

На правах рукописи

Полетаева Дарья Александровна

МЕМБРАНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА ВОДОРАСТВОРИМЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ

03.01.02 – биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
науки Институте проблем химической физики РАН

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук Котельникова
Раиса Алексеевна

Официальные оппоненты:

Пашенко Владимир Захарович доктор физико-математических наук,
профессор, заведующий сектором фотобиологии и биофотоники кафедры
биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Пальмина Надежда Павловна доктор биологических наук, главный научный
сотрудник лаборатории физико-химических основ клеточной регуляции
Института биохимической физики РАН

Ведущая организация: Институт физиологически активных веществ РАН

Защита состоится 31 мая 2012 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного
совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете имени
М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Россия, Москва, Ленинские горы 1/12,
МГУ, биологический факультет, аудитория 389

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан « __ » _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Согласно литературным данным возможность использования производных фуллеренов в биологической и фармакологической практике заслуживает особого внимания. Интерес к ним обусловлен уникальной структурой углеродного сфероида, наличием липофильных и мембранотропных свойств, его способностью генерировать активные формы кислорода в возбужденном состоянии, проявлять антирадикальные свойства, противовирусную активность и противоопухолевое действие. Исходя из сказанного, становится очевидной актуальность изучения физико-химических механизмов действия производных фуллеренов на биологические структуры с целью создания на их основе новых классов высоко эффективных лекарственных препаратов для лечения социально значимых заболеваний.

Одним из основных при решении этой задачи является вопрос о взаимодействии производных фуллеренов с биологическими мембранами, о механизмах проникновения соединений в живые клетки, об их влиянии на каталитическую активность мембраносвязанных ферментов, на процессы, протекающие в мембранах.

Настоящая работа посвящена исследованию влияния водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов C_{60} и C_{70} (ППФ), синтезированных в ИПХФ РАН, на модельные и биологические мембраны, каталитическую активность мембраносвязанных ферментов и процесс пероксидного окисления липидов. Главной особенностью изучаемых соединений является высокая растворимость в воде ($\sim 10^{-1}$ М) за счет пяти ковалентно присоединенных аддендов, на концах которых локализованы положительные или отрицательные заряды. Исходя из того, что электростатические взаимодействия играют важную роль в биохимических реакциях в организме, можно предположить, что ППФ, в структуре которых содержатся заряженные адденды, могут модулировать проявление различных видов биологической активности.

Способность производных фуллеренов встраиваться в мембраны, влиять на их структуру, на каталитическую активность мембраносвязанных ферментов, можно определить термином «мембранотропные свойства производных фуллеренов». Изучение этих свойств является актуальной задачей различных направлений биологии, в том числе биофизики.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы являлась разработка количественных критериев оценки мембранотропных свойств полизамещенных производных фуллеренов и установление корреляции между параметрами мембранотропности и влиянием ППФ на различные виды биологической активности биомембран. Для осуществления цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести количественную оценку мембранотропности новых водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов с помощью методов триплетных и флуоресцентных зондов. Выбрать оптимальные параметры оценки мембранотропности фуллереновых производных.
2. Исследовать антирадикальные свойства ППФ по изменению хемолуминесценции люминола. Установить корреляции между мембранотропностью соединений и их антирадикальными свойствами.
3. Изучить влияние ППФ на активность дыхательной цепи митохондрий по изменению скорости окисления цитохрома *c* цитохром *c*-оксидазой.
4. Исследовать влияние производных фуллеренов на каталитическую активность мембраносвязанных ферментов – моноаминоксидазы А и моноаминоксидазы В.
5. Установить корреляцию между параметрами мембранотропности и функционированием биологических мембран в присутствии ППФ.

Научная новизна работы. Работа посвящена исследованию мембранотропных свойств нового уникального класса производных фуллеренов, отличающихся высокой растворимостью в воде. Комбинация методов флуоресцентной и фосфоресцентной спектроскопии, а также использование широкого спектра люминесцентных зондов различной полярности позволили доказать, что исследуемые ППФ взаимодействуют с фосфолипидными мембранами, преимущественно в районе полярных головок фосфолипидов. Предложены количественные параметры, позволяющие оценить эффективность взаимодействия ППФ с различными участками мембраны. Продемонстрирована антирадикальная активность ППФ анионной природы, установлено влияние ППФ на

каталитическую активность мембраносвязанных ферментов: цитохром *c*-оксидазы, моноаминоксидаз А и В.

Научно-практическая ценность работы. Результаты данной работы представляют большой интерес для дальнейших исследований мембранотропных свойств различных типов водорастворимых производных фуллеренов. Предложенные подходы могут быть использованы для установления молекулярных механизмов биологического действия производных фуллеренов и прогнозирования их фармакологической активности.

Апробация работы. Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях: «Органические и гибридные наноматериалы» (Иваново, 2008), «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы» (Белгород, 2008), «Биохимическая физика, ИБХФ РАН-ВУЗы» (Москва, 2008, 2009), «Нанотехнологии в онкологии» (Москва, 2008), «Успехи химической физики» (Черноголовка, 2011), «Фотоника органических и гибридных наноструктур» (Черноголовка, 2011) и на конкурсе молодых ученых ИПХФ РАН им. С.М. Батурина (Черноголовка, ИПХФ РАН, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них 7 в реферируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа содержит 31 рисунок, 6 таблиц и 1 приложение. Список литературы включает 181 источник.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи исследований, показана их научная новизна и практическая значимость. В главе 1 представлен обзор литературы, в котором отражены основные современные данные по исследованию биологического действия водорастворимых производных фуллеренов. В главе 2 изложены экспериментальные методики, используемые в работе. В главах 3-6 изложены основные результаты и их обсуждение.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили водорастворимые полизамещенные производные фуллеренов, синтезированные А.П. Трошиным, А.Б. Корневым и Е.А. Хакиной. (ИПХФ РАН). В работе исследовались 17 производных фуллерена C_{60} и 2 производных фуллерена C_{70} , которые отличаются структурой аддендов и имеют отрицательные или положительные заряды на аддендах (рис. 1).

