический ток, ультразвук, ультрафиолетовые лучи, ионизирующая радиация), химические факторы (12-0-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат – ТФА, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин – ФМЛФ, 4β-форбол-12-миристат-13-ацетат – ФМА, липополисахарид – ЛПС), агенты, инициирующие процесс фагоцитоза (суспензии микроорганизмов, частицы латекса) [7].

В наши дни физико-химические явления, определяющие превращение энергии реакций в биохимических системах в излучение света, повсеместно используются в медико-биологических, экологических исследованиях и регистрируются с помощью специальных приборов – биохемилюминометров.

1.1.2 Использование билюминесцентных систем для тестирования токсичности

Общая характеристика билюминесцентных биотестов

Известно, что токсичность определяется как подавление физиологических функций организмов. Для анализа токсичности сред сложного состава широко используют биотестирование (биологический анализ), который основан на определении токсичности среды при ее действии на живой организм. Биотестирование учитывает неаддитивность действия токсичных веществ на тестовый организм (эффект суммы не равен сумме его отдельных эффектов). Существует эффект синергизма (эффект суммы веществ больше, чем сумма эффектов отдельных веществ) или антагонизма (эффект суммы веществ меньше, чем сумма эффектов отдельных веществ). Таким образом, основной характеристикой биотестов является интегральность: эффект всех

присутствующих веществ в анализируемой смеси интегрируется в изменении одной физиологической функции или поведения живого организма (подвижности, скорости роста, интенсивности дыхания, времени жизни и др.). Обычно в качестве «меры токсичности» используют концентрацию токсичного вещества, угнетающую физиологическую функцию на 50%. Однако у биотестирования существуют и недостатки. Увеличение экспрессности метода связано с уменьшением точности измерений. Еще одна проблема связана с интерпретацией результатов биотестирования, указывающих лишь на токсичность данной среды для данного тест-объекта. Совершенно понятно, что «норма» для «тестового» организма может оказаться неприемлемой для нормативов, относящихся к человеку. В настоящее время общепринятым считается следующий подход: для характеристики токсичности среды оптимальным является использование комплекса биологических и химических анализов. С помощью биологических тестов проводят экспрессный скрининг токсичности среды и дают рекомендации о необходимости химического анализа с целью определения основных загрязнителей и необходимости принятия мер очистки от них среды. Таким образом, биотесты используются в качестве экспрессных «сигнальных» тестов [2]. При этом необходимо учитывать, что химический анализ обычно более дорогой и длительный, по сравнению с биологическим; он не учитывает неаддитивности воздействия токсикантов на организм, и, следовательно, не дает возможности прогнозировать эффекты сложных многокомпонентных растворов на организмы.

В качестве биотестов обычно используют моллюсков, дафний, рачков, рыб, растения, бактерии (прокариотические клетки), а также эукариотические клетки. Кроме того, широко используют беспозвоночных животных, например, тест, основанный на *Daphnia magna* и *Ceriodaphnia* [2].

Существующие в настоящее время биолюминесцентные тесты отличаются от традиционных биотестов, использующих дафнии, инфузории, водоросли, рыб, тем, что в качестве параметра физиологической активности используется биолюминесценция [2; 8–11]. В основе этих тестов лежит изменение интенсивности биолюминесценции биопрепаратов после воздействия того или иного тестируемого образца. Подавление интенсивности биолюминесценции оценивает токсичность водных растворов, в то время как активация биолюминесценции служит доказательством активизации

физиологических функций, связанных с биолюминесценцией. Использование биолюминесценции обеспечивает несложную приборную регистрацию физиологической функции организма с помощью простых физических устройств. Данные биологические тесты дают количественную меру токсичности, часто превосходят известные биотесты по быстрдействию, простоте и чувствительности к токсикантам. Как и все другие биотесты, они позволяют осуществлять интегральную оценку токсичности совокупности токсикантов в растворе [2; 9; 12], что очень важно при мониторинге окружающей среды, загрязненной большим количеством антропогенных отходов.

Биолюминесцентные биотесты уже более 60 лет используются для мониторинга токсичности различных сред. Впервые биотест, основанный на люминесцентных бактериях, был использован в 1963 г. (в соответствии с работой *Grabert and Kossler* (1997) [13]). Позже, в 1980 г. этот тест был стандартизирован в качестве метода обнаружения поллютантов. Новым направлением в этой области стало применение ферментативных биолюминесцентных реакций [14–16]. Таким образом, появились предпосылки для использования в качестве интегральных биотестов не только светящихся бактерий [8–9; 12; 17], но и выделенных из них ферментов [9; 16; 20–21]. В 1990 г. была предложена концепция нового направления в биотестировании – концепция люциферазных биотестов [2; 18]. Было предложено использовать для анализа токсичности среды биолюминесцентную систему сопряженных ферментативных реакций [16], чувствительность которой можно оптимизировать к определенным поллютантам, изменяя состав ферментативной системы или варьируя концентрации субстрата [19]. Сравнение результатов использования ферментативного и клеточного биотестов позволяет оценить механизм воздействия токсикантов на клеточный организм, связанный с возможностью проникновения токсикантов в клетку и возможностью влияния на внутриклеточные процессы.

На основе светящихся лиофилизированных бактерий и их ферментов, предложен ряд методов экспрессного биолюминесцентного анализа для медицины, контроля состояния природной среды (водных источников, почв и промышленных стоков) [8–9; 12; 17; 20–21], а также для управления рядом биотехнологических процессов. Широко используются для этих целей бактерии двух родов: *Photobacterium* (*P. phosphoreum*, *P. leiognathi*) и *Vibrio* (*V. fischeri*, *V. harveyi*) и рекомбинантный штамм *Escherichia coli*

[2]. Оценка детоксикационной, антиоксидантной активности и токсичности биоактивных соединений является новой и перспективной областью использования биолюминесцентных биотестов [10; 14–15; 22–27]. Простота применяемых биотестов и высокая скорость процесса тестирования позволяют одновременно анализировать большое число проб в сопоставимых условиях, что обеспечивает возможность выполнять надлежащую статистическую обработку результатов тестирования, включая результаты исследования низкоконцентрационных эффектов биологически активных соединений. Возможность использования биолюминесцентных систем различной сложности (клеточных, ферментативных) позволяет сравнивать токсические эффекты на клеточном и биохимическом уровнях, а также выявить закономерности воздействия рядов токсикантов [2; 22; 28–30].

Механизмы воздействия на биолюминесцентные системы различных групп соединений (красители, органические окислители, стабильные и радиоактивные металлы) изучены и классифицированы в работах [2; 18; 28; 31–33].

Светящиеся бактерии как основа биолюминесцентного биотеста

Свечение бактерий обычно доступно визуальному наблюдению от большого ($\sim 10^6$) числа клеток бактерий. При этом интенсивность биолюминесценции постоянна; она не обладает временной организацией, исключая зависимость от фаз развития культуры [34–35].

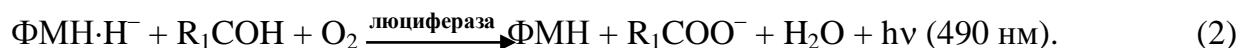
Благодаря защитной функции клеточных стенок и мембран бактерий, препятствующих проникновению посторонних веществ клетки, прямое влияние токсичных веществ на биолюминесцентный фермент люциферазу невозможно. Однако бактериальная люминесценция *in vivo* является чувствительным индикатором токсичности, поскольку регистрируется влияние токсикантов на другие важные метаболические процессы (например, дыхание), опосредованно связанные с биолюминесценцией и, таким образом, отражается метаболический статус клетки. С помощью подобных биотестов возможно выявлять состояние экосистемы как при мгновенном, так и хроническом воздействии токсичного вещества на организм [2; 8–9; 12; 17].

Чувствительность светящихся бактерий к различным веществам зависит от многих факторов. Это могут быть штаммы бактерий, условия их культивирования

(состав питательной среды, рН, фаза роста бактерий и т.д.). Люминесцентные бактерии используются в биотестах в нескольких видах: клеточная суспензия, лиофилизированный препарат, твердая среда. Значимыми преимуществами обладают лиофилизированные бактерии, так как исключают необходимость культивирования и поддержания бактериальных культур. Восстановленные в 3%-ом водном растворе NaCl бактерии демонстрируют постоянный уровень свечения в течение 5–7 ч [2].

Биолюминесцентная система сопряженных ферментативных реакций как основа биолюминесцентного биотеста

Выделенные ферментативные биолюминесцентные системы – одна реакция или система реакций, катализируемых ферментами. Наибольшее распространение получила биолюминесцентная система двух сопряженных ферментативных реакций, катализируемых бактериальными ферментами НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой. Эта система осуществляет следующую цепь ферментативных реакций (далее – ферментативная система) [16; 21]:



В результате реакции (1), катализируемой ферментом редуктазой, происходит восстановление флавинмононуклеотида (ФМН, эндогенный окислитель). Формально процесс представляет собой присоединение водорода. Однако в воде (т.е. в полярном растворителе) этот процесс можно рассматривать как перенос пары ($\text{H}^+ + \text{e}^-$). При этом никотинамиддинуклеотид (НАДН, эндогенный восстановитель) переходит в НАД^+ , передавая молекуле ФМН протон и два электрона с образованием $\text{ФМН}\cdot\text{H}^-$ (депротонированной формы восстановленного флавина). В соответствии с данными [36], при нейтральных рН в водном растворе восстановленный флавин на 90% состоит из депротонированной формы $\text{ФМН}\cdot\text{H}^-$ и только на 10% представлен как $\text{ФМН}\cdot\text{H}_2$. Таким образом, с помощью реакции (1) в системе происходит постоянная наработка $\text{ФМН}\cdot\text{H}^-$, в результате чего поддерживается постоянное свечение.

Реакция (2), катализируемая бактериальной люциферазой, является биолюминесцентной. В этой реакции, восстановленный флавин ($\text{ФМН}\cdot\text{H}^-$) и

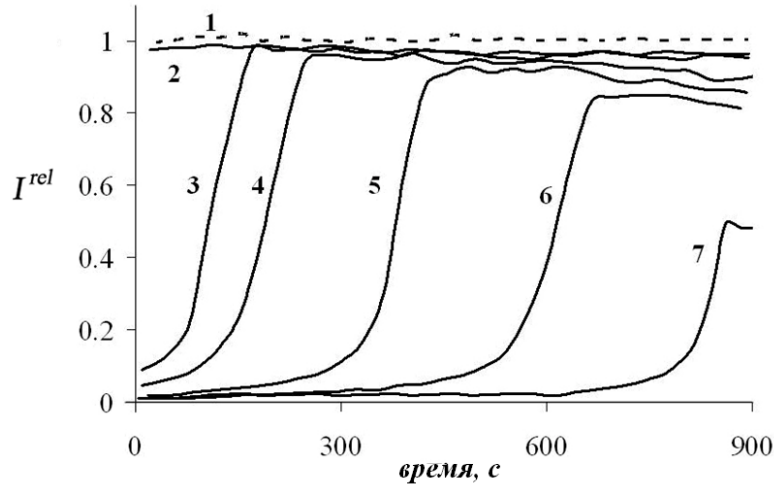
алифатический альдегид (тетрадеканаль) окисляются кислородом воздуха O_2 . В этой реакции образуется окисленная форма флавина (ФМН), жирная кислота (миристиновая) и испускается квант света [2]. Компоненты этой реакции способны реагировать между собой и в отсутствие фермента, но эффективность этого процесса на 10 порядков ниже.

Токсические вещества способны воздействовать непосредственно на люциферазу – ключевой фермент метаболизма светящихся бактерий. Эти соединения могут взаимодействовать также и с субстратами каталитических реакций и с редуктазами (реакция 1). Известно, что редокс-потенциал среды является одной из главных характеристик, определяющих активацию и инактивацию оксидоредуктаз [37]. Поэтому изучению ферментативных реакций в присутствии редокс-активных соединений (экзогенных окислителей) уделяется особое внимание.

Присутствие в системе экзогенных окислителей, способных конкурировать с ФМН (субстратом бактериальной люциферазы) в процессах присоединения водорода (процессах восстановления) в реакции (1), уменьшает количество восстановленного флавина ($ФМН \cdot H$), в результате чего наблюдается ингибирование билюминесцентной реакции (2). Эффективность конкуренции определяется стандартным редокс потенциалом полуреакции окислителя, а также его концентрацией. Так, в системе двух сопряженных реакций (1) и (2) в присутствии сильных окислителей, например, бензохинона, появляется период задержки свечения (индукционный период) и увеличивается время выхода на максимум свечения. Это связано с тем, что, в первую очередь, происходит восстановление бензохинона. Только после того, как концентрация бензохинона в реакционной смеси будет уменьшена до критической, начнется восстановление эндогенного окислителя ФМН в соответствии с реакцией (1) [2]. Позднее подобные эффекты были обнаружены в присутствии неорганического окислителя – $K_3[Fe(CN)_6]$: с ростом концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$ выше 3×10^{-5} М появлялся и увеличивался индукционный период билюминесценции, сдвигался максимум билюминесценции, наблюдалось уменьшение интенсивности билюминесценции [22]; кинетика билюминесценции системы сопряженных ферментативных реакций в растворах $K_3[Fe(CN)_6]$ различных концентраций представлена на Рисунке 1.

Необходимо отметить, что комплексная соль 3-х-валентного железа $K_3[Fe(CN)_6]$ и 1,4-бензохинон характеризуются большими стандартными редокс-потенциалами, чем

ФМН – эндогенный окислитель в ферментативной системе (соответственно 0,36 В, 0,71 В и -0,22 В при нейтральном рН [38]) и, следовательно, в стандартных условиях характеризуются большей окислительной активностью, чем ФМН. В связи с этим, $K_3[Fe(CN)_6]$ и 1,4-бензохинон удобно использовать в качестве экзогенных окислителей для моделирования окислительного стресса в биолюминесцентной системе.



1 – $C = 0$ М; 2 – $C = 3 \times 10^{-6}$ М; 3 – $C = 3 \times 10^{-5}$ М; 4 – $C = 6 \times 10^{-5}$ М; 5 – $C = 8 \times 10^{-5}$ М; 6 – $C = 10^{-4}$ М

Рисунок 1 – Кинетика биолюминесценции системы сопряженных ферментативных реакций в растворах $K_3[Fe(CN)_6]$ различных концентраций [22]

Подобные специфические изменения кинетических параметров биолюминесценции системы двух сопряженных реакций (1) и (2) придают этой системе особые свойства – специфичность к группе окислителей, что является основой определения окислительной токсичности растворов [22; 27; 39–40]. Окислительная токсичность растворов может быть оценена периодом задержки, в то время как общая токсичность оценивается максимальной интенсивностью биолюминесценции [10; 22; 24].

Скорость окисления НАДН определяет ускорение (или замедление) окислительно-восстановительных процессов в ферментативной системе. При этом НАДН может взаимодействовать как с эндогенными окислителями в биохимических процессах (ФМН, реакция 1), так и нейтрализовать экзогенные окислители, которые являются токсикантами [10; 22]. Таким образом, с помощью ферментативной системы можно выявить химические и биохимические процессы, ответственные за окислительную токсичность токсикантов.

1.1.3 Слабая и сверхслабая биохемилюминесценция и ее применение

Эффективность процессов свободнорадикального окисления с участием радикалов кислорода можно оценивать с помощью измерения хемилюминесценции [1; 6–7; 41–55].

Хемилюминесцентный метод основан на использовании окислительно-восстановительных реакций, протекающих с излучением света: в процессе реакции образуется большое количество нестабильных короткоживущих продуктов, в том числе в фазе возбуждения; при переходе из возбужденного в основное состояние происходит излучение видимого света. Хемилюминесцентный метод обычно не связан с ходом процессов в растворах, клетках или тканях, где регистрируется свечение. Этот метод весьма чувствителен при обнаружении короткоживущих реакционноспособных радикалов кислорода (например, время полураспада гидроксильного радикала $\approx 10^{-9}$ с) [1; 6], которые другими способами не регистрируются. Техника регистрации хемилюминесценции проста, занимает не более 5–10 мин, отвечает всем требованиям, предъявляемым к экспресс-анализу [41].

Хемилюминесцентный метод анализа чрезвычайно перспективен для детектирования ряда веществ и широко используется в прикладных исследованиях: для оценки качественных характеристик кумыса [56], анализа качества чая и определения содержания в его экстрактах полифенольных соединений [57], антиокислительных свойств сублимированного кобыльего молока [58], качества и количества жирорастворимых антиоксидантов в фармпрепаратах, пищевых добавках и биосистемах (экстрактах, тканях, плазме крови и т.д.) [59]. Хемилюминесцентный метод также используют в медицине как скрининговый тест, отражающий изменения гомеостаза в организме (исследуют биологические жидкости организма – кровь, мочу, слюну) [41], поскольку изменения показателей хемилюминесценции являются отражением изменений свободнорадикальных процессов в организме [42]. В последние десятилетия применение хемилюминесцентного анализа позволило расширить возможности лабораторной диагностики различных патологических процессов в клинических исследованиях [43]. Так, например, имеются работы, в которых авторы используют хемилюминесцентный метод для мониторинга АФК в крови при различных заболеваниях [7; 44–45; 47–50; 52–53], физических нагрузках [42], а также для изучения показателей антиокислительной активности биологических жидкостей (крови, мочи,

слюны) людей, контактирующих в процессе производства с химическими загрязнителями [41]; изучения биологических последствий микроволнового облучения [60].

Во всех примерах, описанных выше, исследователи оценивают содержание АФК по изменению сверхслабой биохемилюминесценции. Существенным недостатком такого тестирования является низкая интенсивность свечения, что приводит к использованию большого количества исследуемого образца [43]. Поэтому с целью уменьшения количества экспериментального материала применяют химические вещества (хемилюминесцентные зонды), повышающие интенсивность хемилюминесценции (см. подраздел 1.1.1) [1; 61]. Также их применяют тогда, когда собственная хемилюминесценция исследуемой системы находится ниже порога чувствительности измерительной установки [60].

Весьма популярным среди исследователей является применение люминола и его изомера в качестве хемилюминесцентных зондов. Люминол (аминофталгидразид, 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион [61]; о-аминофталойл гидразид) – органическое соединение с формулой $C_8H_7N_3O_2$, представляющее собой белые или светло-желтые кристаллы, которые достаточно хорошо растворимы в полярных органических растворителях, например, этаноле, ограниченно растворимы в щелочных растворах и мало растворимы в воде при нейтральных рН, что позволяет ему связываться с белковыми и липидными компонентами системы. Молекула люминола активно проникает в клетку, в отличие от своего изомера изолюминола, в котором аминогруппа находится в 6-ом положении, а не в 5-ом. Поэтому использование изолюминола, вступающего во взаимодействие с АФК, позволяет оценить их присутствие только во внеклеточной среде [43].

Люминол в присутствии АФК окисляется; этот процесс является сложным, протекает в 8 стадий, и в итоге приводит к испусканию кванта света в синей области спектра. Наблюдаемое при этом свечение связано с переходом молекулы возбужденного продукта (3-аминофталевой кислоты) в основное состояние [1; 43]. В качестве катализатора окисления люминола обычно используют соли трехвалентного иона железа (например, $K_3[Fe(CN)_6]$). Хемилюминесцентная реакция люминола с $K_3[Fe(CN)_6]$ в щелочной среде – классическая реакция хемилюминесценции, исследованная многими учеными [63–64]. Механизм взаимодействия люминола с АФК представлен на Рисунке

2.

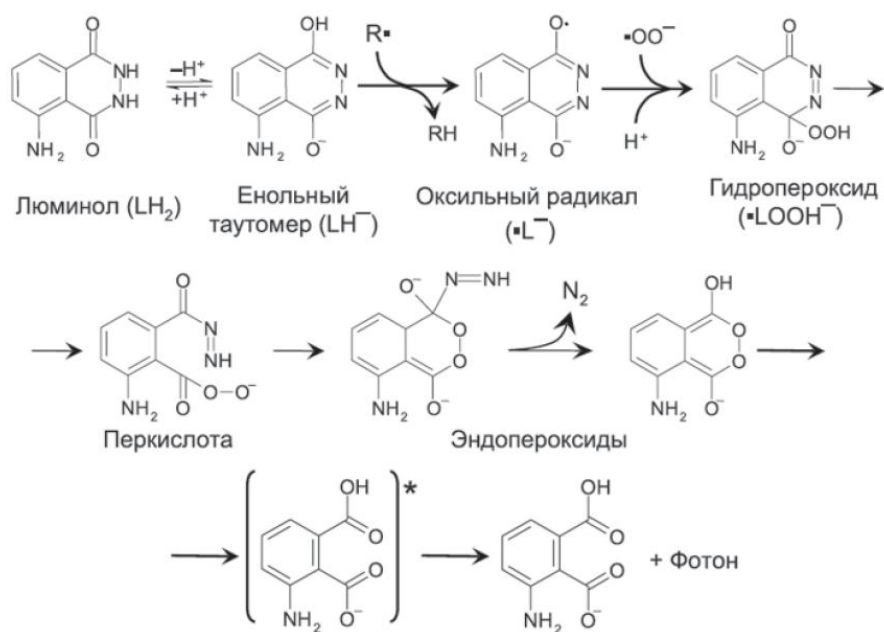


Рисунок 2 – Испускание кванта света при взаимодействии люминола с АФК (схема реакции приведена по [1])

Помимо люминола и его производных, широкое распространение в качестве усилителя хемилюминесценции получил люцигенин [65], который описан в работе [62] и представлен на Рисунке 3.

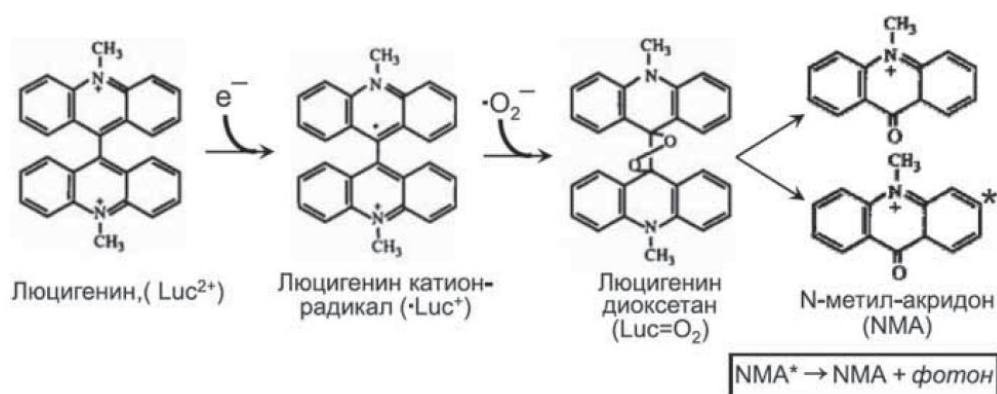


Рисунок 3 – Испускание кванта света при взаимодействии люцигенина с АФК (схема реакции приведена по [1])

Люцигенин – специфичный хемилюминесцентный зонд: количество супероксидного аниона в клетках и тканях в ходе хемилюминесцентного анализа можно определить в присутствии люцигенина в реакционной среде, в свою очередь, перекись водорода (H_2O_2), радикалы (гидроксильный радикал OH^\bullet и синглетный кислород 1O_2),

органические свободные радикалы могут вступать в реакцию с люминолом, изолуминолом [1].

Стоит отметить, что здесь охарактеризованы только наиболее часто применяемые хемилюминесцентные зонды. Количество веществ, чувствительных к радикалам и усиливающих клеточную хемилюминесценцию, достаточно велико. Например, к ним относятся L012, целентеразин, MCLA [62] и др.

Метод люминол-зависимой хемилюминесценции широко применяется в судебно-медицинской экспертизе для определения следов крови; в медицине для определения крови в моче, при мониторинге АФК в крови при различных заболеваниях [47–50; 53], оценке характера процесса свободнорадикального окисления в крови в зависимости от степени химического загрязнения окружающей среды [41; 66], определении лекарственных средств в моче и сыворотке человека [67]. Также данный метод находит применение в экологическом мониторинге: авторы работ [68–69] предлагают определять ионы металлов в пищевых продуктах и окружающей среде, содержание фенола в воздухе [70], а в работе [71] описан метод для эпидемиологического обследования объектов внешней среды на содержание микроорганизмов, в том числе возбудителей особо опасных инфекций.

Таким образом, хемилюминесцентный метод позволяет определять присутствие АФК, поэтому, изучая влияние различных соединений на кинетику хемилюминесценции, можно оценить их способность защищать организм от действия АФК, т.е. проявлять антиоксидантные свойства.

1.1.4 Активные формы кислорода и антиоксиданты в биологических системах

Активные формы кислорода. Функции в организмах и количественная оценка

Активные формы кислорода (АФК) – это химически-активные, неустойчивые молекулы, имеющие в одном из атомов кислорода неспаренный электрон. К АФК относятся ионы кислорода, свободные радикалы и пероксиды как неорганического, так и органического происхождения. Способность образовывать свободные радикалы связана с уникальными свойствами молекулярного кислорода. В этой молекуле оба атома кислорода соединены только одинарной связью, и при этом на каждом атоме

кислорода имеется один неспаренный электрон, т.е. молекула кислорода является бирадикалом, его основное электронное состояние – триплетное.

В целях достижения химической стабильности свободные радикалы стремятся вернуть себе недостающий электрон, отняв его от любой окружающей молекулы, например, от нуклеиновых кислот [72], белков [73], липидов, тем самым разрушая их. Избыток АФК может инициировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) и белков, инактивацию ферментов и окисление ДНК, что в свою очередь может привести к гибели клетки.

Свободные радикалы в организме подразделяют на 3 группы: первичные, вторичные и третичные.

Первичные свободные радикалы (семихиноны, супероксидный анион-радикал ($\bullet\text{O}_2^-$), гидроксильный ($\bullet\text{OH}$) и пероксидный ($\text{HO}\bullet_2$) радикалы, перекись водорода (H_2O_2), пероксидный ион (HO_2^-), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), гипохлорная кислота (HOCl), окись азота ($\text{NO}\bullet$) и пероксинитрит (ONOO^-) и др.) являются эндогенными молекулами, постоянно образуются в клетках и межклеточном пространстве живых организмов как естественный побочный, а иногда и как основной продукт нормального метаболизма кислорода [74–76]. Известно, что 95–98% вдыхаемого молекулярного кислорода расходуется на окислительный метаболизм субстратов и выработку энергии, а 2–5% кислорода переходит в АФК [77]. АФК играют роль медиаторов важных внутриклеточных сигнальных путей (регулируют клеточные процессы: дыхание, деление, индуцируют иммунную систему, мобилизуют системы ионного транспорта и запускают запрограммированную клеточную смерть – апоптоз) [76; 78].

Вторичные радикалы ($\bullet\text{OH}$, радикалы липидов, белков и др.) не выполняют физиологически полезных функций, оказывают разрушительное действие на клеточные структуры: стремятся отнять электроны у «полноценных» молекул. Часто «полноценные» молекулы – это молекулы антиоксидантов; антиоксиданты отдают электроны свободным радикалам, обезвреживая их [74–75], образуя третичные радикалы, не способные к разрушающему действию.

В нормально функционирующих клетках организма существует баланс между производством и нейтрализацией радикалов, который осуществляется антиоксидантной системой – системой защиты от повышенной продукции свободных радикалов, контролирующей уровень свободнорадикальных окислительных реакций и

препятствующей накоплению токсичных продуктов окисления [74]. Следовательно, значительная интенсификация свободных радикалов может являться свидетельством наличия в организме патологического процесса [7; 43–54].

Механизм действия антиоксидантной системы направлен на блокирование действия избытка свободных радикалов. Антиоксидантная система биологических систем образована низкомолекулярными антиоксидантами (токоферол (витамин E), ретинол (витамин A), аскорбиновая кислота (витамин C), таурин, восстановленный глутатион, N-ацетилцистеин, мочевины, билирубин, карнозин и др.) и антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы и другие ферменты [74–75; 77–78], катализирующие реакции, в результате которых свободные радикалы и перекиси превращаются в неактивные соединения). Избыточное число свободных радикалов и недостаточная активность антиоксидантной системы приводит к нарушению необходимого внутреннего равновесия процессов окисления и восстановления, что в свою очередь приводит к окислительному (оксидативному) стрессу, который сопровождается активацией перекисного окисления липидов – разрушительной цепной реакцией, губительно действующей на живые клетки [75]. Наиболее чувствительны к ПОЛ полиненасыщенные высшие жирные кислоты липидного бислоя клеточных мембран (фосфолипиды), липопротеинов. Атака кислородными радикалами приводит к образованию гидрофобных радикалов. Образующиеся липидные радикалы, а также малоновый диальдегид могут атаковать молекулы белков и нуклеиновых кислот, что в свою очередь приведет к нарушению этих структур и их функций. ПОЛ изменяет свойства мембран: образуются поры, растет проницаемость мембран и микровязкость, изменяется ионная проницаемость (разрушение ионных каналов и ионных насосов, например, Na, K-АТФазы), в митохондриях повреждаются компоненты дыхательной цепи и ферменты матрикса. Отсюда нарушаются основные обменные и энергетические процессы в клетке, сокращается ее жизнь, она не выполняет свою функцию. Следует отметить, что окислительные процессы, в частности процессы ПОЛ, постоянно происходят в клетках организмов и «имеют важное значение для обновления состава и поддержания функциональных свойств биомембран, энергетических процессов, клеточного деления, синтеза биологически активных веществ, внутриклеточной сигнализации» [79].

Развитие промышленного производства и антропогенное воздействие на

биосферу сформировали к началу 21 века агрессивную по отношению к живым организмам окружающую среду. Токсичные ксенобиотики [77], инфекционные агенты (вирусы, бактерии), поступающие с продуктами питания, питьевой водой и вдыхаемым воздухом, ионизирующая радиация, жесткое ультрафиолетовое излучение и др. стимулируют повышенное образование радикалов в организме или снижают активность антиоксидантной системы организма, что приводит к окислительному стрессу. Известно, что умеренный окислительный стресс может стимулировать пролиферацию клеток или, напротив, запустить процесс запрограммированной гибели клетки – апоптоз [74]. Сильный окислительный стресс приводит к повреждению цитоскелета, генетического аппарата и в результате – к гибели клеток и некрозу тканей. Известно, что старение организма и многие заболевания сопровождаются развитием окислительного стресса [74; 80–85]. Было выполнено большое количество исследований, связанных с применением антиоксидантов в качестве геропротекторов, а также с поиском средств коррекции возрастных патологий у человека [84–85]. Однако методы нейтрализации АФК антиоксидантами часто оказывались малоэффективными.

Пероксид водорода (перекись водорода) – типичный и распространенный представитель АФК. Он является метаболитом кислорода при аэробном метаболизме, окислительно-восстановительная сигнальная молекула клеток, легко проникающая через мембраны.

В работе [86] указано, что распределение H_2O_2 в клетках и тканях животных неоднородно: внутриклеточный физиологический диапазон концентраций H_2O_2 ~ 1–10 нМ (концентрация зависит от типа клеток, у клеток иммунной системы наибольшая внутриклеточная концентрация H_2O_2); внеклеточный – может быть в 100–650 раз выше. При этом внутриклеточная концентрация $H_2O_2 > 100$ нМ приводит к окислительному стрессу (повреждению биомолекул, остановке роста и гибели клеток).

Ионы переходных металлов (например, Fe^{2+}) катализируют разложение перекиси водорода с образованием высокоактивного гидроксильного радикала ($\bullet OH$), обладающего наибольшей цитотоксичностью среди всех представителей группы АФК [74–75; 87]. При этом инициируют повреждения биологических молекул такие процессы, как отрыв атома водорода (при этом повреждаются сахара в составе нуклеозидов ДНК), реакции присоединения по двойным связям (взаимодействие с пиримидинами и пуринами ДНК и РНК), перенос электронов [88]. Прямое повреждение

ДНК радикалами связано с разрывом цепи, образованием гидропероксидов, окислением оснований. Радикал $\bullet\text{OH}$ при взаимодействии с белками образует гидропероксиды, что может изменить третичную структуру белков, вызвать их агрегацию и денатурацию. Результатом этого может быть нарушение ферментативной и регуляторной активности ряда процессов [89]. С липидами (полиненасыщенными жирными кислотами) $\bullet\text{OH}$ образует перекисные соединения [75].

Пероксид водорода – жидкое неустойчивое соединение с формулой H_2O_2 , легко разлагается на воду и атомарный кислород (связь $-\text{O}-\text{O}-$ в молекуле H_2O_2 непрочна), особенно быстро этот процесс протекает в разбавленных растворах пероксида водорода. Также этому может способствовать присутствие ионов переходных металлов, некоторых белков (например, каталазы, глутатионпероксидазы), которые являются катализаторами разложения пероксида водорода [75; 90].

В молекуле H_2O_2 оба атома кислорода находятся в промежуточной степени окисления -1 , что обуславливает способность пероксида выступать как в роли восстановителя, так и окислителя – слабой двухосновной кислоты, диссоциация которой происходит по двум ступеням:



Для этой молекулы наиболее характерны окислительные свойства (окисляет нитриты в нитраты, выделяет йод из йодидов металлов, расщепляет ненасыщенные соединения по месту двойных связей, при этом образуется H_2O или OH^-). Также, воздействуя концентрированным раствором пероксида водорода на некоторые гидроксиды металлов, можно получить соответствующие пероксиды металлов (соли пероксида водорода – Li_2O_2 , MgO_2 , Na_2O_2 , BaO_2 и др.). При взаимодействии с сильными окислителями пероксид водорода выступает в роли восстановителя, окисляясь до атомарного кислорода. Например, пероксид водорода восстанавливает соли золота и серебра, а также марганец при реакции с водным раствором перманганата калия в кислой среде (эту реакцию используют для определения содержания H_2O_2) [90].

Перекись водорода благодаря своим сильным окислительным свойствам используется как ракетное топливо, отбеливатель в текстильном производстве и при

изготовлении бумаги, в производстве дезинфицирующих, отбеливающих средств, пористых материалов (перекись водорода – пенообразователь). В промышленности пероксид водорода применяют в качестве катализатора, гидрирующего, эпоксилирующего агента. Разбавленные растворы перекиси водорода применяются для удобрения растений, обесцвечивания волос и отбеливания зубов, обработки небольших поверхностных ран, а также для растворения пробок в слуховых каналах. Концентрированные растворы перекиси при попадании на кожу, слизистые оболочки и в дыхательные пути вызывают ожоги (деструктивные изменения, сходные с действием щелочей) [91].

Антиоксиданты. Свойства и применение

В химическом смысле антиоксидантами считаются вещества, способные взаимодействовать со свободными радикалами и прерывать процесс цепного свободнорадикального окисления. При этом молекулы антиоксиданта взаимодействуют с активными радикалами, образуя малоактивные радикалы [74; 92–93]. Антиоксиданты делятся на две больших группы в зависимости от их растворимости в воде или в липидах (соответственно гидрофильные или липофильные). Гидрофильные антиоксиданты окисляются в клетке или в межклеточном пространстве, а липофильные антиоксиданты способны защищать клеточные мембраны от ПОЛ [92]. Антиоксиданты могут синтезироваться в организме или поступать в организм из рациона [93].

Природными антиоксидантами являются такие вещества, как фенолы, флавин и флавоноиды, ароматические амины, хиноны, витамины (аскорбиновая кислота (витамин С), токоферол (витамин Е), β -каротин (провитамин А) и др.). [74]). Антиоксиданты входят в состав лекарственных препаратов, многочисленных биологически активных добавок (БАД). Также их применяют в пищевой промышленности в качестве пищевых добавок (консервантов), в парфюмерной промышленности добавляют в жиросодержащую косметику (помады, увлажняющие и смягчающие средства и др.) с целью уменьшения порчи продукции и т.д.; причем используют как природные, так и синтетические антиоксиданты. Следует отметить, что антиоксиданты природного происхождения примерно на 50% более активны, чем синтетические, поскольку последние зачастую представляют собой смеси стереоизомеров. Преимуществом природных соединений является также меньший риск

отрицательных побочных эффектов при длительном использовании [74].

В последнее время часто публикуют результаты широкомасштабных исследований, которые указывают на небезопасность пищевых добавок с антиоксидантами для здоровья человека [94–95].

Таким образом, рассмотренная в подразделе 1.1 информация позволяет предположить, что билюминесцентные тесты могут быть использованы для оценки токсичности и антиоксидантной активности биологически активных соединений – фуллеренолов разной структуры. В данных биотестах токсичность фуллеренолов может оцениваться по изменению интенсивности билюминесценции тестовых систем, а антиоксидантная активность – по изменению токсичности растворов модельных окислителей при добавлении фуллеренолов в качестве антиоксидантов. Хемилюминесцентный люминольный метод позволяет выявить роль АФК в экспериментальных растворах в исследуемых процессах под действием фуллеренолов. По скорости окисления НАДН можно судить о вкладах НАДН-зависимых процессов в ингибирование или активацию билюминесценции фуллеренолами.

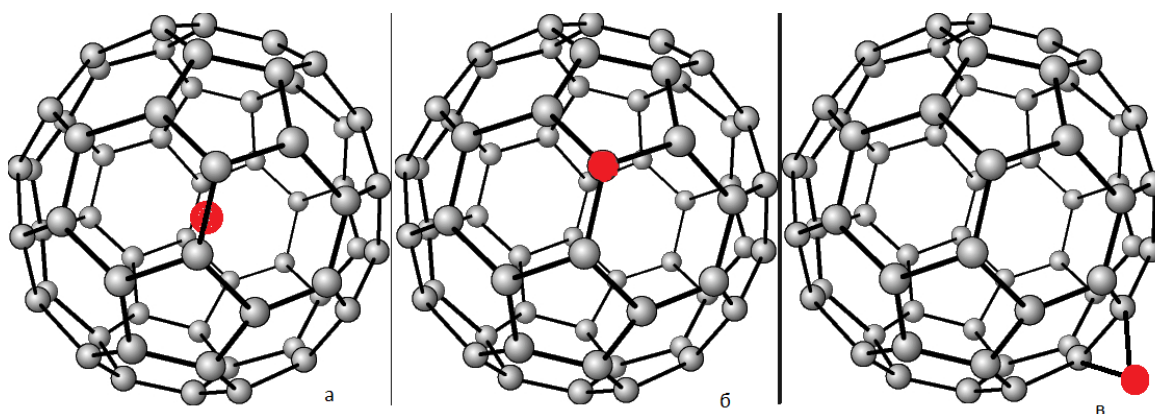
1.2 Фуллерены и их производные: структура, получение, свойства и применение

Фуллерены – аллотропная форма углерода, они в корне отличаются от ближайших сородичей – алмаза и графита. Различия обусловлены тем, что это соединение имеет строго определенное молекулярное, а не только кристаллическое строение. Фуллерены – объемные пустотелые молекулярные соединения. «Фуллеренами» называют замкнутые макромолекулы типа C_{60} , C_{70} , C_{72} , C_{74} , C_{76} , C_{78} , C_{80} и так далее. В этих макромолекулах атомы углерода локализованы в вершинах правильных шестиугольников или пятиугольников на поверхности сферы или сфероида. Термин «фуллерен» берет свое начало от имени американского архитектора Бакминстера Фуллера (1983–1995), который использовал такие структуры при конструировании куполов зданий [96–97].

