

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Кратасюк В.А.

подпись инициалы, фамилия

« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02. Физика

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА
С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО
БИОТЕСТА

Руководитель

Д.ф-м.н,
профессор
кафедры
биофизики

Н.С.Кудряшева

подпись, дата

должность,
ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Д.Э. Куклина

инициалы, фамилия

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Изучение биологической активности водорастворимых производных фуллера с помощью биолюминесцентного ферментативного биотеста» изложена на 35 страницах текстового документа и содержит 9 рисунков, 36 литературных источников.

ФУЛЛЕРЕН, БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СИСТЕМА, ТОКСИЧНОСТЬ, АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА.

Фуллерены – аллотропная форма углерода, наноразмерные структуры, которые являются перспективными фармацевтическими агентами; изучение их биологической активности является актуальной задачей.

Целью работы было выявление токсических и антиоксидантных свойств фуллеренола $C_{60}(OH)_{10-12}$ и $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, (где $x+y=40-42$) с использованием биолюминесцентной ферментативной тестовой системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза.

Токсичность фуллеренолов оценивалась по изменению интенсивности биолюминесценции, антиоксидантную активность изучали в условиях модельного окислительного стресса; по уменьшению общей токсичности растворов рассчитывали коэффициенты детоксикации D_{GT} . Для выявления роли активных форм кислорода (АФК) в процессах детоксикации фуллеренолом использовали хемилюминесцентный люминольный метод.

На основе сравнения величин эффективных концентраций ($4 \cdot 10^{-1}$ и $8 \cdot 10^{-4}$ г/л соответственно для $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ и $C_{60}(OH)_{10-12}$) показано, что первый фуллеренол характеризуется меньшей токсичностью. Продемонстрировано, что фуллеренол $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ проявляет умеренную (до 50%) антиоксидантную активность при малых временах инкубирования (0-30 минут). На основе результатов хемилюминесцентного анализа показано, что антиоксидантный эффект фуллеренола связан с уменьшением содержания АФК. На примере исследованных фуллеренолов продемонстрировано, что биолюминесцентный ферментативный биотест является удобным инструментом для сравнения токсичности и антиоксидантной активности фуллеренов разной структуры

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	6
1. Литературный обзор	6
1.1. Фуллерены и их влияние на биологические объекты.....	6
1.1.1 Водорастворимые производные фуллерена	9
1.1.2 Структура и свойства эндодральных фуллеренов	10
1.1.3 Эндодральный фуллеренол с атомом гадолиния – $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$	11
1.2 Использование 1,4-бензохинона в качестве модельного окислителя.	13
1.3 Билюминесцентные методы и их использование для мониторинга токсичности.	13
1.4. Хемилюминесцентный люминольный метод и его использование для выявления содержания активных форм кислорода.	14
1.5 Роль Активных формы кислорода в биологических процессах.....	15
1.6 Способы оценки токсичности наноматериалов	16
2. Материалы и методы	19
2.1 Получение и характеристика фуллеренолов	19
2.2 Реактивы и материалы.....	19
2.3 Регистрация интенсивности хемилюминесцентной и билюминесцентной реакции	20
2.4 Приготовление реакционных смесей для билюминесцентной	20
ферментативной тестовой системы	20
2.5 Расчет коэффициентов детоксикации.	23
2.6 Исследование содержания активных форм кислорода. Хемилюминесцентный люминольный метод 24	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	31
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	33

ВВЕДЕНИЕ

Фуллерены - углеродные наноматериалы, известные своей уникальной структурой. Первый представитель группы фуллеренов был открыт Гарольдом Крото и его группой в 1985 году [1,2]. Открытие и структурное изучение фуллерена положило начало новой области углеродных аллотропов - химии фуллеренов. Эта новая область позволила получить различные производные фуллерена с потенциальными свойствами, полезными для многочисленных применений в различных областях медицины и биологии. Таким образом, фуллерены и их производные являются перспективными фармацевтическими агентами, изучение их биологической активности является **актуальной задачей**.

Но для использования фуллеренов и их производных в медицинской практике необходимо понимание механизмов прямых и отдаленных последствий их воздействий. В частности, известно, что производные фуллеренов характеризуются различной токсичностью.

В настоящее время синтезируется множество различных водорастворимых производных фуллерена с гидроксильными заместителями. Чрезвычайно актуальной является возможность сравнить одним методом токсические и антиоксидантные свойства водорастворимых производных фуллерена различной структуры.

Биолюминесцентные биотесты являются удобными системами для изучения и сравнения биологической активности производных фуллеренов благодаря своей простоте, чувствительности и высокой скорости анализа (1-10 мин). Эти биотесты используют интенсивность люминесценции в качестве физиологического параметра, который может быть легко измерен с помощью простых физических устройств и приборов. Преимущества биолюминесцентных биотестов позволяют исследователям проводить большое количество тестов в сопоставимых условиях в течение короткого периода времени, обеспечивают получение значительного набора экспериментальных данных и, следовательно, статистическую достоверность полученных результатов. Получение статистически достоверных результатов особенно важно при исследовании низкоинтенсивных (низкодозовых) воздействий, которые обычно характеризуются "шумными" откликами и описываются в терминах "стохастичности".

Целью работы было выявление токсических и антиоксидантных свойств фуллеренола $C_{60}(OH)_{10-12}$ и эндодрального фуллеренола с атомом гадолиния – $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, (где $x+y=40-42$) с использованием биолюминесцентной ферментативной тестовой системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза.

В работе поставлены следующие задачи:

- Оценить и сравнить токсические свойства фуллеренолов $C_{60}(OH)_{10-12}$ и $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ с использованием биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза.
- Выявить антиоксидантный эффект фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ в условиях модельного окислительного стресса, оценив изменение токсичности раствора модельного окислителя 1,4-бензохинона в присутствии фуллеренола.
- Выявить роль активных форм кислорода хемилюминесцентным люминольным методом в процессах изменения токсичности под действием фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Литературный обзор

1.1. Фуллерены и их влияние на биологические объекты.

Углерод является одним из самых распространенных элементов в природе и, безусловно, занимает одно из первых мест в области исследований наноматериалов. Вхождение в мир наноматериалов на основе углерода было связано с открытием в 1985 году Робертом Ф. Керлом, Гарольдом В. Крото и Ричардом Э. Смолли фуллерена, третьего после графита и алмаза аллотропа углерода [1]. Поскольку геодезические купола, спроектированные Бакминстером Фуллером в 1960-х годах, дали подсказки для понимания структуры фуллерена C₆₀, молекула была названа в честь этого американского архитектора - бакминстерфуллерен. После этого открытия, в 1990 году, Вольфганг Кратшмер из Института ядерной физики Макса Планка и Дональд Хаффман из Университета Аризоны со своими студентами преуспели в производстве фуллерена в больших количествах [2]. Наконец, в 1996 году Крото, Смолли и Керл были удостоены Нобелевской премии по химии за открытие фуллерена.

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 [3].