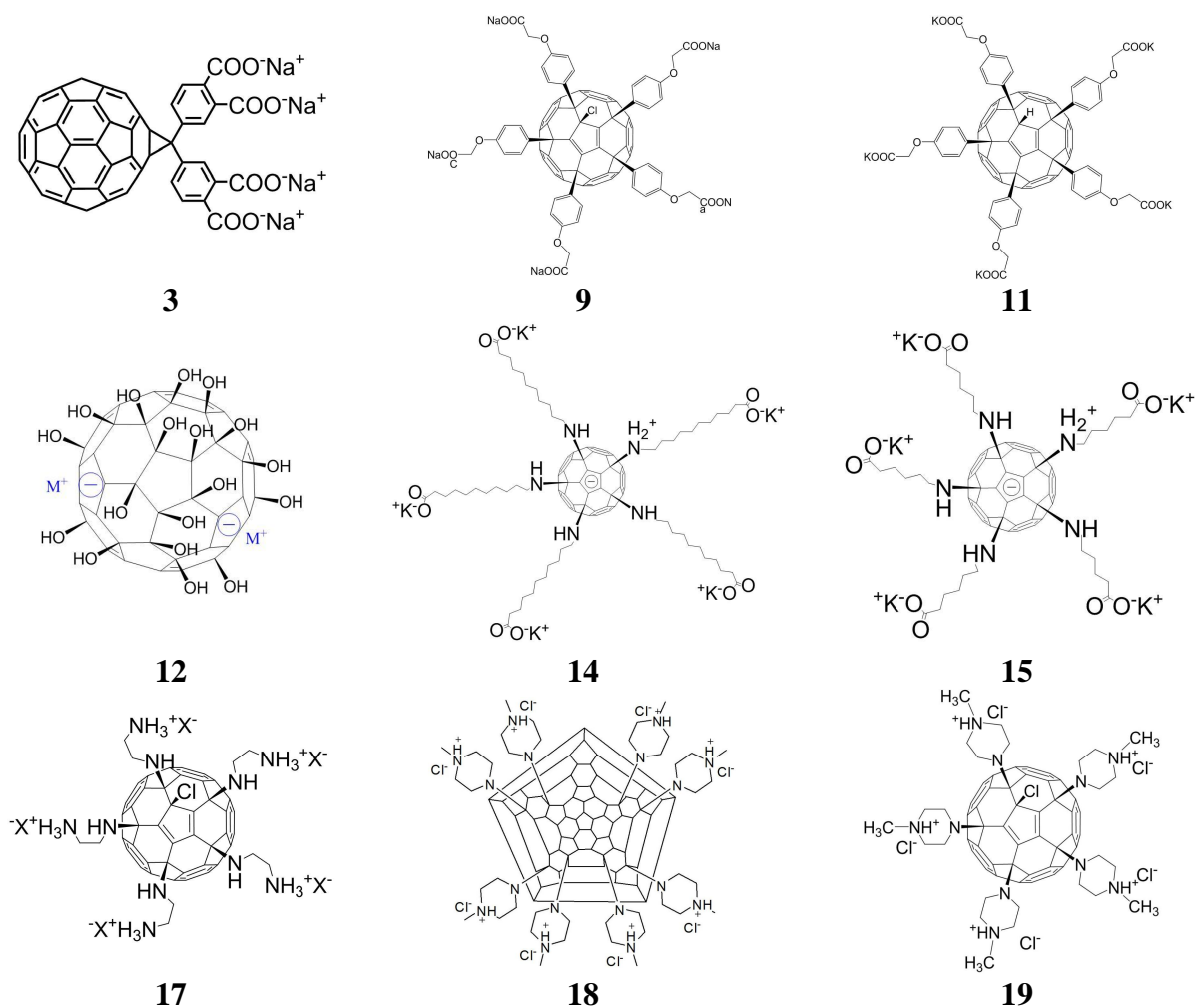


Рис. 1. Структурные формулы некоторых водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов, исследуемых в работе (нумерация по тексту диссертации).

Методами флуоресценции и фосфоресценции в работе изучалось взаимодействие производных фуллеренов с амфифильными люминесцентными зондами: эозином Y, метилированным эозином (эозин M), бромированным профлавином (2.7-Br-профлавин) и рибофлавином. Кроме того, исследовалось взаимодействие ППФ с неполярным зондом пиреном в гидрофобной области

липидного бислоя липосом, в районе жирнокислотных остатков фосфолипидов, по регистрации спектров флуоресценции зонда. Структурные формулы зондов представлены на рисунке 2.