Фуллерены C_{60} и C_{70} впервые были обнаружены в масс-спектре паров графита в 1985 г. учеными Г. Крото, Р. Керл и Р. Смолли (получившими в 1996 г. Нобелевскую премию за это открытие) [96]. В 1990 г. В. Кречмером и Д. Хафманом был предложен метод выделения фуллеренов из сажи, которая образуется термическим испарением

графита в электрической дуге [98]; при этом фуллерены легко переходят в газовую фазу без разрушения образовавшихся макромолекул. Именно после этой работы начались активные исследования фуллеренов, так как они стали доступны в необходимых количествах. К настоящему времени усовершенствованы процессы выделения и очистки фуллеренов, и это позволило повысить выход продуктов и эффективность их разделения [99–101]. Следует также отметить, что в 1992 г. фуллерены были обнаружены в породах докембрийского периода и в некоторых сортах активированного угля. В природе эти соединения образуются при ударе молнии и горении природного газа [96].

Фуллерены отличаются от других углеродных наноматериалов следующими свойствами: они способны вступать в реакции присоединения по двойным связям (получение экзопроизводных фуллеренов), внедрения атомов внутрь углеродной сферы (получение эндопроизводных) и образования гетерофуллеренов (получение полых макромолекул, обладающих формой, близкой к сферической, в которых один или несколько атомов углеродного каркаса замещены на атомы других элементов) и супрамолекул (получение крупных структур, состоящих из большого числа молекулярных олигомеров) [97]. При этом, экзофуллерены, к которым присоединены только атомы металла, называют фуллеридами; атомы водорода – гидрофуллеренами (или гидридами фуллеренов); гидроксильные группы – фуллеренолами (гидроксифуллеренами или фуллеролами). Сферические модели эндо-, экзо- и гетерофуллеренов приведены на Рисунке 4.



а) эндоэдральный фуллерен, б) гетерофуллерен, в) экзоэдральный фуллерен

Рисунок 4 – Модели макромолекул производных фуллерена C_{60}

Свойства фуллереновых наночастиц зависят от способов их получения и функционализации. В результате функционализации происходит присоединение различных групп, что приводит к образованию гетеро-, эндо- и экзопроизводных фуллеренов [97]). Большое значение имеет морфология фуллеренов – их размеры, форма, рельеф поверхности, аффинность к клеточным структурам. Именно от этих параметров зависят биологические эффекты наночастиц, которые могут меняться от цитопротекторного до цитотоксического [102]. Так, известно, что фуллеренолы размером менее 100 нм характеризуются низкой токсичностью.

Основным механизмом воздействия фуллеренов долгое время считалось образование и регуляция АФК. В последнее время показано, что фуллерены способны внедряться в органеллы клеток (в зависимости от их размеров), встраиваться в структуру белков и ДНК, влияя на их конформационную подвижность и изменения параметры метаболизма [97]. Кроме того, показано, что фуллерены и их производные при облучении в присутствии кислорода не только встраиваются в структуру ДНК, но и разрывают ее, оказывая цитотоксический эффект на опухолевые клетки. Фуллерены, а особенно их водорастворимые производные – фуллеренолы – рассматриваются в наномедицине как перспективные агенты. Разрабатываются методы использования фуллеренов и их производных в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии, антиоксидантов, противоопухолевых, бактерицидных агентов, а также противовирусных препаратов, способных подавлять активность различных штаммов вируса гриппа, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатита С и др. Перспективно также создание агентов для адресной доставки лекарственных веществ в организмах [103–106]. В радиомедицине уделяется особое внимание редокс-активным производным фуллеренов, включающим атомы металлов переменной валентности [107–108], способным влиять на редокс процессы в биохимических циклах; при этом эти вещества более стабильны, чем использующиеся хелатные комплексы [109]. На сегодняшний день хорошо изученными считаются фуллерены C_{60} и C_{70} и их производные. Свойства высших фуллеренов (C_{72} , C_{74} , C_{76} и т.д.) и их производных изучены слабо, т.к. исследование усложняется в связи с их высокой химической активностью.

1) Фуллерены C_{60} и C_{70}

Из всех известных фуллеренов молекула C_{60} характеризуется наибольшей симметрией и, как следствие, наибольшей стабильностью. Как видно из Рисунка 5,

фуллерен C_{60} напоминает футбольный мяч и имеет структуру правильного усеченного икосаэдра; атомы углерода которого располагаются на сферической поверхности в вершинах двадцати правильных шестиугольников и двенадцати правильных пятиугольников [96; 110–111]. Размер молекулы C_{60} равен 1,6–1,8 нм [97].

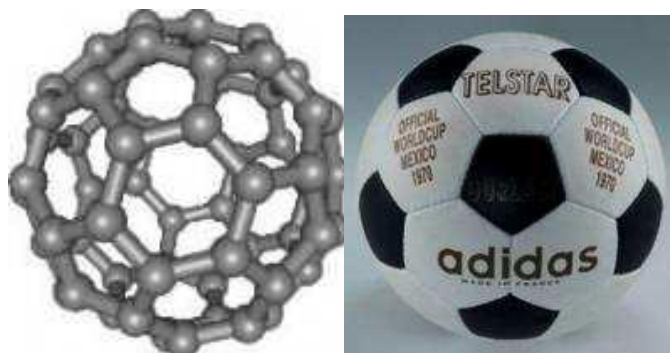


Рисунок 5 – Молекула C_{60} и футбольный мяч [96]

Фуллерен C_{70} отличается от фуллерена C_{60} вставкой пояса из 10 атомов углерода в экваториальную область углеродного каркаса C_{60} , в результате этого молекула C_{70} оказывается вытянутой и напоминает по форме регбийный мяч (Рисунок 6) [97].

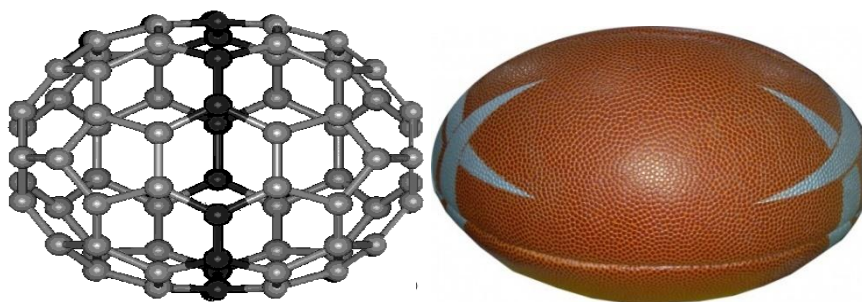


Рисунок 6 – Молекула C_{70} и регбийный мяч

Фуллерены – единственная растворимая форма наночастиц углерода. Так, фуллерены C_{60} и C_{70} практически нерастворимы в полярных растворителях (воде, ацетоне, этаноле, тетрагидрофуране), но хорошо растворяются в неполярных растворителях (хлорбензоле, о-дихлорбензоле, бензоле и толуоле) с образованием растворов, окрашенных в красно-фиолетовый (C_{60}), или темно-коричневый (C_{70}) цвет [110–113]. Тот факт, что фуллерены гидрофобны и не растворимы в водных средах, затрудняет изучение их фармакологических свойств.

Поскольку фуллерены являются электронодефицитными сферическими полиеновыми молекулами (содержат двойные связи), то они главным образом

участвуют в реакциях нуклеофильного, радикального и циклоприсоединения, способны образовывать комплексы с переходными металлами, также фуллерены можно гидрировать, галогенировать и даже окислять, хотя окисление в меньшей степени присуще электронодефицитной молекуле фуллерена [114] (например, фуллерен C_{60} может акцептировать до 12 электронов, а отдавать 1 электрон, т. е. заряд каркаса C_{60} может меняться от +1 до -12). Участие фуллеренов в перечисленных реакциях позволяет получать различные производные фуллерена, в том числе и водорастворимые.

В последнее время в литературе широко обсуждается вопрос о токсичности и антиоксидантной активности фуллеренов. Известно, что при облучении светом C_{60} и некоторые его производные способны генерировать АФК, что обуславливает их прооксидантную активность. Так, например, в работе [115] говорится о потенциальной цитотоксичности фуллерена C_{60} . Также достаточно давно известна способность фуллеренов взаимодействовать со свободными радикалами. Считается, что мощная антирадикальная активность фуллеренов определяется электронодефицитными свойствами системы 30 сопряженных двойных связей, что делает молекулу C_{60} весьма эффективным акцептором свободных радикалов. Одна молекула C_{60} может нейтрализовать более 20 свободных радикалов. Показано, что мишенью для радикала являются sp^2 -гибридизованные атомы углерода. При увеличении числа аддендов (например, при решении проблемы растворимости фуллеренов) снижается антиоксидантная активность, поскольку sp^2 -гибридизованные атомы углерода переходят в sp^3 -гибридизацию, снижая количество π -электронов, доступных для радикальной атаки [116–117]. Вместе с тем, такое традиционное представление о причинах антирадикальной активности фуллеренов не учитывает результаты исследования коллектива ученых из Франции, Англии и Германии (2000 г.). Ими было показано, что водорастворимые производные фуллерена C_{60} с различным количеством двойных связей в фуллереновом каркасе, характеризуются сходной антирадикальной активностью; при этом, нейтрализация АФК происходит без их непосредственного взаимодействия с фуллереновым каркасом. Такие неожиданные факты свидетельствуют о том, что «антирадикальная активность фуллеренов не связана напрямую с химическими свойствами фуллеренового каркаса, а обусловлена особенностями влияния фуллеренов на свойства водной среды, которая их непосредственно окружает» [118]. Кроме того, в 2004 г. обнаружилось, что производные фуллерена C_{60} действуют как катализаторы

рекомбинации и имитируют действие супероксиддисмутазы – фермента, участвующего в нейтрализации супероксид анион радикала, который является побочным и токсичным продуктом метаболизма клетки. Было показано, что нейтрализация происходит без непосредственного взаимодействия фуллеренового каркаса с кислородными радикалами [119].

Классические антиоксиданты – это молекулы восстановителей, они расходуются в ходе реакции. При этом, встретив свободный радикал, молекула антиоксиданта модифицируется, образуя нетоксичное соединение; на нейтрализацию одного радикала идет одна молекула антиоксиданта. Фуллерены – это катализаторы рекомбинации и нейтрализации свободных радикалов. В ходе реакции фуллерены, как и катализаторы, не расходуются, поэтому даже микродозы фуллерена (0,001–0,01%) действуют так же эффективно, как другие антиоксиданты в концентрациях, на порядки больших. По своему действию фуллерены аналогичны витаминам, но гораздо эффективнее их [120].

2) Эндоедральные металлофуллерены

В связи с полым строением фуллерены способны удерживать атомы, ионы и молекулы внутри фуллеренового каркаса, образуя эндоедральные фуллерены (см. подраздел 1.2, Рисунок 4), отличающиеся от немодифицированных фуллеренов физико-химическими свойствами [121]. Внутри макромолекулы эндоедрального металлофуллерена (ЭМФ) находится ион металла, и его валентные электроны принимаются π -системой углеродного скелета. Это оказывает влияние на характер межмолекулярного взаимодействия фуллеренов в кристалле: к слабому Ван-дер-ваальсову взаимодействию добавляется более интенсивное ковалентное взаимодействие, что придает кристаллу большую стабильность и механическую прочность. Ион металла внутри макромолекулы ЭМФ расположен со смещением относительно центра фуллеренового каркаса. За счет этого макромолекулы ЭМФ характеризуются электрическим дипольным моментом [122].

В зависимости от размера фуллерена, типа и количества инкапсулированных атомов, эндоедральные металлофуллерены могут иметь свойства металла, полупроводника с малой полосовой щелью или диэлектрика. В частности, при введении ионов редкоземельных элементов можно ожидать возникновения дипольного или магнитного момента [122].

Например, атомы гадолиния могут удерживаться в структуре фуллерена и формировать ЭМФ. Инкапсуляция электроположительного атома Gd приводит к переносу электронов из атома Gd в электроотрицательную структуру фуллерена, в результате чего образуется цвиттер-ион $[Gd^{3+}@C_{82}^{3-}]$, молекула $Gd@C_{82}$ имеет значительный дипольный момент $\sim 4D$ [123]. Это является причиной упорядоченного расположения эндодральных молекул ЭМФ в кристалле и объясняет спонтанную электрическую поляризацию кристаллов (сегнетоэлектрические свойства).

Известно, что гадолиний обладает уникальными парамагнитными свойствами, широко применяется в качестве контрастного агента (увеличивает скорость релаксации протонов воды) для магниторезонансной томографии (метод диагностического обследования пациентов, использующий магнитное поле и импульсы радиоволновой энергии для получения изображений органов и структур внутри тела). Однако, несмотря на широкое распространение, существующие на сегодняшний день коммерческие препараты на основе гадолиния (гадодиамид, гадопентетат димеглюмин, гадотерат меглюмин [124–125]) имеют ряд существенных недостатков, например, приводят к тяжелым кожным и системным заболеваниям, нарушениям функции почек, внутричерепному осаждению гадолиния и т.д. На сегодняшний день клиническое применение химиотерапевтических препаратов на основе гадолиния ограничено их токсичностью. Возможно, применение ЭМФ с гадолинием [104; 121; 126–129], в котором ионы Gd помещены в оболочку фуллерена, позволит избежать этого недостатка, поскольку высокая химическая стабильность предотвращает распад фуллеренов в различных биологических средах и предотвращает высвобождение токсичных ионов Gd^{3+} .

3) Водорастворимые производные фуллеренов – фуллеренолы

Фуллерены практически нерастворимы в полярных растворителях [111] (растворимость в воде $< 10^{-9}$ г/л), но возможно получение водорастворимых форм фуллеренов [110; 130–131]. В настоящее время во всем мире уделяется самое пристальное внимание перспективам применения водорастворимых производных фуллеренов в физике, химии, области нанобиотехнологии, фармакологии и медицины. Так, в работах [97; 132] показано, что фуллерены и их разнообразные водорастворимые производные могут выступать как цитопротекторы, так и как цитотоксические агенты.

Наиболее перспективными водорастворимыми производными фуллеренов с точки зрения использования в физике, химии, нанобиотехнологии, фармакологии и биомедицине являются биологически активные соединения – фуллеренолы (полигидроксильированные фуллерены). Большинство методов получения фуллеренолов основано на прямом взаимодействии фуллеренов со щелочью в присутствии катализатора, а также на синтезе производных фуллеренов с последующей обработкой щелочью или водой [133]. Модель фуллеренола $C_{60}(OH)_x$ представлена на Рисунке 7.

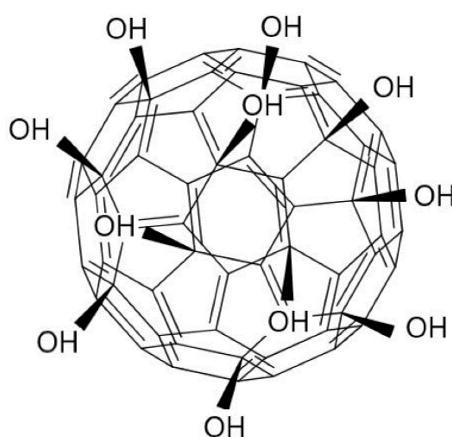


Рисунок 7 – Модель молекулы гидроксильированного фуллерена C_{60} – фуллеренола [134]

Подобно фуллеренам, фуллеренолы являются электронно-дефицитными структурами, и это делает их эффективными катализаторами в химических и биохимических процессах; они представляют собой амфифильные структуры: гидроксильные группы обеспечивают их растворимость в воде, а гидрофобные фрагменты углеродного каркаса – сродством к гидрофобным фрагментам ферментов и липидным структурам клеточных мембран [135–136].

Будучи биологически активными соединениями, фуллеренолы могут проявлять как токсический, так и активирующий эффекты [137–147]. Важной особенностью фуллеренолов является способность проявлять антиоксидантную, и прооксидантную активности. Механизмы антиоксидантного и прооксидантного действия фуллеренолов, предложенные в статье [131], представлены на Рисунках 8–9.

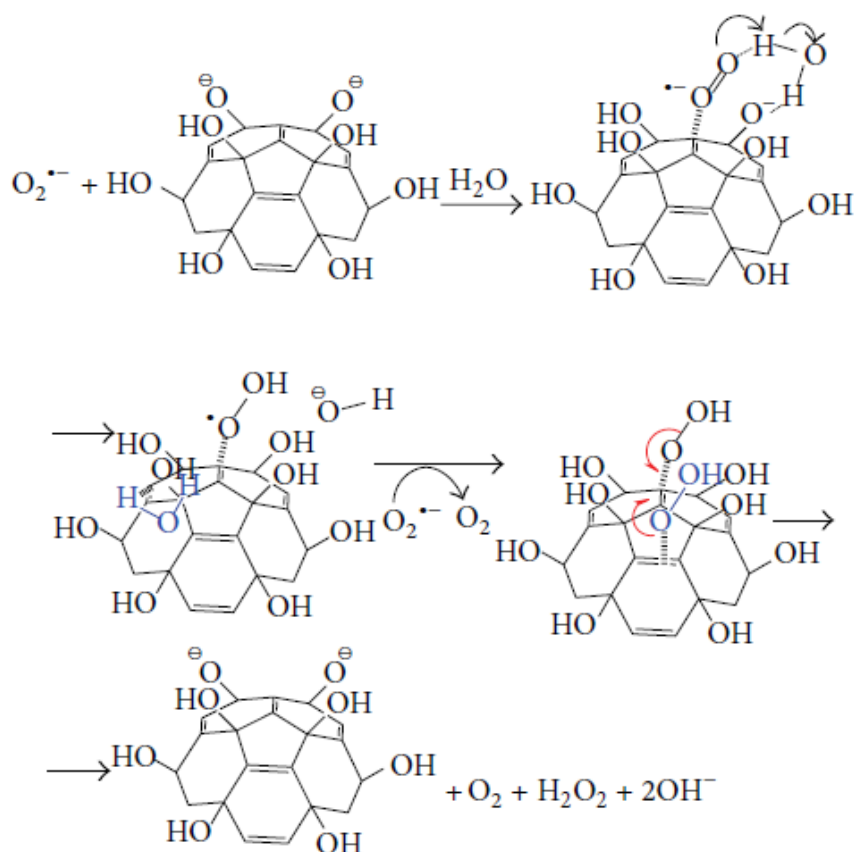


Рисунок 8 – Механизм антиоксидантного действия фуллеренолов [131]

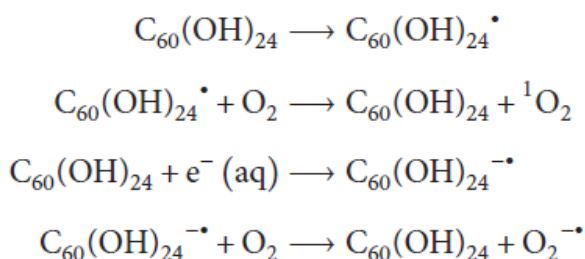


Рисунок 9 – Механизм прооксидантного действия фуллеренолов [131]

Известно, что свободные радикалы в организме способны рекомбинировать (см. подраздел 1.1.1), образуя нетоксичный продукт. При низких концентрациях радикалов их столкновение маловероятно. Фуллеренол выступает в качестве катализатора рекомбинации радикалов, ускоряя этот процесс в сотни и тысячи раз. При этом он собирает свободные радикалы на своей поверхности, где они рекомбинируют, а фуллеренол остается в неизменном виде. На этом и основан механизм антиоксидантной активности фуллеренолов (Рисунок 8) [131]. Благодаря гидрофильным свойствам и способности улавливать активные свободные радикалы, фуллеренолы способны стать серьезной альтернативой традиционным фармакологическим агентам, поскольку они во много раз эффективнее используемых антиоксидантов, таких как, например,

витамины С и Е. Способность фуллеренола $C_{60}(OH)_x$ улавливать свободные радикалы была продемонстрирована *in vivo* и *in vitro* в [148]. Этот фуллеренол не проявлял токсического эффекта, и автор предложил использовать его в составе композиционных биоматериалов, а также в виде компонентов антибактериальных, противовирусных, противогрибковых и противораковых препаратов.

Благодаря способности вызывать гибель клеток, фуллеренолы являются потенциальными противоопухолевыми агентами. В работе [139] был исследован механизм противоопухолевой и антиметастатической деятельности $C_{60}(OH)_{20}$. Мышам с ЕМТ-6 (карциномой молочной железы) вводили 0,1 мл раствора фуллеренола $C_{60}(OH)_{20}$ в концентрации 0,4 мг/мл в течение 16 дней. Было показано, что $C_{60}(OH)_{20}$ модулирует окислительный стресс в клетках карциномы и замедляет образование новых кровеносных сосудов в опухолевых тканях. Кроме того, $C_{60}(OH)_{20}$ активирует перитонеальные макрофаги и ингибирует рост опухоли. При воздействии фуллеренола в диапазоне 0,2–2 мг/кг, продукция фактора некроза опухоли – TNF- α фуллеренол-стимулируемыми макрофагами увеличивалась, при этом не наблюдалось острой токсичности до 5 мг/кг [139].

Биологическую активность ряда полигидроксифуллеренов (фуллеренолов) с различным содержанием гидроксильных групп ($C_{60}(OH)_{12-14}$, $C_{60}(OH)_{18-24}$, $C_{60}(OH)_{30-38}$) изучал Еропкин с соавторами [137]. Было показано, что $C_{60}(OH)_{12-14}$ не растворим в воде и не проявляет биологической активности, а $C_{60}(OH)_{18-24}$, $C_{60}(OH)_{30-38}$ растворяются в воде и проявляют противовирусную активность *in vitro* (против гриппа А (H1N1), свиного гриппа (H3N2), птичьего гриппа (H5N1), вируса герпеса, аденовирусов), при этом $C_{60}(OH)_{18-24}$, $C_{60}(OH)_{30-38}$ не продемонстрировали токсического эффекта на культурах клеток человека и животных (различного тканевого происхождения) в диапазоне концентраций до 1 мг/мл. $C_{60}(OH)_{18-24}$ проявляет максимальную биологическую активность, при этом отмечено, что предварительная инкубация данного фуллеренола с вирусом герпеса и аденовирусом в течение 30 мин или предварительное ультрафиолетовое (УФ) облучение смеси фуллеренол-вирус в течение 5 мин. не влияют на эффективность противовирусной активности фуллеренола. Следовательно, противовирусная активность фуллеренолов не связана с фотодинамическим эффектом, а УФ-защитная и противовирусная активность обусловлена антиоксидантной активностью фуллеренола. Отмечено, что при введении электронодонорных

заместителей (таких как –ОН-группы) в молекулу C_{60} снижается ее электроотрицательность, что уменьшает ее способность взаимодействовать со свободными радикалами, но растворимость полигидроксилированного фуллерена при этом увеличивается. Необходимой для практического применения растворимостью характеризуются производные фуллеренола с 16 и более гидроксильными группами [133; 137]. Таким образом, фуллеренолы могут найти применение в фармакологии в качестве основы для новых эффективных и нетоксичных противовирусных и цитопротекторных препаратов [137].

Стабильность фуллеренолов $C_{60}(OH)_x$ в значительной степени зависит от количества гидроксильных групп на поверхности углеродного каркаса. Фуллеренолы с количеством гидроксильных групп > 36 нестабильны, могут быть структурами с открытыми ячейками, что сильно влияет на их функциональные свойства. Например, не рекомендуется использовать водорастворимые ЭМФ с большим количеством гидроксильных групп (> 36), так как это может привести к высвобождению ионов металлов [149], поэтому в последнее время широко исследуются свойства фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$. В работе [140] сравнивалось противовоспалительное свойство фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$, амифостина и индометацина, их вводили крысам внутривенно в диапазоне доз 12,5–75 мг/кг, 3–10 мг/кг и 50–300 мг/кг, соответственно, за 30 мин до каррагинановой инъекции (вызывает воспаление в организме). Выявлено, что эффект $C_{60}(OH)_{24}$ сравним с индометацином и лучше, чем у амифостина.

В статье Субботиной Т.Ф. [150] изучалось влияние фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ на показатели системы плазменного гемостаза здоровых доноров *in vitro*. Показано, что фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ в микромолярных концентрациях оказывает антикоагулянтный эффект, предположительно являясь ингибитором агрегации фибрина. Эффекты фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ в концентрациях 0,1–100 мкг/мл на эритропоэз изучались на культуре эритробластических островков костного мозга крыс [151]; выяснено, что фуллеренол в концентрациях 10–100 мкг/мл ингибирует пролиферацию эритроидных клеток, подавляет повторное участие макрофагов в эритробластических островках. Следовательно, пациентам с нарушением кроветворения опасно применять фармацевтические препараты, содержащие фуллерены.

Фуллеренолы можно также использовать совместно с медицинскими препаратами, методами лечения заболеваний для уменьшения токсичности. К примеру,

диметилсульфоксид (ДМСО) используется в медицине в качестве растворителя, криопротектора, обезболивающего и противовоспалительного вещества, но в больших количествах ДМСО проявляет побочные действия: нарушает кровоток, снижает внутричерепное давление, способствует отеку тканей, атеросклерозу, воспалительным реакциям, снижает пролиферацию клеток. В работе [141] описано, что $C_{60}(OH)_{24}$ способен уменьшать побочные эффекты ДМСО. В экспериментах *in vivo* также было продемонстрировано, что фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ обладает антипролиферативными свойствами и, благодаря своей способности присоединять свободные радикалы, предотвращает последствия применения доксорубина в химиотерапии рака [142]. Также было показано, что этот фуллеренол обладает радиопротекторными свойствами, и его использование в дозе 40 мг/кг в течение 2 недель перед облучением мышей смертельной дозой гамма-излучения (^{60}Co) приводит к уменьшению смертности мышей за счет повышения иммунитета, улучшения функции митохондрий и снижения окислительных повреждений [143].

Известно, что наночастицы фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ поглощаются клеткой путем эндоцитоза [144]. Так, Vrisebois с соавторами [152] исследовали взаимодействие данного фуллеренола с модельными эукариотическими (бислоем дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФК)/холестерол) и бактериальными (ДПФК/дипальмитоилфосфатидилглицерол (ДПФГ)) мембранами. Было показано, что фуллеренол обладает низким сродством с ДПФК в бислое ДПФК/холестерол и остается на поверхности двухслойной мембраны, наблюдается сродство фуллеренола для анионных фосфолипидов ДПФГ в бислое ДПФК/ДПФГ. Наличие полярной группы (гидроксильный фрагмент) ДПФГ играет большую роль во взаимодействии фуллеренола с мембранами, поскольку он может взаимодействовать с полярными группами фосфотидилглицерина с помощью водородных связей, что в свою очередь приведет к нарушению структурной организации липидного бислоя и вызовет изменение текучести мембраны. Таким образом, взаимодействие фуллеренола с липидами модельной бактериальной мембраны представляет большой интерес для разработки новых антибиотиков.

Изучаются и другие фуллеренолы с большим количеством присоединенных гидроксильных групп. В работе [136] было определено, что фуллеренол $C_{60}(OH)_{36}$ в концентрациях 50–150 мг/л проникает через липидный бислой эритроцитов, увеличивает их текучесть в гидрофобном участке мембраны. Выявлено, что данный

фуллеренол взаимодействует с эритроцитами через –SH группы мембранных белков. Wu с соавторами [153] исследовали взаимодействие фуллеренов/фуллеренолов с модельными белками с использованием вычислительной программы AutoDock 4.0. Было выяснено, что с увеличением размера молекулы фуллерена или фуллеренола увеличивается прочность связи между белком и фуллереном или фуллеренолом.

В работе [145] было выявлено, что во время спонтанной дифференцировки мышечных стромальных преадипоцитов OP9 в адипоциты заметно повышается уровень супероксид анион-радикалов (O_2^-), что сопровождается значительным накоплением внутриклеточных липидов. При добавлении фуллеренола $C_{60}(OH)_{44}$ в культуральную среду происходило снижение концентрации внутриклеточных O_2^- и липидного накопления.

Фуллеренолы $Gd@C_{82}(OH)_x$ перспективны для использования в медицинской диагностике в качестве новых парамагнитных контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии, а также в качестве противоопухолевого агента. Стоит отметить, что с увеличением количества –ОН-групп, увеличивается протонная релаксивность, а, следовательно, и сигнал при диагностике, что позволяет использовать меньшую концентрацию $Gd@C_{82}(OH)_x$. Было выявлено, что релаксивность у всех исследуемых $Gd@C_{82}(OH)_x$ выше, чем у используемого в медицинской практике хелатного комплекса Gd-diethylenetriaminepentaacetic acid [154].

Приведем пример возможного применения часто изучаемого эндоэдрального Gd-содержащего фуллеренола $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$. Противоопухолевая активность $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ изучается с 2005 г. Так, например, Chen и соавторы определили, что частицы фуллеренола $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ (размером 22 нм в физиологическом растворе) с уровнем дозы всего 10^{-7} моль/кг проявляли высокую противоопухолевую эффективность ($\approx 60\%$) у мышей. Увеличение дозы наночастиц до 2×10^{-7} моль/кг повысило ингибирование роста опухоли на 26%. Помимо этого, данные наночастицы обладают выраженной способностью повышать иммунитет и препятствовать инвазии опухоли в нормальные мышечные клетки, с низким уровнем токсичности *in vivo* и *in vitro*. В отличие от обычных противоопухолевых химических веществ, высокая противоопухолевая эффективность наночастиц не была обусловлена токсическим воздействием на клетки, поскольку они не убивали опухолевые клетки непосредственно, и только около 0,05% использованной дозы обнаруживается в опухолевых тканях, что

свидетельствует о том, что противоопухолевый эффект не связан с накоплением фуллеренолов в клетках опухоли [146]. Последующие исследования показали, что наночастицы могут регулировать окислительный стресс в опухолевых клетках *in vivo* и действуют как поглотитель АФК, что может быть причиной их противоопухолевой активности [155–156]. В 2009 г. Zhao с соавторами обнаружили, что наночастицы усиливают иммунные реакции и стимулируют иммунные клетки выделять больше цитокинов Th1, тем самым помогают уничтожать опухолевые клетки [157]. В 2010 г. Liang и соавторы показали, что наночастицы действуют как эффективные ингибиторы ангиогенеза, подавляя множество ангиогенных факторов [158]. Также существуют данные о другом противоопухолевом механизме фуллеренола – стимуляция экспрессии коллагена, который изолирует опухоль от других клеток [147].

Таким образом, фуллерены и их производные являются перспективными наноразмерными фармацевтическими агентами, изучение их биологической активности является актуальной задачей.

1.3 Модельные окислители. Свойства и применение

Для создания модельного окислительного стресса использовали растворы модельных окислителей, свойства которых описаны в данном подразделе.

1.3.1 Феррицианид калия

Красная кровяная соль, красное синькалии, железосинеродистый калий, феррицианид калия, гексацианоферрат калия – комплексное соединение трехвалентного железа, $K_3[Fe(CN)_6]$. Представляет собой темно-красные кристаллы, которые не растворяются в этаноле, но хорошо растворяются в воде (растворимость 48,8 г / 100 мл при 25° С) и образуют зеленовато-желтый раствор. На свету в водном растворе соль $K_3[Fe(CN)_6]$ постепенно переходит в $K_4[Fe(CN)_6]$ и происходит быстрое увеличение рН водного раствора, при помещении в темноту кислотность уменьшается. Это связано со светочувствительностью обратимых реакций:



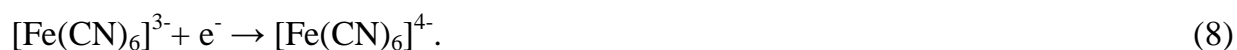
Феррицианид калия – сильный окислитель, особенно активно действующий в щелочной среде. При этом он окисляет H_2S до S , HI до I_2 , PbO до PbO_2 , NH_3 до N_2 и солей аммония [159–160]. В среде едкого кали феррицианид калия реагирует с перекисью водорода с выделением кислорода и образованием гексацианоферрата калия; в нейтральной среде эта реакция протекает в обратную сторону:



Феррицианид калия имеет низкую токсичность. Основной опасностью является то, что это вещество может раздражать глаза и кожу. Однако $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ при взаимодействии с сильными кислотами разлагается с выделением высокотоксичной синильной кислоты (цианистого водорода).

В технологических процессах $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ используют как компонент тонирующих, отбеливающих, усиливающих, ослабляющих растворов в фотографии, в светокопировании; для закалки металла; в производстве пигментов, пиротехнических смесей (для твердых ракетных топлив и в качестве заменителей порохов); как электролит в хемотронных приборах, компонент электролитов в гальванопластике, реагент для обнаружения BaO_2 , Fe^{2+} , Li^+ , Sn^{2+} .

Редокс-система $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (8) – детально исследованная модельная система в кинетике гомогенных процессов переноса электрона:



В настоящее время данная система находит широкое применение в исследованиях [22; 25; 161], т.к. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ стабилен в водных растворах (не гидролизует, в отличие от некомплексных солей железа), а восстановление ионов Fe^{3+} до Fe^{2+} представляет собой быстрый и обратимый одностадийный процесс [162].

1.3.2 Пара-бензохинон

Пара-бензохинон (2,5-циклогексадиен-1,4-дион, 1,4-бензохинон, пара-хинон) представляет собой химическое соединение с формулой $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$, которое относится к классу хинонов. Хиноны являются продуктами окисления фенолов; они более токсичны,

чем соответствующие им фенолы, их предельно допустимые концентрации (ПДК) на порядки ниже (ПДК 1,4-бензохинона равно 5×10^{-5} мг/л, а соответствующего ему дифенола (1,4-гидрохинона) – 2×10^{-1} мг/л).

Бензохинон в чистом виде – ярко-желтые кристаллы с характерным раздражающим запахом, который напоминает запах хлора или плавящегося пластика. Кристаллы 1,4-бензохинона растворимы в ацетоне, бензоле, диэтиловом эфире и этаноле, растворимость в воде 0,7% (5 °С), 1,5% (30 °С). Бензохинон летуч с водяным паром, устойчив к кислотам [163].

Бензохинон применяется при производстве гидрохинона и красителей [163], как исходное вещество в многочисленных синтезах и как окислитель в органическом синтезе, поэтому гидрохинон и 1,4-бензохинон являются широко распространенными химическими загрязнителями поверхностных водных объектов, используемых человеком в хозяйственно-питьевых целях [164]. Также 1,4-бензохинон содержится в выхлопных газах автомобилей [167].

Бензохинон – метаболит бензола (содержится в сигаретном дыме [165–166]), обнаруживается в крови человека и животных; оказывает сильное раздражающее действие на слизистые оболочки, кожные покровы (вызывает эритему – покраснение, сыпь на коже), глаза, кровь (вызывает превращение гемоглобина в метгемоглобин, что приводит к анемии) и печень [163; 168]. Так, например, в работе [169] изучалось воздействие 1,4-бензохинона на эритроциты человека. Было выявлено, что бензохинон при инкубации с эритроцитами проявляет себя как инициатор окислительного стресса, под его воздействием происходит развитие свободнорадикального окисления, сопряженного с одновременной активацией ферментов антиоксидантной системы эритроцитов. Также известно, что 1,4-бензохинон повреждает кроветворные органы и вызывает гемопоэтические злокачественные опухоли (миелодиспластический синдром и миелоидный лейкоз) [170].

Биологическая активность хинонов связана с их физико-химическими свойствами. Наиболее важные физико-химические характеристики хинонов – окислительно-восстановительные потенциалы, константы диссоциации, полярность их фрагментов, определяющие их влияние на окружение в биологических системах [171].

Предполагается, что токсические эффекты хинонов связаны с двумя механизмами воздействия на биологические молекулы:

1. Образование ковалентных связей с биологическими молекулами [172];

2. Продукты превращения хинонов могут переносить электроны на молекулярный кислород, что сопровождается инициацией каскада кислородных радикалов (АФК). Активируемое таким образом превращение субстратов образованием кислородных радикалов, обозначается как «окислительно-восстановительный цикл» [172–174].

Химические свойства 1,4-бензохинона:

1) Подобно ненасыщенным кетонам, 1,4-бензохинон способен к присоединению по кратным связям, при этом продукты присоединения могут окисляться избытком исходного хинона, если их окислительно-восстановительный потенциал ниже, чем у хинона [163].

2) В водном растворе происходит восстановление хинона в гидрохинон (Рисунок 10). Этот процесс является быстрым, количественным и обратимым. Бензохинон также легко и обратимо восстанавливается H_2 (катализатор диоксид платины), SO_2 , гидразином в 1,4-дигидрохинон [163].

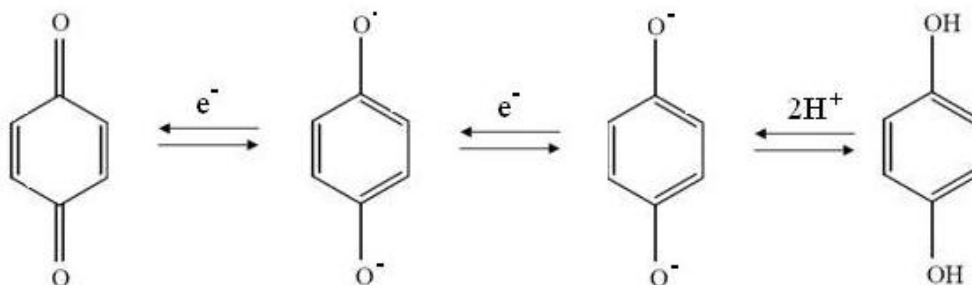


Рисунок 10 – Процесс восстановления 1,4-бензохинона в гидрохинон [163]

Процесс преобразования хинона в гидрохинон происходит в результате присоединения одного электрона и приводит к образованию промежуточного продукта – семихинона-радикала, который при присоединении еще одного электрона дает дианион, а в кислой среде превращается в двухатомный фенол (Рисунок 10) [163]. Семихинон и дианион могут запускать активацию свободнорадикальных реакций на клеточном уровне, а также участвовать в них [75].

2) Бензохинон под действием перекиси водорода также восстанавливается до менее токсичной формы – гидрохинона (Рисунок 10), но в щелочной среде 1,4-бензохинон образует эпоксигидрохинон, превращающийся в кислой среде в гидроксихинон, этот процесс представлен на Рисунке 11 [163].