Одними из уникальных свойств фуллерена являются его трехмерная структура и химическая реакционная способность [3]. Было синтезировано множество соединений на основе фуллеренов с различными биологическими целями; биомедицинские и биоинженерные аспекты их применения в настоящее время интенсивно изучаются. Фуллерены являются перспективными кандидатами для противораковой или противомикробной терапии, цитопротекции, ингибирования ферментов, контролируемой доставки лекарств, контрастной или радиоактивной диагностической визуализации, радиопротекции, фотосенсибилизации и биомиметики. В настоящее время изучаются такие свойства фуллеренов, как антиоксидантный или прооксидантный потенциал, токсичность, мембранотропность, сродство к связыванию белков, противовирусная, противомикробная и антиапоптотическая способность.

Биологическая активность C₆₀-фуллеренолов с различным количеством кислородных групп была широко изучена в предыдущие десятилетия. Тем не менее, большинство экспериментальных исследований не обеспечивали надлежащих условий для сравнения биологической активности различных фуллеренолов. Сравнимые условия были предоставлены в [4]: Еропкин и др. изучали биологическую

активность фуллеренолов $C_{60}(OH)_{12-14}$, $C_{60}(OH)_{18-24}$ и $C_{60}(OH)_{30-38}$. In vitro была оценена токсичность гидроксильных фуллеренов в клетках кожи человека, которая объяснялась увеличением числа гидроксильных групп с 20 до 32. Сопоставимые экспериментальные условия были обеспечены с использованием систем билюминесцентного анализа, одноклеточного и ферментативного; они выявили меньшую токсичность и более высокую антиоксидантную активность фуллеренолов с меньшим числом кислородных заместителей (24-28) по сравнению с большим числом заместителей (40-42).

Хотя было продемонстрировано, что производные фуллерена действуют как сильные антиоксиданты в водных растворах, данные об их антиоксидантных свойствах противоречивы. Некоторые исследования подтверждают наличие антиоксидантного эффекта фуллеренов, в то время как другие свидетельствуют об окислительном стрессе в клеточных системах [5].

Фуллерен с его уникальной структурой, состоящей из sp^2 углеродов, представляет собой высокосимметричную клетку с различными размерами (C_{60} , C_{76} и так далее). Наиболее распространенным фуллереном в синтезированном составе является C_{60} , молекулярная структура которого, наряду со структурой C_{70} , представлена на рис. 1. C_{60} состоит из 60 атомов углерода с одинарными связями C5-C5, образующими 12 пятиугольников, и двойными связями C5-C6, образующими 20 шестиугольников [2]. Действительно, каждый фуллерен с $2n + 20$ атомами углерода содержит 'n' шестиугольников. По форме фуллерен C_{60} напоминает футбольный мяч, и Ядав и другие [6] утверждают, что отношение молекулы фуллерена к футбольному мячу такое же, как отношение футбольного мяча к Земле, где диаметр Земли, футбольного мяча и молекулы фуллерена составляет 12,75 м, 2,2 -1 м и $7,0 \times 10^{-10}$ м, соответственно.

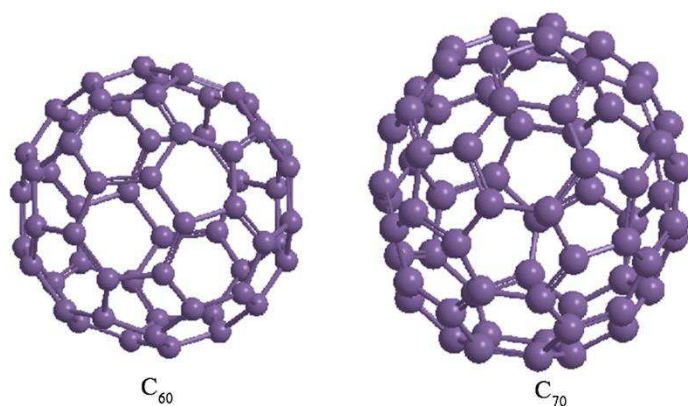
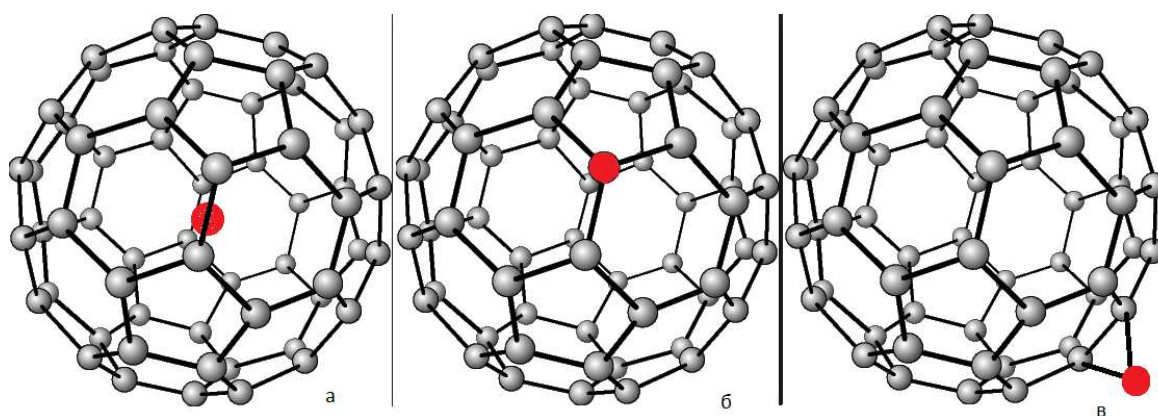


Рисунок 1. Схема молекул фуллеренов (C_{60} и C_{70}).

В отличие от других углеродных наночастиц и материалов, фуллерены могут вступать в реакции с двойными связями (давая начало экзо-производным), атомными и кластерными вставками в углеродную сферу (эндо-производные) и могут образовывать гетерофуллерены (полые молекулы, близкие по форме к сферическим, в которых один или несколько атомов углеродной основы заменены атомами другого элемента) и супрамолекулы (крупные образования, состоящие из большого числа молекулярных олигомеров [7]. При этом экзофуллерены, к которым присоединены только атомы металла, принято называть фуллеридами; атомы водорода – гидрофуллеренами (гидридами фуллеренов); гидроксильные (-ОН) группы – фуллеренолами (фуллеролами или гидроксифуллеренами) и др. Модели эндо-, экзо- и гетерофуллерена представлены на рисунке 2.



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

Рисунок 2 – Модели молекул производных фуллерена C_{60}

Фуллерены, а особенно их водорастворимые формы, рассматриваются как перспективные агенты в наномедицине. Интенсивно разрабатываются подходы, позволяющие использовать их в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии, антиоксидантов, противоопухолевых [7], противовирусных (способны подавлять вирусную активность различных штаммов вируса гриппа, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатита С и др.) и бактерицидных агентов, а также в качестве векторов для адресной доставки лекарственных веществ.

1.1.1 Водорастворимые производные фуллерена

Наиболее распространенная форма фуллерена включает 60 атомов углерода, расположенных в сферической структуре, усеченном икосаэдре или "футбольном мяче", содержащем 12 пятиугольников и 20 шестиугольников, в которой каждый атом углерода образует связь с тремя другими соседними атомами углерода посредством sp^2 -гибридизации [1]. Высокосопряженная π -электронная система углеродной клетки фуллерена обеспечивает его электроноакцепторную способность и, следовательно, каталитическую активность во многих биохимических процессах. Кроме того, на этом основана антирадикальная активность фуллеренов [8,9].