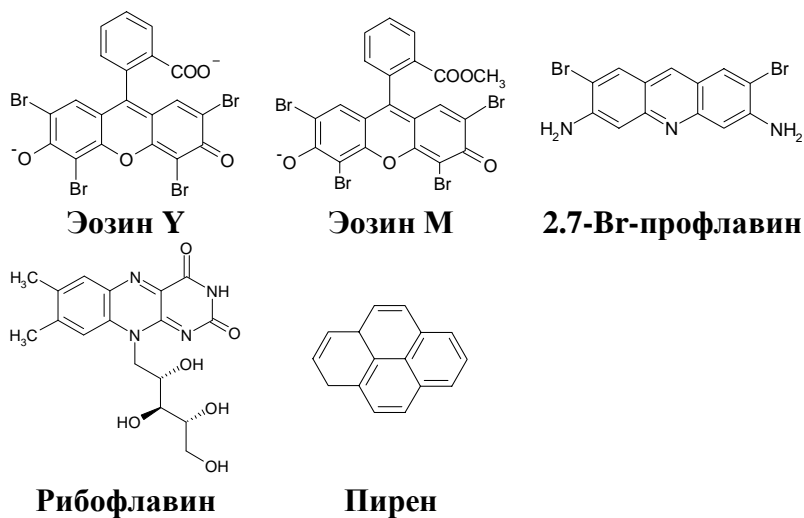


Рис. 2. Структурные формулы молекул зондов.

Также в данной главе описаны препаративные методики, метод триплетных зондов, метод определения антиоксидантной активности ППФ по регистрации хемилюминесценции люминола, методы определения каталитической активности моноаминоксидазы А (МАО-А), моноаминоксидазы В (МАО-В) и каталитической активности цитохром с-оксидазы в митохондриях головного мозга крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование мембранотропных свойств полизамещенных производных фуллеренов методами флуоресцентных и фосфоресцентных зондов

С целью разработки количественных критериев для оценки мембранотропности ППФ в диссертационной работе проведено комплексное исследование взаимодействия большого ряда впервые синтезированных ППФ анионной и катионной природы с красителями методами флуоресценции и фосфоресценции в водных растворах и в структуре липосом. В работе использовались амфифильные красители эозин Y, метилированный эозин (эозин M), 2.7-Br-профлавин и рибофлавин, которые при нейтральных pH имеют заряд (-2), (-1), (+1) и (0), соответственно, а также липофильный зонд пирен.

В экспериментах были изучены эффекты тушения фосфоресценции и флуоресценции эозина Y, эозина M, 2.7-Br-профлавина и рибофлавина, а также тушения флуоресценции данных красителей и пирена исследуемыми ППФ.

Сопоставление констант скорости тушения фосфоресценции k_q триплетных зондов различными ППФ в буферном растворе показало четкую зависимость эффективности тушения от природы (величины и знака) электростатического заряда на триплетном зонде и на ППФ (рис. 3, таблица). Из таблицы видно, что при тушении фосфоресценции эозина Y (имеющего в водных растворах при нейтральных pH два отрицательных заряда) фуллереновыми производными ППФ-1 - ППФ-13, имеющими также отрицательные заряды на аддендах, константы скорости тушения имеют значения $\sim 10^7$ - 10^8 $M^{-1}s^{-1}$, что примерно на 2-3 порядка ниже диффузионной константы. Это явление обусловлено взаимным отталкиванием электростатических зарядов хромофора и ППФ.

Существенная роль электростатических взаимодействий в процессе тушения свечения триплетных зондов производными фуллеренов подтверждается исследованием эффективности тушения фосфоресценции красителя производными ППФ-14 и ППФ-15, у которых один электрон расположен непосредственно на сфероиде фуллерена. В этом случае эффект отталкивания резко возрастает и константа скорости тушения уменьшается более чем на порядок, до значений $k_q < 10^6$ $M^{-1}s^{-1}$. В пользу такого утверждения говорит также факт, что для ППФ-12, который имеет только два отрицательных заряда на сфероиде фуллерена, и не имеет зарядов

на аддендах, константа скорости тушения сопоставима с константами скорости тушения для остальных производных фуллерена, имеющих пять отрицательных зарядов на концах аддендов.

В то же время при тушении свечения отрицательно заряженного эозина Y производными ППФ-17, ППФ-18 и ППФ-19, имеющими на аддендах пять и восемь положительных зарядов, процесс тушения резко отличается от тушения остальными ППФ, имеющими отрицательные заряды. При введении в образец фуллерена ППФ-17 даже в малых концентрациях наблюдалось резкое падение амплитуды флуоресценции эозина практически без изменения времени затухания флуоресценции. Этот эффект может быть объяснен образованием прочного комплекса ППФ-краситель за счет электростатических взаимодействий, в результате чего осуществляется полное тушение возбужденного состояния красителя в комплексе, в то время как динамическое тушение флуоресценции эозина достаточно мало и вносит незначительный вклад в значение константы скорости тушения хромофора при этих концентрациях тушителя. В результате измерение константы скорости тушения флуоресценции эозина Y для ППФ-17, имеющего в качестве аддендов пять коротких этилендиаминовых остатков, оказалось невозможным. Для ППФ-18 и ППФ-19, имеющих в качестве аддендов остатки N-метилпиперазина, этот эффект оказался выраженным в меньшей степени, измеренная константа скорости тушения k_d приближается к диффузионной и равна примерно $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Аналогичные эффекты влияния электростатического заряда взаимодействующих молекул на эффективность тушения триплетных зондов были обнаружены при анализе процессов тушения фуллеренами положительно заряженного зонда 2.7-Br-профлавина и нейтрального флуоресцентного зонда рибофлавина. Константы скорости тушения флуоресценции 2.7-Br-профлавина производными, на аддендах которых имеется положительный заряд (ППФ-17, ППФ-18 и ППФ-19), имели величину $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, что несколько выше, чем для отрицательно заряженных красителей и анионных ППФ. В случае нейтрально заряженного рибофлавина наблюдалось отсутствие зависимости тушения флуоресценции рибофлавина от знака и величины заряда производных фуллерена (таблица).

Таким образом, установлено, что эффективность тушения триплетных зондов производными фуллеренов зависит от знака электростатического заряда на триплетном зонде и на ППФ (на их аддендах или сфероиде).