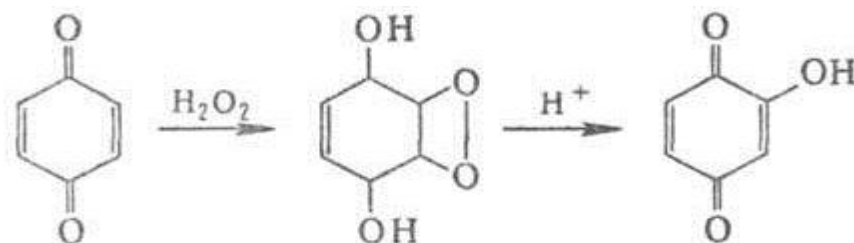


Рисунок 11 – Процесс преобразования 1,4-бензохинона в эпоксигидрохинон, гидроксихинон [163]

Таким образом, рассмотренные свойства 1,4-бензохинона, $K_3[Fe(CN)_6]$ (подраздел 1.3) позволяют их использовать в качестве сильных модельных окислителей в экспериментах по изучению антиоксидантной (детоксицирующей) активности различных веществ.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Регистрация интенсивности биолюминесценции и хемилюминесценции

Для регистрации кинетики биолюминесцентного и хемилюминесцентного сигналов были использованы планшетные биохемилюминометры TriStar Multimode Microplate Reader LB 941 (Berthold technologies, Германия) и Luminoskan Ascent (Thermo Electron Corporation, США). Эти приборы работают в режиме счета импульсов. Основа биохемилюминометров – ФЭУ, который преобразует световой сигнал в электрический. Биохемилюминометры TriStar LB 941 и Luminoskan Ascent измеряют световой поток автоматически по заданной программе (задается при помощи программного обеспечения – ПО), при этом регистрация кинетики биолюминесцентного или хемилюминесцентного сигналов происходит сразу же после запуска реакции, что обеспечивает точность измерений и возможность сравнивать данные. Кроме того, ПО и устройство прибора позволяют провести одновременно измерение в 96 лунках микропланшета в течение большого промежутка времени.

Анализ образцов проводили при комнатной температуре. Для проведения экспериментов использовали 96-луночные микропланшеты для биохемилюминометра, микропипетки емкостью от 5 до 5000 мкл, флаконы и пробирки емкостью 1,5–10 мл и другое лабораторное оборудование и посуду.

2.2 Препараты и реакционные смеси

2.2.1 Используемые реагенты

В работе использовали следующие реагенты:

А) Биолюминесцентные тестовые системы:

i) Интактные бактерии *P. phosphoreum* 1883 IBSO из коллекции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Приготовление бактериальных суспензий: интактные бактерии, выращенные в течение 24 часов (стационарная фаза роста, соответствующая максимальной биолюминесценции) при 25°C на твердой полусинтетической питательной среде, смывали 3%-ым водным раствором NaCl.

ii) Препарат лиофильно высушенных бактерий «Микробиосенсор–677Ф», изготовленный на основе лиофильно высушенных люминесцентных бактерий *P. Phosphoreum 1883 IBSO*. Приготовление бактериальных суспензий: в сосуд с «Микробиосенсором-677Ф» добавляли 2 мл водного раствора NaCl. Для имитации морской среды и для баланса осмотических процессов в бактериях использовали 3%-й водный раствор NaCl (ЗАО Химреактивснаб, Россия). Готовые бактериальные суспензии выдерживали при 4°C в холодильнике в течение 30 мин до начала эксперимента для стабилизации биолюминесценции. Суспензии бактерий во время эксперимента также хранили в холодильнике при 4°C.

iii) Комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ), который включает лиофилизированные препараты люциферазы *P. Leiognathi* (0,5 г/л) и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы из *V. fischeri* (0,15 ед. активности), степень чистоты люциферазы 98% [175]. Во флакон КРАБа вносили 2 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера (pH 6,8), содержимое флакона перемешивали. Так же, как и в случае с бактериальными суспензиями, готовые растворы КРАБа выдерживали при 4°C в холодильнике в течение 30 мин до начала эксперимента для стабилизации биолюминесценции, а во время эксперимента хранили в холодильнике при 4°C. Для приготовления ферментативной системы использовали следующие химические препараты: никотинамиддинуклеотид восстановленный (НАДН) (ICN, США), флавинмононуклеотид (ФМН) (SERVA, Германия), тетрадеканаль (RCHO) (Serva, Германия). Навески НАДН растворяли в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 6,8), ФМН – в дистиллированной воде. Раствор 0,0025% тетрадеканаля (RCHO) готовили путем добавления к 0,25%-ному спиртовому раствору альдегида (50 мкл) 5 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера (pH 6,8). Препараты «Микробиосенсор–677Ф» и КРАБ (биолюминесцентные системы ii и iii, соответственно) были произведены в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск).

Б) Смеси для хемилюминесцентного люминольного анализа:

Для проведения экспериментов с хемилюминесцентной люминольной реакцией использовали следующие химические реагенты: люминол, гидроксид калия (KOH) (ЗАО Химреактивснаб, Россия), $K_3[Fe(CN)_6]$ марки «ч» (Химреактив, Россия). Маточный раствор люминола готовили следующим образом: 0,018 г сухого люминола растворяли в 5 мл 1N водного раствора KOH, затем добавляли 5 мл дистиллированной

воды. Затем маточный раствор разводили дистиллированной водой до получения водно-щелочного раствора люминола концентрации 2×10^{-4} М. Содержание АФК определяли в смесях различного состава. Хемилюминесцентную люминольную реакцию запускали раствором $K_3[Fe(CN)_6]$ с использованием инжекторной системы билюминометров TriStar LB 941 и Luminoskan Ascent. Регистрировали сигнал хемилюминесценции. В момент введения $K_3[Fe(CN)_6]$ в смесь наблюдалась быстрая вспышка хемилюминесценции, отражающая усиление свободно-радикального окисления люминола (острый пик на кинетической кривой хемилюминесценции). Содержание АФК в исследуемых смесях оценивали по максимальному значению интенсивности хемилюминесценции (I_{max}).

В качестве модельных окислителей для билюминесцентных систем использовали феррицианид калия ($K_3[Fe(CN)_6]$) марки «ч» (Химреактив, Россия) и 1,4-бензохинон (Sigma-Aldrich, США), для хемилюминесцентной люминольной реакции – 1,4-бензохинон. Для билюминесцентной ферментативной системы 1,4-бензохинон готовили в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 6,8) (при проведении хемилюминесцентной реакции в ферментативной системе 1,4-бензохинон растворяли в дистиллированной воде), $K_3[Fe(CN)_6]$ – в дистиллированной воде; для бактериальной системы $K_3[Fe(CN)_6]$ и 1,4-бензохинон растворяли в 3%-ом водном растворе NaCl.

В качестве биологически активных соединений использовали фуллеренолы с различным содержанием гидроксильных групп, различным углеродным каркасом и присутствием экзо- и эндогенного атома металла (железа и гадолиния, соответственно). Химические формулы фуллеренолов приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Химические формулы фуллеренолов

Химическая формула	x + y
$C_{60}O_y(OH)_x$	10–12
$C_{60}O_y(OH)_x$	24–28
$C_{60,70}O_y(OH)_x$	24–28
$C_{60,70}O_y(OH)_x$	40–42
$Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$	40–42
$Gd@C_{82}O_y(OH)_x$	40–42
$Gd@C_{82}O_y(OH)_x$	20–24

Фуллеренолы были получены в Институте физики им. Л.В. Киренского СО РАН (Красноярск, Россия) [133; 176]. Методики получения и характеристики фуллеренолов приведены в приложении Б.

2.2.2 Приготовление реакционных смесей

(А) Лиофилизированные и интактные бактерии *Photobacterium phosphoreum*

Для определения интенсивности биолюминесценции контрольного образца, I_o , в каждую лунку микропланшета биолюминометра вносили:

10 мкл суспензии лиофилизированных или интактных бактерий;

240 мкл 3%-го раствора NaCl;

5 мкл дистиллированной воды.

Интенсивность биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum* в растворе $K_3[Fe(CN)_6]$ или 1,4-бензохинона, I_{Ox} , измеряли в смеси следующего состава:

10 мкл суспензии лиофилизированных или интактных бактерий;

240 мкл $K_3[Fe(CN)_6]$ (или 1,4-бензохинона);

5 мкл дистиллированной воды.

Интенсивность биолюминесценции в растворах модельных окислителей ($K_3[Fe(CN)_6]$ или 1,4-бензохинона), I_{Ox} , сопоставляли со свечением контрольного образца, I_o : $I^{rel} = I_{Ox} / I_o$. Варьировали концентрации окислителей; строили зависимость I^{rel} от концентрации модельных окислителей. Определяли концентрацию, ингибирующую биолюминесценцию бактериальной системы на 50% (EC_{50}) и использовали ее в экспериментах по изучению антиоксидантной активности фуллеренолов.

В смеси следующего состава измеряли интенсивность биолюминесценции бактерий в растворах фуллеренолов, I_ϕ :

10 мкл суспензии интактных или лиофилизированных бактерий;

240 мкл 3%-го раствора NaCl;

5 мкл раствора фуллеренола.

Измеряли интенсивность биолюминесценции в присутствии фуллеренола, I_ϕ , затем сопоставляли ее с аналогичной величиной, измеренной для контрольного образца, I_o : $I^{rel} = I_\phi / I_o$. Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимости I^{rel} от концентрации фуллеренолов. Отрицательная величина относительной интенсивности

билюминесценции $I^{rel} < 1$ соответствовала токсическому эффекту фуллеренола. Определяли EC_{50} ($I^{rel} = 0,5$) и использовали ее для сравнения токсичности фуллеренолов.

Интенсивности билюминесценции бактерии в растворах модельных окислителей (1,4-бензохинона и $K_3[Fe(CN)_6]$) и фуллеренолов, $I_{Ox+\phi}$, измеряли в смеси следующего состава:

10 мкл суспензии лиофилизированных или интактных бактерий;

240 мкл $K_3[Fe(CN)_6]$ (или 1,4-бензохинона) (EC_{50});

5 мкл фуллеренола.

Измеряли интенсивность билюминесценции в данных смесях, $I_{Ox+\phi}$; затем сопоставляли ее с билюминесценцией контрольного образца – аналогичного раствора без фуллеренола, I_{Ox} и рассчитывали коэффициенты антиоксидантной активности по изменению общей токсичности растворов модельных окислителей (см. подраздел 2.3): $K_{GT} = I_{Ox+\phi} / I_{Ox}$. Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимости K_{GT} от концентрации фуллеренолов.

Общий объем смеси – 255 мкл.

(Б) Билюминесцентная ферментативная тестовая система

Исследовали действие модельных окислителей и фуллеренолов на интенсивность билюминесценции системы двух сопряженных ферментативных реакций.

Для определения интенсивности билюминесценции контрольного образца, I_o , в лунку микропланшета билюминометра вносили:

раствор КРАБа, 2,5 мкл;

0,0025%-й раствор альдегида RCHO, 25 мкл;

0,05 М калий-фосфатный буфер, рН 6,8, 75 мкл;

$5,4 \times 10^{-4}$ М раствор ФМН, 25 мкл;

дистиллированную воду, 27,5 мкл (или 25 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера и 2,5 мкл дистиллированной воды);

4×10^{-4} М раствор НАДН, 100 мкл.

Интенсивность билюминесценции ферментативной системы в растворе $K_3[Fe(CN)_6]$ или 1,4-бензохинона, I_{Ox} , измеряли в растворе следующего состава:

раствор препарата ферментов КРАБ, 2,5 мкл;

0,0025%-й раствор альдегида, 25 мкл;

0,05 М калий-фосфатный буфер, рН 6,8, 75 мкл;
 $5,4 \times 10^{-4}$ М раствор ФМН, 25 мкл;
 раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ (или 1,4-бензохинона), 25 мкл;
 дистиллированная вода, 2,5 мкл;
 4×10^{-4} М раствор НАДН, 100 мкл.

Рассчитывали относительную интенсивность билюминесценции I^{rel} , сопоставляя интенсивность билюминесценции в растворах модельного окислителя, I_{Ox} , с интенсивностью свечения контрольного образца, I_o : $I^{rel} = I_{Ox} / I_o$. Варьировали концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$, 1,4-бензохинона; строили зависимость I^{rel} от их концентраций. Определяли концентрацию модельных окислителей, ингибирующую билюминесценцию на 50% (IC_{50}) и использовали ее в экспериментах по изучению антиоксидантной активности фуллеренолов.

Для исследования влияния фуллеренолов на ферментативную систему, проводили измерения интенсивности свечения, I_ϕ , в растворах следующего состава:

раствор препарата ферментов КРАБ, 2,5 мкл;
 0,0025%-й раствор альдегида RCHO, 25 мкл;
 0,05 М калий-фосфатный буфер, рН 6,8, 100 мкл;
 $5,4 \times 10^{-4}$ М раствор ФМН, 25 мкл;
 раствор фуллеренола, 2,5 мкл;
 4×10^{-4} М раствор НАДН, 100 мкл.

Измеряли интенсивность билюминесценции в присутствии фуллеренола, I_ϕ , сопоставляли ее с интенсивностью свечения контрольного образца, I_o : $I^{rel} = I_\phi / I_o$. Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимости I^{rel} от их концентраций. Отрицательная величина относительной интенсивности билюминесценции $I^{rel} < 1$ соответствовала токсическому эффекту фуллеренола. Определяли IC_{50} ($I^{rel} = 0,5$) и использовали ее для сравнения токсичности фуллеренолов.

Интенсивность билюминесценции ферментативной системы в модельных растворах окислителей ($K_3[Fe(CN)_6]$ или 1,4-бензохинона) и фуллеренолов, $I_{Ox+\phi}$, измеряли в смеси следующего состава:

раствор препарата ферментов КРАБ, 2,5 мкл;
 0,0025%-й раствор альдегида RCHO, 25 мкл;
 0,05 М калий-фосфатный буфер, рН 6,8, 75 мкл;

$5,4 \times 10^{-4}$ М раствор ФМН, 25 мкл;

раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ (или 1,4-бензохинона) 25 мкл (IC_{50});

раствор фуллеренола, 2,5 мкл;

4×10^{-4} М раствора НАДН, 100 мкл.

Интенсивность биолюминесценции $I_{Ox+\phi}$ сопоставляли с биолюминесценцией контрольного образца – аналогичного раствора без фуллеренола, I_{Ox} и рассчитывали коэффициенты антиоксидантной активности, используя характеристики общей токсичности растворов модельных окислителей (см. подраздел 2.3): $K_{GT} = I_{Ox+\phi} / I_{Ox}$. Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимости K_{GT} от концентрации фуллеренолов.

Общий объем смеси составлял 255 мкл.

Запуск реакции осуществлялся добавлением раствора НАДН. Использовали только свежеприготовленные растворы КРАБа, НАДН, ФМН, $K_3[Fe(CN)_6]$, РСНО, 1,4-бензохинона.

(В) Среды для хемиллюминесцентного люминольного анализа

Содержание АФК определяли в дистиллированной воде, 3%-ом растворе NaCl, водных растворах фуллеренолов, 1,4-бензохинона, в системе 1,4-бензохинон + фуллеренол; в бактериальных суспензиях/ферментативной системе; в бактериальных суспензиях/ферментативной системе + фуллеренол; в бактериальных суспензиях/ферментативной системе + 1,4-бензохинон; в бактериальных суспензиях/ферментативной системе + 1,4-бензохинон + фуллеренол (см. подразделы 2.2.2А–Б).

Для определения содержания АФК в смесях разного состава, строили калибровочную кривую с использованием пероксида водорода (H_2O_2) разных концентраций. Разбавленные растворы H_2O_2 готовили из маточного 3%-го раствора H_2O_2 (ООО Тульская фармацевтическая фабрика, Россия) непосредственно перед закапыванием в лунки микропланшета биолюминометра. Регистрировали сигнал хемиллюминесценции (максимум спектра на длине волны 425 нм [177]). Калибровочные кривые получали в дистиллированной воде (для определения АФК в водных системах) (Рисунок 12) и в 3%-ом растворе NaCl (для определения АФК в бактериальных суспензиях и в растворах с 3%-м NaCl) (Рисунок 13).

Для определения концентраций АФК в дистиллированной воде; исследуемых

водных растворах и смесях: фуллеренола, 1,4-бензохинона, 1,4-бензохинона + фуллеренола, ферментативной системы, а также в ферментативной системе + фуллеренол, ферментативной системе + 1,4-бензохинон и в ферментативной системе + 1,4-бензохинон + фуллеренол использовали калибровочную зависимость, связывающую интенсивность хемилюминесценции люминола с концентрацией H_2O_2 . Эта зависимость представлена на Рисунке 12.

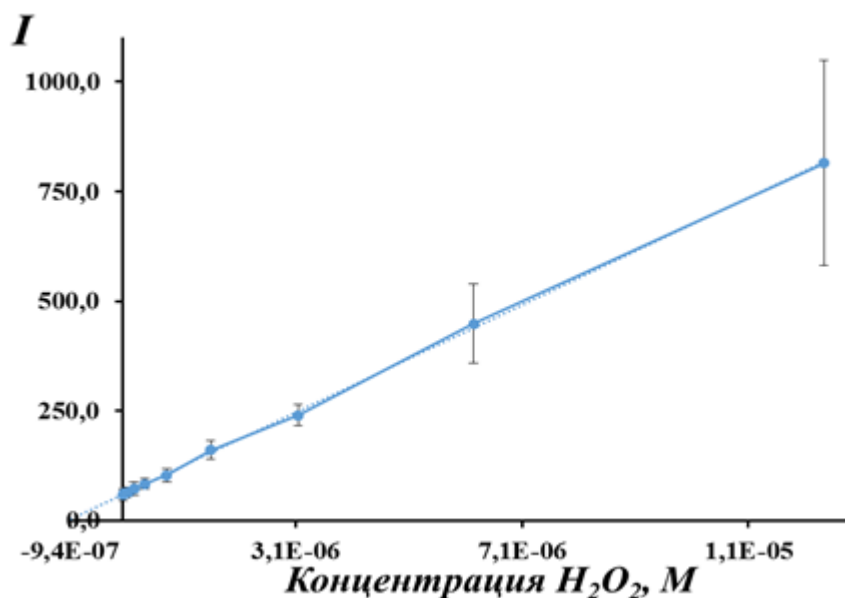


Рисунок 12 – Зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола, I , от концентрации водных растворов H_2O_2

Для получения данной калибровочной кривой в водных растворах в лунку микропланшета биолюминометра вносили:

127,5 мкл водного раствора H_2O_2 ;

80 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4}$ М);

44 мкл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C_{K_3[Fe(CN)_6]} = 1,7 \times 10^{-3}$ М).

Калибровочная кривая аппроксимирована линейной зависимостью с коэффициентом аппроксимации $R^2 = 1$. Уравнение зависимости имело вид:

$$I_{max} = 61171014,28 \cdot C + 59,86, \quad (9)$$

где I_{max} – максимальная интенсивность хемилюминесценции люминола;

C – концентрация H_2O_2 .

Анализ зависимости (9) (Рисунок 12) определяет исходную концентрацию АФК в

дистиллированной воде как $9,4 \times 10^{-7} \text{M}$.

Состав реакционной смеси для определения содержания АФК в дистиллированной воде:

127,5 мкл H_2O ;

80 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4} \text{M}$);

44 мкл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($C_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 1,7 \times 10^{-3} \text{M}$).

Содержание АФК в водных растворах модельного органического окислителя, 1,4-бензохинона, определяли в смеси следующего состава:

115,5 мкл H_2O ;

12,5 мкл раствора 1,4-бензохинона;

80 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4} \text{M}$);

44 мкл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($C_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 1,7 \times 10^{-3} \text{M}$).

Варьировали концентрацию 1,4-бензохинона; строили зависимость относительного содержания АФК, $A\Phi K^{rel}$, от концентрации 1,4-бензохинона.

Состав реакционной смеси для определения содержания АФК в водных растворах фуллеренолов:

125 мкл H_2O ;

2,5 мкл раствора фуллеренола;

80 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4} \text{M}$);

44 мкл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($C_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 1,7 \times 10^{-3} \text{M}$).

Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимости $A\Phi K^{rel}$ от концентрации фуллеренолов.

Состав реакционной смеси для определения содержания АФК в растворах 1,4-бензохинона (IC_{50}) и фуллеренола:

112,5 мкл H_2O ;

12,5 мкл раствора 1,4-бензохинона (IC_{50});

2,5 мкл раствора фуллеренола;

80 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4} \text{M}$);

44 мкл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($C_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 1,7 \times 10^{-3} \text{M}$).

Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимости $A\Phi K^{rel}$ от концентрации фуллеренолов.

Общий объем реакционной смеси – 251,5 мкл.

Измерение хемиллюминисцентного сигнала в ферментативной системе или ферментативной системе + фуллеренол, ферментативной системе + 1,4-бензохинон, ферментативной системе + 1,4-бензохинон + фуллеренол проводилось сразу же после регистрации интенсивности биолюминесценции ферментативной системы (см. подраздел 2.2.2Б) в одних и тех же ячейках добавлением 80 мкл водно-щелочного раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4}$ М) и 44 мкл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C_{K_3[Fe(CN)_6]} = 1,7 \times 10^{-3}$ М). Следует отметить, что каждый компонент системы был уменьшен в объеме в 2 раза (общий объем смеси ферментативной системы – 127,5 мкл) (см. подраздел 2.2.2Б) и приготовлен в дистиллированной воде, без использования калий-фосфатного буфера (см. подраздел 2.2.1).

Для определения содержания АФК в 3%-ом растворе NaCl и в исследуемых растворах 1,4-бензохинона (приготовленного в 3%-ом растворе NaCl) и в системе 1,4-бензохинон (приготовленного в 3%-ом растворе NaCl) + фуллеренол; бактериальных суспензиях, а также в бактериальных суспензиях + фуллеренол, бактериальных суспензиях + 1,4-бензохинон, бактериальных суспензиях + 1,4-бензохинон + фуллеренол использовали калибровочную зависимость интенсивности хемиллюминесценции люминола от концентрации H_2O_2 , которая представлена на Рисунке 13.

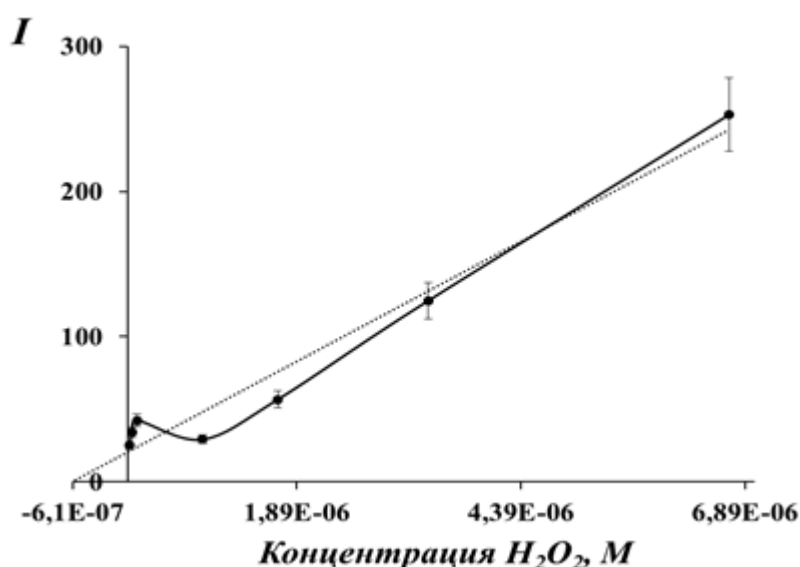


Рисунок 13 – Зависимость интенсивности хемиллюминесценции люминола, I , от концентрации H_2O_2 в 3%-ом растворе NaCl

Для получения данной калибровочной кривой в лунку микропланшета

биолюминометра вносили:

127,5 мкл раствора H_2O_2 (приготовленного в 3%-ом растворе NaCl);

80 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$);

44 мкл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($C_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Калибровочная кривая аппроксимирована линейной зависимостью с коэффициентом аппроксимации $R^2 = 0,97$. Уравнение зависимости имело вид:

$$I_{\max} = 3 \cdot 10^7 \cdot C + 20,358, \quad (10)$$

где I_{\max} – максимальная интенсивность хемилюминесценции люминола;

C – концентрация H_2O_2 .

Анализ зависимости (10) (Рисунок 13) определяет исходную концентрацию АФК в 3%-ом растворе NaCl : $6,1 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Состав реакционной смеси для определения содержания АФК в 3%-ом растворе NaCl :

127,5 мкл 3%-го раствора NaCl ;

80 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$);

44 мкл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($C_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Содержание АФК в водных растворах модельного органического окислителя – 1,4-бензохинона (приготовленных в 3%-ом растворе NaCl) определяли в смеси следующего состава:

115 мкл 3%-го раствора NaCl ;

12,5 мкл раствора 1,4-бензохинона;

80 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}} = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$);

44 мкл раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($C_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Варьировали концентрацию 1,4-бензохинона; строили зависимость $A\Phi K^{rel}$, от концентрации 1,4-бензохинона.

Измерение хемилюминесцентного сигнала в бактериальных суспензиях или бактериальных суспензиях + фуллеренол; бактериальных суспензиях + 1,4-бензохинон + фуллеренол проводилось сразу же после регистрации интенсивности биолюминесценции бактериальных суспензий (см. подраздел 2.2.2А) в одних и тех же ячейках добавлением 80 мкл водно-щелочного раствора люминола ($C_{\text{люминола}} =$

2×10^{-4} М) и 44 мкл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($C_{K_3[Fe(CN)_6]} = 1,7 \times 10^{-3}$ М). Следует отметить, что каждый компонент системы был уменьшен в объеме в 2 раза (общий объем смеси бактериальной системы – 127,5 мкл) (см. подраздел 2.2.2А).

Общий объем смеси составлял 251,5 мкл.

Запуск хемилюминесцентной реакции осуществлялся добавлением катализатора данной реакции – раствора $K_3[Fe(CN)_6]$. Измеряли максимальную интенсивность хемилюминесценции в смеси в присутствии модельного окислителя – 1,4-бензохинона или фуллеренола, I , сопоставляли с максимальным свечением контрольного образца, аналогичной смеси без 1,4-бензохинона или фуллеренола I_o , для расчета относительного содержания АФК: $AФК^{rel} = I/I_o$.

2.3 Расчет коэффициентов антиоксидантной активности фуллеренолов в биолюминесцентных системах

При оценке токсичности растворов исходили из того, что снижение интенсивности максимальной биолюминесценции, I , определяет общую токсичность раствора.

Увеличение интенсивности биолюминесценции в растворах окислителей (т.е. смягчение ингибирующего эффекта окислителя) рассматривается как антиоксидантный эффект фуллеренолов.

Антиоксидантные эффекты фуллеренолов оценивали в бактериальной и ферментативной биолюминесцентных системах по величине коэффициентов антиоксидантной активности K_{GT} :

$$K_{GT} = I_{(Ox+\phi)} / I_{Ox} \quad (11)$$

где $I_{(Ox+\phi)}$ и I_{Ox} – интенсивность биолюминесценции в растворах модельного окислителя соответственно в присутствии и отсутствии фуллеренола.

Коэффициент K_{GT} является количественной мерой «смягчения» токсического эффекта окислителя с помощью фуллеренола; он показывает, во сколько раз изменяется интенсивность биолюминесценции в токсичных растворах при добавлении фуллеренолов.

Известно, что ферментативный биотест является специфичным к группе

окислителей, поэтому его можно использовать для мониторинга «окислительной» токсичности растворов. Рисунок 14 схематически демонстрирует особенности кинетики биолюминесценции ферментативной системы в растворах окислителей [22; 30]. Окислительную токсичность можно охарактеризовать величиной задержки свечения (индукционного периода), а конкретно, временем достижения половины максимальной величины биолюминесценции, $T_{0,5}$. Это время можно определить по перегибу S-образной кинетической кривой в начальный момент наблюдения (Рисунок 14Б) с использованием метода второй производной.

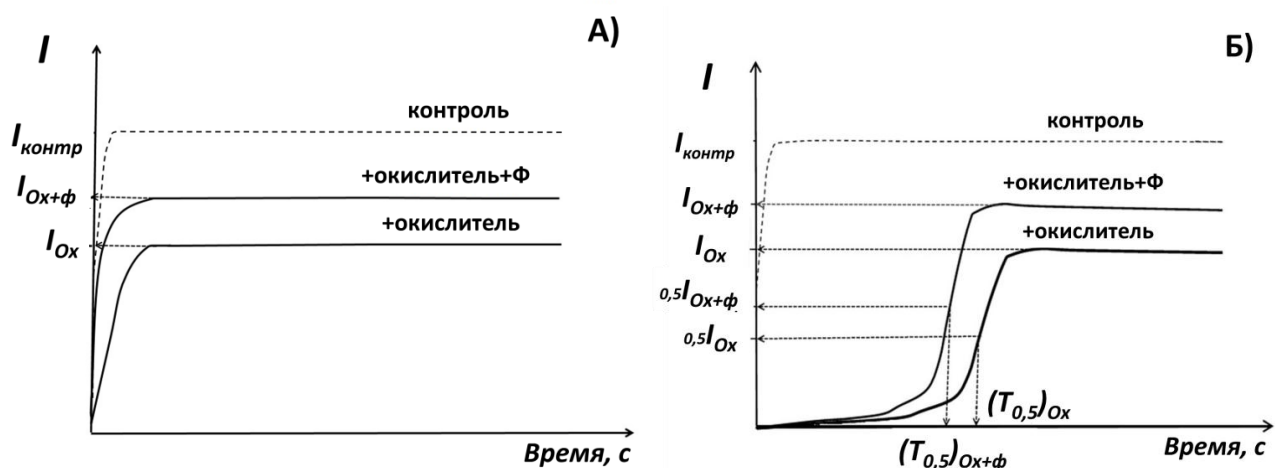


Рисунок 14 – Кинетика биолюминесценции А) бактериальной и Б) ферментативной систем в растворах модельного окислителя (Ох) в присутствии и отсутствии фуллеренола (Ф)

Возникновение задержки свечения связано с процессами конкуренции экзогенного окислителя, с окислителем системы – ФМН в ферментативной системе (см. подраздел 1.1.2).

Изменение «окислительной» токсичности растворов модельных окислителей под действием фуллеренолов определяли в биолюминесцентной ферментативной системе по величине коэффициента антиоксидантной активности K_{OxT} :

$$K_{OxT} = (T_{0,5})_{Ox} / (T_{0,5})_{Ox+\Phi} \quad (12)$$

где $(T_{0,5})_{Ox}$ и $(T_{0,5})_{Ox+\Phi}$ – период задержки биолюминесценции в растворе модельного окислителя соответственно в отсутствии и присутствии фуллеренола.

Окислительная токсичность определяется редокс-активностью токсичных соединений, в то время как общая токсичность определяется комплексом взаимодействий с участием экзогенных соединений, таких как взаимодействия с компонентами ферментативных реакций, окислительно-восстановительные реакции, гидрофобные и полярные связывания.

Положительные 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, $K_{GT} < 1$ и $K_{OxT} < 1$ – увеличению токсичности модельного окислителя (прооксидантной активности фуллеренола).

В ходе экспериментов использовали концентрации растворов модельных окислителей $K_3[Fe(CN)_6]$ и 1,4-бензохинона, ингибирующие до 50%-го остаточного свечения ($I^{rel} = 0,5$) (см. подраздел 2.2.2).

2.4 Определение скорости окисления НАДН в растворах различного состава в присутствии и отсутствии фуллеренолов

Для определения скоростей окисления НАДН регистрировали оптическую плотность раствора, D , на спектрофотометре UVIKON-943 (KONTRON Instruments, Italy) в максимуме поглощения (340 нм).

Если на определенной длине волны коэффициенты молярной экстинкции ϵ исходного вещества и продуктов реакции различаются, то можно зарегистрировать изменение оптической плотности ΔD в ходе химической реакции ($\Delta D = \Delta \epsilon C l$). Для НАДН оптическая плотность окисленных и восстановленных форм различается:



Коэффициенты молярной экстинкции компонентов процесса 13 следующие: $\epsilon_{\text{НАДН}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\lambda = 340 \text{ нм}$), $\epsilon_{\text{НАД}^+} = 0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\lambda = 340 \text{ нм}$) [178–179].

Следовательно, скорость химической реакции может быть определена по спектрам поглощения и рассчитана по следующей формуле:

$$V = \pm \Delta C / \Delta t, \quad (14)$$

где ΔC – изменение концентрации компонента химической реакции;

$\Delta t = 10$ мин.

ΔC рассчитывали по следующей формуле:

$$\Delta C = \Delta D / \varepsilon l, \quad (15)$$

где ε – молярный коэффициент экстинкции НАДН в максимуме его поглощения (340 нм); $l = 1$ см – оптический путь пучка света в растворе.

2.5 Статистическая обработка результатов

Каждое измерение проводили в 5–40 повторностях. Погрешность измерений интенсивности биолюминесценции бактериальной, ферментативной систем и хемилюминесценции люминола не превышала 5, 7% и 10%, соответственно. Погрешности величин V и V_{ϕ} определяли с использованием стандартной методики [180]; они составляли 10^{-8} М/мин.

Статистическая обработка результатов экспериментов и их графическое представление проводились с использованием пакетов программ MS Office (Microsoft, США), а также GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Сан-Диего, США).

Чтобы оценить корреляцию между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК, была проанализирована статистическая зависимость между этими величинами; рассчитаны ранговые коэффициенты корреляции Спирмена r [181]. Применение этого метода было оправдано отсутствием нормального распределения интенсивности биолюминесценции и содержания АФК, а также в некоторых случаях ограниченным набором данных.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

Структурные свойства фуллеренолов определяют их биологическую активность (в нашем случае: токсичность и антиоксидантную активность). Токсичность и антиоксидантная активность фуллеренолов рассмотрена в подразделах 3.1 и 3.2, соответственно.

3.1 Токсичность фуллеренолов

3.1.1 Характеристики токсичности фуллеренолов

Исследованы зависимости интенсивности биолюминесценции бактериальной и ферментативной тестовых систем от концентрации фуллеренолов, полученные данные представлены соответственно на Рисунках 15 и 16.

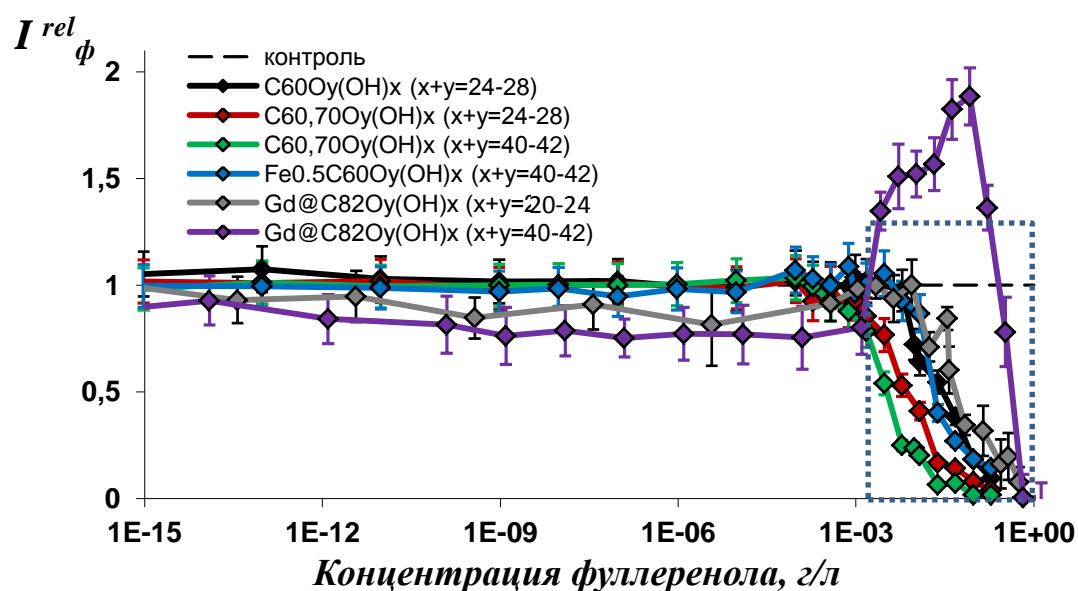


Рисунок 15 – Зависимости относительной интенсивности биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum*, I^{rel} , от концентрации фуллеренолов

Из Рисунков 15–16 видно, что существуют интервалы больших концентраций фуллеренолов ($> 10^{-3}$ г/л), ингибирующие биолюминесценцию тестовых систем (выделены синим прямоугольником). Данные интервалы представлены в Таблице 2 для каждой из используемых биолюминесцентных систем. Подавление интенсивности биолюминесценции рассматривается как результат токсического действия фуллеренолов на мембранные и внутриклеточные процессы (на примере бактериальных

клеток) или химических и биохимических реакций (на примере ферментативной системы).

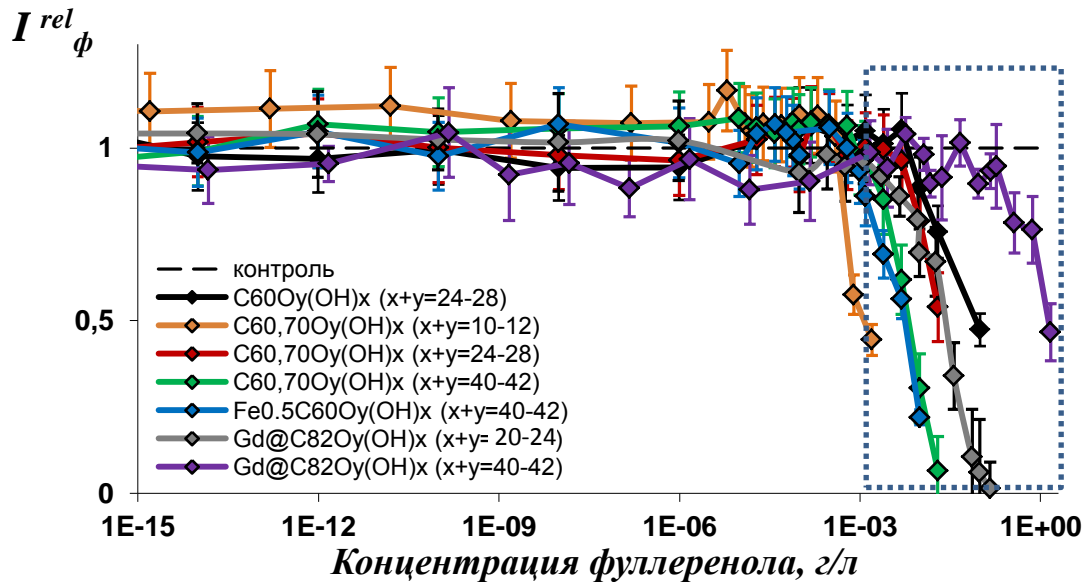


Рисунок 16 – Зависимости относительной интенсивности биолюминесценции ферментативной тестовой системы, I^{rel} , от концентрации фуллеренолов

Таблица 2 – Концентрации фуллеренолов, ингибирующие биолюминесценцию тестовых систем

Фуллеренолы	Концентрации, ингибирующие биолюминесценцию, г/л	
	Бактериальная система	Ферментативная система
$C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)	> 0,001	> 0,003
$C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$)	> 0,002	> 0,010
$C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 10-12$)	> 0,001	> 0,002
$C_{60}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$)	> 0,010	> 0,010
$Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)	> 0,012	> 0,001
$Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)	> 0,292	> 0,184
$Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 20-24$)	> 0,009	> 0,001

Известно, что изучение токсичности окрашенных растворов биолюминесцентным методом может быть искажено эффектом оптического фильтра (абсорбции люминесценции) [26]. Эффективность тушения определяется перекрытием спектров биолюминесценции со спектрами поглощения компонентов раствора. В условиях эксперимента оптическая плотность всех изучаемых растворов фуллеренолов была

меньше 0,1 (при длине оптического пути 1 см), следовательно, эффектом оптического фильтра можно пренебречь.