В 1995 г. была получена устойчивая композиция фуллерена и воды, получившая название гидратированного фуллерена C_{60} (HyFn). С одной стороны, HyFn можно рассматривать как сильный акцептор электронов, антиоксидант, с другой – как прооксидант, что объясняется особыми свойствами водных сферических оболочек [10]. HyFn положительно влияет на многие биологические процессы *in vivo*. Было доказано, что C_{60} (HyFn) благодаря антиоксидантному действию ингибирует катаболическую стресс-индуцированную продукцию матричных металлопротеиназ MMP-1, MMP-3 и MMP-13, а также апоптоз и преждевременное старение в культурах хондроцитов человека. Это позволяет предполагать возможность его использования в качестве защитного агента против остеоартрита.

Чистый C_{60} чрезвычайно гидрофобен и нерастворим в воде, что препятствует его использованию в биомедицинских и фармацевтических приложениях. Традиционный метод получения водорастворимой формы фуллерена C_{60} (гидратированного фуллерена C_{60}) включает ультразвуковую обработку водных дисперсий фуллерена [11]. Андриевский и др. предположили, что гидратированный фуллерен C_{60} представляет собой гидрофильный супрамолекулярный комплекс, состоящий из макромолекулы фуллерена C_{60} , заключенной в гидратную оболочку. Продолжают накапливаться сомнения относительно полезных эффектов гидратированного фуллерена C_{60} , поскольку его нейропротективное, противораковое, противовоспалительное и антиатерогенное действие зависит от антиоксидантной способности гидратированного фуллерена C_{60} , которая, как правило, проявляется при крайне низких концентрациях.

Кроме того, увеличение растворимости в воде может быть результатом модификации поверхности фуллерена полярными химическими группами. Было разработано множество производных фуллерена C_{60} с различными полярными функциональными группами. Водорастворимые модификации C_{60} расширяют область применения в биомедицине, например, нейропротекция, доставка лекарств и генов, защита от радиационно-индуцированных повреждений, фотосенсибилизация, соносенсибилизация, восстановление костей и биосенсибилизация [11,12].

В 1992 году Чианж и другие [13] впервые синтезировали полигидроксильное производное фуллерена, который был относительно хорошо растворим в воде, с 14-15 гидроксильными группами. Этим производным был фуллеренол, или фуллерол, или полигидроксилированный фуллерен (фуллеренол - FUL), чья гидрофильность увеличивается с ростом числа присоединенных гидроксильных групп (ОН).

Следует подчеркнуть, что в зависимости от количества гидроксильных групп цитотоксичность фуллеренолов изменяется в зависимости от количества гидроксильных групп и их положения. Shi и др [14] в исследовании на 3 линиях клеток печени, 2 линиях рака dRLh-84 и HepG2 и первичных гепатоцитах крыс показали низкую цитотоксичность фуллерена C₆₀ и фуллеренолов C₆₀(ОН)₂ и C₆₀(ОН)₃₆. В случае C₆₀(ОН)₆₋₁₂ и C₆₀(ОН)₁₂ наблюдалось появление многочисленных вакуолей вокруг клеточного ядра и ингибирование митохондриальной активности.

1.1.2 Структура и свойства эндоэдральных фуллеренов

Структура молекулы эндоэдрального металлофуллерена (ЭМФ) существенно отличается от структуры обычных молекул фуллеренов. Внутри молекулы ЭМФ находится ион металла, валентные электроны которого принимаются π-системой углеродной клетки. В зависимости от размера фуллерена, типа и количества инкапсулированных атомов, эндоэдральные 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. В настоящее время синтезированы и изучены ЭМФ с магнитным моментом [15].

Поскольку ион металла в молекуле ЭМФ смещен от центра клетки, в этой молекуле при определенных условиях возникает электрический дипольный момент. Это было обнаружено, например, в La@C₈₂ [16]. Этот фуллерен имеет достаточно высокое значение диэлектрической проницаемости ($\epsilon = 10-20$ на частоте $f = 1$ МГц). Указанные выше две особенности молекул ЭМФ проявляются в их способности работать как полевой транзистор, как органический солнечный элемент, как часть устройства памяти в молекулярной электронике. Другое возможное применение - в качестве добавки к различным материалам для улучшения их термоэлектрических свойств. Такие материалы используются в энергетике и производстве теплоизоляции в твердотельных устройствах памяти.

Дипольный момент может также возникать в гидроксильных фуллеренах (фуллеренолах), в которых группы О и ОН присоединены к клетке основной молекулы. Поляризуемость таких фуллеренолов будет зависеть от количества присоединенных функциональных О и ОН групп. А

их взаимное расположение на каркасе основной молекулы влияет на их химические и электрофизические свойства [17]. ЭМФ с ОН и другими более сложными группами, присоединенными к каркасу, перспективны для использования в биомедицине: в магнитно-резонансной томографии и в качестве противоракового агента. Известно, что фуллеренолы на основе C_{60} и C_{70} обладают ионной проводимостью, которая зависит от количества ОН групп, поэтому появление ионной проводимости в гидроксированном $Gd@C_{82}$ также вполне ожидаемо. Введение фуллеренов и фуллеренолов улучшает электрические и температурные характеристики полимерных ионных проводников, которые широко используются в топливных элементах. Сродство к электрону у $Gd@C_{82}$ больше, чем у C_{60} (3,3 и $2,7 \pm 0,1$ эВ, соответственно) [18], поэтому он может присоединять больше радикалов. Кроме того, наличие дипольного момента в ЭМФ может быть использовано для изменения диэлектрической проницаемости материалов. До настоящего времени детальные исследования электрофизических свойств ЭМФ и фуллеренолов на их основе в виде порошков или пленок еще не проводились.

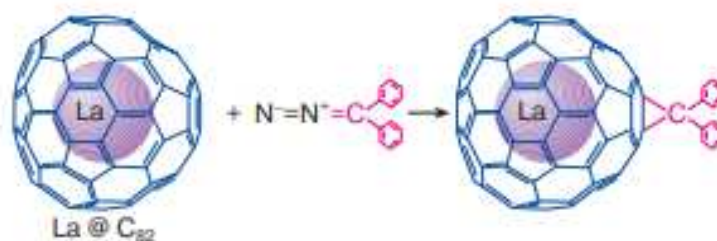


Рисунок 3. Схема реакции $La@C_{82}$ с дифенилдиазометаном

1.1.3 Эндодраальный фуллеренол с атомом гадолиния – $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$

На сегодняшний день наноматериалы имеют широкое биомедицинское применение, что обусловлено их размерами и значительными многофункциональными возможностями. Многие недавно полученные наноматериалы имеют благоприятные терапевтические или диагностические свойства. Например, гадолиний, обладающий уникальными парамагнитными свойствами, благодаря своей частично заполненной 4f орбитали, широко применяется в качестве агента для магниторезонансной томографии и обеспечивает противоопухолевое воздействие [19]. Однако, несмотря на широкое распространение, существующие на сегодняшний день коммерческие препараты на основе гадолиния (магневист, омневист) имеют ряд существенных недостатков, например, приводят к тяжелым кожными и системными заболеваниями,

нарушениям функции почек, внутричерепному осаждению гадолиния и т.д. На сегодняшний день клиническое применение химиотерапевтических препаратов на основе гадолиния ограничено их высокой токсичностью. Возможно, применение гидроксированного ЭМФ с гадолинием, в котором ионы Gd помещены в оболочку фуллерена, позволит избежать этого недостатка.