Экспериментально показано, что при введении в суспензию липосом эозин Y и другие амфифильные зонды локализуются в районе полярных головок мембран. Этот вывод сделан из сопоставления эффективности тушения фосфоресценции триплетного зонда в структуре мембраны тушителями различной полярности: феррицианидом, ионами Co^{2+} , ферроценом, исследуемыми ППФ. Тушитель, в зависимости от своей полярности, может быть локализован в объеме растворителя, на поверхности мембран в районе полярных головок или в гидрофобной зоне мембраны. Как видно из таблицы, триплетно возбужденный эозин Y в структуре мембраны эффективно взаимодействует как с незаряженным ферроценом (тушение из гидрофобного слоя мембраны), так с полярным ионом Co^{2+} (тушение из объема воды) или с противоположно заряженными ППФ в районе полярных головок липидов, что говорит о его локализации в этой зоне мембран. Сопоставление констант скорости тушения триплетного зонда эозина Y различными ППФ в липидных мембранах выявляет те же закономерности важной роли зарядов на хромофорах и тушителях при их взаимодействии, что и для процессов в водном растворе. Эффект тушения резко снижается при дезактивации триплетного возбужденного состояния заряженного красителя одноименно заряженным ППФ (также в районе полярных головок липидов).

Обнаружена высокая корреляция между константами скорости тушения фосфоресценции эозина Y производными фуллеренов в водном растворе и в структуре липосом. Коэффициент Пирсона в этом случае равен 0.98 при $p < 0.01$. Принимая во внимание липофильность фуллереновых производных, можно сделать вывод о преимущественном расположении ППФ в районе полярных головок липидного бислоя, при этом их взаимодействие с триплетными зондами осуществляется за счет латеральной диффузии в поверхностном слое мембран.

Таким образом, по величине констант скорости тушения k_q можно оценивать эффективность взаимодействия производных фуллеренов с эозином Y, который взаимодействует с полярными головками фосфолипидов на границе раздела фаз: вода/мембрана. В этом случае k_q может служить интегральной характеристикой

способности фуллереновых производных встраиваться в липидные мембраны и отражать, таким образом, мембранотропные свойства исследуемых соединений.

Красители эозин Y, эозин M, 2.7-Br-профлавин и рибофлавин, использованные в предыдущем разделе в качестве фосфоресцентных зондов, обладают интенсивной флуоресценцией как в водных растворах, так и в составе липосом. Было обнаружено, что введение в водный раствор красителя производных фуллеренов, имеющих заряд, противоположный заряду красителя, приводит к эффективному уменьшению амплитуды флуоресценции красителя (рис. 4).

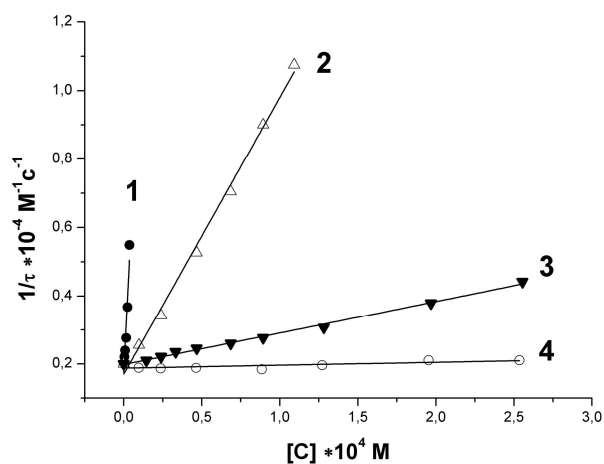


Рис. 3. Зависимости скорости затухания фосфоресценции эозина Y в буфере трис-HCl (0,02 M, pH=7,2) от концентрации ППФ: **1.** ППФ-19; **2.** ППФ-9; **3.** ППФ-5; **4.** ППФ-14.

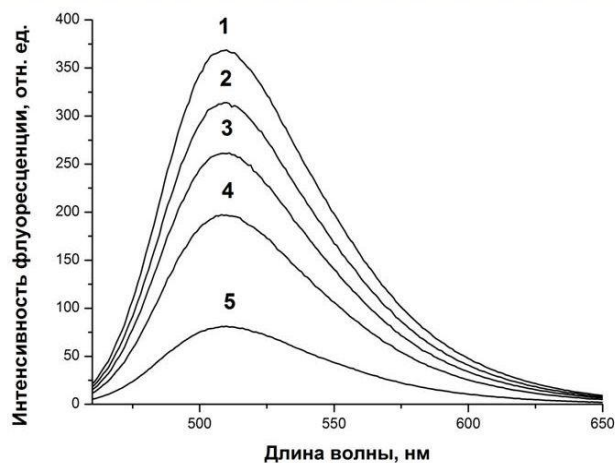


Рис. 4. Тушение флуоресценции 2.7-Br-профлавина в буфере трис-HCl (0.02 M, pH=7.2) при различных концентрациях ППФ-9: **1.** без добавления ППФ; **2.** 10^{-7} M; **3.** $2.5 \cdot 10^{-7}$ M; **4.** $5 \cdot 10^{-7}$ M; **5.** 10^{-6} M.

Как известно, при динамических столкновениях в растворе возбужденных молекул хромофоров и тушителей регистрация процессов тушения флуоресценции с временами $\sim 10^{-9}$ с возможна при концентрациях тушителей порядка $\sim 10^{-1}$ -1 M.