Данные, представленные на Рисунках 15–16, также были использованы для расчета эффективных (EC_{50}) и ингибирующих (IC_{50}) концентраций, подавляющих биолюминесценцию на 50% бактериальной и ферментативной тестовых систем, соответственно. Полученные результаты приведены в Таблице 3.

Таблица 3 – Концентрации фуллеренолов, ингибирующие биолюминесценцию тестовых систем на 50%. Группы фуллеренолов, отличающиеся только количеством кислородосодержащих заместителей выделены синим и зеленым 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} были использованы для характеристики и сравнения ингибирующей способности растворов фуллеренолов, различающихся количеством кислородосодержащих заместителей, строением углеродного каркаса и присутствием экзогенного или эндогенного атома металла (железа или гадолиния, соответственно):

1) Зависимость токсичности фуллеренолов от количества кислородосодержащих групп:

Две группы фуллеренолов, отличающиеся только количеством кислородосодержащих заместителей, выделены в Таблице 3 зеленым и голубым цветом. Из Рисунков 15–16 и Таблицы 3 видно, что в каждой из этих групп наибольшими величинами EC_{50} и IC_{50} (меньшей токсичностью) обладают фуллеренолы, у которых количество кислородосодержащих групп было близко $\frac{1}{2}$ количества атомов углерода в

каркасе фуллеренолов, а именно, $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) и $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$).

Иллюстрация на примере трех фуллеренолов $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 10-12$; $24-28$; $40-42$). Рассмотрим Таблицу 3 и Рисунок 17.

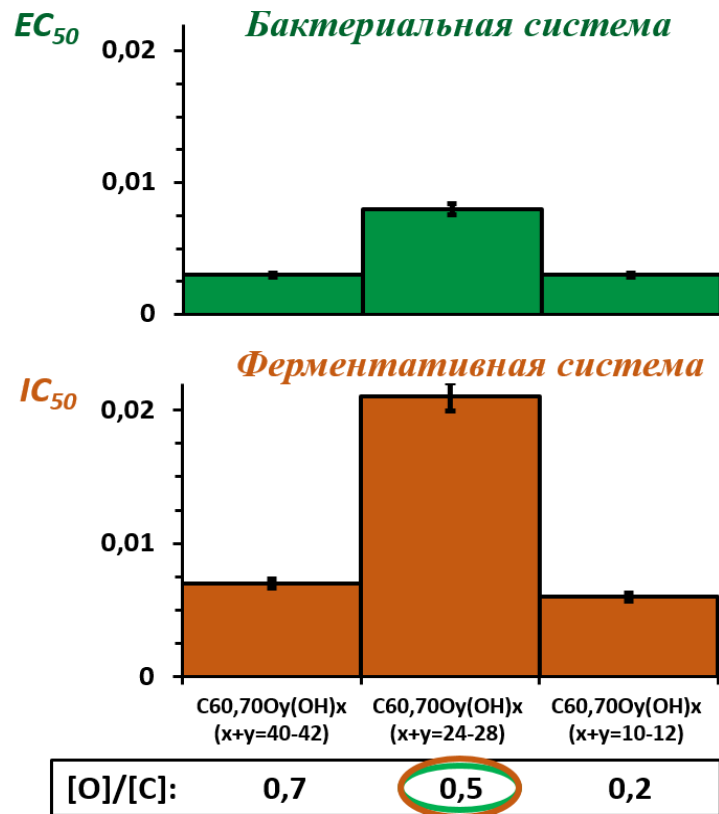


Рисунок 17 – Величины EC_{50} и IC_{50} группы фуллеренолов с различным содержанием кислородосодержащих групп, г/л

Из Таблицы 3 и Рисунка 17 следует, что величины EC_{50} и IC_{50} фуллеренола $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 10-12$) больше, чем у $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) и сопоставима с $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$). Таким образом, видно, что ингибирование биоллюминесценции фуллеренолами не является простой линейной функцией количества кислородосодержащих групп. Возможно, оно зависит от растворимости фуллеренолов в воде. Это предположение подтверждается теоретическими исследованиями для фуллеренола $C_{60}(OH)_n$, где $n = 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24$: число водородных связей фуллеренол-вода увеличивается пропорционально числу гидроксильных групп ($-OH$) от 12 до 24 [182], что обеспечивает более высокую растворимость, однако присоединение более 36 $-OH$ -групп к каркасу фуллерена C_{60} приводит к меньшей растворимости и из-за эффективного взаимодействия $-OH$ -групп фуллеренового каркаса [183]. Следовательно,

в данном случае, фуллеренол с 24–28 кислородосодержащими группами (Рисунок 16, Таблицы 2–3) характеризуется максимальной растворимостью в воде, а также меньшей ингибирующей способностью (для ферментативной системы) и токсичностью (для бактерий). Это также подтверждает нашу гипотезу о том, что наименьшую ингибирующую способность (или токсичность) демонстрируют фуллеренолы, у которых количество кислородосодержащих групп приближенно равно $\frac{1}{2}$ (половине) количества углеродных атомов в каркасе фуллерена.

2) Зависимость токсичности фуллеренолов от строения углеродного каркаса:

Анализируя Рисунки 15–16 и Таблицу 3, можно увидеть, что величины EC_{50} и IC_{50} для фуллеренола $C_{60}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24–28$) оказались больше, чем у смеси двух фуллеренолов с различным размером углеродного каркаса (60 и 70 атомов углерода) $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24–28$). Таким образом, смесь фуллеренолов $C_{60,70}$ токсичнее (обладает большей ингибирующей способностью), чем фуллеренол с каркасом из 60 атомов углерода. Иными словами, тестовые системы оказались чувствительными к размеру углеродного каркаса фуллеренолов. Известно, что, чем больше размер молекулы фуллеренола, тем прочнее связь между белками и фуллеренолом [153]. Возможно, что больший по размеру фуллеренол $C_{60,70}O_y(OH)_x$, $x + y = 24–28$, связываясь с гидрофобными частями ферментов биолюминесцентной системы (люциферазы и редуктазы) или клеточных мембран бактерий, эффективнее подавляют их функции, чем фуллеренол с меньшим размером углеродного каркаса – $C_{60}O_y(OH)_x$, где $x + y = 24–28$. Этот результат подтверждает гипотезу «половинного соотношения»: наименьшей ингибирующей способностью характеризуются фуллеренолы с количеством кислородосодержащих групп, приближенно равным $\frac{1}{2}$ от числа атомов углерода фуллеренолового каркаса, в данном случае, $C_{60}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24–28$).

3) Особенности токсичности фуллеренола $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$, при $x + y = 40–42$:

Соединение $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ состоит из двух каркасов фуллеренола $C_{60}O_y(OH)_x$, соединенных между собой одним атомом железа. Из Рисунков 15–16 и Таблицы 3 видно, что данный фуллеренол обладает меньшей ингибирующей способностью для бактериальной тестовой системы, поскольку его EC_{50} больше, чем IC_{50} . Вероятно, атомы железа фуллеренола специфически влияли на метаболизм бактериальных клеток, в частности, на мембранно-транспортный процесс, в соответствии со свойствами железа как микроэлемента.

4) Особенности биологической активности фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$):

Из Таблицы 3 и Рисунков 15–16 видно, что $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) характеризовался наибольшими величинами EC_{50} и IC_{50} и, следовательно, меньшей ингибирующей способностью (токсичностью) по сравнению с другими фуллеренолами.

Рассмотрим особенности воздействия $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) на бактериальную тестовую систему более подробно (Рисунок 15).

На Рисунке 18А представлена зависимость I^{rel} бактериальных суспензий от концентрации фуллеренола. Из Рисунка 18А видно, что эта зависимость включает три стадии биологического отклика: (I) умеренное ингибирование ($I^{rel} < 1$) при 10^{-14} – 10^{-3} г/л, (II) активация ($I^{rel} > 1$) при 10^{-3} – 3×10^{-1} г/л и (III) ингибирование ($I^{rel} < 1$) при 3×10^{-1} – 3 г/л. Бактериальный отклик на воздействие данного фуллеренола соответствует модели «гормезиса» [184–187], которая представлена на Рисунке 18Б. Как концепция, гормезис включает в себя благоприятные биологические реакции на низкие воздействия стрессоров (стадия II) [188–189].

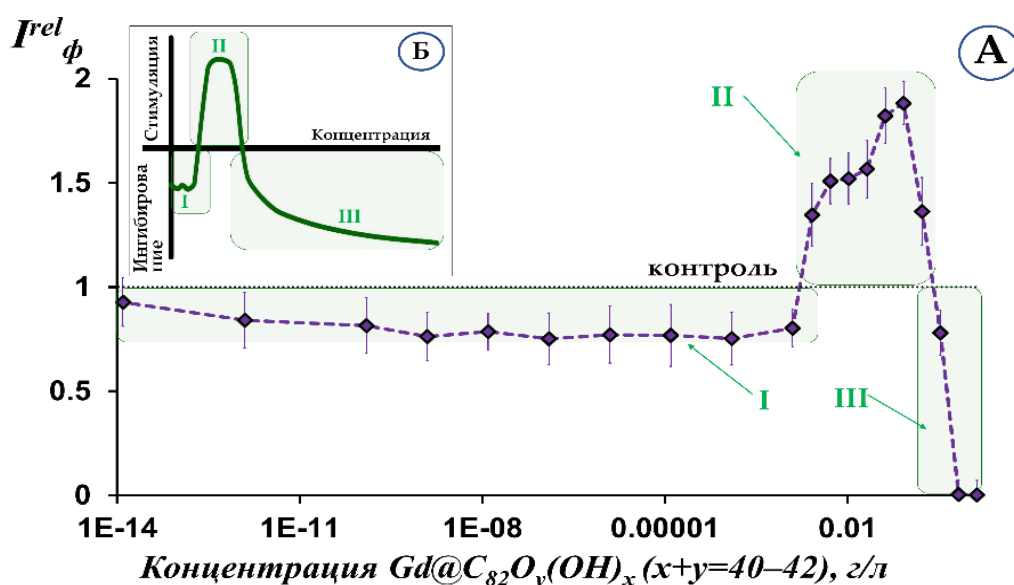


Рисунок 18. (А) Зависимость относительной интенсивности билюминесценции, I^{rel} , от концентрации фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ (где $x + y = 40-42$) в бактериальной суспензии; (Б) Схема модели гормезиса, представленная в соответствии с [195]. Стадии гормезиса: I – распознавание стресса, II – активация, адаптивный отклик, перекомпенсация, III – угнетение физиологических функций, токсичность. «Контроль» соответствует отсутствию фуллеренола в бактериальных суспензиях

Значительную активацию бактериальной биолюминесценции (почти до 100% по сравнению с контролем) мы наблюдали только для $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) (Рисунки 15 и 18А, II стадия). Эта особенность вероятно свидетельствует о более высокой электронно-донорной (акцепторной) способности этого фуллеренола [190–192]. При этом следует отметить, что в ферментативной тестовой системе в присутствии этого фуллеренола активации биолюминесценции не наблюдалось (как и в случае с другими фуллеренолами) (Рисунок 16), что может быть связано с вовлечением гидрофобных взаимодействий в клеточно-мембранные процессы бактерий (косвенное воздействие на биолюминесцентную реакцию).

При сравнении фуллеренолов с одинаковым количеством кислородосодержащих заместителей, но различным строением фуллеренового каркаса, т.е. $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ и $C_{60,70}O_y(OH)_x$ (где $x + y = 40-42$), можно увидеть, что фуллеренол с каркасом из 82 углеродных атомов менее эффективно ингибирует биолюминесценцию тестовых систем (его EC_{50} и IC_{50} намного больше, чем у смеси фуллеренолов $C_{60,70}$, Таблица 3). Объяснение может быть следующее: Gd-содержащий эндофуллерен характеризуется более высокой (на полтора–два порядка) реакционной способностью по сравнению с C_{60} и C_{70} из-за неравномерного распределения электронной плотности фуллеренового каркаса в присутствии эндоэдрального атома Gd [193]. Сродство к электрону этого эндофуллеренола больше. Так, известно, что введение Gd в клетку C_{82} увеличивает сродство к электрону до 3,3 эВ [194], что больше в 1,25 и 1,19 раза, чем у C_{60} и C_{70} , соответственно. У этого эндофуллеренола наблюдается неравномерное распределение электронной плотности углеродного каркаса из-за присутствия эндоэдрального атома Gd. Инкапсуляция атома Gd приводит к переносу электронов из атома Gd в π -систему углеродного каркаса фуллерена, в результате чего образуется цвиттер-ион $[Gd^{3+}@C_{82}^{3-}]$.

В целом, анализируя Рисунки 15–16 и Таблицу 3, следует отметить, что:

1) Фуллеренолы в зависимости от строения проявляют разную ингибирующую активность по отношению к биолюминесценции тестовых систем.

2) Все исследуемые фуллеренолы эффективнее ингибируют биолюминесценцию бактерий, чем системы ферментативных реакций. Это можно объяснить способностью фуллеренолов нарушать структурную организацию липидного бислоя клеточной мембраны (способность вызывать изменение текучести мембран: фуллеренол

взаимодействует с гидроксильными фрагментами (гидрофильными участками) анионных фосфолипидов), что может привести к гибели клетки [152]. Исключения – Fe- и Gd-содержащий фуллеренолы $\text{Fe}_{0,5}\text{C}_{60}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x + y = 40\text{--}42$) и $\text{Gd}@C_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x + y = 20\text{--}24$).

3) Наименьшей токсичностью для бактерий обладали Gd-содержащие фуллеренолы $\text{Gd}@C_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x + y = 20\text{--}24$; $x + y = 40\text{--}42$) (Рисунки 15–16, Таблица 3). Этот эффект можно объяснить большим размером углеродного каркаса фуллеренолов (включающего 82 атома углерода) и их склонностью к агрегации (наногруппировка полианионов в кластеры в водных растворах). Образование агрегатов было подробно изучено в [196–198]: на примере эндоэдрального фуллеренола с 22 гидроксильными группами, $\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}$ была продемонстрирована наногруппировка полианионов в кластеры в водных растворах. Агрегация фуллеренолов может препятствовать их интенсивному взаимодействию $\text{Gd}@C_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x + y = 20\text{--}24$; $x + y = 40\text{--}42$) с клеточными мембранами или с водорастворимыми ферментами.

3.1.2 Роль активных форм кислорода в токсических эффектах фуллеренолов

Ингибирование биолюминесценции тестовых систем фуллеренолами (токсический эффект) может быть связано с их способностью изменять содержание активных форм кислорода (АФК), поскольку известно, что (1) биолюминесцентная ферментативная реакция включает в качестве промежуточного продукта пероксидное соединение (перокси-полуацеталь флавина), и (2) пероксидные соединения являются продуктами темновых побочных процессов в реакции бактериальной люциферазы [199]. Кроме того, известно о разнонаправленном действии перекиси водорода (представителя АФК) на биолюминесценцию бактериальной и ферментативной тестовых систем на различных концентрационных интервалах: ингибирование биолюминесценции происходит при больших концентрациях перекиси водорода, а активация – при малых [33]. Следуя предположению об активной роли АФК в токсических эффектах фуллеренолов, мы использовали люминольный хемилюминесцентный метод определения содержания АФК в водных растворах фуллеренолов. На Рисунке А.1 (приложение А) представлены зависимости относительного содержания АФК, $AФК^{rel}$, от концентраций фуллеренолов в небиологической системе (дистиллированной воде). Отмечено, что все исследуемые фуллеренолы при больших концентрациях уменьшают

содержание АФК по сравнению с контролем, $AФК^{rel} < 1$. Возможно, что это изменение вносит вклад в токсический эффект фуллеренолов. Определены диапазоны концентраций фуллеренолов, уменьшающие содержание АФК в небиологической системе (дистиллированной воде), данные представлены в Таблице 4. Таблица 4 и Рисунок А.1 (Приложение А) показывают, что фуллеренол $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 20-24$) снижает количество АФК в небиологической системе (водной среде) более эффективно, чем другие исследуемые фуллеренолы.

Таблица 4 – Диапазоны концентраций фуллеренолов, уменьшающие содержание АФК в небиологической системе

Фуллеренолы	Диапазоны концентраций фуллеренолов, уменьшающие содержание АФК, г/л
$C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)	$> 0,083$
$C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$)	$> 0,061$
$C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 10-12$)	$> 0,079$
$C_{60}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$)	$> 0,015$
$Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)	$> 0,035$
$Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)	$> 0,067$
$Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 20-24$)	$> 0,001$

Из Рисунка А.1 (Приложение А) видно, что фуллеренолы $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$), $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$), $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$), $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) способны увеличивать содержание АФК в 1,2–1,4 раза в небиологической среде, что подтверждает предположение о том, что токсичность фуллеренолов может быть также связана с формированием в водной среде АФК, т.е. с их прооксидантной активностью [131].

Более подробно роль АФК в токсических (ингибирующих) эффектах фуллеренолов рассмотрим на примере фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40-42$. Чтобы выявить роль АФК в биологических эффектах этого фуллеренола (Рисунки 15–16), мы определяли содержание АФК в бактериальных суспензиях (Рисунок 19А), ферментативной системе (Рисунок 19Б) и небиологической среде (Рисунок 19В). Значения $AФК^{rel}$ были определены непосредственно в биолюминесцентных системах после определения интенсивности биолюминесценции, I^{rel} . Результаты представлены на

Рисунке 19 для бактериальной (Рисунок 19А) и ферментативной (Рисунок 19Б) тестовых систем. Также мы проанализировали корреляции между концентрационными зависимостями I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$, результаты представлены ниже.

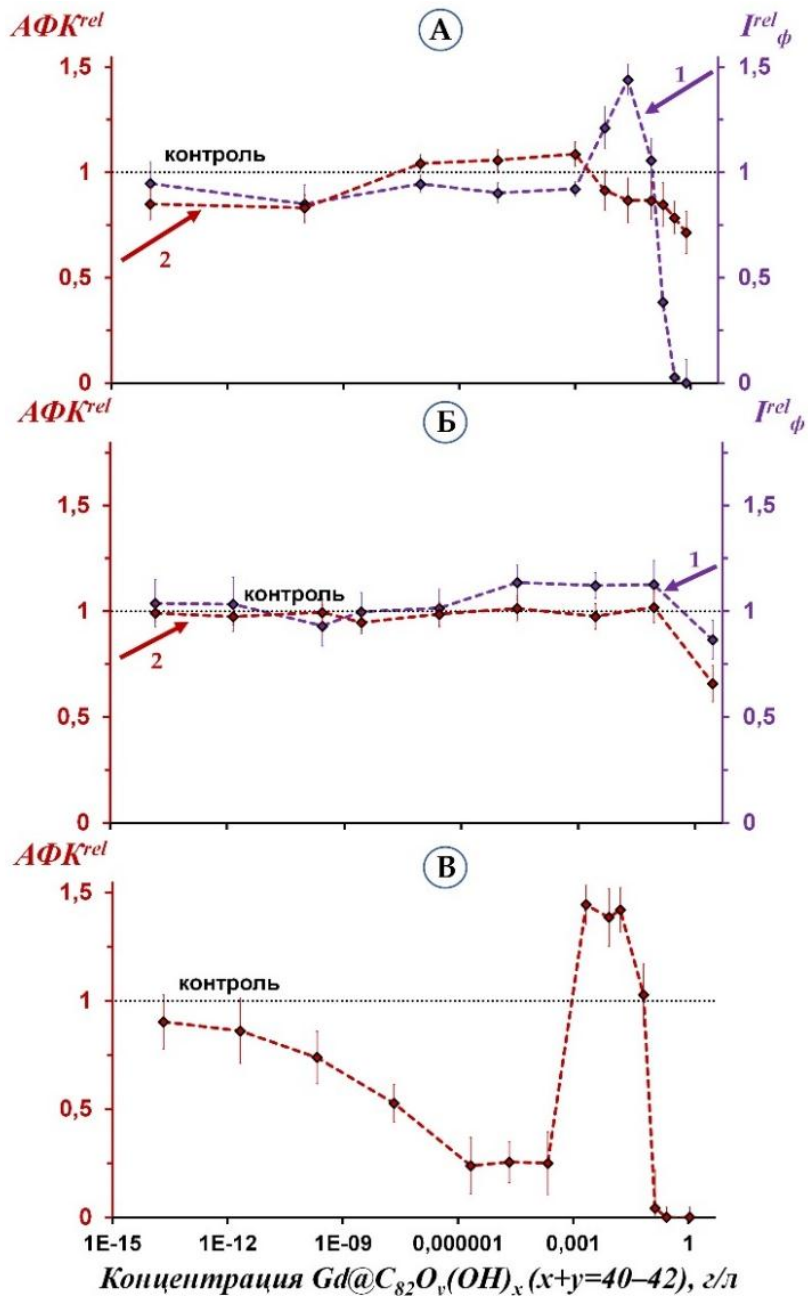


Рисунок 19 – Относительная интенсивность биOLUMИнесценции, I^{rel} , (1) и относительное содержание АФК, $A\Phi K^{rel}$, (2) при различных концентрациях $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40-42$. (А) бактериальная суспензия, (Б) ферментативная система и (В) небиологическая система (дистиллированная вода). 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

1) Бактериальная тестовая система

В диапазоне низких концентраций 10^{-7} – 10^{-1} г/л Gd-содержащего фуллеренола (Рисунок 19А), выявлена отрицательная корреляция ($r = -0,8$) между концентрационными зависимостями I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$, т.е. продемонстрирована обратная зависимость между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК. Мы можем заключить, что активация бактериальной биолюминесценции фуллеренолом ($I^{rel} > 1$, Рисунок 18А) связана с умеренным снижением АФК ($A\Phi K^{rel} < 1$, кривая 2, Рисунок 19А), вероятно, в результате усиления потребления АФК бактериями [200–201], индуцированного фуллеренолом, и ускорения всех внутриклеточных процессов, включая биолюминесцентную реакцию бактериальной люциферазы. Это позволяет сделать вывод о молекулярном механизме «горьезиса» бактериальных клеток в присутствии Gd-содержащего фуллеренола.

Более высокий диапазон концентраций Gd-содержащего фуллеренола, при котором наблюдается токсический эффект (10^{-1} – 8×10^{-1} г/л), выявил положительную корреляцию между концентрационными зависимостями I^{rel} и содержанием АФК, $A\Phi K^{rel}$ ($r = 0,8$). Этот результат показывает различные молекулярные механизмы влияния Gd-содержащего фуллеренола на бактерии в диапазоне низких и высоких концентраций, что приводит к активации и ингибированию биолюминесценции, соответственно.

Итак, токсический эффект фуллеренола (при высоких концентрациях $> 10^{-1}$ г/л) связан с уменьшением АФК в бактериальных суспензиях ниже физиологически необходимого для функционирования бактерий. При этом возможно, происходит смещение равновесия между растворенным молекулярным кислородом O_2 и физиологическими концентрациями АФК, и, следовательно, подавление дыхания бактерий.

2) Ферментативная тестовая система

На Рисунке 19Б представлены зависимости I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$ от концентрации Gd-содержащего фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40$ – 42 в системе ферментативных реакций (кривые 1 и 2, соответственно). Достоверной активации биолюминесценции не наблюдалось (кривая 1, Рисунок 19Б). Была обнаружена высокая положительная корреляция ($r = 0,9$) между зависимостями I^{rel} и $A\Phi K^{rel}$ при высоких концентрациях фуллеренола (10^{-7} – 3 г/л) (Рисунок 19Б).

Следует отметить, что снижение как I^{rel} , так и $A\Phi K^{rel}$, а также положительная

корреляция между этими параметрами были зарегистрированы для ферментативной тестовой системы, подвергшейся воздействию высоких концентраций фуллеренола $C_{60}O_y(OH)_x$, где $x + y = 10-12$ [202].

Физико-химический механизм влияния фуллеренолов на ферментативную систему, вероятно, обусловлен его способностью нейтрализовать свободные радикалы, включая промежуточный продукт билюминесцентной люциферазной реакции (перекисный радикал – перокси-полуацеталь флавина) [199; 203–204]. Следовательно, снижение содержания АФК ($A\Phi K^{rel} < 1$) при высоких концентрациях фуллеренола можно принять в качестве причины ингибирования билюминесцентной реакции (реакция 2 подраздела 1.1.2).

3) Небиологическая система (водные растворы фуллеренолов)

На Рисунке 19В представлено содержание АФК в водных растворах Gd-содержащего фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40-42$. Сложность зависимости $A\Phi K^{rel}$ от концентрации фуллеренола очевидна из этого рисунка. Диапазон низких концентраций ($< 10^{-4}$ г/л) показывает снижение содержания АФК по сравнению с контролем ($A\Phi K^{rel} < 1$); следовательно, только этот диапазон обеспечивает антирадикальную активность фуллеренола. Более высокий диапазон концентраций фуллеренола ($10^{-4}-10^{-1}$ г/л) демонстрирует увеличение содержания АФК ($A\Phi K^{rel} > 1$, Рисунок 19В). Механизм этого явления требует дальнейшего выяснения. Однако, мы можем предварительно предположить, что снижение способности к нейтрализации АФК может быть связано с образованием агрегатов [196–198; 205].

Тем не менее, видно, что обсуждаемый диапазон концентраций фуллеренола с высоким содержанием АФК в небиологической системе ($10^{-4}-10^{-1}$ г/л, Рисунок 19В) обеспечивает эффективную активацию билюминесценции для бактерий (Рисунки 15, 18А, 19А кривая 1) или незначительную активацию для ферментативного процесса (Рисунки 16, 19Б кривая 1), со значениями $A\Phi K^{rel}$, незначительно отклоняющихся от контрольных (Рисунки 19А,Б, кривые 2). Можно предполагать, что клеточные или ферментативные структуры способны смягчать (в определенных пределах) отклонения содержания АФК в окружающей среде за счет функции билюминесценции (детоксикация активного кислорода с помощью реакции бактериальной люциферазы [206]).

Как упоминалось ранее, в литературе имеется устоявшееся положение, что только

избыток АФК приводит к токсическим эффектам, которые стимулируют повреждение ДНК и гибель клеток [207–209]. Наши результаты демонстрируют сложные взаимосвязи между содержанием АФК и физиологической функцией организма – биолюминесценцией. Вероятно, существует оптимальный диапазон концентраций АФК, который уравнивается и поддерживается живыми системами естественным образом.

Из результатов, представленных на Рисунке 19, на примере Gd-содержащего фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40–42$ можно сделать следующие выводы:

1. Токсические эффекты фуллеренолов ($I^{rel} < 1$, Рисунки 15–16, 19) могут быть связаны с нейтрализацией АФК ($AФК^{rel} < 1$) в бактериальной и ферментативной тестовых системах ниже допустимого равновесного содержания. Это происходит при высоких концентрациях фуллеренола ($> 10^{-1}$ г/л, Рисунок 19).

2. Активация бактериальной биолюминесценции (Рисунки 15, 18А, 19А) при низкой концентрации фуллеренола ($10^{-3}–2 \times 10^{-1}$ г/л) связана с избыточным потреблением АФК ($AФК^{rel} < 1$, Рисунок 19А).

3. Детоксикация избытка АФК, вызванного присутствием фуллеренола в водной среде, может происходить с помощью реакции бактериальной люциферазы и клеток бактерий.

Итак, по результатам подраздела 3.1 можно сделать следующие обобщения.

Бактериальный биотест показывает, что фуллеренолы проявляют токсичность при концентрациях $> 10^{-3}$ г/л [10; 210–213]. Если рассматривать группы гомологичных фуллеренолов, различающихся количеством кислородосодержащих групп или размером углеродного каркаса, то можно сделать вывод, что наименьшей токсичностью обладают фуллеренолы, структура которых соответствует «гипотезе $\frac{1}{2}$ », т.е. количество кислородосодержащих групп приближенно равно $\frac{1}{2}$ количества атомов углерода в фуллереноловом каркасе [10; 202; 210; 213]. Эта гипотеза связана с соотношением размера фрагментов гидрофобной π -системы и содержанием полярных кислородосодержащих групп в структуре фуллеренола. Наименьшую токсичность имеют металлосодержащие фуллеренолы [210; 213]. Самым нетоксичным оказался эндодральный Gd-содержащий фуллеренол $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40–42$ [210; 213]. В его присутствии наблюдали также активацию биолюминесценции [210–211]. Возможно, способность активировать биолюминесценцию определяется высоким

сродством к электрону и, как следствие, высокой реакционной способностью этого фуллеренола.

Полученные данные показывают, что фуллеренолы, в структуру которых не включены атомы металлов, эффективнее ингибируют биолюминесценцию бактерий, чем систему ферментативных реакций (IC_{50} в 2–3 раза превышают EC_{50}) [213]. Эта особенность связана с наличием дополнительных каналов воздействия фуллеренолами на гидрофобные фрагменты клеточной мембраны бактерий.

Увеличение токсичности всех исследованных сред при увеличении концентрации фуллеренолов ($> 10^{-3}$ г/л) сопровождается падением содержания АФК [202; 210–211; 213–214]. Этот эффект демонстрирует избыточную антирадикальную активность фуллеренолов в концентрированных растворах, замедляющую метаболические окислительные процессы в биологических системах. Активация бактериальной биолюминесценции Gd-содержащим фуллеренолом в интервале его концентраций 10^{-1} – 10^{-4} г/л связана с умеренным снижением АФК [210–211], вероятно, в результате усиления потребления АФК бактериями, индуцированного фуллеренолом; продемонстрирована отрицательная корреляция между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК.

3.2 Антиоксидантная активность фуллеренолов

3.2.1 Модельный окислительный стресс

Антиоксидантную активность фуллеренолов изучали в условиях модельного окислительного стресса, т.е. в растворах модельных окислителей органического и неорганического типов (1,4-бензохинон и феррицианид калия ($K_3[Fe(CN)_6]$), соответственно). Мы «зафиксировали» условия модельного окислительного стресса, используя концентрации модельных окислителей, ингибирующие биолюминесценцию бактериальной и ферментативной тестовых систем на 50% (EC_{50} и IC_{50} , соответственно; эти значения представлены в Таблице 5).

Из Таблицы 5 видно, что величина IC_{50} феррицианида калия $K_3[Fe(CN)_6]$ оказалась ниже в ферментативном тесте (10^{-4} М), чем в бактериальном ($EC_{50} = 10^{-3}$ М, $EC_{50} = 4 \times 10^{-2}$ М). Последний факт демонстрирует большую чувствительность ферментативного теста к $K_3[Fe(CN)_6]$, по сравнению с бактериальным, что согласуется с

ранее полученными данными [10; 22]. Вполне вероятно, что высокая электронно-донорная способность $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ответственна за его взаимодействие с функциональными группами ферментов и субстратов ферментативных реакций, что обеспечивает более низкую величину IC_{50} в ферментативной системе.

Таблица 5 – Концентрации IC_{50} и EC_{50} модельных окислителей, полученные с использованием биолюминесцентных тестовых систем

Соединение	IC_{50} , М	EC_{50} , М	
	Ферментативная система	Лиофилизированные бактерии	Интактные бактерии
1,4-бензохинон	10^{-5}	$2,5 \times 10^{-7}$	8×10^{-7}
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	2×10^{-4}	4×10^{-2}	10^{-3}

Величины IC_{50} , EC_{50} 1,4-бензохинона для биолюминесцентных систем оказались меньше, чем величины IC_{50} , EC_{50} феррицианида калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Таблица 5), следовательно, органический окислитель эффективнее ингибирует биолюминесценцию используемых биотестов, чем неорганический. Это вероятно связано с тем, что 1,4-бензохинон обладает большим окислительно-восстановительным потенциалом, чем феррицианид калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0,71 и 0,36 В при нейтральном pH, соответственно) [215].

Органический окислитель 1,4-бензохинон эффективнее ингибирует биолюминесценцию бактериальной системы ($EC_{50} = 2,5 \times 10^{-7}$ М, $EC_{50} = 8 \times 10^{-7}$ М), чем ферментативной ($IC_{50} = 10^{-5}$ М). Этот окислитель, являясь амфифильным соединением, способен к гидрофобным взаимодействиям, оказывает влияние на клеточную мембрану [216–217] и обладает большим сродством к гидрофобным фрагментам ферментов. Взаимодействуя с белками, 1,4-бензохинон способен изменять структуру (конформацию) белка, что приводит к снижению его активности или потере функции [169]. Дополнительным фактором токсичности 1,4-бензохинона является то, что 1,4-бензохинон в водной среде восстанавливается в гидрохинон через промежуточные формы – семихинон и дианион, которые могут запускать активацию свободнорадикальных реакций на клеточном уровне (см. подраздел 1.3.2). При больших концентрациях АФК развивается окислительный стресс, который может привести к апоптозу клетки [74; 76; 218].

Ранее было установлено, что IC_{50} 1,4-бензохинона равно 10^{-4} М [22; 26–27], и IC_{50} $K_3[Fe(CN)_6]$ равно 8×10^{-5} М [22] для ферментативной системы; EC_{50} 1,4-бензохинона 9×10^{-7} М [26–27], EC_{50} $K_3[Fe(CN)_6]$ $0,4 \times 10^{-2}$ М [22] для бактериальной системы. Полученные нами величины IC_{50} , EC_{50} (Таблица 5), близки к литературным данным. Различия с литературными данными могут быть связаны с особенностями бактериальных и ферментативных препаратов.

3.2.2 Коэффициенты антиоксидантной активности фуллеренолов в биолюминесцентных системах

Для изучения антиоксидантной активности фуллеренолов в условиях модельного окислительного стресса (см. подраздел 3.2.1) были исключены диапазоны их высоких концентраций, ингибирующие биолюминесценцию тестовых систем (подраздел 3.1, Рисунки 15–16, концентрации выделены синим прямоугольником, Таблица 2). В присутствии фуллеренолов рассчитывали коэффициенты, K_{GT} и K_{OxT} . Значения $K_{GT} > 1$ и $K_{OxT} > 1$ свидетельствовали об антиоксидантной активности фуллеренолов.

а) Коэффициент K_{GT} . Ферментативная и бактериальная тестовые системы

Как уже было сказано выше (см. подраздел. 2.3), в бактериальной и ферментативной тестовых системах в присутствии модельного окислителя происходит снижение максимума биолюминесценции, что характеризует «общую токсичность» раствора [2; 22; 24]. В данном подразделе представлены результаты влияния фуллеренолов на общую токсичность растворов модельных окислителей неорганического ($K_3[Fe(CN)_6]$) и органического (1,4-бензохинон) происхождения. В качестве примера для иллюстрации этих эффектов выбраны два фуллеренола, различающиеся количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24–28$) и $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40–42$). В данных экспериментах были выбраны концентрации модельных окислителей, ингибирующие биолюминесценцию на 50% (см. подраздел 3.2.1). По изменению общей токсичности (General Toxicity, GT) растворов окислителей в присутствии фуллеренолов рассчитывали коэффициенты K_{GT} согласно формуле (11) (см. подраздел 2.3).

На Рисунке 20 показаны кривые зависимости величин коэффициентов K_{GT} в растворах 1,4-бензохинона (Рисунок 20А) и $K_3[Fe(CN)_6]$ (Рисунок 20Б), полученные с использованием ферментативной тестовой системы, от концентраций фуллеренолов.

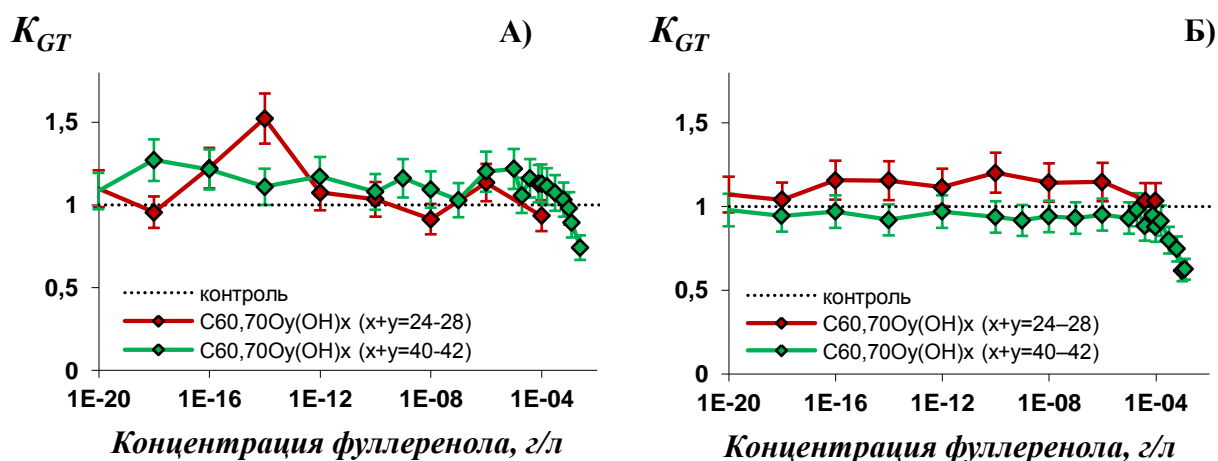


Рисунок 20 – Зависимости коэффициента антиоксидантной активности K_{GT} от концентрации фуллеренолов в растворах модельных окислителей: А) – 1,4-бензохинона ($IC_{50} = 10^{-5}$ М), Б) – $K_3[Fe(CN)_6]$ ($IC_{50} = 2 \times 10^{-4}$ М). Ферментативная система

Из Рисунка 20А видно, что $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) проявляет антиоксидантный эффект в растворе 1,4-бензохинона в диапазоне концентраций $10^{-18}-10^{-12}$ г/л ($K_{GT} > 1$), максимальное значение $K_{GT} = 1,5$. При использовании фуллеренола с большим количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) наблюдалось умеренное снижение общей токсичности раствора 1,4-бензохинона в диапазоне концентраций фуллеренола $10^{-20}-10^{-10}$ г/л ($K_{GT} > 1$) (Рисунок 20А), но максимальное значение K_{GT} оказалось меньшим, 1,3. Данные, представленные на Рисунке 20Б, показывают, что воздействие фуллеренола $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) низких концентраций ($10^{-18}-10^{-5}$ г/л) приводит к уменьшению общей токсичности раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($K_{GT} > 1$) с максимальным значением $K_{GT} = 1,2$, чего не наблюдается при использовании фуллеренола с большим количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) ($K_{GT} \approx 1$). Полученные данные (Рисунок 20), показывают, что уменьшение общей токсичности модельных окислителей в ферментативной системе происходит эффективнее под действием фуллеренола с меньшим количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$), чем под действием $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$), а также эффективнее в растворе органического модельного окислителя – 1,4-бензохинона (Рисунок 20А), чем неорганического – $K_3[Fe(CN)_6]$ (Рисунок 20Б).