В журнале Nature Nanotechnology Чанг и другие [20] показали, что отдельные молекулы металлофуллерена $Gd@C_{82}$, вставленные между золотыми электродами, демонстрируют управляемое затвором переключение между двумя электрическими дипольными состояниями при температуре 1,6 К, что приводит к созданию бинарного устройства памяти. Авторы исследования заметили, что атом гадолиния приобретает заряд, будучи заключенным в фуллерен, что способствует образованию двух одноэлектронных транспортных каналов. Материал можно переключать между двумя состояниями, прикладывая напряжение на затворе ± 11 В, что эквивалентно коэрцитивному полю 50 мВ \AA^{-1} . Сходство свойств $Gd@C_{82}$ со свойствами ферроэлектрического материала делает этот эндоэдральный фуллерен знаковым первым примером одномолекулярного электрета (SME).

В статье представлены результаты экспериментальных измерений конститутивных и [21] электрофизических свойств в гидроксированном эндоэдрическом металлофуллерене с пробой гадолиния. Эндоэдрический металлофуллерен был выделен из углеродного конденсата, синтезированного в плазме высокочастотного дугового разряда. Позже были добавлены гидроксильные группы. Методами инфракрасной и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии установлено, что молекулы гидроксированного эндоэдрического металлофуллерена имеют состав $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$, $x+y=(40-42)$. Методом измерения электрического импеданса в диапазоне частот от 100 Гц до 100 МГц показано, что полученный гидроксированный фуллерен является ионным проводником. Измеренные частотные зависимости диэлектрической проницаемости и проводимости гидроксированного фуллерена объясняются на основе предположения о неоднородном распределении электрических зарядов в объеме материала. Измерены петли диэлектрического гистерезиса в диапазоне частот 25 Гц-1 МГц и температурном диапазоне 80-300 К, а также вольт-амперные характеристики. Полученные результаты свидетельствуют о появлении в гидроксированном фуллерене остаточной поляризации, индуцированной электрическим полем. Однако постоянный дипольный момент отсутствует.

Магнитно-резонансная томография - это метод, в котором используются контрастные агенты на основе гадолиния. Фуллерены с их галловой клеткой могут быть использованы для инкапсуляции гадолиния с

целью решения проблем, связанных с использованием Gd для МРТ, учитывая, что после инъекции C_{60} распределяется в тканях и перемещается в выбранные органы без обнаруживаемой и острой токсичности. Эндоэдральные фуллерены, которые захватывают атомы металлов в молекулярную клетку, не высвобождая их даже *in vivo*, являются хорошими кандидатами в качестве контрастного агента как в магнитно-резонансной томографии, так и в рентгеновской томографии [22].

1.2 Использование 1,4-бензохинона в качестве модельного окислителя.

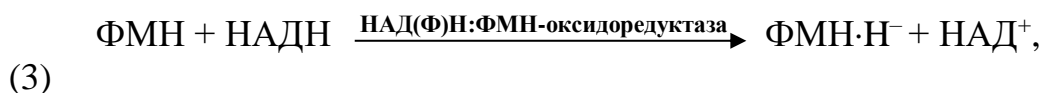
Парабензохинон (2,5-циклогексадиен-1,4-дион, 1,4-бензохинон, парахинон) - это химическое соединение с формулой $C_6H_4O_2$, относящееся к классу хинонов. Хиноны являются продуктами окисления фенола.

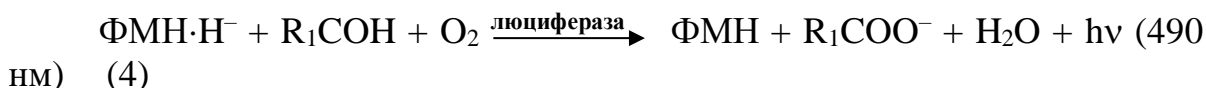
Бензохинон в чистом виде образует ярко-желтые кристаллы с характерным раздражающим запахом, напоминающим хлор или плавящийся пластик. Кристаллы 1,4-бензохинона растворимы в ацетоне, бензоле, диэтиловом эфире и 10 % этаноле, редко растворимы в воде (растворимость 11 г/л). Бензохинон летуч с водяным паром, устойчив к кислотам. [25]

Как и ненасыщенные кетоны, 1,4-бензохинон способен к присоединению по нескольким связям (присоединение по 1,2-С связям; присоединение по 1,4-С=О связям), и продукты присоединения могут быть окислены избытком исходного хинона, если их окислительно-восстановительный потенциал ниже, чем у хинона. В водном растворе восстановление хинона до гидрохинона представляет собой быстрый, количественный и обратимый процесс. Бензохинон также легко и обратимо восстанавливается H_2 (катализатор диоксид платины), SO_2 и гидразином до 1,4-дигидрохинона.

1.3 Билюминесцентные методы и их использование для мониторинга токсичности.

Билюминесцентная система двух сопряженных ферментативных реакций, катализируемых бактериальными ферментами НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой, осуществляет следующую цепь ферментативных реакций (далее – ферментативная система) [26]:





В результате первой реакции (3), катализируемой редуктазой, происходит восстановление флавинмононуклеотида (ФМН) – эндогенного окислителя системы. Формально процесс выглядит как присоединение водорода. Однако в таком полярном растворителе, как вода, перенос водорода можно рассматривать как перенос пары протон + электрон ($\text{H}^+ + \text{e}^-$). При этом никотинамиддинуклеотид (НАДН – эндогенный восстановитель системы) переходит в НАД^+ , передавая молекуле ФМН протон и два электрона с образованием $\text{ФМН}\cdot\text{Н}^-$ (депротонированной формы восстановленного флавина). В водных растворах при нейтральных рН восстановленный флавин на 90% состоит из депротонированной формы и только на 10% представлен в виде $\text{ФМН}\cdot\text{H}_2$. С помощью этой реакции в системе на протяжении довольно большого интервала времени происходит постоянная наработка $\text{ФМН}\cdot\text{Н}^-$, в результате чего поддерживается постоянное свечение.

Вторая реакция (4), катализируемая люциферазой, является биолюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавин ($\text{ФМН}\cdot\text{Н}^-$) и алифатический альдегид (тетрадеканаль) окисляются кислородом воздуха. В результате реакции образуется окисленная форма флавина (ФМН), жирная кислота (миристиновая), а также испускается квант света [27]. Компоненты данной биолюминесцентной реакции способны реагировать и в отсутствие фермента, но эффективность хемилюминесценции такого процесса на 10 порядков ниже.

1.4. Хемилюминесцентный люминольный метод и его использование для выявления содержания активных форм кислорода.