Так как в проведенных экспериментах тушение наблюдается при концентрациях производных фуллерена $\sim 10^{-6}$ M, можно сделать вывод, что тушение возбужденного синглетного состояния (имеющего для данных красителей время жизни ~ 1.2 нс) происходит не за счет диффузионных столкновений, а в результате образования долгоживущего комплекса ППФ-краситель, в том числе благодаря взаимному электростатическому притяжению разноименных зарядов на красителе и ППФ.

Исходя из предполагаемых структур комплексов и спектральных свойств хромофора и ППФ, сделан вывод, что тушение возбужденного синглетного состояния хромофора в комплексе может происходить как по механизму индуктивно-

резонансного диполь-дипольного переноса возбуждения с хромофора на фуллереновое ядро, так и по механизму переноса заряда.

Измеряя изменение интенсивности флуоресценции F от концентрации ППФ, из угла наклона линейных анаморфоз в координатах Штерна-Фольмера можно найти значение k_p – константы равновесия комплекса. Для ряда разноименно заряженных красителей и ППФ значения k_p лежат в диапазоне $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$ (таблица).

В случае, если тушение флуоресценции красителя осуществляется одноименно заряженным ППФ, эффект тушения флуоресценции выражен в значительно меньшей степени, а значения k_p снижаются на несколько порядков. Это может быть обусловлено слабым комплексообразованием за счет гидрофобных взаимодействий хромофоров непосредственно со сфероидом фуллерена.

В то же время анализ процессов тушения флуоресценции красителей различными фуллереновыми производными показал, что рассматриваемые процессы зачастую не описываются линейной зависимостью в координатах Штерна-Фольмера (рис. 5). В качестве наиболее вероятной причины такого отклонения можно рассмотреть агрегацию молекул ППФ с ростом их концентрации, повышающую эффективность связывания красителя с ППФ. Если при агрегации двух молекул ППФ прочность комплекса фуллерен-краситель возрастает, то кривые тушения флуоресценции красителя в координатах Штерна-Фольмера будет носить параболический характер.

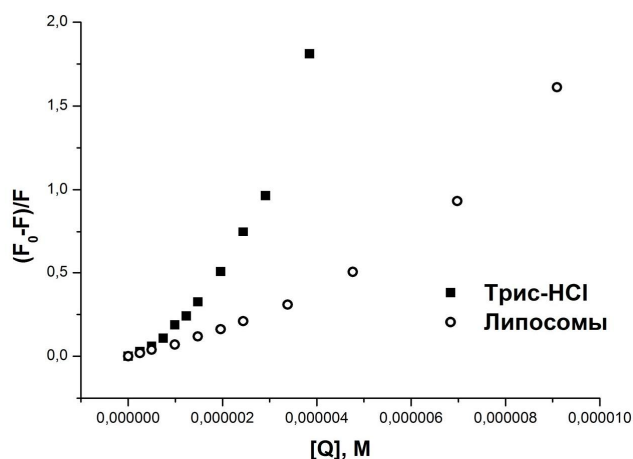


Рис. 5. Тушение флуоресценции эозина Y ППФ-17 в буфере трис-НСI (0.02 М, рН=7.2) и в суспензии липосом в координатах Штерна-Фольмера.

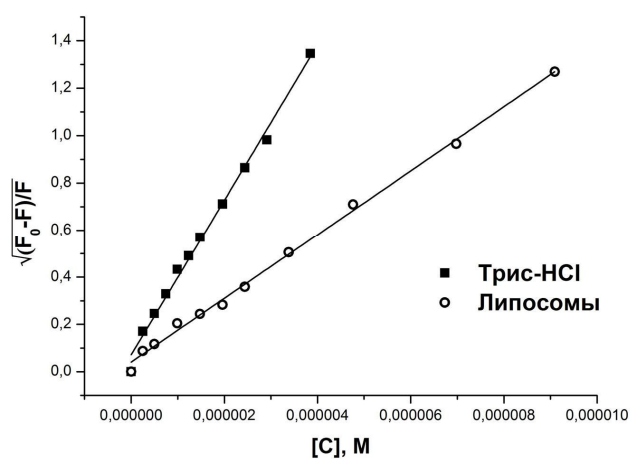


Рис. 6. Тушение флуоресценции эозина Y ППФ-17 в буфере трис-НСI (0.02 М, рН=7.2) и в суспензии липосом в координатах $\sqrt{\frac{F_0-F}{F}}$ от $[Q]$.

В этом случае линейная зависимость должна получаться при анализе экспериментальных данных в координатах $\sqrt{\frac{F_0 - F}{F}}$ от $[Q]$, что и наблюдается в эксперименте. Например, процесс тушения флуоресценции эозина Y производным ППФ-17 действительно описывается линейной зависимостью в координатах $\sqrt{\frac{F_0 - F}{F}}$ от $[Q]$, что позволяет сделать вывод о наличии процесса агрегации ППФ (рис. 6).

В то же время, для ряда ППФ концентрационные зависимости тушения являются линейными в обычных координатах Штерна-Фольмера в широком диапазоне концентраций. Принимая во внимание возможность сложного механизма комплексообразования при взаимодействии фуллереновых производных и красителя, в качестве параметра, характеризующего комплекс краситель-ППФ в различных средах, в диссертационной работе предлагается использовать константу равновесия k_p , получаемую согласно уравнению Штерна-Фольмера из наклона касательной к экспериментальной зависимости в начале координат, т.е. при минимальных концентрациях ППФ, когда их агрегацией можно пренебречь (рис. 7).