На Рисунке 21 приведены зависимости K_{GT} в растворе 1,4-бензохинона (Рисунок 21А) и $K_3[Fe(CN)_6]$ (Рисунок 21Б) от концентрации фуллеренолов, полученные

с помощью бактериального биотеста.

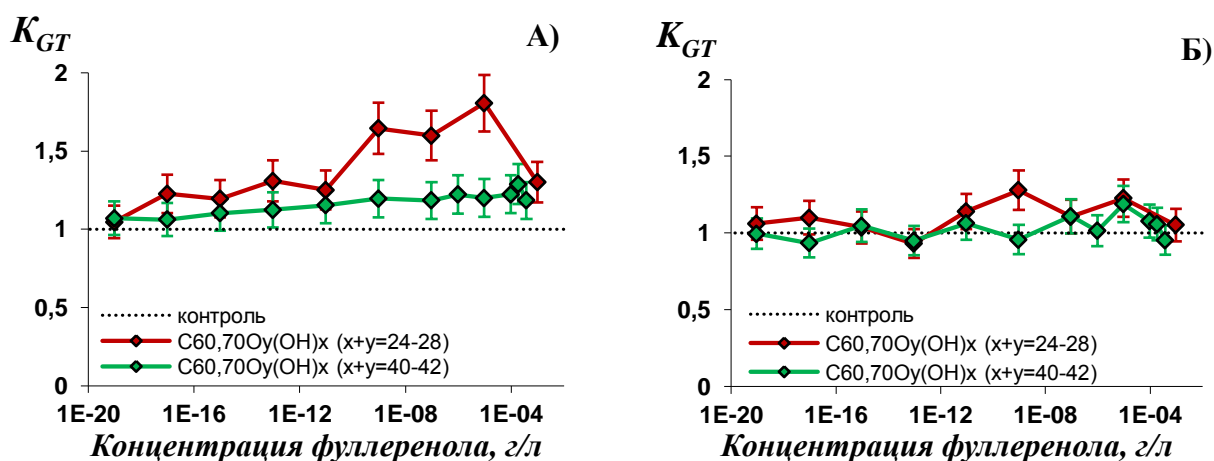


Рисунок 21 – Зависимости коэффициента антиоксидантной активности K_{GT} от концентрации фуллеренолов в растворах модельных окислителей: А) – 1,4-бензохинона ($EC_{50} = 2,5 \times 10^{-7}$ М), Б) – $K_3[Fe(CN)_6]$ ($EC_{50} = 4 \times 10^{-2}$ М). Лиофилизированные бактерии

Данные, представленные на Рисунке 21А, показывают, что $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) проявляет антиоксидантное действие во всем исследуемом диапазоне концентраций $10^{-19}-10^{-3}$ г/л в растворе 1,4-бензохинона ($K_{GT} > 1$), максимальное значение $K_{GT} = 1,8$, а фуллеренол с большим количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) при концентрациях $10^{-13}-4 \times 10^{-4}$ г/л, при этом максимальное значение $K_{GT} = 1,2$. Анализ данных, представленных на Рисунке 21Б, показывает, что $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) незначительно проявляет антиоксидантное действие при концентрациях $10^{-13}-10^{-3}$ г/л в растворе $K_3[Fe(CN)_6]$, при этом максимальное значение $K_{GT} = 1,3$, а фуллеренол с большим количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) вообще не проявляет антиоксидантной активности при всех исследуемых концентрациях ($K_{GT} \approx 1$).

Таким образом, полученные данные (Рисунок 21), показывают, что уменьшение общей токсичности модельных окислителей в бактериальной системе, так же, как и в ферментативной, происходит эффективнее под действием $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$), чем под действием фуллеренола с большим количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$), и также эффективнее в растворе органического модельного окислителя – 1,4-бензохинона (Рисунок 21А), чем неорганического – $K_3[Fe(CN)_6]$ (Рисунок 21Б).

Подобные зависимости коэффициентов антиоксидантной активности, K_{GT} , от концентрации фуллеренолов в растворах модельных окислителей были получены и для других фуллеренолов с помощью ферментативной и бактериальной биолюминесцентных систем. Полученные данные сведены в Таблицу 6. Для характеристики антиоксидантной активности исследуемых фуллеренолов нами были проанализированы диапазоны их активных концентраций, при которых наблюдалось уменьшение общей токсичности растворов модельных окислителей – $K_3[Fe(CN)_6]$ и 1,4-бензохинона ($K_{GT} > 1$), а также максимальные значения коэффициентов K_{GT} .

Таблица 6 – Диапазоны активных концентраций фуллеренолов, уменьшающие общую токсичность растворов ($K_{GT} > 1$) модельных окислителей (IC_{50} для ферментативной системы, EC_{50} для бактериальной системы) и максимальные значения коэффициентов K_{GT} , определенные с использованием биолюминесцентных систем. 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 Таблицы 6 видно, что наибольшей антиоксидантной активностью по обладают фуллеренолы, у которых число кислородосодержащих групп близко $\frac{1}{2}$ числу атомов углерода фуллеренового каркаса. В двух выделенных цветом группах это фуллеренолы с наибольшими коэффициентами K_{GT} : $C_{60,70}O_y(OH)_x$, где $x + y = 24-28$; $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$,

где $x + y = 40-42$, а также $C_{60}O_y(OH)_x$, где $x + y = 24-28$). Также видно, что антиоксидантная активность фуллеренолов выше в растворах органического окислителя (1,4-бензохинона), чем неорганического ($K_3[Fe(CN)_6]$).

Одной из причин уменьшения общей токсичности растворов модельных окислителей фуллеренолами может быть образование короткоживущих комплексов фуллеренола с модельным окислителем при частичной или полной нейтрализации модельного окислителя. Поскольку фуллеренолы и 1,4-бензохинон – амфифильные соединения, то детоксикация раствора 1,4-бензохинона происходит эффективнее (вероятно благодаря гидрофобному связыванию амфифильных молекул бензохинона), чем $K_3[Fe(CN)_6]$ (ионной соли). Кроме того, фуллеренолы могут участвовать и в ряде других процессов, определяющих защитные реакции клеток.

Антиоксидантная активность сильно разбавленных растворов фуллеренолов (несколько десятков молекул фуллеренола на литр) на бактериальных клетках может описываться в рамках модели гормезиса [10], которая связывает эту активность со стимуляцией адаптивного клеточного ответа (активацией жизненно важных функций) при низких концентрациях фуллеренолов. Предполагаемый механизм гормезиса принято объяснять репарацией поврежденного ДНК или клеточными мембранными процессами. В работе [10] нами было высказано предположение, что в механизм детоксикации модельных окислителей фуллеренолами вовлечены процессы, связанные с гидрофобной структурой мембран.

б) Коэффициент K_{OxT} . Ферментативная тестовая система

Как уже говорилось ранее (подразделы 1.2.2 и 2.3), билюминесцентная ферментативная тестовая система позволяет оценивать воздействие окислителей не только по изменению интенсивности билюминесценции (I), но и периоду задержки билюминесценции (T), (Рисунок 14, подраздел 2.3). «Общая» токсичность, определяемая по изменению интенсивности билюминесценции (I), основана на комплексе процессов, включающих окислительно-восстановительные и полярные/неполярные взаимодействия в ферментативной системе. Параметр T специфичен для окислителей и отвечает за «окислительную» токсичность исследуемых растворов (Oxidative Toxicity, OxT) [22; 24]. Предполагается, что «окислительная» токсичность зависит от окислительно-восстановительной активности токсичных сред, и определяется концентрацией и редокс-потенциалами окислителей в этой среде.

Согласно формуле (12) (п. 2.4), мы рассчитывали коэффициент антиоксидантной активности по изменению индукционного периода билюминесценции, K_{OxT} , в растворах модельных окислителей (1,4-бензохинона и $K_3[Fe(CN)_6]$) в присутствии фуллеренолов.

В данном подразделе, как и в подразделе 3.2.2а, в качестве примера выбраны те же два фуллеренола, различающиеся количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) и $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$). Полученные данные приведены на Рисунке 22.

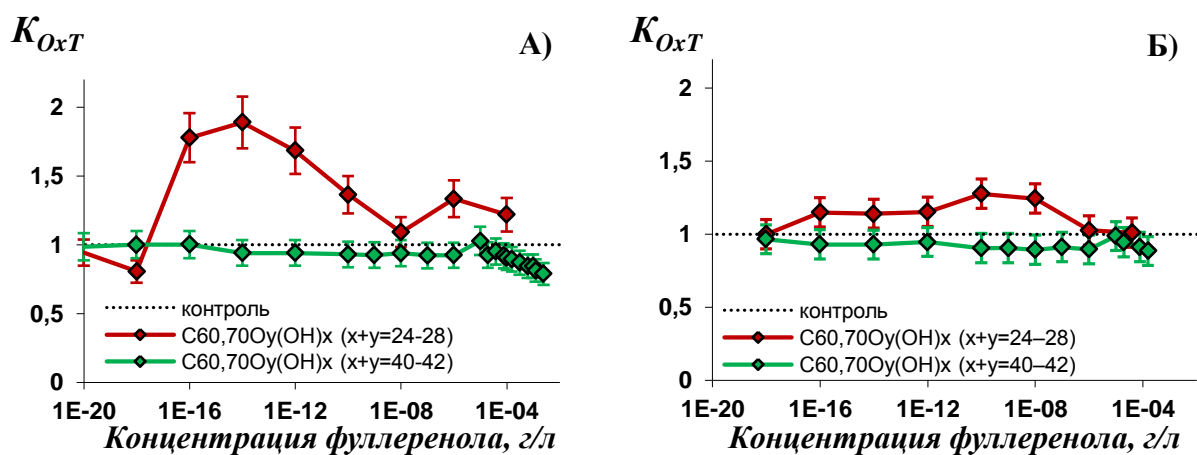


Рисунок 22 – Зависимости коэффициента антиоксидантной активности K_{OxT} от концентрации фуллеренолов в растворах модельных окислителей: А) – 1,4-бензохинона ($IC_{50} = 10^{-5}$ М), Б) – $K_3[Fe(CN)_6]$ ($IC_{50} = 2 \times 10^{-4}$ М). Ферментативная система

Данные, представленные на Рисунке 22А, демонстрируют снижение окислительной токсичности раствора 1,4-бензохинона ($K_{OxT} > 1$) при использовании $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) в широком диапазоне концентраций $10^{-18}-10^{-4}$ г/л (максимальное значение $K_{OxT} = 1,9$), чего не наблюдается при использовании фуллеренола с большим количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) ($K_{OxT} \approx 1$). Также наблюдается незначительное снижение окислительной токсичности раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ ($K_{OxT} > 1$) при использовании $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) в качестве антиоксидантного агента при концентрациях $10^{-18}-10^{-6}$ г/л (максимальное значение $K_{OxT} = 1,3$) и не наблюдается при использовании фуллеренола с большим количеством кислородосодержащих заместителей $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) ($K_{OxT} \approx 1$) (Рисунок 22Б). Анализ полученных данных (Рисунок 22) показал, что

$C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$) обладает большей антиоксидантной активностью, чем $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$). Результат аналогичен полученному выше (анализ K_{GT} в подразделе 3.2.2а).

Подобные зависимости были получены и для других исследуемых фуллеренолов. Полученные данные сведены в Таблицу 7. Для характеристики антиоксидантной активности исследуемых фуллеренолов нами были проанализированы диапазоны их активных концентраций, при которых наблюдалось уменьшение окислительной токсичности растворов модельных окислителей – $K_3[Fe(CN)_6]$ и 1,4-бензохинона ($K_{OxT} > 1$), а также максимальные значения коэффициентов K_{OxT} .

Таблица 7 – Диапазоны концентраций фуллеренолов, уменьшающие окислительную токсичность ($K_{OxT} > 1$) растворов модельных окислителей (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

Из Таблицы 7 видно, что наибольшей антиоксидантной активностью по отношению к исследуемым модельным окислителям обладают фуллеренолы $C_{60}O_y(OH)_x$ и $C_{60,70}O_y(OH)_x$, где $x + y = 24-28$. Аналогичные закономерности были получены для антиоксидантных коэффициентов по изменению общей токсичности модельных окислителей, K_{GT} (подраздел 3.2.2а, Таблица 6). Если рассматривать группу фуллеренолов, отличающихся только количеством кислородосодержащих групп

($C_{60,70}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40-42$, $x + y = 24-28$, $x + y = 10-12$, помечены синим в Таблице 7), то можно заметить, что фуллеренол с ($x + y = 24-28$) характеризуется максимальным коэффициентом K_{OxT} . Это именно тот фуллеренол, для которого отношение количества атомов кислорода к количеству атомов углерода близко $\frac{1}{2}$. Аналогичная тенденция изменения биологической (антивирусной) активности наблюдалась для аналогичного ряда фуллеренолов в работе Еропкина и коллег [137].

Таким образом, из анализа данных Таблиц 6 и 7 следует, что коэффициенты K_{GT} и K_{OxT} соответствуют «гипотезе $\frac{1}{2}$ », т.е. максимальная антиоксидантная активность проявляется для фуллеренола, с соотношением атомов кислорода и углерода, близким $\frac{1}{2}$.

Проиллюстрируем эти результаты с помощью диаграмм (Рисунок 23 и 24). В качестве примера рассмотрим группу фуллеренолов, выделенных голубым цветом (Таблицы 6 и 7). Видно, что коэффициенты K_{OxT} и K_{GT} выше у фуллеренолов с отношением равным $\frac{1}{2}$.

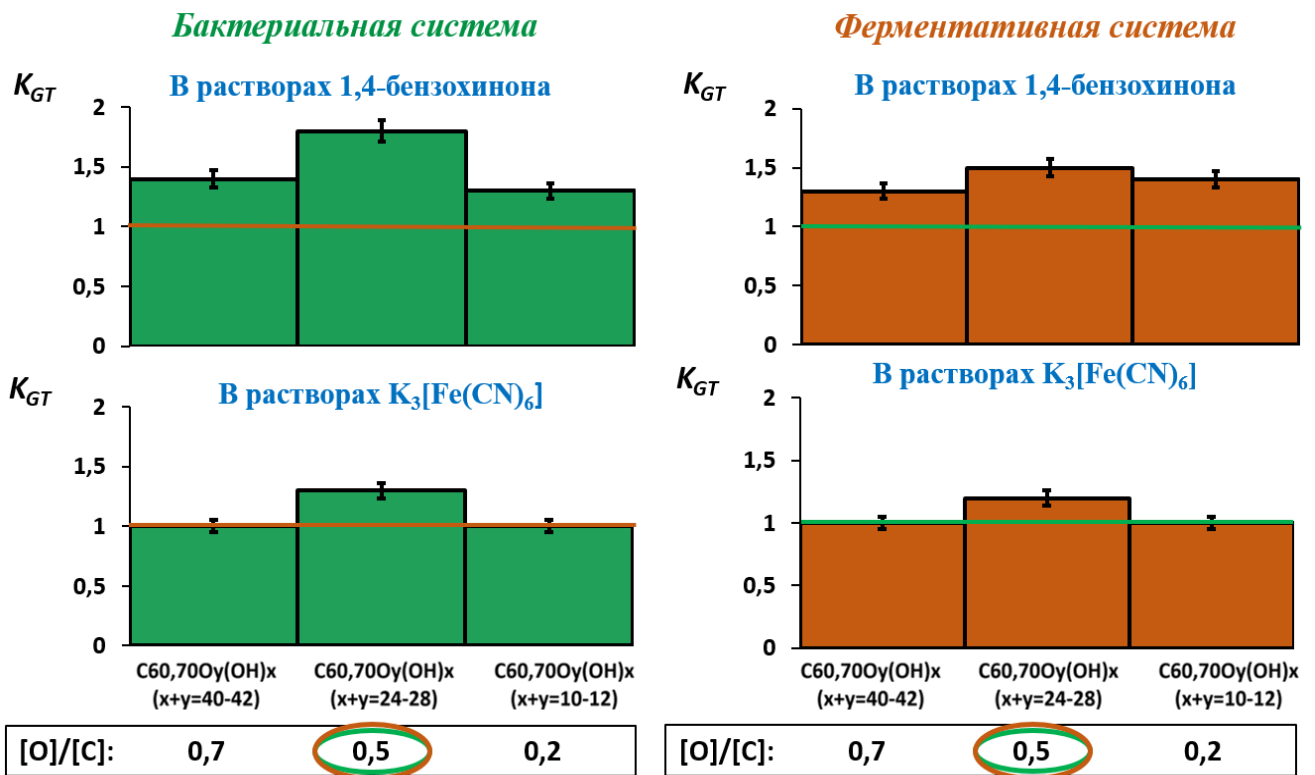


Рисунок 23 – Коэффициенты антиоксидантной активности K_{GT}

Ферментативная система

В растворах 1,4-бензохинона

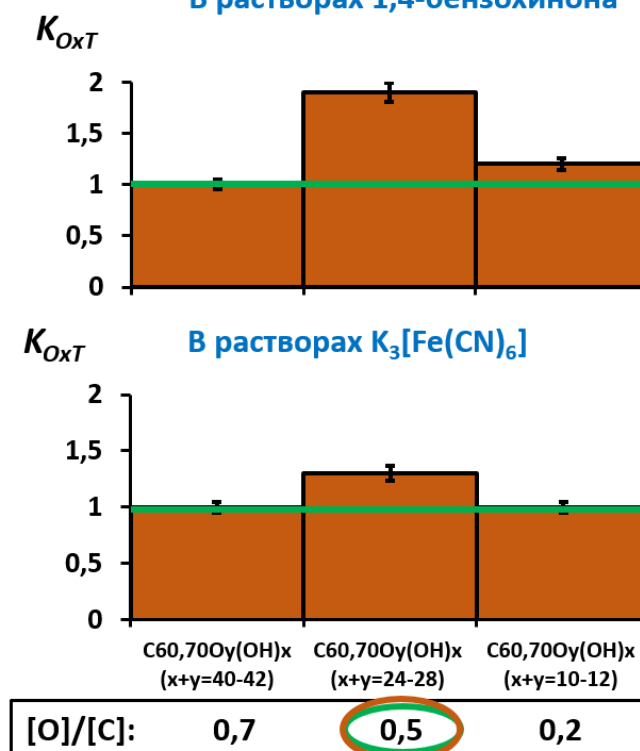


Рисунок 24 – Коэффициенты антиоксидантной активности K_{OxT}

3.2.3 Роль активных форм кислорода в антиоксидантной активности фуллеренолов

а) Роль активных форм кислорода в условиях модельного окислительного стресса

Моделирование условий окислительного стресса представляет собой особый интерес; варьирование содержания АФК в биохимических и клеточных процессах остается малоизученным. Мы пытаемся прояснить этот вопрос, используя водные среды различной сложности, включающие органический модельный окислитель: (1) растворы 1,4-бензохинона разных концентраций, (2) растворы 1,4-бензохинона разных концентраций + бактериальная суспензия и (3) растворы 1,4-бензохинона разных концентраций + ферментативная система. Известно, что 1,4-бензохинон в присутствии кислорода воздуха способен формировать АФК, что может привести к росту содержания АФК в исследуемых биологических и небиологических средах. Мы проверили данное утверждение, полученные данные представлены на Рисунках 25–26.

На Рисунке 25 приведены зависимости относительного содержания АФК от концентрации бензохинона в присутствии и отсутствии бактериальных суспензий (кривые 1 и 2, соответственно). Из рисунка видно, что происходит увеличение содержания АФК по сравнению с контролем при концентрациях 1,4-бензохинона $> 10^{-7}$ М в растворах 3%-го NaCl в присутствии и отсутствии бактериальных суспензий ($AФK^{rel} > 1$, кривые 1 и 2, соответственно). Видно, что бактерии снижают избыток АФК по сравнению с безбактериальным раствором при больших концентрациях 1,4-бензохинона $> 10^{-4}$ М (сравните кривые 1 и 2 на Рисунке 25). При этом бактерии увеличивают избыток АФК по сравнению с безбактериальным раствором при меньших концентрациях 1,4-бензохинона $> 10^{-4}$ – 10^{-7} М (сравните кривые 1 и 2 на Рисунке 25). Следовательно, участие бактерий в регуляции АФК в растворах органического окислителя очевидно.

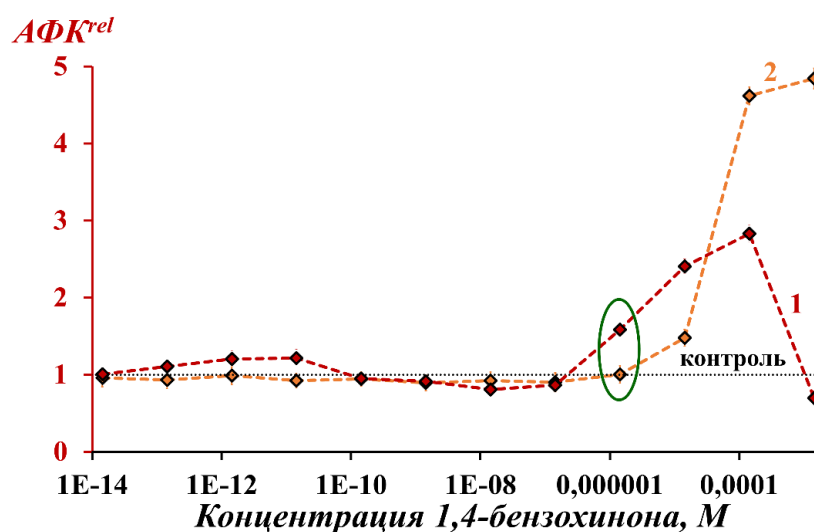


Рисунок 25 – Относительное содержание АФК, $AФK^{rel}$, в бактериальной суспензии (1), безбактериальном растворе 3%-го NaCl (2) при различных концентрациях 1,4-бензохинона. «Контроль» соответствует отсутствию 1,4-бензохинона в экспериментальных растворах. Концентрации АФК составляли $1,3 \times 10^{-5}$ М и $4,8 \times 10^{-6}$ М в безбактериальном контрольном растворе 3%-го NaCl и бактериальной суспензии, соответственно. Относительное содержание АФК при EC_{50} отмечено зеленым эллипсом

На Рисунке 26 приведены зависимости относительного содержания АФК, $AФK^{rel}$, от концентрации бензохинона в присутствии и отсутствии ферментов (кривые 1 и 2, соответственно). Мы обнаружили, что 1,4-бензохинон увеличивает содержание АФК,

$A\Phi K^{rel} > 1$, в водных растворах и ферментативной системе практически при всех исследованных концентрациях, кривые 1 и 2, соответственно, Рисунок 26. Этот рисунок демонстрирует, что АФК снижается в ферментативных процессах по сравнению с водными растворами (сравни кривые 1 и 2) в диапазоне концентраций 1,4-бензохинона $> 10^{-8}$ М. Этот эффект является результатом потребления АФК в ходе биoluminesцентной окислительной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой (реакция 2, подраздел 1.1.2), как обсуждалось выше (см. подраздел 3.1.2).

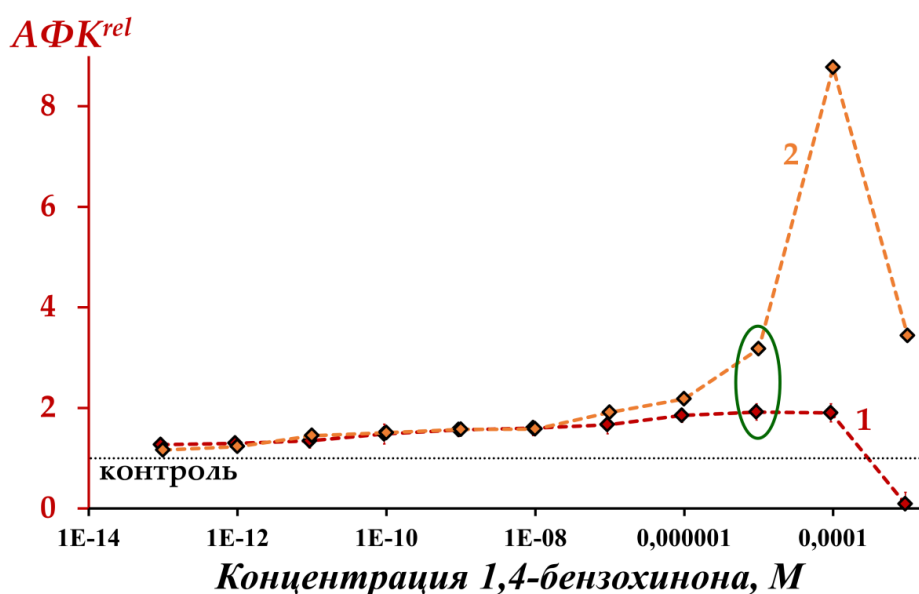


Рисунок 26 – Относительное содержание АФК, $A\Phi K^{rel}$, в ферментативной системе (1), дистиллированной воде (2) при различных концентрациях 1,4-бензохинона. «Контроль» соответствует отсутствию 1,4-бензохинона в экспериментальных растворах. Концентрации АФК составляли $4,5 \times 10^{-7}$ М и $1,9 \times 10^{-5}$ М в контрольной дистиллированной воде и ферментативной системе, соответственно. Относительное содержание АФК при IC_{50} отмечено зеленым эллипсом

Содержание АФК в условиях модельного окислительного стресса (при EC_{50} и IC_{50}), используемого в дальнейших экспериментах, выделено зеленым эллипсом на Рисунках 25–26.

Различия во влиянии бактериальных суспензий и ферментативной системы на содержание АФК в водных растворах могут быть связаны с разным уровнем функциональной организации этих двух систем, в частности, функциями клеточной мембраны и метаболическими клеточными процессами, сопряженными с

биоллюминесцентной реакцией. Это различие является очень важным предметом для дальнейших исследований.

б) Коэффициент K_{GT} и содержание АФК

Роль АФК в антиоксидантной активности фуллеренолов, оцененную по изменению общей токсичности раствора 1,4-бензохинона, рассмотрим на примере Gd-содержащего фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40-42$.

Коэффициенты K_{GT} и относительное содержание АФК, $A\Phi K^{rel}$, были рассчитаны в широком диапазоне концентраций фуллеренола. Сравнивались зависимости коэффициентов K_{GT} (Таблица 6) и относительное содержание АФК, $A\Phi K^{rel}$, от концентраций фуллеренола.

На Рисунке 27 представлены значения K_{GT} и $A\Phi K^{rel}$ в растворах органического окислителя, 1,4-бензохинона, в бактериальной и ферментативной тестовых системах (Рисунок 27А и 27Б, соответственно) при различных концентрациях фуллеренола.

1) Бактериальная тестовая система

Из Рисунка 27А видно, что фуллеренол в диапазоне концентраций $10^{-3}-2 \times 10^{-1}$ г/л ослабляет действие модельного окислителя (антиоксидантный эффект) на бактериальные клетки (кривая 1, Рисунок 27А) ($K_{GT} > 1$; максимальное значение $K_{GT} = 1,75$), при этом не происходит заметного изменения содержания АФК в бактериальной суспензии в условиях модельного окислительного стресса при всех используемых концентрациях (Рисунок 27А, кривая 2). Мы можем предположить, что данный фуллеренол при низких концентрациях полностью нейтрализовал вызванный 1,4-бензохиноном избыток АФК в бактериальной суспензии (кривая 1, Рисунок 26, отмечено зеленым эллипсом).

Выявлена умеренная отрицательная корреляция ($r = -0,7$) между концентрационными зависимостями K_{GT} и $A\Phi K^{rel}$ в бактериальных суспензиях (Рисунок 27А) в условиях модельного окислительного стресса (т.е. в растворах 1,4-бензохинона, EC_{50}) во всем исследуемом диапазоне концентраций фуллеренола: $10^{-14}-2 \times 10^{-1}$ г/л. Коэффициент корреляции указывает на обратную зависимость между интенсивностью биоллюминесценции бактерий и содержанием АФК в условиях модельного окислительного стресса. Аналогичный результат мы получили ранее при отсутствии окислительного стресса (раздел 3.1.2, Рисунок 19А). Можно заключить, что «смягчение» окислительного (т.е. активация бактериальной биоллюминесценции на

Рисунке 27А, кривая 1) связано с усилением потребления АФК бактериями. Примечательно, что максимальные коэффициенты K_{GT} фуллеренола в бактериальной суспензии растут с увеличением времени воздействия: с 1,4 (при 5-минутной инкубации (Рисунок А.2А, кривая 1, Приложение А) до 1,75 (при 45-минутной инкубации, Рисунок 27А, кривая 1), но содержание АФК практически не меняется на протяжении всего эксперимента.

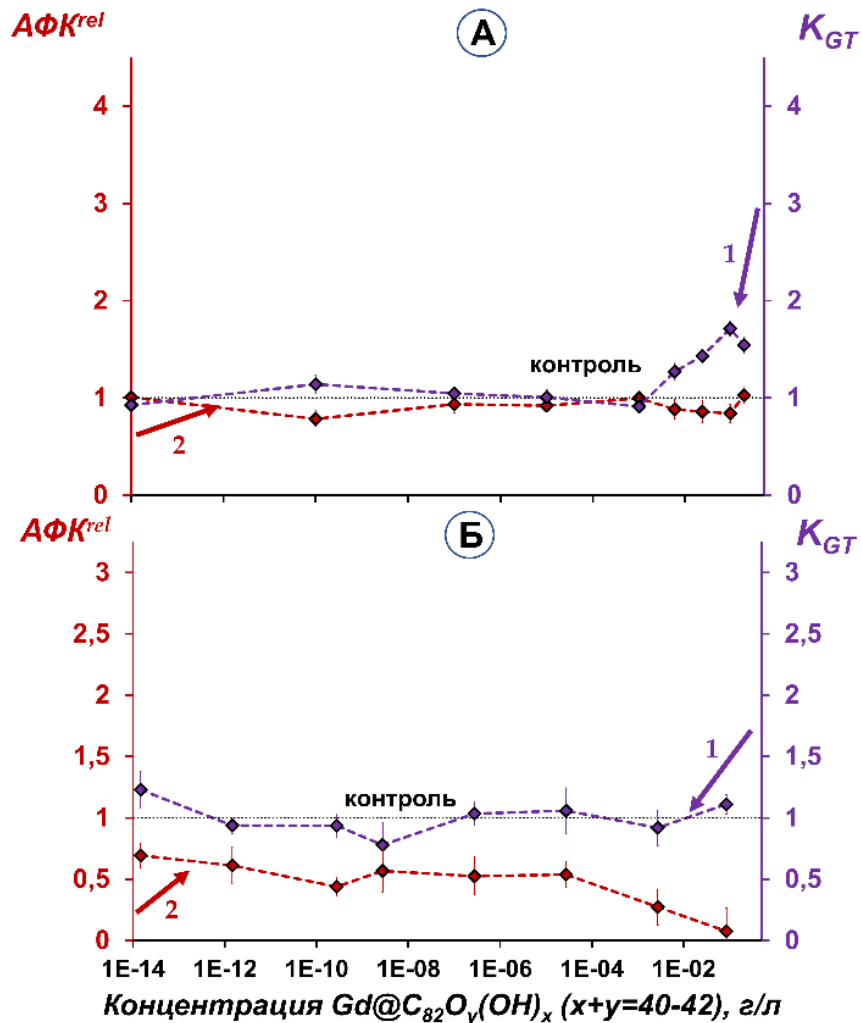


Рисунок 27 – Коэффициенты антиоксидантной активности K_{GT} (1) и относительное содержание АФК, AFC^{rel} , (2) при различных концентрациях $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40-42$. (А) бактериальная суспензия, (Б) ферментативная система. «Контроль» соответствует отсутствию фуллеренола в экспериментальных растворах. Время инкубирования 45 мин. Концентрация АФК в контрольной бактериальной суспензии (бактериальная суспензия + 1,4-бензохинон, $EC_{50} = 8 \times 10^{-7} M$) составляла $\sim 5,8 \times 10^{-6} M$, в контрольной ферментативной системе (ферменты + 1,4-бензохинон, $IC_{50} = 10^{-5} M$) – $4,9 \times 10^{-5} M$

2) Ферментативная тестовая система

Рисунок 27Б показывает отсутствие заметного антиоксидантного эффекта фуллеренола ($K_{GT} \approx 1$) в растворе 1,4-бензохинона на интенсивность биолюминесценции ферментативной тестовой системы (кривая 1). В отличие от бактериальной системы (Рисунок 27А, кривая 2), ферментативная система продемонстрировала снижение содержания АФК примерно на 50% в широком диапазоне низких концентраций фуллеренола (10^{-14} – 10^{-4} г/л), Рисунок 27Б, кривая 2. Мы можем предположить, что данный фуллеренол при низких концентрациях полностью нейтрализовал вызванный 1,4-бензохиноном избыток АФК в ферментативной тестовой системе (кривая 1, Рисунок 26, отмечено зеленым эллипсом).

Следует отметить, что коэффициенты K_{GT} фуллеренола в ферментативной тестовой системе уменьшаются с увеличением времени воздействия: с 1,2 (при 5-минутном инкубировании (Рисунок А.2Б, кривая 1, Приложение А) до ≈ 1 (при 45-минутном ингибировании, Рисунок 27Б, кривая 1), при этом содержание АФК уменьшается при всех исследуемых концентрациях фуллеренола на протяжении всего эксперимента. Результат подчеркивает сложность процессов, ответственных за антиоксидантный эффект фуллеренола.

Различия в отклике клеточных и ферментативных систем на фуллеренол в растворах модельных окислителей можно рассматривать как дополнительное косвенное подтверждение важности гидрофобных взаимодействий и участия клеточной мембраны в биоэффектах фуллеренолов.

в) Коэффициент K_{OxT} и содержание АФК

Роль АФК в антиоксидантной активности фуллеренолов также рассмотрим на примере Gd-содержащего фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40$ – 42 с привлечением коэффициентов антиоксидантной активности K_{OxT} .

Коэффициенты K_{OxT} и относительное содержание АФК, $AФK^{rel}$, были рассчитаны в широком диапазоне концентраций фуллеренола. Сравнивались зависимости коэффициентов K_{OxT} (Таблица 7) и относительное содержание АФК, $AФK^{rel}$, от концентраций фуллеренола.

На Рисунке 28 представлена зависимость K_{OxT} в растворах 1,4-бензохинона от концентрации фуллеренола в ферментативной тестовой системе. Из Рисунка 28 видно, что фуллеренол при концентрациях 10^{-12} – 10^{-4} г/л демонстрирует антиоксидантный

эффект ($K_{OxT} > 1$); однако средние значения K_{OxT} не превышали 1,1, т. е. были близки к пределам достоверности результата. В данном диапазоне концентраций фуллеренола наблюдается снижение содержания АФК (Рисунок А.2Б, кривая 2, Приложение А), коэффициент корреляции ($r = -0,8$). Аналогичный коэффициент корреляции получали и для K_{GT} (см. подраздел 3.2.3б).

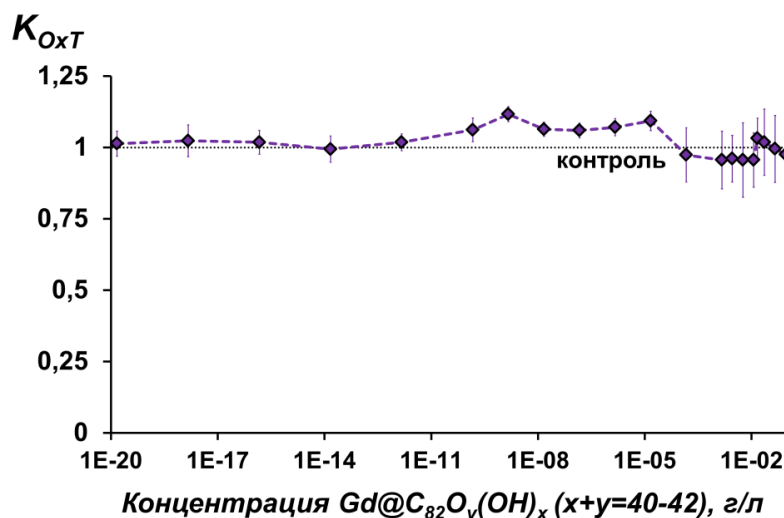


Рисунок 28 – Зависимости коэффициента антиоксидантной активности K_{OxT} раствора – 1,4-бензохинона ($IC_{50} = 10^{-5}$ М), K_{OxT} , от концентрации фуллеренола. Ферментативная тестовая система

Следует отметить, что коэффициенты K_{OxT} фуллеренола были ниже, чем K_{GT} (см. Таблицы 6 и 7, подразделы 3.2.2а–б). Этот результат указывает на то, что детоксикация растворов окислителя фуллеренолом связана не только с редокс-процессами. Вероятно, гидрофобные взаимодействия вносят вклад в процесс нейтрализации окислительного стресса фуллеренолами.

Обобщение по подразделу 3.2.

Показано, что фуллеренолы способны смягчать окислительный стресс, вызванный воздействием молекул окислителей на бактерии, т.е. обладают антиоксидантной активностью [10; 211; 213]. Об этом свидетельствуют коэффициенты антиоксидантной активности, рассчитанные как по интенсивности, так и по задержке биолуминесценции, $K_{GT} > 1$ [10; 211; 213] и $K_{OxT} > 1$ [15; 202; 212; 214], соответственно (Таблицы 6 и 7). Антиоксидантная активность проявляется при низких концентрациях фуллеренолов ($< 10^{-3}$ г/л) [10; 15; 202; 212–214]. Наибольшей антиоксидантной активностью обладают

фуллеренолы, у которых количество кислородосодержащих групп близко $\frac{1}{2}$ от количества атомов углерода в фуллереноловом каркасе (Таблицы 6 и 7) [10; 202; 213].