Процессы свободнорадикального окисления, протекающие с образованием радикалов кислорода можно оценивать посредством измерения интенсивности хемилюминесценции [28].

Хемилюминесцентный анализ - метод химического анализа, основанный на измерении светового потока хемилюминесценции; вариант люминесцентного анализа. Он позволяет изучать элементарные акты химических превращений, измерять скорость реакций, определять концентрации реагентов. Количественные определения в хемилюминесцентном анализе основаны на корреляции между скоростью реакции (индикаторная реакция) и интенсивностью хемилюминесценции. Поскольку метод одновременно включает кинетические и люминесцентные характеристики, он обеспечивает высокочувствительные и широкие динамические диапазоны. При этом, по сравнению с

фотолюминесцентным анализом, не требуется никакого внешнего источника света, что дает некоторые преимущества, такие как отсутствие рассеяния или фонового сигнала фотолюминесценции. В зависимости от природы определяемого вещества и реакции ХЛ увеличение или уменьшение интенсивности ХЛ будет непосредственно связано с концентрацией определяемого вещества.

Люминол-зависимый хемилюминесцентный метод широко используется в судебно-медицинской экспертизе для определения следов крови; в медицине для определения крови в моче, в мониторинге АФК в крови при различных заболеваниях при определении препаратов в моче и сыворотке человека [29], активности клеток крови.

Таким образом, хемилюминесцентный метод позволяет нам определять наличие АФК, поэтому, изучая влияние различных природных и синтетических соединений на кинетику хемилюминесценции, мы можем оценить способность этих веществ защищать организм от вредного воздействия АФК, т.е. проявляют антиоксидантные свойства.

1.5 Роль Активных формы кислорода в биологических процессах

Активные виды кислорода (АФК) являются молекулами, образующимися в процессе клеточного метаболизма [30]. В нормальных условиях содержание АФК поддерживается на низком уровне и играет важную роль во многих важных биологических процессах, включая рост, развитие и смерть. Воздействие АФК на клетки зависит от их внутриклеточной концентрации и клеточного контекста. Низкие уровни АФК действуют как ключевые сигнальные молекулы для клеточного метаболизма, но высокие уровни АФК становятся смертельными и разрушают структуру биологических макромолекул, таких как ДНК и белки, вызывая окислительный стресс.

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

Известно, что 95–98% вдыхаемого O₂ расходуется на выработку энергии и окислительный метаболизм субстратов, 2–5% O₂ переходит в АФК. АФК играют роль медиаторов важных внутриклеточных сигнальных путей [31] (регулируют клеточные процессы: клеточное дыхание, деление и др.

1.6 Способы оценки токсичности наноматериалов

Наночастицы (НЧ) нашли широкое применение в электронике, сельском хозяйстве, текстильном производстве, медицине и многих других отраслях промышленности и науки. Международная организация по стандартизации определяет НЧ как структуры, размеры которых в одном, двух или трех измерениях находятся в диапазоне от 1 до 100 нм.

В последние годы были проведены многочисленные экспериментальные исследования, чтобы понять токсичность различных наноматериалов и их влияние на организмы, а также их поведение (например, агрегацию и растворение) в различных условиях окружающей среды [32].

Тем не менее, использование наноматериалов вызывает серьезную обеспокоенность из-за их токсичности и безопасности, особенно потому, что наиболее популярные наноматериалы содержат токсичные элементы, например, CdSe, CdTe и CdS.

анализы на основе красителей

Для определения цитотоксичности НЧ существует ряд анализов, включая множество анализов на основе красителей (нефлуоресцентных и флуоресцентных). В исследовании [33] одностенные углеродные нанотрубки (SWCNT), фуллерены (C_{60}), сажа (CB), nC_{60} и квантовые точки (QD) были изучены *in vitro* для определения их токсичности в ряде типов клеток. Использовалось большое количество красителей жизнеспособности для оценки токсичности данных наноматериалов. Результаты были очень разными из-за взаимодействия углеродных наноматериалов с красителем/продуктом красителя, и авторы рекомендовали использовать более одного анализа для точного определения токсичности.

анализ нанотоксичности in vitro

Для тестирования патогенных эффектов НЧ большинство анализов *in vitro* были разработаны с использованием клеток-мишеней легкого и плевры с конечными точками, такими как цитотоксичность, пролиферация и генотоксичность.

Анализ нанотоксичности *in vitro* включает изучение перекисного окисления липидов для выяснения роли окислительного стресса, а также методы исследования апоптоза, включая высвобождение цитохрома c из митохондрий и активацию каспазы. Перекисное окисление липидов-это окислительная деградация клеточных мембран, инициируемая присутствием АФК, и чаще всего измеряется путем анализа присутствия

малонового диальдегида или других реакционноспособных веществ тиобарбитуровой кислоты.

Несколько исследований показали что наночастицы активируют окислительный стресс и экспрессию генов участвующих в воспалении. НЧ могут проникать в организм человека через дыхание, прием внутрь и инъекции и, следовательно, накапливаться в различных тканях и органах [34], могут даже достигать мозга, разрывая прочные связи между клетками и проходя через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ);

Другой метод определения токсичности основан на количественном определении АТФ. АТФ широко используется для оценки общей микробной биомассы в различных системах. В люминесцентном анализе токсичность определяется, когда фермент люцифераза светлячка преобразует АТФ. Этот биоанализ чувствителен и экономит время, он более чувствителен, чем МТТ-тест. Хотя высокопроизводительные анализы на цитотоксичность могут использоваться во многих лабораториях, они подвержены помехам при оценке нанотоксичности, поскольку наноматериалы могут мешать компонентам теста.

анализ токсичности наноматериалов in vivo

Исследовано влияние большого количества наноматериалов в экспериментах на животных.

В опытах [35] Экспериментальным животным (крысам) вводили суспензию TiO_2 NPs при этом контролировалось их биологическое распределение, а также общее состояние животных. Результаты показали, что у животных наблюдается воспаление или другое проявление токсического эффекта.

Эксперименты *in vivo*, как правило, длительны, дорогостоящи и связаны с этическими проблемами.

Несмотря на обширные исследовательские усилия, клеточные реакции на наноматериалы часто изменчивы и даже противоречивы.

Тщательная оценка механизмов токсичности НЧ необходима для полного понимания их свойств. На сегодняшний день существует ограниченная информация о механизмах токсичности наноматериалов на молекулярном уровне, поскольку большинство исследований проводится на клеточном уровне, и в этой области необходимы дополнительные исследования.

Не существует единого метода определения биотоксичности НЧ из-за их специфических механизмов действия.

Можно предположить, что измерения биолюминесценции могут быть использованы для оценки токсичности и антиоксидантной активности фуллеренолов. В этих биотестах физиологическим параметром активности является интенсивность биолюминесценции, поэтому токсичность

фуллеренов можно оценить по изменению интенсивности биолюминесценции тест-систем, а антиоксидантную активность - по изменению общей и окислительной токсичности модельных растворов оксидантов при добавлении фуллеренов в качестве детоксицирующих агентов. Хемилюминесцентный люминольный метод позволяет исследовать роль АФК в процессах модификации токсичности в водной среде под воздействием фуллеренолов.