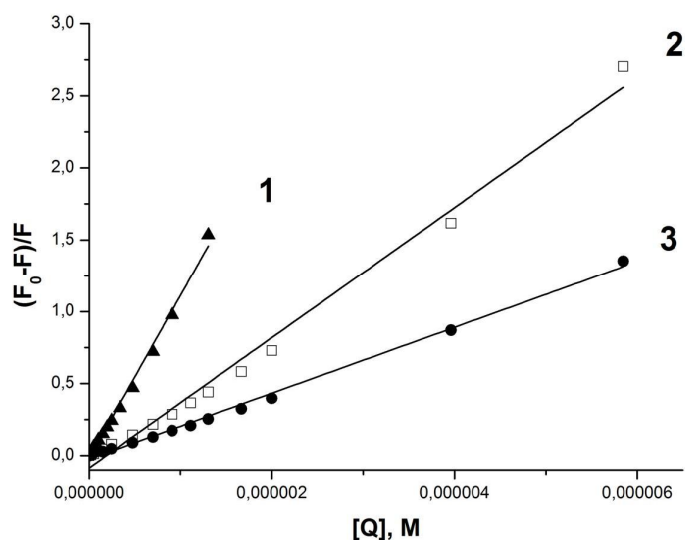


Рис. 7. Тушение флуоресценции 2.7-Vr-профлавина в буфере трис-HCl (pH=7.2, 0.02 M) соединениями: **1.** ППФ-9; **2.** ППФ-1; **3.** ППФ-3.

Полученные концентрационные зависимости тушения флуоресценции зондов в координатах Штерна-Фольмера для различных полизамещенных производных фуллеренов значительно различаются по наклону касательных в начале координат. Для большинства разноименно заряженных красителей и ППФ значения k_p лежат в диапазоне $10^5 - 10^6 M^{-1}$ (таблица).

На процесс комплексообразования влияют, в первую очередь, величина и расположение зарядов на красителе и ППФ. Так, при титровании эозина Y, имеющего два отрицательных заряда, и эозина M, имеющего один отрицательный заряд, анионными ППФ зависимости $\frac{F_0 - F}{F}$ от [Q] имеют значительно отличающиеся наклоны касательных в начале координат, что отражает изменение значений констант равновесия k_p .

В случае рибофлавина, не имеющего электростатического заряда при нейтральных pH, значения k_p не зависят от заряда ППФ, а их величины равны или в несколько раз меньше, чем для эозина Y и 2.7-Br-профлавина. В случае, если тушение флуоресценции красителя осуществляется одноименно заряженным ППФ, эффект тушения флуоресценции выражен в значительно меньшей степени, а значения k_p снижаются на несколько порядков. Это может быть обусловлено слабым комплексообразованием за счет гидрофобных взаимодействий хромофоров непосредственно со сфероидом фуллерена при ослаблении комплекса за счет электростатического отталкивания.

Помимо собственных зарядов красителя и фуллереновых производных, на процесс тушения флуоресценции красителей в значительной степени влияет состав растворителя или окружающей среды.

При введении красителей в структуру мембран анализ тушения флуоресценции при повышении концентрации ППФ показывает, что комплексы краситель:ППФ эффективно взаимодействуют со структурой мембраны, при этом снижение значений k_p по сравнению с таковыми для водного раствора свидетельствует о взаимодействии зарядов красителя и ППФ с зарядами полярных головок липидов.

Для исследования процессов взаимодействия ППФ с липосомами в районе жирнокислотных остатков фосфолипидов использовался гидрофобный люминесцентный зонд пирен. Как известно, пирен испускает флуоресценцию как в мономерной ($\lambda_{фл}=394$ нм), так и в эксимерной ($\lambda_{фл}=475$ нм) форме, при этом время жизни возбужденного синглетного состояния пирена составляет ~ 100 нс.

При титровании пирена различными ППФ наблюдалось эффективное тушение как мономерной, так и эксимерной флуоресценции пирена при концентрациях ППФ $10^{-6} - 10^{-5}$ М, следовательно, тушение осуществляется путем образования долгоживущих комплексов пирен:ППФ именно в гидрофобной зоне мембраны.

Значения k_p , определенные для различных ППФ, приведены в таблице, они лежат в диапазоне $3 \cdot 10^4 - 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Такие величины констант равновесия указывают на эффективное взаимодействие ППФ с молекулами пирена. Так как молекула пирена не имеет заряда и является ароматически насыщенной структурой, по всей вероятности, взаимодействие пирена с ППФ в значительной степени осуществляется за счет прямого комплексования ароматической структуры пирена со сфероидом фуллерена или его аддендами именно в гидрофобной зоне мембраны. При этом прочность комплекса пирен:ППФ практически не зависит от заряда ППФ.

Наблюдаемые различия в значениях k_p для различных ППФ при взаимодействии с пиреном могут быть объяснены как частичным участием самих аддендов в процессе комплексообразования, так и различной степенью проникновения фуллеренового ядра в гидрофобную область мембраны.

Таким образом, взаимодействие ППФ с пиреном должно в наиболее адекватной форме отражать мембранотропность ППФ с точки зрения их способности проникать в гидрофобную зону мембраны или проникать через липидный бислой, а параметр k_p отражать степень мембранотропности ППФ.

На основании изложенных экспериментальных данных можно сделать вывод, что полизамещенные производные фуллеренов образуют с флуоресцентными зондами комплексы, прочность которых характеризуется величиной констант равновесия, определяемых из уравнения Штерна-Фольмера. Выбор зондов разной полярности позволяет анализировать эффективность взаимодействия ППФ с различными сайтами фосфолипидной мембраны, которая, в свою очередь, существенно зависит от структуры и заряда аддендов, присоединенных к сфероиду полизамещенных производных фуллеренов. Это позволяет рассматривать значения констант равновесия k_p комплексов ППФ и флуоресцентных зондов различной полярности в качестве количественной оценки мембранотропности полизамещенных производных фуллеренов.