Антиоксидантный эффект фуллеренолов зависит от гидрофильно-гидрофобных характеристик среды: он больше в растворах амфифильного органического окислителя – 1,4-бензохинона (коэффициенты K_{GT} достигают 2,2), чем неорганического – феррицианида калия [10; 211; 213]. Коэффициенты K_{GT} , как правило, выше в клеточной, чем ферментативной системе [10; 211; 213]. Кроме того, коэффициенты K_{OxT} фуллеренола оказались ниже, чем K_{GT} [211; 213]. Три последних факта указывают на то, что гидрофобные взаимодействия вносят вклад в процесс нейтрализации окислительного стресса фуллеренолами, а также свидетельствуют о важности гидрофобных взаимодействий при функционировании клеточной мембраны и ферментативной активности белков.

Показано, что не происходит значительного изменения содержания АФК в бактериальной суспензии в условиях модельного окислительного стресса при всех используемых концентрациях фуллеренола (Рисунок 27А, кривая 2), однако выявлены умеренные отрицательные корреляции между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК (Рисунок 27А, кривые 1,2). Это позволяет предположить, что смягчение модельного окислительного стресса в бактериальной суспензии связано с потреблением АФК бактериями. Сопоставление данных по содержанию АФК в бактериальной суспензии и растворах ферментов, с учетом анализа влияния фуллеренолов на биолюминесценцию, указывает на сложную связь интенсивности биолюминесценции (как интегрального показателя физиологической активности бактерий) с содержанием АФК [211]. Данное направление чрезвычайно перспективно для дальнейших исследований.

3.3 Скорости окисления НАДН в ферментативной системе

Известно, что никотинамиддинуклеотид восстановленный (НАДН) выполняет роль эндогенного органического восстановителя во многих биохимических процессах в организмах, и является компонентом биолюминесцентной ферментативной системы (реакция 1, подраздел 1.2.2). Об антиоксидантной активности веществ можно судить по их способности ингибировать окисление НАДН в присутствии ферментов; величина скорости окисления НАДН является характеристикой ускорения (или замедления)

редокс-процессов в ферментативной системе.

Оценены скорости окисления эндогенного восстановителя биолюминесцентной ферментативной системы (НАДН) в растворе эндогенного окислителя ФМН в присутствии (V_{ϕ}) и отсутствии (V) фуллеренола. В Таблице 8 в качестве примера представлены значения V и V_{ϕ} для фуллеренола $C_{60}O_y(OH)_x$ (где $x + y = 24-28$).

Таблица 8 – Скорости окисления НАДН в растворах различного состава в присутствии (V_{ϕ}) и отсутствии (V) фуллеренола $C_{60}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$)

№	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

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

В Таблице 8 представлены данные, которые демонстрируют, что скорости автоокисления НАДН в отсутствии (1) и присутствии (1E) ферментов близки между собой. Кроме того, их величины близки к скоростям, определенным ранее в схожих условиях [22; 219]. Добавление фуллеренола в раствор эндогенного восстановителя (НАДН) приводит к увеличению скорости его автоокисления примерно в 1,7 и 2,3 раза, соответственно (Таблица 8, система 1 и 1E). Эти данные свидетельствуют о способности фуллеренола уменьшать восстановительную активность среды, что вносит вклад в уменьшение эффективности биолюминесценции системы при достаточно высоких концентрациях фуллеренола. Вероятно, фуллеренол может расходовать эндогенный восстановитель НАДН, удаляя его из процессов 1 и 1E. Ускорение автоокислительных процессов в ферментативной тестовой системе под действием фуллеренола можно рассматривать как причину ингибирования биолюминесценции фуллеренолом, что вносит вклад в его токсичность.

Системы 2 и 2E (Таблица 8) представляют эндогенные процессы, т.е. окислительно-восстановительные реакции эндогенного восстановителя (НАДН) и

окислителя (ФМН) (реакция 1, подраздел 1.2.2) в отсутствии и присутствии ферментов, соответственно. Добавление ФМН к НАДН (Таблица 8) 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 связано с эндогенным взаимодействием восстановителя и окислителя в системе. Добавление фуллеренола к НАДН + ФМН в ферментативном процессе (2E, Таблица 8) дополнительно увеличивает скорость окисления НАДН в 1,2 раза и не влияет на аналогичную скорость окисления НАДН в неферментативном (2) процессе.

Таким образом, фуллеренол в каталитических концентрациях (10^{-8} г/л) ускоряет ферментативное окисление НАДН эндогенным окислителем (ФМН), ускоряя биолюминесцентную реакцию.

Обобщение по подразделу 3.3.

Таким образом, анализ скоростей окисления НАДН показывает, что фуллеренол $C_{60}O_y(OH)_x$ (где $x + y = 24-28$):

–Увеличивает скорость автоокисления НАДН, способствуя росту окислительной токсичности раствора, что, возможно, вносит вклад в токсичность исследуемых фуллеренолов [10];

–Ускоряет окисление НАДН эндогенным окислителем (ФМН) в ферментативной реакции; увеличивая при этом конкурентоспособность биолюминесцентной реакции (НАДН + ФМН) [10]. 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 $\frac{1}{2}$ »: 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 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. Вероятно, амфифильность фуллеренолов благоприятствует взаимодействию молекул ФМН и НАДН, которые также являются амфифильными структурами.

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.

Разработанная 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, 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

EC_{50} – эффективная концентрация, ингибирующая биолюминесценцию бактериальной тестовой системы на 50%;

I – интенсивность биолюминесцентного или хемилюминесцентного сигнала;

$I_{0,5}$ – половина максимального значения интенсивности биолюминесценции;

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;

P. phosphoreum – *Photobacterium phosphoreum*;

РCHO – альдегид (тетрадеканаль);

$T_{0,5}$ – время достижения половины максимального значения интенсивности биолюминесценции;

V. fischeri – *Vibrio fischeri*;

АФК – активные формы кислорода;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДПФГ – дипальмотоилфосфатидилглицерол;

ДПФК – дипальмитоилфосфатидилхолин;

КРАБ – комплект реактивов аналитической биолюминесценции;

НАД(Ф)Н – никотинамиддинуклеотидфосфат;

НАДН – никотинамиддинуклеотид;

ПДК – предельно допустимая концентрация;

ПО – программное обеспечение;

ПОЛ – перекисное окисление липидов;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия;

Ф – фуллеренол;

ФМН – флавинмононуклеотид;

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель;

ЭМФ – эндодральный металлофуллерен.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
2. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск : КГУ, 2000. – 154с.
3. Hastings, J. W. Bioluminescence / J. W. Hastings // Cell Physiology. 3rd Edition. / Academic Press – New York, 2001. – P. 1115–1131.
4. Lee, J. Electronic excitation transfer in the complex of lumazine protein with bacterial bioluminescence intermediates / J. Lee, Y. Wang, G. Gibson // Biochemistry. –1991. – Vol. 30. – P. 6825–6835.
5. Dunlap, P. V. Bioluminescence / P. V. Dunlap // Microbial Encyclopedia of Microbiology / Elsevier – Oxford, 2009. –P. 45–61.
6. Кривохижина, Л. В. Хемилюминесценция тромбоцитов. Использование метода хемилюминесценции для определения активности тромбоцитов / Л. В. Кривохижина, С. А. Кантюков, Е. Н. Ермолаева, Д. Н. Кривохижин // Вестник Тюменского государственного университета. – 2013. – № 6. – С. 174–181.
7. Туменбаева, Ж. С. Хемилюминесцентный метод в диагностике рака молочной железы / Ж. С. Туменбаева, Л. А. Антоненко, Д. Т. Арыбжанов // Тюменский медицинский журнал. – 2010. – № 2. – С. 52–53.
8. Girotti, S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E. N. Ferri, M. G. Fumo, E. Maiolini // Analytica chimica acta. – 2008. – Vol. 608. – № 1. – P. 2–29.
9. Kratasyuk, V. A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova, M. I. Gladyshev, E. B. Khromichek, A. M. Kuznetsov, E. A. Ivanova // Chemosphere. – 2001. – № 42. – P. 909–915.
10. 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. – 2017. – Vol. 9. – P. 1–8.
11. Кратасюк, В. А. Использование бактериальной биолюминесценции и биолюминесцентного анализа / В. А. Кратасюк, И. И. Гительзон // Успехи микробиологии. – 1987. – Т.21. – С. 3–30.
12. Stom, D. I. Bioluminescent method in studying the complex effect of sewage components / D. I. Stom, T. A. Geel, A. E. Balayan, A. M. Kuznetsov, S. E. Medvedeva // Archives of Environmental Contamination and Toxicology – 1992. – № 22. – P. 203–208.
13. Grabert, E. About the effect of nutrients on the luminescent bacteria test / E. Grabert, F. Kossler // Bioluminescence and chemiluminescence, Wiley, Chichester. – 1997. – P. 291–294.
14. Tarasova, A. S. Antioxidant activity of humic substances via bioluminescent monitoring in vitro / A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // Environmental Monitoring and Assessment. – 2015. – Vol. 187, № 3. – P. 89.
15. 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. – Vol. 93, № 2, P. 536–540.

16. Kratasyuk, V. A. Principle of luciferase biotesting / V. A. Kratasyuk // Proceeding of the First International School «Biological Luminescence». –Singapore, 1990. World Scientific Publishing Co., 1990. – P. 550–558.

17. Bulish, A. A. Use of the luminescent bacterial system for rapid assessment of aquatic toxicity / A. A. Bulish, D. L. Isenberg // ISA Transactions. – 1981. – № 20. – P. 29–33.

18. Kudryasheva, N. S. Bioluminescence and exogenous compounds. Physico-chemical basis for bioluminescent assay / N. S. Kudryasheva // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2006. – № 1. – P. 77–86.

19. Kudryasheva, N. S. Effects of quinones and phenols on the NAD(H)-dependent triple systems / N. S. Kudryasheva, I. Y. Kudinova, E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, D. I. Stom // Chemosphere. – 1998. – № 38. – P. 751–758.

20. Esimbekova, E.N. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. N. Esimbekova, A. Kondik, V. A. Kratasyuk // Environmental Monitoring and Assessment. – 2013. – Vol. 185. – P. 5909–5916.

21. Kratasyuk, V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening. – 2015. – Vol. 18. – P. 952–959.

22. Тарасова, А. С. Использование билюминесцентных систем для изучения закономерностей детоксикации растворов модельных поллютантов гуминовыми веществами : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 / Тарасова Анна Сергеевна. – Красноярск, 2012. – 22 с.

23. Tarasova, A. S. Bioluminescent toxicity monitoring of oxidizer solutions: effect of humic substances / A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2011. – Vol. 30, № 5. – P. 1013–1017.

24. Kudryasheva, N. S. Pollutant toxicity and detoxification by humic substances: mechanisms and quantitative assessment via luminescent biomonitoring / N. S. Kudryasheva, A. S. Tarasova // Environmental Science Pollution Research. – 2015. – Vol. 22, № 1. – P. 155–167.

25. Tarasova, A. S. Bioluminescence as a tool for studying detoxification processes in metal salt solutions involving humic substances / A. S. Tarasova, S. L. Kislun, E. S. Fedorova, A. M. Kuznetsov, O. A. Mogilnaya, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2012. – № 117. – P. 164–170.

26. Fedorova, E. Bioluminescent monitoring of detoxification processes: activity of humic substances in quinone solutions / E. Fedorova, N. Kudryasheva, A. Kuznetsov, O. Mogil'naya, D. Stom // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 2007. – Vol. 88. – I. 2–3. – P. 131–136.

27. Федорова, Е. С. Билюминесцентный мониторинг процессов детоксикации растворов органических соединений : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 / Федорова Елена Сергеевна. – Пушкино, 2011. – 21 с.

28. Rozhko, T. V. Effect of low-level α -radiation on bioluminescent assay systems of various complexity / T. V. Rozhko, N. S. Kudryasheva, A. M. Kuznetsov, G. A. Vydryakova, L. G. Bondareva, A. Ya. Bolsunovsky // Photochemical and Photobiological Sciences. – 2007. – Vol. 6, № 1. – P. 67–70.

29. Selivanova, M. A. Effect of tritium on luminous marine bacteria and enzyme reactions / M. A. Selivanova, O. A. Mogilnaya, G. A. Badun, G. A. Vydryakova, A. M. Kuznetsov, N. S. Kudryasheva // Journal of Environmental Radioactivity. – 2013. – Vol. 120. – P. 19–25.

30. Kudryasheva, N. Bioluminescent assays: effects of quinones and phenols / N. Kudryasheva,

- E. Vetrova, A. Kuznetsov, V. Kratasyuk, D. Stom // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2002. – Vol. 53, № 4. – P. 221–225.
31. Kirillova, T. N. Effect of heavy atom in bioluminescent reactions / T. N. Kirillova, N. S. Kudryasheva // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 387. – P. 2009–2016.
32. Kirillova, T. N. Effect of halogenated fluorescent compounds on bioluminescent reactions / T. N. Kirillova, M. A. Gerasimova, E. V. Nemtseva, N. S. Kudryasheva // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 400. – P. 343–351.
33. Селиванова, М.А. Влияние на люминесцентные бактерии бета- и альфа-излучающих радионуклидов на примере трития и америция-241 : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 / Селиванова Мария Александровна. – Москва, 2013. – 117 с.
34. Гительзон, И. И. Светящиеся бактерии / Родичева Э. К., Медведева С. Е. и др. // Новосибирск : Наука, 1984. – 298с.
35. Nealson, K. H. Isolation, indentification and manipulation of luminous bacteria / K. H. Nealson // *Methods in enzymology*. – 1978. – Vol. 57. – P. 153–166.
36. Heelis, P. F. The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines) / P. F. Heelis // *Chemical society reviews*. – 1982. – Vol. 11, № 1. – P. 15–39.
37. Манжуйль, М. М. Исследование свойств НАД(Р)Н:ФМН-оксидоредуктазы из морских люминесцентных бактерий *Vibrio fischeri* / М. М. Манжуйль, В. С. Данилов // *Журн. биохимии*. – 1994. – Т. 59, № 10. – С. 1608–1614.
38. Vany'sek, P. *Electrochemical series* / P. Vany'sek. – CRC PRESS LLC, 2000.
39. Vetrova, E. V. Redox compounds influence on the NAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase bioluminescent system / E. V. Vetrova, N. S. Kudryasheva, V. A. Kratasyuk // *Photochemical and Photobiological Sciences*. – 2007. – Vol. 6. – P. 35–40.
40. Ветрова, Е. В. Механизмы действия редокс – активных соединений на биолюминесцентную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза. Автореф. дис. канд. биологических наук : 03.00.02/ Ветрова Елена Владимировна. – Красноярск, 2002. – 20 с.
41. Сабитова, Р. И. Хемилюминесценция как один из методов, используемых для изучения антиокислительной активности крови, слюнной жидкости и мочи у работников нефтехимической промышленности / Р. И. Сабитова, Д. А. Еникеев, Д. Ф. Шакиров, Р. Т. Буляков // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2014. – Т. 9, № 5. – С. 87–90.
42. Кривохижина, Л. В. Хемилюминесценция сыворотки при физических нагрузках различной интенсивности / Л. В. Кривохижина, Е. Н. Ермолаева, Е. Ф. Сурина-Марышева, С. А. Кантюков, В. П. Яковлева // *Здоровье и образование в XXI веке*. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 542–547.
43. Образцов, И. В. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика / И. В. Образцов, М. А. Годков // *Молекулярная медицина*. – 2013. – № 4. – С. 3–9.
44. Касыев, Н. Б. Иммунохемилюминесценция в диагностике рецидивных форм эхинококкоза / Н. Б. Касыев, М. С. Айтназаров, А. А. Казиева, А. Н. Нурбекова // *Казанский медицинский журнал*. – 2017. – Т. 98, № 1. – С. 141–143.
45. Щеглова, Е. Л. Хемилюминесценция эритроцитов подростков при острой алкогольной интоксикации / Е. Л. Щеглова, В. Е. Высокогорский, А. В. Индутный, А. В. Ершов, Н. В. Орлова, Н. И. Пискарева // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 1. – С. 190–193.
46. Дунаевский, С. С. Активные формы кислорода и хемилюминесценция при остром панкреатите / С. С. Дунаевский, Е. В. Дябкин // *Сибирский медицинский журнал*. – 2010. – № 3. – С. 38–40.

47. Иванов, А. В. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови больных почечно-клеточным раком до и после хирургического лечения / А. В. Иванов, Е. А. Шкапова, Р. А. Зуков // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 1. – С. 57–58.
48. Коленчукова, О. А. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом / О. А. Коленчукова, А. А. Савченко, С. В. Смирнова // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 4–5. – С. 437–440.
49. Shkarova, E. Lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils in patients with renal cancer / E. Shkarova, L. Kurtasova, A. Savchenko // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2010. – Vol. 149, № 2. – P. 239–241.
50. Портнягина, Э. В. Метод люминол-зависимой хемилюминесценции в оценке иммунного статуса у больных гидронефрозом / Э. В. Портнягина, В. А. Юрчук, Е. В. Портнягин, Г. В. Макарская, М. Ю. Галактионова, И. Т. Эюбов, Д. А. Дергачев // Мать и Дитя в Кузбассе. – 2013. – № 2. – С. 40–44.
51. Сахапова, Г. Ф. Хемилюминесценция ротовой жидкости в диагностике язвенно-некротических поражений слизистой оболочки полости рта у пациентов с множественной миеломой / Г. Ф. Сахапова // Клиническая стоматология. – 2011. – № 2. – С. 84–86.
52. Новицкая, И. В. Хемилюминесцентный анализ в иммунодиагностике кандидозной инфекции / И. В. Новицкая, В. П. Васильев // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 1, № 1. – С. 78–79.
53. Боякова, Н. В. Динамика показателей люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком желудка после хирургического лечения / Н. В. Боякова, Ю. С. Винник, Г. Н. Филькин, С. М. Селин, Е. О. Петрова // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2015. – № 1. – С. 49–50.
54. Ивачева, Н. А. Хемилюминесцентный анализ в диагностике гнойно-воспалительных осложнений острого панкреатита / Н. А. Ивачева, А. С. Ивачев, Н. С. Рябин, С. Е. Гуменюк, В. М. Бенсман // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – № 6. – С. 58–63.
55. Ташкинов, Н. В. Возможности прогнозирования развития тяжелого гнойного трахеобронхита методом хемилюминесценции при термоингаляционном поражении дыхательных путей / Н. В. Ташкинов, О. А. Лебедько, Л. А. Мухамедова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – № 3. – С. 27–31.
56. Максютов, Р. Р. Оценка качественных характеристик кумыса методом хемилюминесцентного анализа / Р. Р. Максютов, А. Н. Мамцев, Е. Е. Пономарев, В. Н. Козлов, А. Л. Даниленко, А. А. Казак // Молочная промышленность. – 2013. – № 12. – С. 60–61.
57. Каниболоцкая, Л. В. Хемилюминесценция в реакциях окисления водных экстрактов чая кислородом в водно-щелочной среде / Л. В. Каниболоцкая, О. С. Лебедкова, А. Н. Шендрик // Химия растительного сырья. – 2006. – № 2. – С. 43–46.
58. Валиев, А. Г. Хемилюминесцентный анализ сухого кобыльего молока / А. Г. Валиев // Пермский медицинский журнал. – 2011. – Т. 28, № 6. – С. 100–105.
59. Русина, И. Ф. Анализ содержания антиоксидантов в фармпрепаратах, пищевых добавках и биосистемах методом хемилюминесценции / И. Ф. Русина, А. Ф. Карташева, Т. В. Максимова, О. Т. Касайкина // Альманах клинической медицины. – 2006. – № 12. – С. 128.
60. Казаринов, К. Д. Изучение биологических эффектов микроволнового излучения с помощью хемилюминесцентного метода / К. Д. Казаринов, И. Г. Полников // Электронная техника. Сер. 1. СВЧ-техника. – 2010. – Вып. 2, № 505. – С. 57–71.

61. Хабибуллин, Р. Р. Теоретические и практические аспекты процесса люминол-зависимой хемилюминесценции в живых организмах / Р. Р. Хабибуллин, А. В. Федосов // Башкирский химический журнал. – 2006. – Т. 13, № 2. – С. 106–107.
62. Beloborodova, N. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils / N. Beloborodova, I. Bairamov, A. Olenin, V. Shubina, V. Teplova, N. Fedotcheva // Journal of Biomedical Science. – 2012 – Vol. 19, № 1. – P. 89.
63. Vieru, I. Y. Kinetics of luminol oxidation with ferricyanide in aqueous alkaline solutions / I. Y. Vieru, Y. N. Kozlov, A. N. Petrov // Kinetics and Catalysis. – 1996. – Vol. 37. – P. 754–759.
64. Vieru, I. Y. Kinetics and mechanism of tetranitromethane reduction in luminol oxidation with ferricyanide in aerated aqueous alkali solutions / I. Y. Vieru, Y. N. Kozlov, A. N. Petrov // Kinetics and Catalysis. – 1997. – Vol. 38. – P. 480–484.
65. Mokgobu, M. I. Manganese promotes increased formation of hydrogen peroxide by activated human macrophages and neutrophils in vitro / M. I. Mokgobu, R. Anderson, H. C. Steel, M. C. Cholo, G. R. Tintinger, A. J. Theron // Inhalation Toxicology. – 2012. – Vol. 24, № 10. – P. 634–644.
66. Еникеев, Д. А. Хемилюминесценция крови млекопитающих в среде химического загрязнения / Д. А. Еникеев, Э. Н. Хисамов, С. А. Еникеева, Л. Т. Идрисова // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 2. – С. 52–55.
67. Ли, К. Определение фенобарбитала в моче и сыворотке человека с помощью проточно-инжекционной хемилюминесценции / К. Ли, Л. Ц. Нью, К. Л. Хэ, К. Х. Сонг // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58, Вып. 1. – С. 88–94.
68. Hu, Y. Study of the catalytic effect of PAR on the luminal-potassium ferricyanide reaction using a flow-injection chemiluminescence method / Y. Hu, Z. Pang, Z. Yang, W. Wel, Y. Wu // Luminescence. – 2005. – № 20. – С. 25–29.
69. Hu, Y. Flow injection-chemiluminescence method for the determination of trace Cu^{2+} in environmental samples / Y. Hu, Z. Yang // Fen Xi Ke Xue Xue Bao. – 2004. – № 20. – P. 148–150.
70. Рязанцева, Л. Т. Хемилюминесцентный способ определения фенола в воздухе / Л. Т. Рязанцева, Б. А. Спиридонов, П. С. Куприенко, И. Г. Казьмина // Современные технологии обеспечения гражданской обороны и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций. – 2012. – № 1. – С. 129–131.
71. Пушкарь, В. Г. Совершенствование метода приготовления иммуносорбентов с магнитными свойствами для хемилюминесцентного анализа / В. Г. Пушкарь, М. Я. Кулаков // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 4. – С. 112–114.
72. Dizdaroglu, M. Introduction to serial reviews on oxidative DNA damage and repair / M. Dizdaroglu // Free Radical Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 32, № 8. – P. 677.
73. Levine, R. L. Oxidative modification of proteins during aging / R. L. Levine // Experimental Gerontology. – 2001. – Vol. 9, № 9. – P. 1495–1502.
74. Костюк, В. А. Биорадикалы и биоантиоксиданты : монография / В. А. Костюк, А. И. Потапович. – Минск : БГУ, 2004. – 174 с.
75. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Соросовский общеобразовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13–19.
76. Hancock, J. T. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways / J. T. Hancock, R. Desikan, S. J. Neill // Biochemical Society Transactions. – 2001. – Vol. 29. – P. 345–350.

77. Кулинский, В. И. Обезвреживание ксенобиотиков / В. И. Кулинский // Соросовский общедобразовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
78. Devasagayam, T. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects / T. Devasagayam, J. C. Tilak, K. K. Bloor, K. S. Sane, S. S Ghaskadbi, R. D. Lele // Journal of Association of Physicians of India. – 2004. – Vol. 52. – P. 796.
79. Собакарь, М. С. Антиоксидантная терапия и метаболические подходы к лечению заболеваний сердечно-сосудистой системы / М. С. Собакарь, Е. В. Ших // Биомедицина. – 2010. – № 3. – С. 10–21.
80. Klaunig, J. E. The role of oxidative stress in carcinogenesis / J. E. Klaunig, L. M. Kamendulis // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2004. – Vol. 44. – P. 239–267.
81. Anderson, G. Neurodegeneration in Parkinson's disease: interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins / G. Anderson, M. Maes // Molecular Neurobiology. – 2014. – Vol. 49, № 2. – P. 771–783.
82. Giacco, F. Oxidative stress and diabetic complications. / F. Giacco, M. Brownlee // Circulation research. – 2010. – Vol. 107, № 9. – P. 1058–1070.
83. Caldeira, GL. Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress / G. L. Caldeira, I. L. Ferreira, A. C. Rego // Journal of Alzheimer's Disease. – 2013. – Vol. 34, № 1. – P. 115–131.
84. Kitani, K. Do antioxidant strategies work against aging and age-associated disorders / K. Kitani, C. Minami, T. Yamamoto, W. Maruyama, S. Kanai, G. O. Ivy, M. C. Carrillo // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2001. – Vol. 928. – P. 248–260.
85. Анисимов, В. Н. Средства профилактики преждевременного старения (геропротекторы) / В. Н. Анисимов // Успехи геронтологии. – 2000. – Вып. 4. – С. 55–74.
86. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress / H. Sies // Redox Biology. – 2017. – Vol. 11. – P. 613–619.
87. Minotti, G. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation / G. Minotti, S. D. Aust // Chemistry and Physics of Lipids. – 1987. – Vol. 44, № 2–4 – P. 191–208.
88. Box, H. C. Free radical-induced double lesions in DNA / H. C. Box, J. B. Dawidzik, E. E. Budzinski // Free Radical Biology and Medicine. – 2001. – Vol. 31, № 7. – P. 856–868.
89. Gebicki, J. M. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species / J. M. Gebicki // Redox Report. – 1997. – Vol. 3, № 2. – P. 99–110.
90. Злотников Э. Г. Краткий справочник по химии / Э. Г. Злотников. – Санкт-Петербург : Издательский дом «Питер», 2010. – 192 с.
91. Шамб У. К. Перекись водорода / У. К. Шамб – Москва : Издательство иностранной литературы, 1958. – 578 с. .
92. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants / H. Sies // Experimental physiology. – 1997. – Vol. 82, № 2. – P. 291–295.
93. Vertuani, S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview / S. Vertuani, A. Angusti, S. Manfredini // Current pharmaceutical design. – 2004. – Vol. 10, № 14. – P. 1677–1694.
94. Bjelakovic, G. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis / G. Bjelakovic, D. Nikolova, L. L. Gluud, R. G. Simonetti, C. Gluud // Journal of the American Medical Association. – 2007. – Vol. 297, № 8. – P. 842–857.
95. Seifried, H. E. The antioxidant conundrum in cancer / H. E. Seifried, S. S. McDonald, D. E. Anderson, P. Greenwald, J. A. Milner // Cancer research. –

2003. – Vol. 63, № 15. – P. 4295–4298.

96. Андриевский, Г. В. О Харькове, р-числах Фибоначчи, математике гармонии, фуллеренах и диетической добавке «C₆₀ Water of Life» [Электронный ресурс] / Г.В. Андриевский, А.П. Стахов // Академия Тринитаризма. – 2011. – С. 7–11.

97. Орлова, М. А. Производные фуллерена как модуляторы процессов клеточной пролиферации и апоптоза / М. А. Орлова, Т. П. Трофимова, А. П. Орлов, О. А. Шаталов, А. А. Свистунов, Ю. К. Наполов, В. П. Чехонин // Онкогематология. – 2012. – № 4. – С. 7–10.

98. Kratscher, W. Solid C₆₀: a new form of carbon / W. Kratscher, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, D. Huffman // Nature. – 1990. – Vol. 347. – P. 354–358.

99. Meier, M. S. Efficient preparative separation of C₆₀ and C₇₀. Gel permeation chromatography of fullerenes using 100% toluene as mobile phase / M. S. Meier, V. P. Selegue // Journal of Organic Chemistry. – 1992. – Vol. 57. – P. 1924–1926.

100. Churilov, G. N. Synthesis of fullerenes and other nanomaterials in arc discharge / G. N. Churilov // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2008. – Vol. 16. – P. 395–403.

101. Churilov, G. N. Synthesis of fullerenes in a high-frequency arc plasma under elevated helium pressure / G. N. Churilov, W. Kratschmer, I. V. Osipova, G. A. Glushenko, N. G. Vnukova, A. L. Kolonenko, A. I. Dudnik // Carbon. – 2013. – Vol. 62. – P. 389–392.

102. Орлова, М. А. Фуллерены и оксидативный стресс / М. А. Орлова, Т. П. Трофимова, А. П. Орлов, О. А. Шаталов, А. А. Свистунов, Ю. К. Наполов, В. П. Чехонин // Онкогематология. – 2012. – № 4. – С. 11–15.

103. Bakry R. Medicinal applications of fullerenes / R. Bakry, R.M. Vallant, M. Najam-ul-Haq, M. Rainer, Z. Szabo, C.W. Huck, G.K. Bonn // International Journal of Nanomedicine. – 2007. – Vol. 2, № 4. – P.639–649.

104. Anilkumar, P. Fullerenes for Applications in Biology and Medicine / P. Anilkumar, F. Lu, L. Cao, P. G. Luo, J.-H. Liu, S. Sahu, K. N. Tackett, Y. Wang, Y.-P. Sun // Current Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 18, № 14 – P. 2045–2059.

105. Castro, E. Fullerenes in biology and medicine / E. Castro, A. H. Garcia, G. Zavala, L. Echegoyen // Journal of Materials Chemistry B. – 2017. – Vol. 5, № 32. – P. 6523–6535.

106. Андреев С. М. Фуллерены: биомедицинский аспект / С. М. Андреев, Е. Н. Башкатова, Д. Д. Пургина, Н. Н. Шершакова, М. Р. Хаитов // Иммунология. – 2015. – № 1. – С. 57–61

107. Пухова, Я. И. Исследование биологической активности водорастворимых комплексов фуллеренов / Я. И. Пухова, Г. Н. Чурилов, В. Г. Исакова, А. Я. Корец, Я. Н. Титаренко // Доклады академии наук. – 1997. – Т. 355, № 2. – С. 269–272.

108. Петраковская, Э. А. Исследование продуктов синтеза фуллеренов с никелем и кобальтом / Э. А. Петраковская, Н. В. Булина, Г. Н. Чурилов, А. П. Пузырь // Журнал технической физики. – 2001. – Т. 71, Вып. 1. – С. 44–48.

109. Логинова Н. Ю. Исследование биологической активности водорастворимого комплекса C₆₀/поли-N-винилпирролидон / Н. Ю. Логинова, Ю. С. Чесовских, В. Б. Бородулин // Тонкие химические технологии. – 2022. – Т. 17, № 6. – С. 492–503.

110. Никитина Ю. Н. Структура и физические свойства фуллерена C₆₀ / Ю. Н. Никитина, А. В. Зотова, З. А. Ягафарова // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2017. – Т. 2. – С. 37–39.

111. Биглова Ю. Н. Химия фуллеренов. I. Общая характеристика, получение и физические свойства / Ю. Н. Биглова, Н. Н. Сигаева, Р. Ф. Талипов, Ю. Б. Монаков // Вестник Башкирского университета. – 2004. – № 1. – С. 24–30.

112. Semenov, K. N. Solubility of Light Fullerenes in Organic Solvents / K. N. Semenov, N. A. Charykov, V. A. Keskinov, A. K. Piartman, A. A. Blokhin, A. A. Kopyrin // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2010. – Vol. 55, № 1. – P. 13–36.
113. Bezmel'nitsyn, V. N. Fullerenes in solutions / V. N. Bezmel'nitsyn, A. V. Eletsii, M. V. Okun' // *Physics-Uspexhi*. – 1998. – Vol. 41, № 11. – P. 1091–1114.
114. Юровская, М. А. Методы получения производных фуллерена C₆₀ / М. А. Юровская // *Соросовский образовательный журнал*. – 2000. – Т. 6, № 5. – С. 26–30.
115. Шарафутдинова, Л. А. Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C₆₀ / Л. А. Шарафутдинова, Е. Н. Горшкова, И. И. Садрутдинова, З. Р. Хисматуллина, С. А. Башкатов // *Биомедицина*. – 2014. – № 3. – С. 49–53.
116. Krusic, P. J. Radical reactions of C₆₀ / P. J. Krusic, E. Wasserman, P. Keizer, J. R. Morton, K. F. Preston // *Science*. – 1991. – Vol. 254. – P. 1183–1185.
117. Morton, J. R. Addition of free radicals to C₆₀ / J. R. Morton, F. Negri, Preston, K. F. // *Accounts of Chemical Research*. – 1998. – Vol. 31, № 2. – P. 63–69.
118. Bensasson, R. V. Reactions of e⁻_{aq}, CO₂^{•-}, HO[•], O₂^{•-} and O₂(¹Δ_g) with a dendro[60]fullerene and C₆₀[C(COOH)₂]_n (n = 2–6) / R. V. Bensasson, M. Bretteich, J. Frederiksen, H. Gottinger, A. Hirsch, E. J. Land, S. Leach, D. J. Mcgarvey, H. Schonberger // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2000. – Vol. 29, № 1 – P. 26–33.
119. Ali, S. S. Biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties / S. S. Ali, J. I. Hardt, K. L. Quick, J. S. Kim-Han, B. F. Erlanger, Ting-Ting Huang, C. J. Epstein // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2004. – Vol. 37, № 8. – P. 1191–1202.
120. Орлов, А. Д. Шунгит – Камень чистой воды / А. Д Орлов. – Санкт-Петербург : Диля, 2004. – 50 с.
121. Bolskar, R. D. Gadofullerene MRI contrast agents / R. D. Bolskar // *Nanomedicine (Lond)*. – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 201–213.
122. Елецкий А.В. Эндоэдральные структуры // *Успехи физических наук*. 2000. Т. 170, № 2. С. 113–142.
123. Козлов В.С., Суясова М.В., Лебедев В.Т. Синтез, экстракция и хроматографическая очистка высших пустых и эндометаллофуллеренов гадолиния // *Журнал прикладной химии*. 2014. Т. 87, № 2. С. 137–143.
124. Maravilla, K. R. Comparison of Gadoterate Meglumine and Gadobutrol in the MRI Diagnosis of Primary Brain Tumors: A Double-Blind Randomized Controlled Intraindividual Crossover Study (the REMIND Study) / K. R. Maravilla, D. San-Juan, S. J. Kim, G. Elizondo-Riojas, J. R. Fink, W. Escobar, A. Bag, D. R. Roberts, J. Hao, C. Pitrou, A. J. Tsiouris, E. Herskovits, J. B. Fiebach // *American Journal of Neuroradiology*. – 2017. – Vol. 38, № 9. –P. 1681–1688.
125. Ersoy H. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis / H. Ersoy, F. J. Rybicki // *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. – 2007. – Vol. 26, № 5. – P. 1190–1197.
126. Fatouros, P. P. In vitro and in vivo imaging studies of a new endohedral metallofullerene nanoparticle / P. P. Fatouros, F. D. Corwin, Z. J. Chen, W. C. Broaddus, J. L. Tatum, B. Kettenmann, Z. Ge, H. W. Gibson, J. L. Russ, A. P. Leonard, J. C. Duchamp, H. C. Dorn // *Radiology*. – 2006. – Vol. 240, № 3. – P. 756–764.
127. Anderson, S. A. Gadolinium-fullerenol as a paramagnetic contrast agent for cellular imaging / S. A. Anderson, K. K. Lee, J. A. Frank // *Investigative radiology*. – 2006. – Vol. 41, № 3. – P. 332–338.

128. Sitharaman, B. Gadofullerenes and gadonanotubes: a new paradigm for high-performance magnetic resonance imaging contrast agent probes / B. Sitharaman, L.J. Wilson // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2007. – Vol. 3. – P. 342–352.
129. Zhang, J. Synthesis and in vivo study of metallofullerene based MRI contrast agent / J. Zhang, K. Liu, G. Xing, T. Ren, S. Wang, // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. – 2007. – Vol. 272, № 3. – P. 605–609.
130. Биглова Ю. Н. Химия фуллеренов. II. Химические свойства / Ю. Н. Биглова, Н. Н. Сигаева, Р. Ф. Талипов, Ю. Б. Монаков // *Вестник Башкирского университета*. – 2004. – № 2. – С. 38–55.
131. Wang, Z. Syntheses, structures and antioxidant activities of fullerlenols: knowledge learned at the atomistic level / Z. Wang, S. Wang, Zhang-Hui Lu, X. Gao // *Journal of Cluster Science*. – 2015. – Vol. 26, № 375. – P. 375–388.
132. Harhaji, L. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene / L. Harhaji, A. Isakovic, N. Raicevic, Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, N. Nikolic, S. Vranjes-Djuric, I. Markovic, V. Trajkovic // *European Journal of Pharmacology*. – 2007. – № 568. – P. 89–98.
133. Гончарова, Е. А. Получение водорастворимых полигидроксилированных фуллеренов с использованием наночастиц железа в качестве катализатора / Е. А. Гончарова, В. Г. Исакова, Е. В. Томашевич, Г. Н. Чурилов // *Вестник СибГАУ*. – 2009. – Вып.1 (22), Ч. 2. – С. 90–93.
134. Lichota, A. A Multiparametric Study of Internalization of Fullereneol $C_{60}(OH)_{36}$ Nanoparticles into Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cytotoxicity in Oxidative Stress Induced by Ionizing Radiation / A. Lichota, I. Piwoński, S. Michlewska, A. Krokosz // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 7. – P. 2281.
135. Foley, S. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative/ S. Foley, C. Crowley, M. Smahhi, C. Bonfils, B. F. Erlanger, P. Seta, Ch. Larroque // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2002. – Vol. 294. – P. 116–119.
136. Grebowski, J. Fullereneol $C_{60}(OH)_{36}$ could associate to band 3 protein of human erythrocyte membranes / J. Grebowski, A. Krokosz, M. Puchala // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2013. – № 1828. – P. 2007–2014.
137. Eropkin, M. Yu. Synthesis and biological activity of fullerlenols with various contents of hydroxyl groups / M. Yu. Eropkin, E. Yu. Melenevskaya, K. V. Nasonova, T. S. Bryazzhikova, E. M. Eropkina, D. M. Danilenko, O. I. Kiselev // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2013 – Vol. 47, № 2. – P. 87–91.
138. Grebowski, J. Fullerlenols as a new therapeutic approach in nanomedicine / J. Grebowski, P. Kazmierska, A. Krokosz // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–9.
139. Jiao, F. Studies on antitumor and antimetastatic activities of fullereneol in a mouse breast cancer model / F. Jiao, Y. Liu, Y. Qu, W. Li, G. Zhou, C. Ge, Yu. Li, B. Sun, Ch. Chen // *Carbon*. – 2010. – № 48. – P. 2231–2243.
140. Dragojevic-Simic, V. Antiinflammatory activity of fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ nanoparticles in a model of acute inflammation in rats / V. Dragojevic-Simic, V. Jacevic, S. Dobric, A. Djordjevic, D. Bokonjic, M. Bajcetic, R. Injac // *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. – 2011. – № 6. – P. 819–827.
141. Slavic, M. Fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ nanoparticles decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction / M. Slavic, A. Djordjevic, R. Radojicic, S. Milovanovic, Z. Orescanin-Dusic, Z. Rakocevic, M. B. Spasic, D. Blagojevic // *Journal of*

Nanopartical Research. – 2013. – Vol. 15, № 1650. – P. 1–10.