2. Материалы и методы

2.1 Получение и характеристика фуллеренолов

Фуллеренолы были получены и охарактеризованы в Институте физики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск. Углеродный конденсат был синтезирован в плазме высокочастотного дугового разряда при атмосферном давлении. Смесь фуллеренов экстрагировали толуолом в экстракторе Сокслета и выпаривали растворитель. Следи за подстроками и абзацами

Фуллеренолы получали путем растворения порошкообразной смеси фуллеренов в бензоле с последующим переводом этого раствора в водную фазу (деионизированная вода) с помощью ультразвуковой обработки (мощность 230 Вт, рабочая частота 35 кГц) при температуре окружающей среды и с удалением органического растворителя.

Препараты фуллеренолов характеризовали с помощью ИК-спектроскопии в KBr матрице с использованием Фурье-спектрометра VERTEX 70, Bruker, Германия. Количество -ОН групп оценивали методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии с использованием спектрометра UNI-SPECS, SPECS GmbH, Германия. [36]

2.2 Реактивы и материалы

В работе использовали комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ), включающий бактериальную люциферазу и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу. Этот препарат был произведен в лаборатории нанобиотехнологий и биолюминесценции Института Биофизики СО РАН (Красноярск). Для проведения экспериментов использовали следующие химические реагенты: флавиномононуклеотид (ФМН) (SERVA, Германия), никотинамиддинуклеотид восстановленный (НАДН) (ICN, США), тетрадеканаль (RCHO) (Serva, Германия).

Для проведения хемилюминесцентного анализа использовали люминол, 3% раствор пероксида водорода (H₂O₂) (ООО Тульская фармацевтическая фабрика, Россия).

В экспериментах в качестве модельного окислителя использовали 1,4- бензохинон (Sigma-Aldrich, США), в качестве биологически активных соединений использовали фуллеренол с малым содержанием гидроксильных групп C₆₀(ОН)₁₀₋₁₂ и эндоэдральный фуллеренол с атомом гадолиния – Gd@C₈₂O_y(ОН)_x, где x+y=40-42.).

При выполнении экспериментов использовали свежеприготовленные растворы. Образцы соединений растворяли в 0,05 М калий-фосфатном буфере (рН 6,8), или дистиллированной воде. Анализ образцов проводили при комнатной температуре.

Использовали 96-луночные микропланшеты для биолюминометра, микропипетки емкостью от 2 до 5000 мкл, флаконы и пробирки емкостью 5–50 мл и другое лабораторное оборудование.

2.3 Регистрация интенсивности хемилюминесцентной и биолюминоесцентной реакции

Для регистрации кинетики сигналов хемилюминесценции и биолюминоесценции использовали TriStar Multimode Microplate Reader LB 941 (Berthold technologies, Германия). Это устройство работает в режиме подсчета импульсов. Основой измерения биолюминоесценции является фотоэлектронный умножитель, который преобразует световой сигнал в электрический и усиливает его. Счетчики биолюминоесценции измеряют световой поток автоматически по заранее определенному графику (заданному программно с помощью компьютера), так что регистрация кинетики биолюминоесценции или хемилюминесценции производится сразу после начала реакции, что гарантирует точность измерения и возможность сравнения данных. Кроме того, программное обеспечение прибора и устройство позволяют проводить одновременные измерения в 96 лунках микропланшета в течение длительного периода времени.

2.4 Приготовление реакционных смесей для биолюминоесцентной ферментативной тестовой системы

Исследовали действие модельного окислителя 1,4-бензохинона и фуллеренолов на интенсивность биолюминоесценции системы двух сопряженных ферментативных реакций.

Препараты ФМН, $C_{60}(OH)_{10-12}$, $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y=40-42$ растворяли в дистиллированной воде, а НАДН и 1,4-бензохинон растворяли в 0,05 М калий-фосфатном буфере (рН 6,8), Раствор 0,0025 % тетрадеканала (RCHO) готовили добавлением к 50 мкл 0,25%-ного спиртового раствора альдегида 5 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8). Во флакон препарата ферментов (в состав входят препарат бактериальной люциферазы и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы) вносили

2 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8), содержимое флакона перемешивали, раствор хранили на льду.

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

2,5 мкл раствора препарата ферментов;

25 мкл 0,0025% раствора РСНО;

75 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

27,5 мкл дистиллированной воды (или 25 мкл 0,05 М калий фосфатногобуфера и 2,5 мкл дистиллированной воды);

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора
НАДН; 25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора
ФМН.

Для изучения антиоксидантных свойств фуллеренола $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$, где $x+y=40-42$ была выбрана эффективная концентрация (ЕС-50=10-5М) модельного органического окислителя – 1,4-бензохинона, ингибирующая биолюминесценцию на 50%. Антиоксидантная активность изучалась при разных временах инкубирования (0, 15, 30, 45 минут) раствора 1,4-бензохинона с фуллеренолом разных концентраций.

Интенсивность биолюминесценции ферментативной системы в растворе 1,4-бензохинона, измеряли в смеси следующего состава:

2,5 мкл раствора препарата ферментов;

25 мкл 0,0025% раствора РСНО;

75 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора ФМН;

25 мкл раствора 1,4-бензохинона;

2,5 мкл дистиллированной воды;

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН.

При исследовании действия фуллеренолов на ферментативную систему, измерения интенсивности свечения, проводили в смеси следующего состава:

2,5 мкл раствора препарата ферментов;

25 мкл 0,0025% раствора РСНО;

100 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора ФМН;

2,5 мкл раствора фуллеренола;

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН.

Измеряли интенсивность биолюминесценции в присутствии фуллеренола, сопоставляли ее со свечением контрольного образца. Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимости I от их концентраций. Определяли EC_{50} и использовали ее для сравнения токсичности фуллеренолов.

Интенсивности биолюминесценции ферментативной системы в растворе токсиканта окислительной природы 1,4-бензохинона и фуллеренолов измеряли в смеси следующего состава:

2,5 мкл раствора препарата ферментов;

25 мкл 0,0025% раствора РСНО;

75 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

25 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора ФМН;

25 мкл раствора 1,4-бензохинона (EC_{50});

2,5 мкл раствора фуллеренола;

100 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора НАДН.

Измеряли интенсивность биолюминесценции; сопоставляли ее со свечением контрольного образца – аналогичного раствора без фуллеренола. Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимости I от концентрации фуллеренола.

Каждое измерение проводили в 15-20 повторностях. С использованием пакетов программы Microsoft Office (Microsoft, США) выполняли статистическую обработку результатов и построение графиков.

2.5 Расчет коэффициентов детоксикации.

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

Изменение общей токсичности растворов модельных окислителей под действием фуллеренолов оценивали по величине коэффициентов детоксикации D^{GT} .

$$D^{GT} = I_{(T+\phi)} / I_T \quad (8)$$

где $I_{(T+\phi)}$ – относительная интенсивность биоломинесценции в растворе модельного токсиканта (окислителя) в присутствии фуллеренолов;

I_T – относительная интенсивность биоломинесценции в растворе модельного токсиканта (окислителя) в отсутствие фуллеренолов.