2. Исследование антирадикальной активности полизамещенных производных фуллеренов

Антирадикальная активность ППФ изучалась с помощью метода хемилюминесценции по изменению свечения хромофора люминола в присутствии ППФ. Для оценки антирадикальной активности ППФ определялось значение площади (S) под кинетической кривой люминесценции хромофора при его взаимодействии со свободными радикалами (рис. 8).

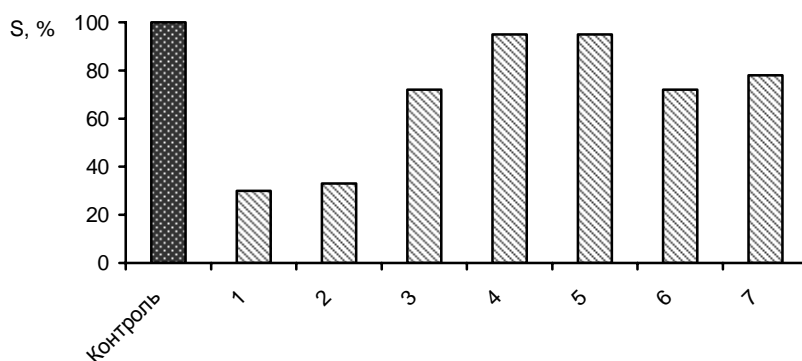


Рис. 8. Изменение интенсивности пероксидного окисления липидов в гомогенате головного мозга мышей при действии ППФ в концентрации 10^{-5} М на примере соединений: **1.** ППФ-9; **2.** ППФ-11; **3.** ППФ-12; **4.** ППФ-14; **5.** ППФ-17; **6.** ППФ-18; **7.** ППФ-19.

Как видно из таблицы, все исследуемые водорастворимые полизамещенные производные фуллеренов проявляют в разной степени антирадикальную активность. Наиболее эффективными антиоксидантами являются соединения, на аддендах которых имеется отрицательный заряд (ППФ-5, ППФ-9, ППФ-10, ППФ-11).

На основании анализа экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что ППФ эффективно встраиваются в мембрану в области полярных головок фосфолипидов (в месте локализации красителей), образуя комплексы с красителями. При этом изменения константы равновесия этих комплексов k_p при изменении структуры ППФ хорошо коррелирует с изменением антиоксидантной активности данных ППФ: по мере повышения прочности комплекса краситель-ППФ возрастает антиоксидантная активность ППФ.

Этот факт позволяет предположить, что антирадикальная активность ППФ наиболее эффективно проявляется при их локализации в районе полярных головок липидов и, возможно, связана с участием в данных реакциях как заряженных радикальных частиц, таких как O_2^- , так и карбоксильных групп аддендов.

3. Влияние водорастворимых производных фуллеренов на каталитическую активность мембраносвязанных ферментов моноаминоксидазы А и моноаминоксидазы В

Моноаминоксидаза А и моноаминоксидаза В - мембраносвязанные ферменты, осуществляющие окислительное дезаминирование биогенных аминов в организме. Они играют центральную роль в регуляции метаболизма биогенных аминов, многие из которых выполняют нейромедиаторные функции в живых организмах. Изучение влияния ППФ на MAO-A и MAO-B является важной задачей для создания новых лекарственных препаратов на основе фуллеренов. Полученные данные представлены в таблице и на рисунке 9.

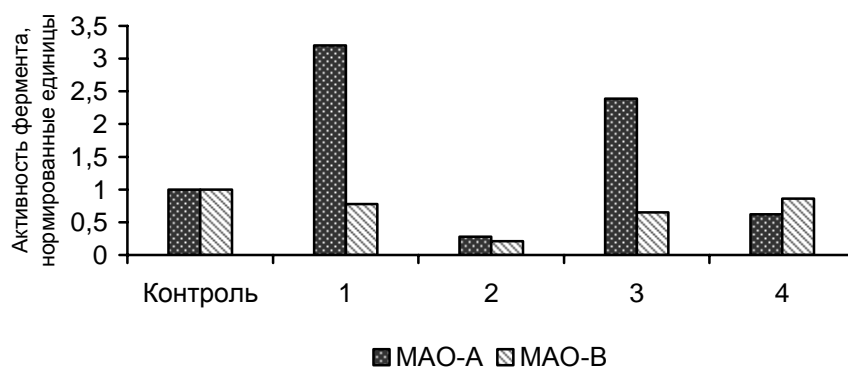


Рис. 9. Изменение каталитической активности MAO-A и MAO-B в гомогенате головного мозга крыс при действии ППФ на примере соединений: 1. ППФ-3; 2. ППФ-4; 3. ППФ-15; 4. ППФ-19.

Как видно из таблицы, ППФ-1, 2, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 15 увеличивают каталитическую активность MAO-A и снижают активность MAO-B. Как известно, повышение активности MAO-A приводит к снижению уровня адреналина в организме, что позволяет рассматривать активаторы MAO-A как потенциальные препараты для снятия нервного возбуждения. Поскольку MAO-B является одним из ключевых ферментов, обеспечивающих метаболизирование дофамина в мозге до его конечного продукта – гомованилиновой кислоты, ингибирование данного фермента позволяет пролонгировать эффекты синаптического дофамина, в чем и состоит теоретическое обоснование использования ингибиторов MAO-B при терапии болезни Паркинсона.