142. Torres, V. M. Fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats / V. M. Torres, B. Srdjenovic, V. Jacevic // *Pharmacological Reports*. – 2010. – V. 62, № 4. – P. 707–718.

143. Cai, X. The polyhydroxylated fullerene derivative $C_{60}(OH)_{24}$ protects mice from ionizing radiation-induced immune and mitochondrial dysfunction / X. Cai, J. Hao, X. Zhang, B. Yu, J. Ren, C. Luo, Q. Li, Q. Huang, X. Shi, W. Li, J. Liu // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2010. – № 243. – P. 27–34.

144. Srdjenovic, B. Antioxidant properties of fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin / B. Srdjenovic, V. Milic-Torres, N. Grujic, K. Stankov, A. Djordjevic, V. Vasovic // *Toxicology Mechanisms and Methods*. – 2010 – Vol. 20, № 6. – P. 298–305.

145. Saitoh, Y. Polyhydroxylated fullerene $C_{60}(OH)_{44}$ suppressed intracellular lipid accumulation together with repression of intracellular superoxide anion radicals and subsequent PPAR γ 2 expression during spontaneous differentiation of OP9 preadipocytes into adipocytes / Y. Saitoh, H. Mizuno, L. Xiao, S. Hyoudou, K. Kokubo, N. Miwa // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2012. – № 366. – P. 191–200.

146. Chen, C. Multihydroxylated $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity / C. Chen, G. Xing, J. Wang, Y. Zhao, B. Li, J. Tang, G. Jia, T. Wang, J. Sun, L. Xing, H. Yuan, Y. Gao, H. Meng, Z. Chen, F. Zhao, Z. Chai, X. Fang // *Nano letters*. – 2005. – Vol. 5, № 10. – P. 2050–2057.

147. Liu, J. Molecular mechanism of $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ increasing collagen expression: implication for encaging tumor / J. Liu, S. Kang, Z. Yang, J.K. Weber, N. Tao, Z. Qin, Q. Miao, C. Chen, R. Zhou, Y. Zhao // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 152. – P. 24–36.

148. Пиотровский, Л.Б. Фуллерены в биологии / Л.Б. Пиотровский, О.И. Киселев. – Санкт-Петербург : ООО «Издательство «Росток»», 2006. – 336 с.

149. Xing, G. M. Influences of Structural Properties on Stability of Fullerenols / G. M. Xing, J. Zhang, Y. L. Zhao, J. Tang, B. Zhang, X. F. Gao, H. Yuan, L. Qu, W. B. Cao, Z. F. Chai, K. Ibrahim, R. Su // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2004. – Vol. 108, № 31, P. 11473–11479.

150. Субботина, Т. Ф. Влияние фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ на показатели системы гемостаза in vitro / Т. Ф. Субботина, М. О. Новак, Ю. В. Картышкина, А. С. Щурева, М. А. Думпис // *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*. – 2012. – Т. XIX, № 2. – С. 19–22.

151. Tishevskaya, N. V. Effects of fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ on erythropoiesis in vitro / N. V. Tishevskaya, Yu. M. Zakharov, E. V. Golubotovskii, O. L. Kolesnikov, N. V. Trofimova, Yu. V. Arkhipenko, T. G. Sazontova // *Pharmacology and Toxicology*. – 2014. – Vol. 157, № 1. – P. 49–51.

152. Brisebois, P. P. Comparative study of the interaction of fullerenol nanoparticles with eukaryotic and bacterial model membranes using solid-state NMR and FTIR spectroscopy / P. P. Brisebois, A. A. Arnold, Y. M. Chabre, R. Roy, I. Marcotte // *European Biophysics Journal* – 2012. – № 41. – P. 535–544.

153. Wu, X. Influences of the size and hydroxyl number of fullerenes/fullerenols on their interactions with proteins / X. Wu, S. T. Yang, H. Wang, L. Wang, W. Hu, A. Cao, Y. Liu // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2010. – Vol. 10, № 10. – P. 6298–6304.

154. Popov, A. A. Endohedral Fullerenes / A. A. Popov, S. Yang, L. Dunsch // *Chemical Reviews*. – 2013. – Vol. 113, № 8. – P. 5989–6113.

155. Wang, J. X. Antioxidative function and biodistribution of $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ nanoparticles in tumor-bearing mice / J. X. Wang, C. Y. Chen, B. Li, H. W. Yu, Y. L. Zhao, J. Sun, Y. F. Li,

G. M. Xing, H. Yuan, J. Tang, Z. Chen, H. Meng, Y. X. Gao, C. Ye, Z. F. Chai, C. F. Zhu, B. C. Ma, X. H. Fang, L. Wan // *Biochemical Pharmacology*. – 2006. – Vol. 71, № 6. – P. 872–881.

156. Yin, J.-J. Inhibition of Tumor Growth by Endohedral Metallofullerenol Nanoparticles Optimized as Reactive Oxygen Species Scavenger / J.-J. Yin, F. Lao, J. Meng, P. P. Fu, Y. Zhao, G. Xing, X. Gao, B. Sun, P. C. Wang, C. Chen, X.-J. Liang // *Molecular Pharmacology*. – 2008. – Vol. 74, № 4. – P. 1132–1140.

157. Liu, Y. The effect of Gd@C₈₂(OH)₂₂ nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-alpha mediated cellular immunity / Y. Liu, F. Jiao, Y. Qiu, W. Li, F. Lao, G. Zhou, B. Sun, G. Xing, J. Dong, Y. Zhao, Z. Chai, C. Chen // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – P. 3934–3945.

158. Meng, H. Potent angiogenesis inhibition by the particulate form of fullerene derivatives / H. Meng, G. Xing, B. Sun, F. Zhao, H. Lei, W. Li, Y. Song, Z. Chen, H. Yuan, X. Wang, J. Long, C. Chen, X. Liang, N. Zhang, Z. Chai, Y. Zhao // *ACS Nano*. – 2010. – Vol. 4, № 5. – P. 2773–2783.

159. Некрасов, Б. В. Основы общей химии: в 2 т.: 3-е изд. / Б. В. Некрасов. – Москва : Химия, 1973. – Т.2. – 371с.

160. Починок, А. П. Энциклопедия по безопасности и гигиене труда: в 4 т.: 4-е изд.: Пер. с англ. / А. П. Починок. – Москва : Министерство труда и социального развития Российской Федерации, 2001. – Т.4.–188 с.

161. Katafias, A. Hydrogen peroxide as a reductant of hexacyanoferrate (III) in alkaline solutions: kinetic studies / A. Katafias, O. Impert, P. Kita // *Transition metal chemistry*. – 2008. – Vol. 33, № 8. – P. 1041–1046.

162. Zhang, Y. Determination of electrochemical electron-transfer reaction standard rate constants at nanoelectrodes: Standard rate constants for ferrocenylmethyltrimethylammonium (III)/(II) and hexacyanoferrate (III)/(II) / Y. Zhang, J. Zhou, L. Lin, Z. Lin // *Electroanalysis*. – 2008. – Vol. 20, № 13. – P. 1490–1494.

163. Химическая энциклопедия : в 5 т. / И. Л. Кнунянц [и др.] – Москва : Советская энциклопедия, 1988. – Т. 1– 623 с.: ил.

164. Карпович Т. А. Рекомендации к разработке комплексного метода биотестирования сточных вод с использованием рыб в качестве тест-объекта / Т. А. Карпович, В. И. Лукьяненко // *Экспериментальная водная токсикология*. – 1990. – № 14. – С. 232–237.

165. Banerjee, S. Cellular and molecular mechanisms of cigarette smoke-induced lung damage and prevention by vitamin C / S. Banerjee, R. Chattopadhyay, A. Ghosh, H. Koley, K. Panda, S. Roy, D. Chattopadhyay, I. B. Chatterjee // *Journal of Inflammation (London, U. K.)*. – 2008. – Vol. 5. – P. 21.

166. Lin, Y. S. Albumin adducts of electrophilic benzene metabolites in benzene-exposed and control workers / Y. S. Lin, R. Vermeulen, C. H. Tsai, S. Waidyanatha, Q. Lan, N. Rothman, M. T. Smith, L. Zhang, M. Shen, G. Li, S. Yin, S. Kim, S. M. Rappaport // *Environmental Health Perspectives*. – 2007. – Vol. 115. – P. 28–34.

167. Jakober, C. A. Quinone emissions from gasoline and diesel motor vehicles / C. A. Jakober, S. G. Riddle, M. A. Robert, H. Destailats, M. J. Charles, P. G. Green, M. J. Kleeman // *Environmental Science and Technology*. – 2007. – Vol. 41. – P. 4548–4554.

168. Иванов, В. Г. Органическая химия / В. Г. Иванов, В. А. Горленко, О. Н. Гева. – Москва : Мастерство, 2003. – 624с.

169. Кудряшов, А. М. Влияние поллютантов с различными стресс-характеристиками на антиоксидантный статус эритроцитов *in vitro* / А. М. Кудряшов, Н. М. Титова, Е. В. Кудряшова // *Экология человека*. – 2005. – № 1, С. 14–18.

170. Hartwig, A. The role of DNA repair in benzene-induced carcinogenesis / A. Hartwig // *Chemico-Biological Interactions*. – 2010. – Vol. 184. – P. 269–272.
171. Brunmark, A. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications / A. Brunmark, E. Cadenas // *Free radical biology and medicine*. – 1989. – Vol. 7, I. 4. – P. 435–477.
172. Rodriguez, C. E. An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system / C. E. Rodriguez, M. Shinyashiki, J. Froines, R. C. Yu, J. M. Fukuto, A. K. Cho // *Toxicology*. – 2004 – Vol. 201, I. 1–3. – P. 185–196.
173. Schultz, T. W. Quinone-induced toxicity to *Tetrahymena*: structure-activity relationships / T. W. Schultz, G. D. Sinks, M. T. D. Cronin // *Aquatic toxicology*. – 1997. – V. 39. – I. 3–4. – P. 267–278.
174. Куценко, С.А. Основы токсикологии / С. А. Куценко. – СПб. : Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2002.– 395 с.
175. Tyulkova, N. A. Purification of bacterial luciferase from *Photobacterium leiognathi* with the use of FPLC-system / N. A. Tyulkova // *Bacterial Luminescence*. Singapore: WorldScient: 1990. P. 369–374.
176. Исакова, В. Г. Гидроксилирование фуллеренов, модифицированных наночастицами железа / В. Г. Исакова, Е. А. Гончарова, О. А. Баюков, Г. Н. Чурилов // *Журнал прикладной химии*. – 2011. – Вып. 7, Т. 64 – С. 1093–1097.
177. Roswell D. F. The chemiluminescence of luminol and related hydrazides / D. F. Roswell, E. H. White // *Methods in Enzymology*. – 1978. – Т. 57. – С. 409–423.
178. Фадеева, М. С. Сравнительное изучение Na^+ -транслоцирующих NADH:хинон-оксидоредуктаз из *Vibrio harveyi*, *Klebsiella pneumoniae* и *Azotobacter vinelandii*: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Фадеева Мария Сергеевна. – Москва, 2008. – 26 с.
179. Губич, О. И. Структурная биохимия / О. И. Губич, Т. Н. Зырянова, Е. О. Корик, Т. А. Кукулянская, С. И. Мохорева, Д. А. Новиков, Н. М. Орел, И. В. Семак. – Минск: БГУ, 2011. – 379 с.
180. Яворский, В.А. Планирование научного эксперимента и обработка экспериментальных данных / В.А. Яворский // *Методические указания к лабораторным работам*. – М., 2006. – 24 с.
181. Gmurman, V.E. Fundamentals of Probability Theory and Mathematical Statistics / V. E. Gmurman; Ed. I. I. Berenblut. – UK, London: Pliffe Book Ltd, 1968. –249 p.
182. Keshri, S. Insights into the structural and thermodynamic properties of fullerols $[\text{C}_{60}(\text{OH})_n]$, $n = 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24$ in aqueous media / S. Keshri // *Fluid Phase Equilibria*. – 2020. – Vol. 525. – P. 112805.
183. Chaban, V. V. Which fullereneols are water soluble? Systematic atomistic investigation / V. V. Chaban, E. E. Fileti // *New Journal of Chemistry*. – 2017. –Vol. 41. – P. 184–189.
184. Calabrese, E. J. Hormesis: Path and Progression to Significance / E. J. Calabrese // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 10. – P. 2871.
185. Jargin, S. V. Hormesis and Radiation Safety Norms: Comments for an Update / S. V. Jargin // *Human and Experimental Toxicology*. – 2018. – Vol. 37, № 11. – P. 1233–1243.
186. Shibamoto, Y. Overview of Biological, Epidemiological, and Clinical Evidence of Radiation Hormesis / Y. Shibamoto, H. Nakamura // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 8. – P. 2387.
187. Ge, H. Novel Segmented Concentration Addition Method to Predict Mixture Hormesis of Chlortetracycline Hydrochloride and Oxytetracycline Hydrochloride to *Aliivibrio fischeri* / H. Ge,

M. Zhou, D. Lv, M. Wang, D. Xie, X. Yang, C. Dong, S. Li, P. Lin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 2. – P. 481.

188. Kaiser, J. Hormesis: Sipping from a poisoned chalice *Science* / J. Kaiser // *Science*. – 2003. – Vol. 302, № 5644. – P. 376–379.

189. Calabrese, E. J. Hormetic mechanisms / E. J. Calabrese // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2013. – Vol. 43, № 7. – P. 580–606.

190. Guha, S. Electronic structures and spectral properties of endohedral fullerenes / S. Guha, K. Nakamoto // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2005. – Vol. 249, № 9–10. – P. 1111–1132.

191. Proskurnina, E. V. Effects of Aqueous Dispersions of C₆₀, C₇₀ and Gd@C₈₂ Fullerenes on Genes Involved in Oxidative Stress and Anti-Inflammatory Pathways / E. V. Proskurnina, I. V. Mikheev, E. A. Savinova, E. S. Ershova, N. N. Veiko, L. V. Kameneva, O. A. Dolgikh, I. V. Rodionov, M. A. Proskurnin, S. V. Kostyuk // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 11. – P. 6130.

192. Mikheev, I. V. Antioxidant Potential of Aqueous Dispersions of Fullerenes C₆₀, C₇₀, and Gd@C₈₂ / I. V. Mikheev, M. M. Sozarukova, D. Y. Izmailov, I. E. Kareev, E. V. Proskurnina, M. A. Proskurnin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 11. – P. 5838.

193. Mikheev, I. V. Non-Functionalized Fullerenes and Endofullerenes in Aqueous Dispersions as Superoxide Scavengers / I. V. Mikheev, M. M. Sozarukova, E. V. Proskurnina, I. E. Kareev, M. A. Proskurnin // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 11. – P. 2506.

194. Boltalina, O. Electron Affinity of Some Endohedral Lanthanide Fullerenes / O. Boltalina, I. Ioffe, I. Sorokin, L. N. Sidorov // *Journal of Physical Chemistry A*. – 1997. – Vol. 101, № 50. – P. 9561–9563.

195. Rozhko, T. V. Humic Substances Mitigate the Impact of Tritium on Luminous Marine Bacteria. Involvement of Reactive Oxygen Species / T. V. Rozhko, O. V. Kolesnik, G. A. Badun, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – P. 6783.

196. Meng, J. Biological characterizations of [Gd@C₈₂(OH)₂₂]_n nanoparticles as fullerene derivatives for cancer therapy / J. Meng, X. Liang, X. Chen, Y. Zhao // *Integrative Biology*. – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 43–47.

197. Balogh, L. P. Caging cancer / L. P. Balogh // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2015. – Vol. 11, № 4. – P. 867–869.

198. Liu, Y. Gd-metallofullerenol nanomaterial as non-toxic breast cancer stem cell-specific inhibitor / Y. Liu, C. Chen, P. Qian, X. Lu, B. Sun, X. Zhang, L. Wang, X. Gao, H. Li, Z. Chen, et al. // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 5988.

199. Hastings J.W., Gibson Q.H. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide / J.W. Hastings, Q.H. Gibson // *J. Biol. Chem.* – 1963. – V. 238, № 7. – P. 2537–2554.

200. Paiva, C. N. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? / C. N. Paiva, M. T. Bozza // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2014. – Vol. 20, № 6. – P. 1000–1037.

201. Herb, M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity / M. Herb, M. Schramm // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10, № 2. – P. 313.

202. Kovel (Sushko), E. S. Toxicity and Antioxidant Activity of Fullereneol C_{60,70} with Low Number of Oxygen Substituents / E. S. Kovel, A. G. Kicheeva, N. G. Vnukova, G. N. Churilov, E. A. Stepin, N. S. Kudryasheva // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – P. 6382.

203. Nemtseva, E. V. The mechanism of electronic excitation in bacterial bioluminescent reaction / E. V. Nemtseva, N.S. Kudryasheva // *Uspekhi khimii*. – 2007. – Vol. 76, № 1. – P. 101–112.
204. Lee, J. The sensitized bioluminescence mechanism of bacterial luciferase / J. Lee, F. Müller, A.J.W.G. Visser // *Photochemistry and Photobiology*. – 2019. – Vol. 95, № 3. – P. 679–704.
205. Kareev, I. V. Cluster formation of endohedral metallofullerenes with Y, Gd, Ho in asolution and on a solid surface / I. V. Kareev, V. P. Bubnov, E. K. Alidzhanov, S. N. Pashkevich, Y. D. Lantukh, S. N. Letuta, D. A. Razdobreev // *Solid State Physics*. – 2016. – Vol. 58, № 9. – P. 1924–1929.
206. Szpilewska, H. Experimental Evidence for the Physiological Role of Bacterial Luciferase in the Protection of Cells Against Oxidative Stress / H. Szpilewska, A. Czyż, G. Wgrzyn // *Current Microbiology*. – 2003. – Vol. 47. – P. 379–382.
207. Weyemi, U. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses / U. Weyemi, C. Dupuy // *Mutation Research*. – 2012. – Vol. 751, № 2. – P. 77–81.
208. Sedelnikova, O.A. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis / O. A. Sedelnikova, C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura, A. G. Georgakilas, W. M. Bonner // *Mutation Research*. – 2010. – Vol. 704, № 1–3. – P. 152–159.
209. Lambeth, J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: An example of antagonistic pleiotropy / J. D. Lambeth // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 43, № 3, P. 332–347.
210. 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.
211. 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.
212. 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.
213. 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.
214. 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.
215. Глинка, Н. Л. Задачи и упражнения по общей химии / Н. Л. Глинка. Л. : Химия, 1986. – 272 с.
216. Das, A. 1,4-Benzoquinone (PBQ) Induced Toxicity in Lung Epithelial Cells Is Mediated by the Disruption of the Microtubule Network and Activation of Caspase-3 / A. Das, S. Chakrabarty, D. Choudhury, G. Chakrabarti // *Chemical Research in Toxicology*. – 2010. Vol. 23, № 6. – P. 1054–1066.
217. Kim, M. H. Antimicrobial Activities of 1,4-Benzoquinones and Wheat Germ / M. H. Kim, S. H. Jo, K. S. Ha, J. H. Song, H. D. Jang, Y. I. Kwon // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 20, № 8. P. 1204–1209.

218. Circu, M. L. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis / M. L. Circu, T. Y. Aw // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – Vol. 15. – C. 749–762.

219. Tarasova, A.S. Effect of humic substances on toxicity of inorganic oxidizer bioluminescent monitoring / A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2011. – Vol. 30, № 5. – P. 1013–1017.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

Воздействие фуллеренолов на системы различной сложности

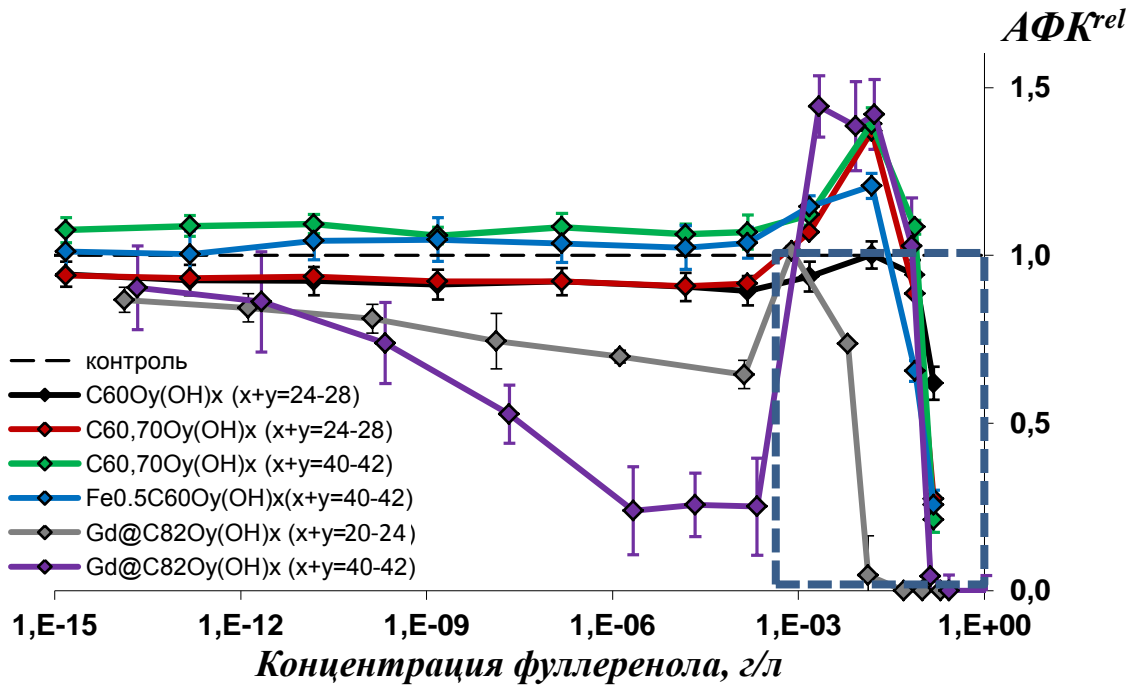


Рисунок А.1 – Зависимости относительного содержания АФК, $A\Phi K^{rel}$, в небиологической системе (дистиллированной воде) от концентраций фуллеренолов.

Содержание АФК в дистиллированной воде (контроле) – 3×10^{-7} М

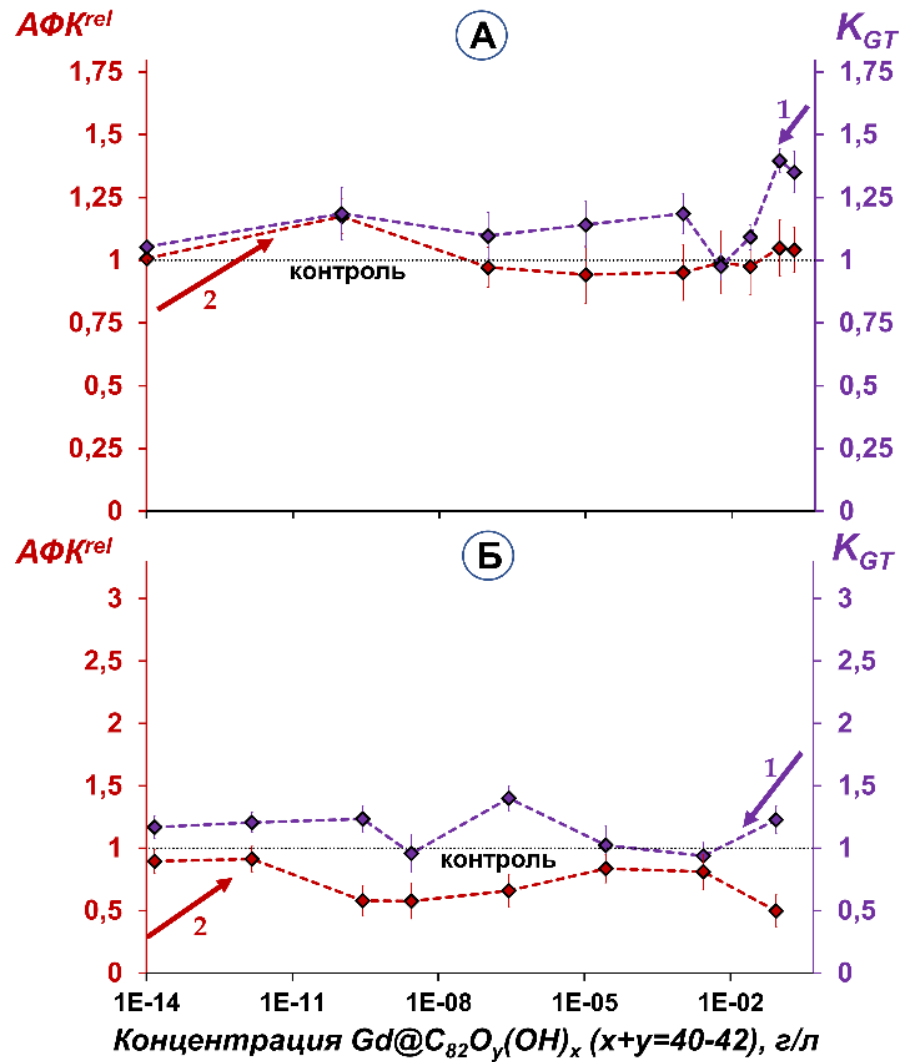


Рисунок А.2 – Коэффициенты антиоксидантной активности K_{GT} (1) и относительное содержание АФК, AFK^{rel} , (2) при различных концентрациях $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x + y = 40-42$. (А) бактериальная суспензия, (Б) ферментативная система. Время инкубирования 5 мин. Концентрация АФК в контрольной бактериальной суспензии (бактериальная суспензия + 1,4-бензохинон ($EC_{50} = 8 \times 10^{-7}$ М)) составляла $\sim 6,4 \times 10^{-6}$ М, в контрольной ферментативной системе (ферменты + 1,4-бензохинон ($IC_{50} = 10^{-5}$ М)) – 6×10^{-5} М. «Контроль» соответствует отсутствию фуллеренола в экспериментальных растворах

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(справочное)

Б.1 Получение и характеристика фуллереновой смеси

Фуллеренсодержащие сажи были синтезированы из графитовых стержней для эмиссионного спектрального анализа (ТУ 3497-001-51046676-2008) в дуговой углеродно-гелиевой высокочастотной плазме [1–2] на установке, описанной в работах [3–4]. Синтез осуществлялся в дуговом разряде переменного тока частотой 66 кГц, при фиксированном давлении гелия; стержни отжигались в вакууме при температуре 1800° С. Стержни подавались непрерывно в процессе их выгорания таким образом, чтобы ток дуги оставался постоянным. Скорость подачи гелия поддерживалась в пределах 4 л/мин, а давление – на уровне 2–3% от заданного.

Извлечение смеси фуллеренов из углеродной сажи проводили методом экстракции в аппарате Сокслета бензолом (о.с.ч.). В дальнейшем смесь высушивалась, а для проведения хроматографических исследований перерастворялась в толуоле. Разделение и идентификацию фуллереновой смеси проводили с использованием жидкостного хроматографа Agilent Technologies 1200-Series (Agilent Technologies, США) с колонками Cosmosil Buckyprep-M 4,6–250 мм; в качестве стационарной фазы – турбостратный графит (межполостное расстояние 3,42 Å), в качестве подвижной фазы – смесь толуол/гексан (4:6). Анализ выполнялся при скорости элюирования 5 мл/мин, детектирование проводилось на длине волны 323 нм [5–6].

По результатам хроматографического исследования было выявлено, что состав фуллереновой смеси зависит от давления гелия при синтезе фуллеренсодержащей сажи (чем меньше давление, тем больше выход высших фуллеренов) [4].

1) При атмосферном давлении гелия площади пиков поглощения индивидуальных фуллеренов по отношению к общей площади поглощения всей фуллереновой смеси составляют: C₆₀ – 70,7%, C₇₀ – 20,3%, высших фуллеренов (C₇₆, C₇₈, C₈₀, C₈₂, C₈₄ и другие) – 5,8%, оксидов C₆₀ и C₇₀ – 3,2% (Рисунок Б.1). В данном случае, содержание C₆₀ в углеродной саже достигало 12,6 вес.%.

2) При давлении гелия 98 кПа фуллереновая смесь имеет следующий состав: C₆₀ – 65,8%, C₇₀ – 22,2%, высших фуллеренов (C₇₆, C₇₈, C₈₀ и другие) – 12%.

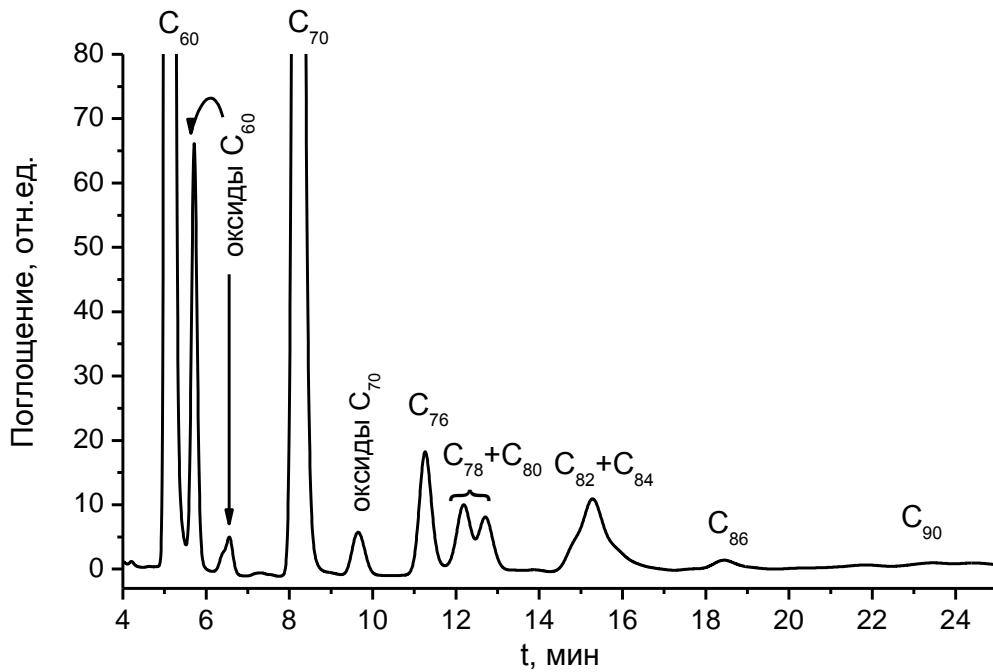


Рисунок Б.1 – Хроматограмма фуллереновой смеси ($\lambda = 323$ нм)

Особенности синтеза и характеристики $Gd@C_{82}$

Для получения $Gd@C_{82}$ в углеродной саже использовали стержни с осевыми отверстиями диаметром 3 мм, содержащими смесь порошка Gd_2O_3 и графита в соотношении 1:1 по весу. В остальном синтез был идентичным, как описано выше. Из полученной сажи в аппарате Сокслета выделяли фуллереновую смесь дисульфидом углерода. Затем, по методике, основанной на применении кислоты Льюиса $TiCl_4$ [7], из полученного раствора выделялась смесь $Gd@C_{82}$ и высших фуллеренов. Далее растворитель испарялся, и полученная твердая фракция растворялась в толуоле. Из раствора смеси фуллеренов выделяли $Gd@C_{82}$ с использованием жидкостного хроматографа Agilent Technologies 1200-Series, как это описано выше. Исследования масс-спектров проведены на приборе MALDI-TOF Bruker BIFLEX TM III в Институте твердого тела и материаловедения им. Лейбница (Дрезден, Германия), масс-спектр фуллерена $Gd@C_{82}$ представлен на Рисунке Б.2. Как видно, в масс-спектре присутствует только основная фракция $Gd@C_{82}$, хорошо выделенная на фоне широкополосного шума. Масс-спектрометрический метод показал качественный состав и то, что в синтезированном веществе не содержится металл в чистом или кластерном виде [8].

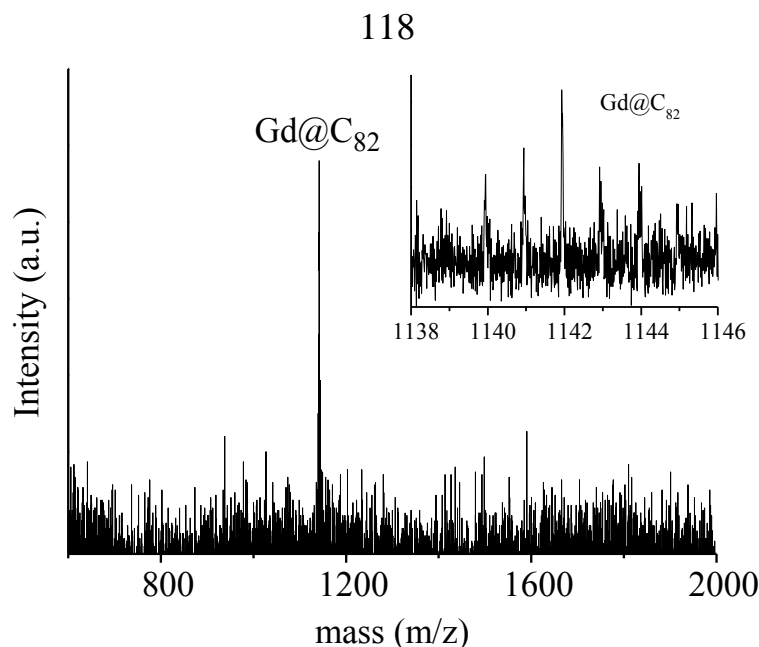


Рисунок Б.2 – Масс-спектр хроматографической фракции с Gd@C₈₂ (положительная мода)

Б.2 Получение фуллеренолов

Б.2.1 Синтез фуллеренолов из фуллеренов

(1) C_{60,70}O_y(OH)_x (x + y = 10–12)

Данный препарат получали по методу синтеза гидратированных фуллеренов, который заключается в переносе фуллеренов из растворов в органическом растворителе в водную фазу с использованием ультразвуковой (УЗ-) обработки с последующим удалением органического растворителя [9–10]. Для получения фуллеренола использовали: деионизированную воду, бензол марки «хч» (АО «Экос-1», Россия), круглодонную колбу объемом 500 мл, американскую воронку Шотта (диаметр пор 40–60 мкм) и УЗ-ванну УЗВ-2,8 (ЗАО «ПФК» «Сапфир», Россия). Характеристики УЗ-бани: общая мощность 230 Вт, мощность нагревателя 130 Вт, рабочая частота 35 кГц.

Навеску фуллереновой смеси C_{60,70} (содержание C₇₀ в смеси 20%) растворяли в бензоле для получения насыщенного раствора с концентрацией 1,5 мг/мл, затем фильтровали. В стеклянную круглодонную колбу наливали деионизированную воду и добавляли бензольный раствор фуллереновой смеси в соотношении 6:1. Круглодонную колбу помещали в ультразвуковую ванну и закрепляли на штативе. После включения ультразвука наблюдалось образование водно-бензольной суспензии белесой окраски на разделе двух фаз (водной и бензольной). Суспензию подвергали ультразвуковой обработке в течение ~ 10 часов (без учета перерывов), с интервалами УЗ-обработки по 14–15 минут, и перерывами между УЗ-обработкой 5–8 минут. Воду в УЗ-ванне меняли по мере ее нагрева. Периодически отмывали бензольную пленку с фуллеренами с поверхности колбы. По мере обработки ультразвуком бензол испарялся,

и на поверхности воды образовывалась серая пленка из частиц фуллереновой смеси, которую растворяли добавлением бензола. В ходе обработки фуллереновая смесь из водно-бензольной суспензии белесой окраски переходила в водную, при этом водная фаза приобретала коричневый цвет. Получившийся водный раствор фуллереновой смеси фильтровали через фильтровальную бумагу и воронку Шотта.

(2) $C_{60}O_y(OH)_x$ и $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$); $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 20-24$); $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)

Синтез данных препаратов был выполнен с использованием концентрированной HNO_3 (о.с.ч.) с последующим гидролизом образующихся полинитрофуллеренов водой [11–14]. Фуллерен $C_{60}/Gd@C_{82}$ /смесь фуллеренов $C_{60,70}$ подвергали воздействию концентрированной HNO_3 при температуре приблизительно $90-100^\circ C$ в течение 3, 6 и 8 часов (чем больше время воздействия азотной кислотой, тем больше присоединяется кислородосодержащих групп). Растворимую в кислоте фракцию (раствор желтого цвета) отбирали и выпаривали. Полученные порошки нитрофуллеренов $C_{60}/C_{60,70}/Gd@C_{82}$ растворяли в воде, затем растворы фильтровали и выпаривали до достижения pH раствора $\sim 5-6$. Таким способом получали аморфные порошки коричневого цвета, хорошо растворимые в воде $C_{60}O_y(OH)_x$ и $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$), желто-коричневые кристаллы $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$), а также желтая масса $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x + y = 20-24$), напоминающая по внешнему виду воск.

Б.2.2 Синтез фуллеренолов из фуллеренсодержащей сажи

(1) $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) получали из смеси фуллеренсодержащей сажи (содержание фуллеренов не более 10%) с ацетилацетонатом железа ($Fe(acac)_3$). Для этого фуллеренсодержащую сажу (1–2 г) и $Fe(acac)_3$ (10–20% по весу) нагревали до возгорания смеси ($180-200^\circ C$), далее горение протекало без дополнительного нагрева, в течение $\sim 20-30$ минут. По окончании горения убыль массы достигала 80–85%.

В полученном продукте реакции горения Fe_2O_3 удаляли растворением в разбавленной HCl при кипячении. Обработку кислотой повторяли, удаляя соль металла (растворившуюся часть). Твердый остаток промывали водой и использовали для синтеза фуллеренолов по методике, описанной в подразделе Б.2.1: В результате получили аморфный порошок коричнево-черного цвета, растворимый в воде.

Из дифрактограммы (Рисунок Б.3) видно, что конденсированным продуктом термической реакции порошковой смеси фуллеренсодержащей сажи + $Fe(acac)_3$ является смесь фуллерены/графит.