Коэффициент детоксикации D^{GT} показывает, во сколько раз изменяется интенсивность биоломинесценции в токсичных растворах под воздействием фуллеренолов.

Величина коэффициента $D^{GT} > 1$ соответствует детоксикации раствора модельного окислителя, $D^{GT} = 1$, – отсутствию эффекта, $D^{GT} < 1$ и – увеличению токсичности.

В ходе экспериментов использовали концентрации растворов 1,4-бензохинона (EC_{50}), ингибирующие до 50%-го остаточного свечения ($I=0,5$).

Статистическая обработка результатов и построение графиков проводилась с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Office (Microsoft, США).

2.6 Исследование содержания активных форм кислорода. Хемилюминесцентный люминольный метод

Для определения содержания активных форм кислорода (АФК) в присутствии гидратированного фуллерена использовали калибровочную зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации H_2O_2 , которая представлена на рисунке.[36]

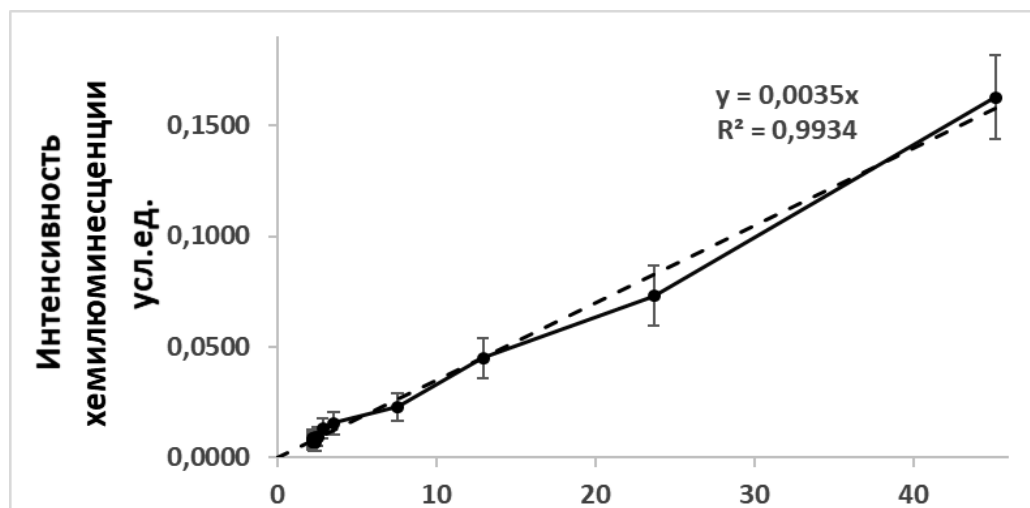


Рисунок 4. Зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации пероксида водорода H_2O_2 в растворе 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8)

Калибровочная кривая аппроксимирована линейной зависимостью с коэффициентом аппроксимации $R^2=0,99$.

Состав реакционной смеси для определения хемилюминесцентным методом концентрации пероксидных соединений в 0,05 М калий-фосфатном буфере (рН 6,8):

мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8); 79 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}}=1,7 \cdot 10^{-4}$ М);

Концентрации пероксидных соединений, $C_{H_2O_2}$, в растворах модельного органического окислителя – 1,4-бензохинона определяли в смеси следующего состава:

мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

12,5 мкл раствора 1,4-бензохинона ($C_{1,4\text{-бензохинона}}=10^{-5}$ М);

79 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}}=1,7 \cdot 10^{-4}$ М);

Состав реакционной смеси для определения концентрации пероксидных соединений в растворах фуллеренолов:

128 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,8);

79 мкл раствора люминола ($C_{\text{люминола}}=1,7 \cdot 10^{-4}$ М);

Варьировали концентрацию 1,4-бензохинона; строили зависимость содержания пероксидных соединений, $C_{H_2O_2}$, от концентрации 1,4-бензохинона.

Состав реакционной смеси для определения концентрации пероксидных соединений в растворах фуллеренолов:

37,5 мкл раствора фуллеренола;

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

75 мкл раствора 1,4-бензохинона.

Варьировали концентрации фуллеренолов; строили зависимость содержания пероксидных соединений, $C_{H_2O_2}$, от концентраций фуллеренолов.

Общий объем смеси – 248 мкл.

Каждое измерение проводили в 25–40 повторностях. При статистической обработке полученных данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Оценку различия средних величин осуществляли с помощью коэффициента достоверности (t) Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Статистическая обработка результатов и построение графиков проводилась с использованием пакетов прикладной программы MS Office (Microsoft, США).

Со страницы 26 по 30 изъято в связи с авторскими правами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- С помощью биолюминесцентного ферментативного биотеста исследована зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации двух фуллеренолов - $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ и $C_{60}O_y(OH)_x$. На основе величин эффективных концентраций этих фуллеренолов ($4 \cdot 10^{-1}$ и $8 \cdot 10^{-4}$ г/л соответственно) показано, что первый фуллеренол характеризуется меньшей токсичностью.

- Показано, что в условиях модельного окислительного стресса (т.е. в растворах органического окислителя – 1,4-бензохинона) фуллеренол $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ проявляет умеренную (до 25-50%) антиоксидантную активность при малых временах инкубирования (0-30 минут) с ферментативной системой; при больших временах антиоксидантный эффект отсутствует.

- Выявлена обратная корреляция между зависимостями (1) интенсивности биолюминесценции от концентрации фуллеренола и (2) содержанием АФК от концентрации фуллеренола в условиях модельного окислительного стресса, что указывает на то, что его антиоксидантный эффект связан с уменьшением содержания АФК в растворах модельного окислителя.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК– активные формы кислорода

ЭМФ- эндоэдральный металлофуллерен

МРТ- магнитно-резонансная томография

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Saba Goodarz. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend/ Tatiana Da Ros, João Conde, Farshid Sefat, Masoud Mozafari // *Materials Today*, Volume 20, Issue 8, 2017, Pages 460-480, ISSN 1369-7021
2. W. Kratschmer. "Solid C₆₀: A New Form of Carbon,"/ L. D. Lamb, K. Fostiropoulos and D. R. Huffman // *Nature*, Vol. 347, No. 6291, 1990, pp. 354-358. doi:10.1038/347354a0
3. Novoselov, K.S. Electric field in atomically thin carbon films/ Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D., Zhang, Y., // *Science*, Volume 306, Issue 5696, 22 October 2004, Pages 666-669
4. Eropkin, M.Yu.; Synthesis and biological activity of fullerenols with various contents of hydroxyl groups./ Melenevskaya, E.Yu.; Nasonova, K.V.; Bryazzhikova, T.S.; Eropkina, E.M.; Danilenko, D.M.; Kiselev, O.I. // *Pharm. Chem. J.* 2013, 47(2), 87–91, DOI: 10.1007/s11094-013-0901-x.
5. Nakamura, H.; Effect of number of hydroxyl groups of fullereneol C₆₀(OH)_n on its interaction with cell membrane./ Nozaki, Yu.; Koizumi, Yu.; Watano, S. // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2018, 90, 18–24, DOI:10.1016/j.jtice.2017.11.016.
6. B. Yadav, R. Kumar/*Int. J. Nanotechnol. Appl.*, 2 (1) (2008), pp. 15-24
7. Harhaji, L. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene / L. Harhaji, A. Isakovic, N. Raicevic et al. // *European Journal of Pharmacology*. – 2007. – № 568. – P. 89–98.
8. Субботина, Т. Ф. Влияние фуллеренола C₆₀(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.
9. 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.
10. 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.
11. Андриевский Г.В. Универсальная биологическая активность гидратированного фуллерена и его наноструктур, как ключ к пониманию закономерностей действия сверхмалых доз. «Механизмы действия сверхмалых доз». Тез. докл. 4 международн. симп. 28-29 октября 2008 . – М., 2008. – С. 6-7
12. Tikhomirov A.A., Andrievsky G.V. Chronic alcoholization-induced damage to astroglia and intensification of lipid peroxidation in the rat brain protector effect of hydrated form of fullerene C₆₀ // *Neurophysiology*. – 2007. – Vol. 39, №2. –P. 119-125