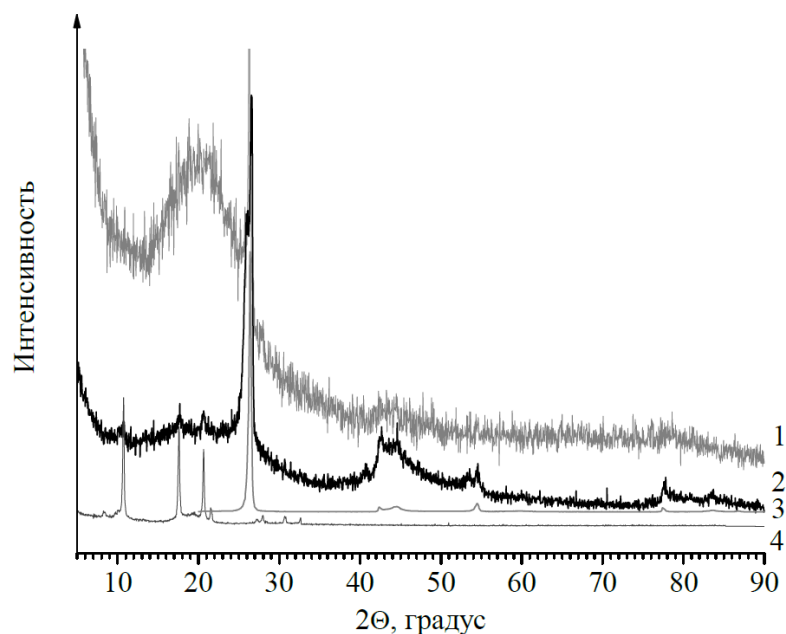


Рисунок Б.3 – Дифрактограммы исходной фуллеренсодержащей сажи (1), продукта реакции смеси фуллеренсодержащей сажи + $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (2), графита (3), фуллеренов (4)

(2) $\text{Fe}_{0,5}\text{C}_{60}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x + y = 40-42$; атом железа – экзогенный, объединяет 2 молекулы $\text{C}_{60}\text{O}_y(\text{OH})_x$)

Синтез производили по методике, описанной для $\text{C}_{60,70}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x + y = 40-42$), только вместо фуллеренсодержащей сажи использовали сажу, содержащую железо-фуллереновые аддукты. Такую сажу получали путем распыления порошка железа (Fe_2O_3) в плазму во время синтеза сажи. Как и в случае фуллеренсодержащей сажи, сажа, содержащая железо-фуллереновые аддукты, не возгоралась в отсутствие $\text{Fe}(\text{acac})_3$ вплоть до $450\text{ }^\circ\text{C}$.

Получившиеся продукты реакции использовали в качестве прекурсора в синтезе фуллеренолов. Гидроксилирование прекурсоров осуществляли методом, описанным для $\text{C}_{60,70}\text{O}_y(\text{OH})_x$ ($x + y = 40-42$).

Согласно данным хроматографического анализа (см. Рисунок Б.4), полученный продукт (образец Fe-содержащего фуллеренола), является полифазным.

С помощью колоночной хроматографии была выделена фракция с наиболее высоким выходом (Рисунок Б.4), соответствующая фуллеренолу с углеродным каркасом C_{60} [15].

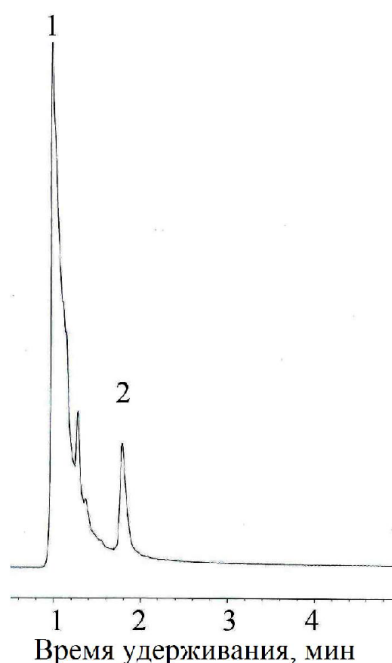


Рисунок Б.4 – Хроматограмма образца Fe-содержащего фуллеренола, элюент вода : ацетонитрил (1:1), колонка Agilent C18

Б.3 Подготовка к характеристике фуллеренолов

Исследуемые фуллеренолы не требовали особой подготовки для аттестации, поскольку препараты были в виде твердых веществ (порошки, кристаллы, воскообразная масса), единственное исключение – водный раствор $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 10-12$).

После обработки ультразвуком регистрировали спектр поглощения водного раствора $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 10-12$), в нем не наблюдали пик при 210 нм, характерный для бензола. Концентрацию полученного раствора определяли с помощью спектрофотометрического метода, она составила 0,16 г/л. Для аттестации (регистрации спектра в инфракрасной (ИК-) области и рентгеновского фотоэлектронного спектра (РФЭС)) часть полученного водного раствора фуллереновой смеси высушивали на водяной бане при $100^\circ C$. Для сравнения брали контрольный образец (бензольный раствор фуллереновой смеси $C_{60,70}$ (содержание C_{70} в смеси 20%) концентрации 1,5 мг/мл высушенный при комнатной температуре под вытяжкой в течение 12 ч.).

Б.4 Характеристика фуллеренолов

Б.4.1 Характеристика пустотелых и экзоэдральных фуллеренолов

Полученные фуллеренолы были охарактеризованы с помощью инфракрасных (ИК-) спектров, сделанных на Фурье-ИК-спектрометре Vertex 70 (Bruker, Германия) и методом

рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) [16] на фотоэлектронном спектрометре UNI-SPECS (SPECS GmbH, Германия).

1) С помощью ИК-спектрометрии определяли наличие –ОН-групп.

На Рисунке Б.5 представлена общая схема ИК-спектра, характерная для всех фуллеренолов. Обычно в спектре регистрируют полосы, которые характеризуют окисленные единицы на углеродном каркасе [17], максимумы этих полос находятся примерно при:

- 3300–3450 см^{-1} (область валентных колебаний –ОН-групп),
- 1700–1750 см^{-1} (область колебаний –C=O),
- 1550–1630 см^{-1} (область валентных колебаний –C=C– и –C–C– групп),
- 1340–1400 см^{-1} (область деформационных колебаний –ОН-групп),
- 1070–1080 см^{-1} (область колебаний –C–O–).

Полосы 1070–1080 см^{-1} , 1700–1750 см^{-1} отражают наличие карбонильных, кетоновых, спиртовых групп.

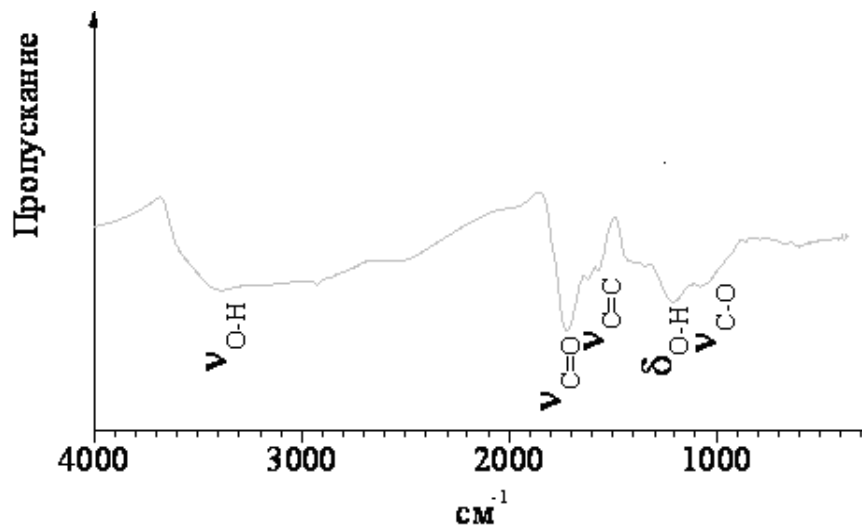


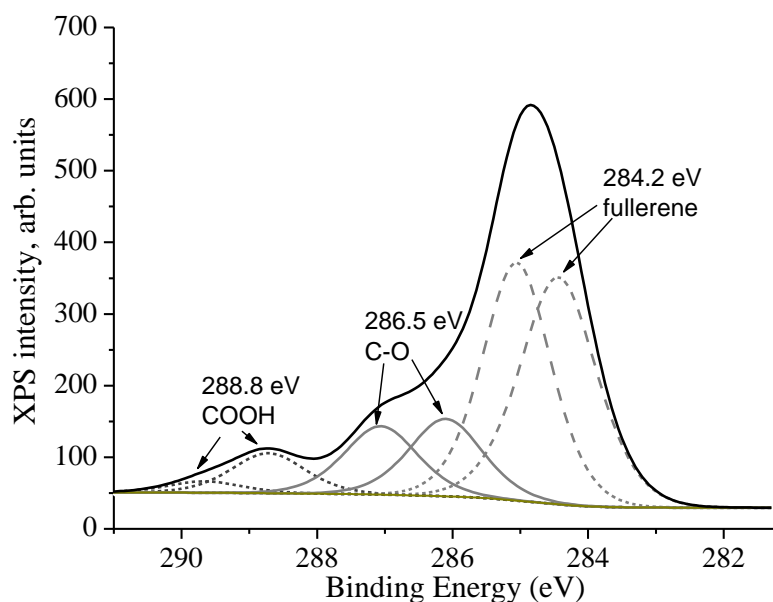
Рисунок Б.5 – Общая схема спектра ИК-пропускания фуллеренолов

В Таблице Б.1 представлены максимумы спектра ИК-пропускания фуллеренолов.

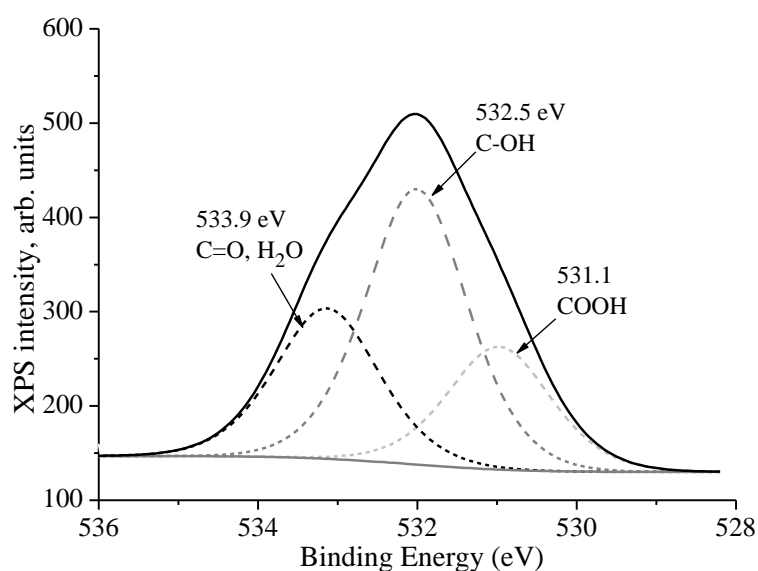
Таблица Б.1 – Максимумы спектра ИК-пропускания фуллеренола

Фуллеренол	Максимумы спектра ИК-пропускания фуллеренола, см ⁻¹				
	валентные колебания –ОН-групп	деформационные колебания ОН-групп (связь –С–О–Н)	колебания –С–О–связей	валентные колебания –С=С–связей	колебания –С=О групп
C ₆₀ O _y (ОН) _x (x + y = 10–12)	3427	1390	1078	1627	1703
C ₆₀ O _y (ОН) _x (x + y = 24–28)	3330	1370	1078	1635 и 1623	1720
C _{60,70} O _y (ОН) _x (x + y = 24–28)	3427	1390	1078	1627	1703
C _{60,70} O _y (ОН) _x (x + y = 40–42)	3400	1340 и 1385	~ 1070	1560–1625	1715
Fe _{0,5} C ₆₀ O _y (ОН) _x (x + y = 40–42)	~ 3400	~ 1350 и ~ 1385	~ 1050– 1150	1625	~ 1710

2) Для оценки количества функциональных групп фуллеренолов применяли метод рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) [16; 18–19]. Полученные спектры анализировались аналогично работе [20]. Подобный анализ рассмотрим на примере C_{60,70}O_y(ОН)_x (x + y = 10–12) (Рисунок Б.6). Из Рисунка Б.6 видно, что в РФЭС-спектре C_{60,70}O_y(ОН)_x наблюдаются пики, относящиеся к С (Рисунок Б.6а) и О (Рисунок Б.6б) и не обнаруживаются пики, соответствующие энергии связи N, то есть в структуре полученного соединения не содержится нитро-групп. В фотоэлектронном спектре образца Gaussian/Lorentzian разложением линии C1s (Рисунок Б.6а) зарегистрированы три энергии связи 284,8; 286,2; 289 эВ. Из этого следует, что углерод в C_{60,70}O_y(ОН)_x находится в трех состояниях с различными степенями окисления: пик углерода в степени окисления 0; пик углерода в степени окисления +1; пик углерода в степени окисления +2. Данные пики соответствуют неокисленному углероду С-С (36%), связанному с –ОН-группой (С–ОН (11%)), и связанному с кислородом (С=О (10%)) [18]. Количество функциональных групп, рассчитанное из доли атомов углерода, связанных химически с кислородом, составляет 21% для данного образца, следовательно, среднее число групп –С=О и –ОН-групп составляет x + y = 10–12. Так как число ОН-групп на поверхности фуллерена, должно быть четным [21], средний состав препарата следующий: C_{60,70}O_y(ОН)_x, где x + y = 10–12, x–четное.



a



б

Рисунок Б.6 – РФЭС-спектр $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 10-12$): а – линия $C1s$, б – линия $O1s$

Подобные РФЭС-спектры были получены и для $C_{60}O_y(OH)_x$ и $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 24-28$).

3) Элементный состав фуллеренолов определяли энергодисперсионным рентгеновским анализом.

На Рисунке Б.7 в качестве примера приведен энергодисперсионный рентгеновский спектр (ЭДРС) для смеси фуллеренолов $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$).

Из Рисунка Б.7 видно, что спектр ЭДРС содержит только сигналы от углерода (C) и кислорода (O), нет сигнала от азота (N), а водород (H) данным методом не анализируется. По оценочным результатам элементного анализа (Таблица Б.2) при использовании в синтезе фуллеренолов стадии отжига фуллеренсодержащей сажи и $Fe(acac)_3$ была синтезирована смесь фуллеренолов с числом кислородосодержащих групп равным $x + y = 40-42$. Эмпирическая

формула: $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$). Видимо, окисление фуллеренов происходит уже на стадии горения смесей фуллеренсодержащей сажи с $Fe(acac)_3$.

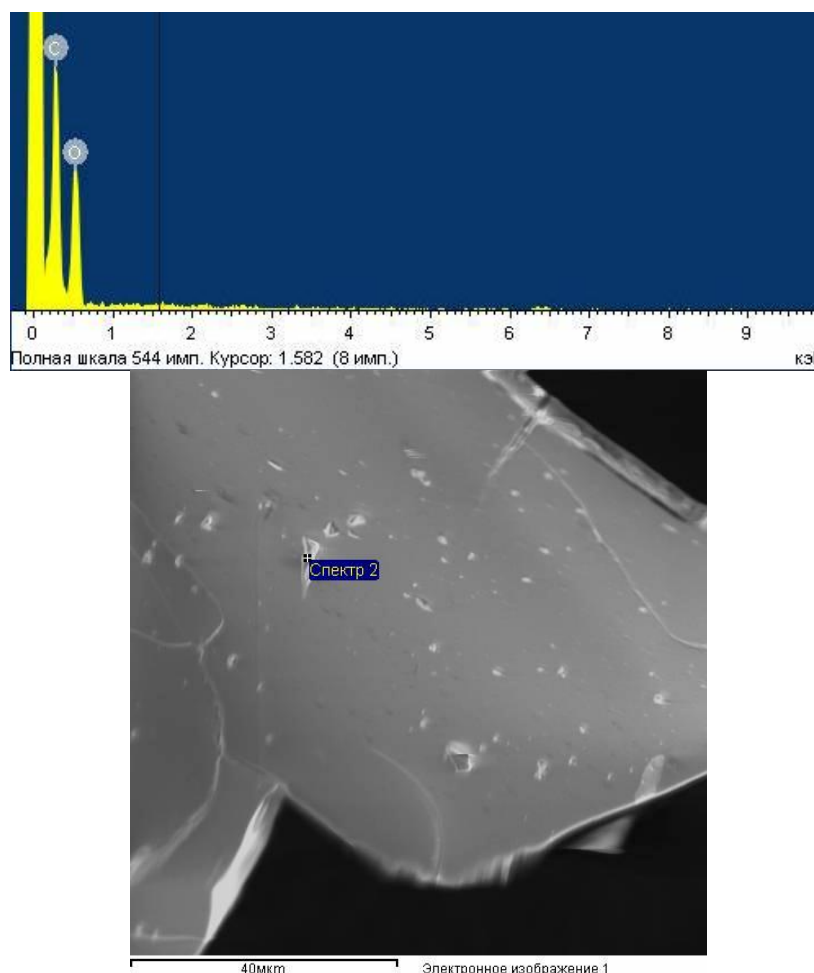


Рисунок Б.7 – ЭДРС фуллеренола $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)

Таблица Б.2 – Результаты элементного анализа фуллеренола $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$)

Элемент	Процентное содержание, %	
	вес	атом
Углерод (С)	46,42	53,57
Кислород (О)	53,58	46,43

Согласно данным хроматографического анализа (Рисунок Б.8) смесь фуллеренолов $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$) содержит несколько фракций с различным временем удерживания, где первая фракция представляет собой фуллеренол $C_{60}O_y(OH)_x$, вторая – фуллеренол $C_{70}O_y(OH)_x$.

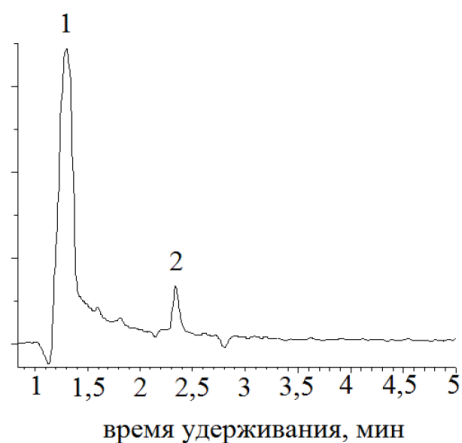


Рисунок Б.8 – Хроматограмма смеси фуллеренолов $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ($x + y = 40-42$), элюент вода : ацетонитрил (1:1), колонка Agilent C18

Б.4.2 Характеристика эндодральных Gd-содержащих фуллеренолов

Гидроксирование $Gd@C_{82}$ выполненное в течении 8 часов позволило получить образец 1, а в течении 3 часов – образец 2.

Регистрация наличия –ОН-групп с помощью ИК-спектрометрии.

На Рисунке Б.9 представлен ИК-спектр первого образца $Gd@C_{82}$. В спектре зарегистрированы характерные полосы 3427, 1627, 1390 и 1078 cm^{-1} , которые свидетельствуют о наличии окисленных единиц на поверхности углеродного каркаса. Связи углерода и кислорода характеризуются волновыми числами 1703 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$) и 1078 cm^{-1} (ν_{C-O}), что отражает наличие карбонильных, кетонных, спиртовых групп [17]. Значениям волнового числа 3427 cm^{-1} и 1390 cm^{-1} соответствуют колебания ν_{O-H} и δ_{O-H} .

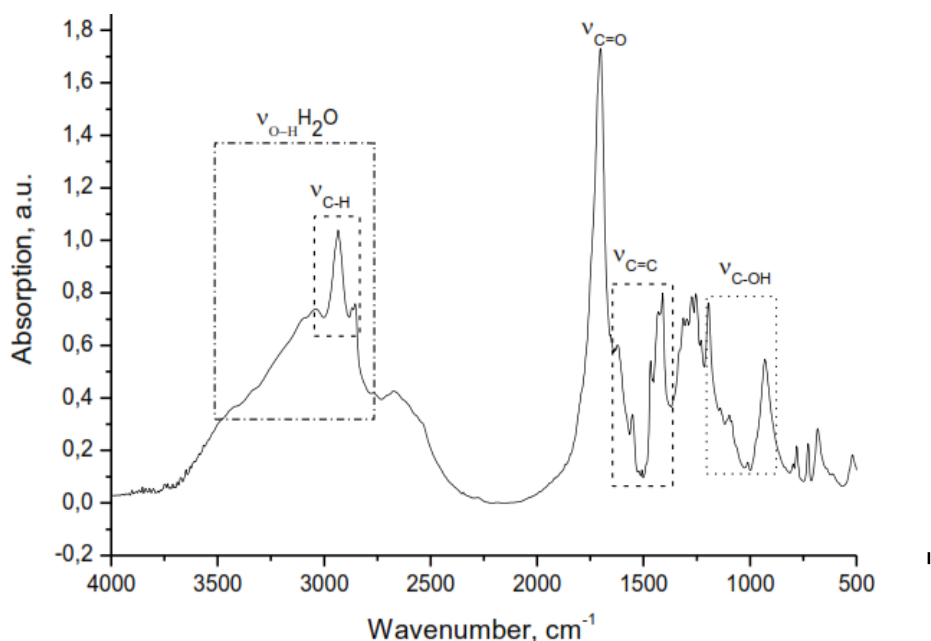


Рисунок Б.9 – ИК-спектр гидроксированного $Gd@C_{82}$ (образец 1)

На Рисунке Б.10 изображен ИК-спектр образца 2. В этом спектре также наблюдаются широкая полоса поглощения с максимумом $\sim 3400 \text{ см}^{-1}$ в области валентных колебаний -OH -групп, полосы валентных колебаний C=C ($\sim 1630 \text{ см}^{-1}$), полосы, которые можно отнести к деформационным колебаниям -OH ($\sim 1370 \text{ см}^{-1}$), кроме того, наблюдаются полосы валентных колебаний C=O ($\sim 1711 \text{ см}^{-1}$) и C-O ($\sim 1050\text{--}1150 \text{ см}^{-1}$) групп.

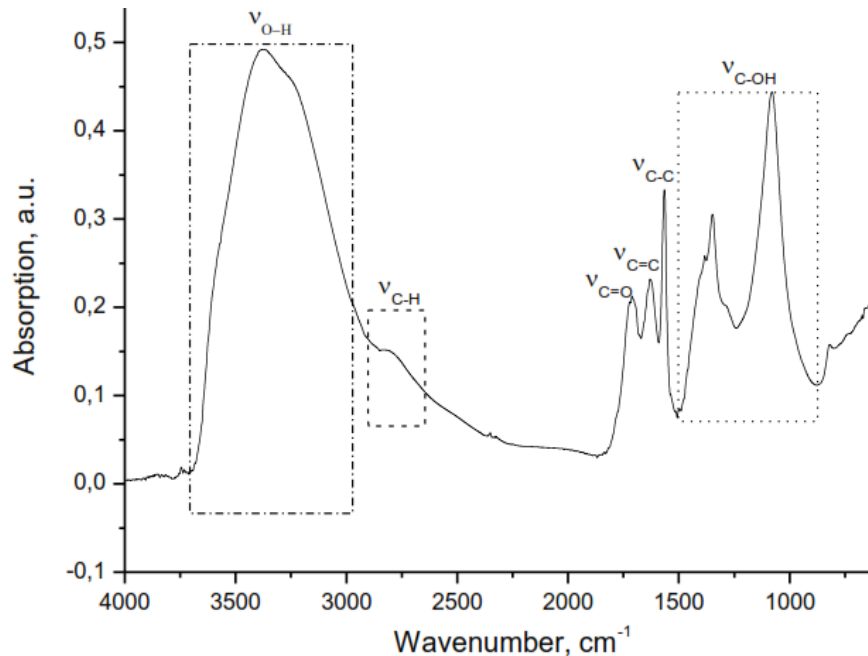


Рисунок Б.10 – ИК-спектр гидроксированного Gd@C_{82} (образец 2)

2) Оценки количества функциональных групп фуллеренолов методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС)

В фотоэлектронном спектре образца 1 Gaussian/Lorentzian разложением линии C1s (Рисунок Б.11) зарегистрированы энергии связи 284,8; 286,2; 289 эВ, которые отнесены к C-C (50,6%), C-O (35,2%) и C=O (14,2%), соответственно [18–19]. Количество функциональных групп определяли исходя из доли атомов углерода, связанных химически с кислородом (49,4% для исследуемого образца). Отсюда следует, что в фуллерене примерно 40,5 атома углерода из 82 атомов связаны с кислородом. Так как число -OH -групп, присоединенных к фуллерену, должно быть четным [21]; средний состав продукта, определенный на основании анализа представляется следующим: $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_y(\text{OH})_x$, где $x + y = 40\text{--}42$.

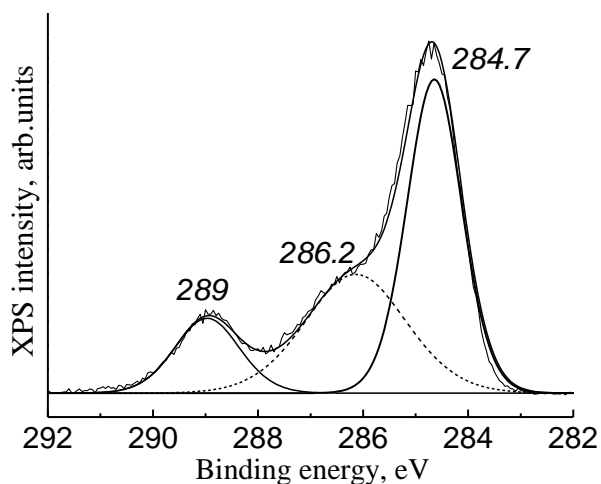


Рисунок Б.11 – Линия C 1s РФЭС-спектр гидроксилированного Gd@C₈₂ (образец 1)

В РФЭС-спектре образца 2 Gaussian/Lorentzian разложением линии C1s (Рисунок Б.12) зарегистрированы энергии связи 284,8; 286,2; 289 эВ, которые отнесены к C-C (72,67%), C-O (19,28%) и C=O (8,05%). Средний состав продукта составил: Gd@C₈₂O_y(OH)_x, где x + y = 20–24.

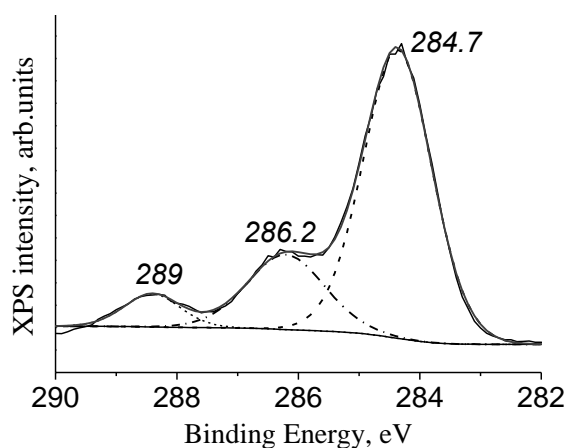


Рисунок Б.12 – Линия C 1s РФЭС-спектр гидроксилированного Gd@C₈₂ (образец 2)

Оценка количества гидроксильных групп и воды, содержащихся в образцах была выполнена методом термогравиметрического (ТГ) анализа. Термическое разложение образцов выполнялось в динамической атмосфере аргона (99,998%) со скоростью потока 90 мл/мин. Были сделаны две навески образцов: 2.880 образец 2 (Gd@C₈₂O_y(OH)_x, где x + y = 20–24) и 3.179 мг образец 1 (Gd@C₈₂O_y(OH)_x, где x + y = 40–42), точность взвешивания ± 0,001 мг. Нагрев образцов производился при 40° С в течении 30 минут, дальнейший нагрев осуществлялся до 1000° С. Регистрировались массы m / z = 18 (H₂O), 28 (N₂, CO), 30 (NO), 32 (O₂), 40 (Ar), 44 (CO₂), 46 (NO₂), 64 (SO₂). На Рисунке Б.13 представлен ТГ для образца 1 (а) и 2 (б).

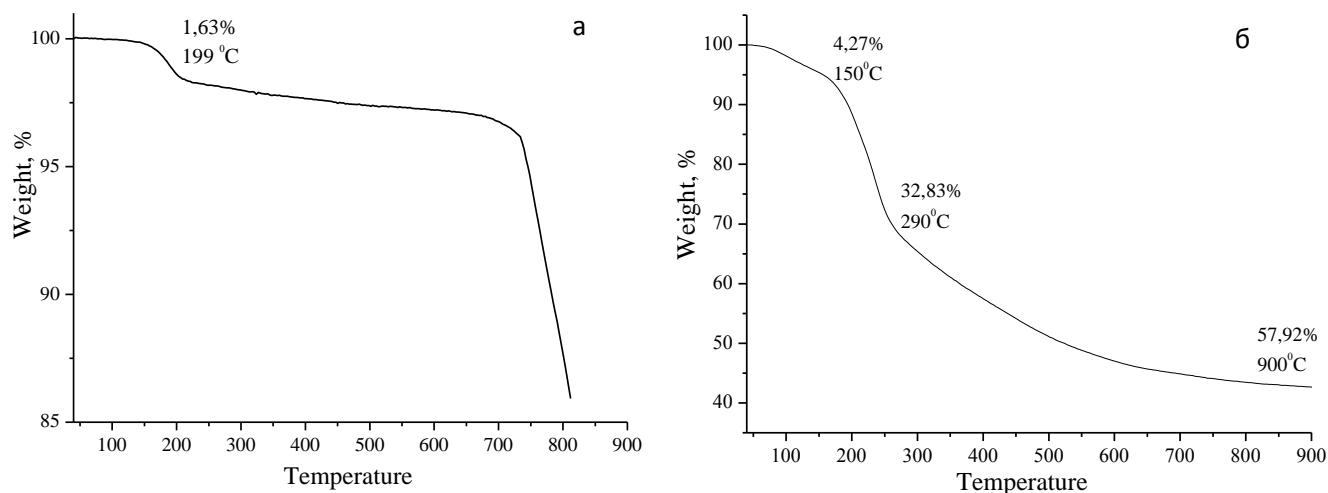


Рисунок Б.13 – ТГ для образца 1 (а) и образца 2(б)

На Рисунке Б.13а наблюдается потеря массы 1,63 вес.% при температуре 140–200° С, которая обусловлена удалением молекул воды. Уменьшение массы образца при 731° С связано с плавлением молекулы фуллерена. При анализе образца 2 (Рисунок Б.13б) начало потери массы практически совпадает с началом нагрева. Первый пик потери массы соответствует выделению H_2O и сопровождается эндотермическим эффектом, $T_m = 107^\circ C$, $m = -4.27\%$. В этом интервале потеря массы происходит с выделением тепла, причем наряду с водой начинается выделение CO_2 , а на кривой ДТГ имеется явно выраженное плечо. В низкотемпературной части пика (150–210° С) вместе с $m/z = 18$ и 44 наблюдается увеличение ионного тока $m/z = 28$ и 30, что может соответствовать N_2 и NO , соответственно. Высокотемпературная часть пика (210–290° С) – выделение воды и CO_2 .

Таким образом, методом дифференциального термического анализа показано, что удаление H_2O в образце происходит при температуре до 150° С, разрушение гидроксильных групп при температуре 150–570° С, а при температуре свыше 570° С происходит структурная деградация фуллерена. Полученные данные подтверждаются литературными данными [22–23]. Установлено, что вода присутствует в образце 1 ($Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, $x + y = 40–42$) в количестве 1,63%, а в образце 2 ($Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, $x + y = 20–24$) в количестве 4,27%.

Воспроизводимость полученных продуктов была проверена путем трехкратного повторения процесса гидроксирования с дальнейшей аттестацией полученных образцов методами ИК- и РФЭС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ к приложению Б

1. Патент № 2320536 Российская Федерация, МПК С 01 В 31/00, В 82 В 3/00. Способ синтеза фуллереновой смеси в плазме при атмосферном давлении : №2005138095/15 : заявл. 07.12.2005 : опубл. 27.03.2008 / Чурилов Г. Н. ; заявитель Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения РАН. – 7 с.
2. Чурилов, Г. Н. Фуллерены. Синтез и теория образования : монография / Г. Н. Чурилов, Н. В. Булина, А. С. Федоров; отв. ред. В. Ф. Шабанов. – Новосибирск : Издательство СО РАН, 2007. – 227 с. – ISBN 978-5-7692-0957-4.
3. Churilov, G. Controlled Synthesis of Fullerenes and Endohedral Metallofullerenes in High Frequency Arc Discharge / G. Churilov, A. Popov, N. Vnukova, A. Dudnik, N. Samoylova, G. Glushenko // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2016. – Vol. 24, № 11. – P. 675–678.
4. Чурилов, Г. Н. Метод и установка для высокопроизводительного управляемого синтеза фуллеренов и эндодральных металлофуллеренов / Г. Н. Чурилов, А. А. Попов, Н. Г. Внукова, А. И. Дудник, Г. А. Глущенко, Н. А. Самойлова, И. А. Дубинина, У. Е. Гуляева // Письма в ЖТФ. – 2016. – Т.42, Вып. 9. – С. 64–70.
5. Churilov, G. N. Synthesis of fullerenes and other nanomaterials in arc discharge / G. N. Churilov // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2008. – Vol. 16. – P. 395–403.
6. Churilov, G. N. Synthesis of fullerenes in a high-frequency arc plasma under elevated helium pressure / G. N. Churilov, W. Kratschmer, I. V. Osipova, G. A. Glushenko, N. G. Vnukova, A. L. Kolonenko, A. I. Dudnik // Carbon. – 2013. – Vol. 62. – P. 389–392.
7. Akiyama, K. Non-HPLC rapid separation of metallofullerenes and empty cages with TiCl_4 Lewis acid / K. Akiyama, T. Hamano, Y. Nakanishi, E. Takeuchi, S. Noda, Z. Wang, S. Kubuki, H. Shinohara // Journal of the American Chemical Society. – 2012. – Vol. 134, № 23. – P. 9762–9767.
8. Тамм, Н. Б. Исследования в области высших фуллеренов / Н. Б. Тамм, Л. Н. Сидоров, С. И. Троянов // Вестник Моск. Ун-та. – 2009. – Т. 50, № 6. – С. 411–427.
9. Andrievsky, G. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. / G. Andrievsky, M. Kosevich, O. Vovk, V. Shelkovsky, L. A. Vashchenko // Journal of The Chemical Society, Chemical Communications. – 1995. – Iss. 12. – P. 1281–1282.
10. Andrievsky, G. Is C_{60} fullerene molecule toxic?! / G. Andrievsky, V. Klochkov, L. Derevyanchenko // Fullerenes, Nanotubes Carbon Nanostructures. – 2005. – Vol. 13 – P. 363–376.
11. Гончарова, Е. А. Получение водорастворимых полигидроксिलированных фуллеренов с использованием наночастиц железа в качестве катализатора / Е. А. Гончарова, В. Г. Исакова, Е. В. Томашевич, Г. Н. Чурилов // Вестник СибГАУ. – 2009. – Вып.1 (22), Ч. 2. – С. 90–93.
12. Исакова, В. Г. Гидроксילирование фуллеренов, модифицированных наночастицами железа / В. Г. Исакова, Е. А. Гончарова, О. А. Баяков, Г. Н. Чурилов // Журнал прикладной химии. – 2011. – Вып. 7, Т. 64 – С. 1093–1097.
13. Sun, D. Synthesis and Characterization of a Water-soluble Endohedral Metallofullerol / D. Sun, H. Huang, S. Yang, Z. Liu, S. Liu // Chemistry of Materials. – 1999. – Vol. 11, № 4. – P. 1003–1006.

14. Chiang, L. Y. Multi-hydroxy additions onto C₆₀ fullerene molecules / L. Y. Chiang, J. W. Swirczewski, C. S. Hsu, S. K. Chowdhury, S. Cameron, K. Creegan // *Journal of The Chemical Society, Chemical Communications*. – 1992. – Iss. 24. – P. 1791–1793.
15. Гончарова, Е. А. Получение железосодержащих порошков фуллеренов и фуллеренолов, их свойства и применение: автореф. дис. ... канд. техн. наук : 05.16.06 / Гончарова Елена Анатольевна. – Красноярск, 2017. – 18 с
16. Li, J. Separation and purification of fullerenols for improved biocompatibility / J. Li, M. Zhang, B. Sun, G. Xing, Y. Song, H. Guo, Y. Chang, Y. Ge, Y. Zhao // *Carbon*. – 2012. – Vol. 50, Iss. 2 – P. 460–469.
17. Arrais, A. Synthesis and Spectral Characterization of Water-Soluble Derivatives of C₇₀ and High-Order Fullerene Mixture (C₇₆, C₇₈ and C₈₄) Achieved by Chemically Induced Air Oxidation / A. Arrais, R. Gobetto, R. Rossetti, E. Diana // *New Diamond and Frontier Carbon Technology*. – 2006. – Vol. 16. – Iss. 2. – P. 79–96.
18. Li, J. A water-soluble gadolinium metallofullerenol: facile preparation, magnetic properties and magnetic resonance imaging application / J. Li, T. Wang, Y. Feng, Y. Zhang, M. Zhen, C. Shu, L. Jiang, Y. Wang, C. Wang // *Dalton transactions*. – 2016. – Vol. 45, Iss. 21. – P. 8696–8699.
19. Georgieva, A. T. Polyhydroxy fullerenes / A. T. Georgieva, V. Pappu, V. Krishna, P. G. Georgiev, I. Ghiviriga, P. Indeglia, X. Xu, Z. H. Fan, B. Koopman, P. M. Pardalos, B. Moudgil // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2013. – Vol. 15, № 7, 1690.
20. Vileno, B. Spectroscopic and Photophysical Properties of a Highly Derivatized C₆₀ Fullerol / B. Vileno, P. R. Marcoux, M. Lekka, A. Sienkiewicz, T. Feher, L. Forro // *Advanced Functional Materials*. – 2006. – Vol. 16. – P. 120–128.
21. Wang, B.-C. Theoretical studies of C₇₀(OH)_n (n = 14, 16, 18 and 20) fullerenols / B.-C. Wang, H.-W. Wang, H.-C. Tso, T.-L. Chen, Y.-M. Chou // *Journal of molecular Structure (Theochem)*. – 2002. – Vol. 581. – P. 177–186.
22. Afreen, S. Hydration or hydroxylation: direct synthesis of fullereneol from pristine fullerene [C₆₀] via acoustic cavitation in the presence of hydrogen peroxide / S. Afreen, K. Kokubo, K. Muthoosamy, S. Manickam // *RSC Advances*. – 2017. – Vol. 7, Iss. 51. – P. 31930–31939.
23. Singh, R. Understanding of thermo gravimetric analysis to calculate number of addends in multifunctional hemi-ortho ester derivatives of fullereneol / R. Singh, T. Goswami // *Thermochimica Acta*. – 2004. – Vol. 419, Iss. 1–2. – P. 97–104.