13. Zhang, Y., Han, Y./Test research on greenhouse heating system for ground source heat pump based on solar energy// *Water Resources and Power*, Volume 29, Issue 2, Pages 126-128
14. Shi, S., Khemani, K.C., Li, Q.C., Wudl, F./ A Polyester and Polyurethane of Diphenyl C61: Retention of Fulleroid Properties in a Polymer// *Journal of the American Chemical Society*, Volume 114, Issue 26, 1 December 1992, Pages 10656-10657
15. Brown, Richard & Ito. Electron spin coherence in metallofullerenes: Y, Sc and La@C82./ Yasuhiro & Warner, Jamie & Ardavan, Arzhang & Shinohara, Hisanori & Briggs, George & Morton, John. (2010). // *Physical Review B*. 82. 10.1103/PhysRevB.82.033410.
16. Suematsu, H., Crystal Structure of Endohedral Metallofullerene La@C82. / Murakami, Y., Kawata, H., Fujii, Y., Hamaya, N., Shimomura, O., . . . Ikemoto, I.//*MRS Proceedings*, 349, 213. doi:10.1557/PROC-349-213
17. Krause, Matthias & Kuzmany, Hans. (2002). Raman and Infrared Spectra of Endohedral Fullerenes. 10.1007/978-94-015-9938-2_8.
18. Kato, Tatsuhisa & Suzuki. ESR Study of the Electronic Structures of Metallofullerenes: A Comparison Between La C82 and Sc C82./ Shinzo & Kikuchi, Koichi & Achiba, Yohji. // *The Journal of Physical Chemistry*. 97. 13425-13428. 10.1021/j100153a001.
19. Okazaki. Electronic properties of Gd@C 82 metallofullerene peapods: (Gd@C 82) n @SWNTs./ Toshiya & Shimada, Takashi & Suenaga, K. & Ohno, Y. & Mizutani, T. & Lee, Jhinhwan & Kuk, Young & Shinohara, H.. // *Applied Physics A-materials Science & Processing - APPL PHYS A-MAT SCI PROCESS*. 76. 475-478. 10.1007/s00339-002-2039-7.
20. Zhang,. (2020). A Gd@C82 single-molecule electret./ Kangkang & Wang, Cong & Zhang, Minhao & Bai, Zhanbin & Xie, Fang-Fang & Tan, Yuan-Zhi & Guo, Yilv & Hu, Kuo-Juei & Cao, Lu & Zhang, Shuai & Tu, Xuecou & Pan, Dan-Feng & Kang, Lin & Chen, Jian & Wu, Ph & Wang, Xuefeng & Wang, Jinlan & Liu, Junming & Wang, Baigeng// *Nature Nanotechnology*. 15. 1-6. 10.1038/s41565-020-00778-z.
21. A. I. Dudnik. Electrophysical properties of hydroxylated endohedral metallofullerene with gadolinium / A. I. Dudnik, N. G. Vnukova, N. A. Drokin [et al.] // *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. – 2019. – Vol. 135. – P. 109094. – DOI 10.1016/j.jpcs.2019.109094.
22. Иванов, В. Г. Органическая химия / В. Г. Иванов, В. А. Горленко, О. Н. Гева. – Москва : Мастерство, 2003. – 624с
23. Orsolya Fónagy, Erzsébet Szabó-Bárdos, Ottó Horváth/1,4-Benzoquinone and 1,4-hydroquinone based determination of electron and superoxide radical formed in heterogeneous photocatalytic systems//*Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Volume 407,2021,113057,ISSN 1010-6030
24. T. Wilke, M. Schneider, K. Kleinermanns//1,4-hydroquinone is a hydrogen reservoir for fuel cells and recyclable via photocatalytic water splitting/ *Open J. Phys. Chem.*, 03 (2013), pp. 97-102,

25. W.N. Hartley, A.G.G. Leonard/VI.—the absorption spectra of para-benzoquinone, quinol, and quinhydrone in the state of vapour and in solution// *J. Chem. Soc. Trans.*, 95 (1909), pp. 34-52, 10.1039/CT9099500034

26. 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.

27. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск : КГУ, 2000. – 154с.

28. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биологической химии*. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.

29. 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.

30. 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.

31. Helmut Sies, Dean P. Jones/Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents//*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 21 (7) (2020), pp. 363-383

32. Ajdary, M.; Health Concerns of Various Nanoparticles:/ Moosavi, M.A.; Rahmati, M.; Falahati, M.; Mahboubi, M.; Mandegary, A.; Jangjoo, S.; Mohammadinejad, R.; Varma, R.S.// *A Review of Their in Vitro and in Vivo Toxicity. Nanomaterials* 2018, 8, 634. <https://doi.org/10.3390/nano8090634>

33. Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Jan 15;234(2):222-35. doi: 10.1016/j.taap.2008.09.030. Epub 2008 Oct 17. PMID: 18983864.

34. Hillegass JM,. Assessing nanotoxicity in cells in vitro./ Hillegass JM, Shukla A, Lathrop SA, MacPherson MB, Fukagawa NK, Mossman BT. // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2(3):219-231. doi:10.1002/wnan.54

35. Almutary A, Sanderson BJS. The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. *International Journal of Toxicology*. 2016;35(4):454-462. doi:10.1177/1091581816648906

36. Ekaterina S Kovel. Toxicity and Antioxidant Activity of Fullerenol C60, 70 with Low Number of Oxygen Substituents./ Ekaterina S Kovel, Arina G Kicheeva, Natalia G Vnukova, Grigory N Churilov, Evsei A Stepin, Nadezhda S Kudryasheva // *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22(12), 6382; <https://doi.org/10.3390/ijms22126382>

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк Кратасюк В.А.
подпись инициалы, фамилия
« 28 » июня 20 21 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02. Физика

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА
С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО
БИОТЕСТА

Руководитель

Н.С. Кудряшева
28.06.2021

подпись, дата

Д.ф-м.н,
профессор
кафедры
биофизики

должность,
ученая степень

Н.С.Кудряшева

инициалы, фамилия

Выпускник

Д.Э. Куклина
28.06.2021

подпись, дата

Д.Э. Куклина

инициалы, фамилия

Красноярск 2021