Соединения ППФ-4, ППФ-15 и ППФ-19 являются эффективными ингибиторами MAO-A и MAO-B. Ингибиторы MAO, блокируя в организме процесс окисления биогенных аминов, способствуют их накоплению в тканях центральной и

периферической нервной системы, а также в других органах и тканях. Накоплением серотонина, триптамина, норадреналина, дофамина объясняют антидепрессивное и гипотензивное действие ингибиторов МАО. Ингибиторы МАО способны усиливать коронарное кровообращение. В клинической практике ингибиторы МАО применяют при лечении депрессивных состояний и стенокардии. Опираясь на полученные экспериментальные данные, согласно протоколам ВОЗ, водорастворимые производные фуллерена ППФ-4, ППФ-15 и ППФ-19 можно рассматривать в качестве потенциальных антидепрессантов.

4. Изменение каталитической активности цитохром *c*-оксидазы под влиянием водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов

Митохондрии играют основную роль как в продукции АТФ, так и в генерации активных форм кислорода (АФК). Синтез АТФ происходит за счет создания на мембране градиента H^+ , который, в свою очередь, генерируется цитохром *c* оксидазой, осуществляющей реакцию $4H^+ + 4e^- + O_2 = 2H_2O$ за счет электронов, переносимых по электронтранспортной цепи митохондрий, состоящей из нескольких белковых комплексов. При этом в физиологических условиях в митохондриях ~1-2% перенесенных электронов поступают на кислород, превращая его в супероксид анион.

Любое повреждение электрон транспортной цепи может инициировать генерацию активных форм кислорода, вызывающих впоследствии нарушения в самих митохондриях и в других мембранных структурах.

Наиболее изученным комплексом дыхательной цепи митохондрий является цитохром *c*-оксидаза. Этот фермент катализирует перенос электронов от феррицитохрома *c* на кислород в процессе окислительного фосфорилирования.

В диссертационной работе исследовалась способность ППФ катионной и анионной природы влиять на каталитическую активность цитохром *c*-оксидазы в митохондриях головного мозга крыс. Воздействие биологически активных соединений на данную ферментативную систему может происходить по нескольким механизмам. В первую очередь, это может быть вызвано их взаимодействием с активным центром цитохромом *c*-оксидазы, который связывает цитохром *c*.

Цитохром *c* – электрон-транспортный белок, входящий в состав дыхательной цепи митохондрий, в функции которого входит перенос электрона от цитохром *c*-редуктазы к цитохром *c*-оксидазе.

Для оценки влияния электростатических зарядов белковой глобулы цитохрома *c* на эффективность реакции с другими заряженными молекулами в растворе в данной диссертационной работе исследовался эффект тушения триплетных состояний эозина *Y* гемом цитохрома при различных значениях ионной силы раствора. Предполагается, что тушение фосфоресценции гемом цитохрома *c* осуществляется по обменному механизму, и данная реакция может моделировать реакции переноса электрона с участием цитохрома *c*.

Анализ зависимости значений k_q – константы скорости тушения фосфоресценции триплетного зонда эозина *Y* цитохромом *c* в буферном растворе от ионной силы этого раствора проводился с использованием уравнения Бренстеда

$$\lg k_q = \lg k_q^0 + z_1 z_2 \sqrt{\mu}$$

Согласно этому уравнению, из наклона линейного участка зависимости $\lg k_q$ от $\sqrt{\mu}$ можно определить величину эффективного заряда одного из реагентов z_1 , зная величину заряда z_2 второго реагента (рис. 9).

В проведенном эксперименте в качестве триплетного зонда использовался эозин *Y*, имеющий заряд (-2) при нейтральных рН.

Ионная сила раствора изменялась введением в образец концентрированного раствора NaCl. Величина k_q определялась из анализа кинетических кривых затухания фосфоресценции эозина *Y* при различных концентрациях цитохрома *c*.

Известно, что цитохром *c* при рН=7 имеет восемь положительно заряженных лизиновых групп, эозин в этих условиях находится в растворе в виде дианиона. Как видно из рисунка 10, зависимость $\lg k_q$ от $\sqrt{\mu}$ линейна при $\sqrt{\mu} < 0.3$.

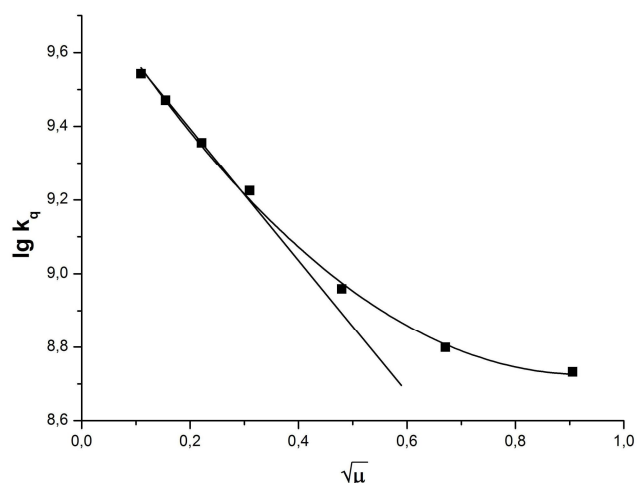


Рис. 10. Зависимость константы скорости тушения флуоресценции эозина цитохромом *c* (k_q) от ионной силы (μ) раствора.

Исходя из того, что $z_1 = -2$ для эозина Y, из наклона линейного участка этой зависимости определена величина эффективного заряда цитохрома *c*, которая составила +1.7. На основании этого можно сделать заключение, что несмотря на то, что полный заряд цитохрома *c* в этих условиях +8, лишь две лизиновые группы эффективно влияют на процесс столкновения эозина Y с участком поверхности цитохрома *c*, на котором находится выступающий край гема, принимающий участие в каталитическом акте. Такой подход позволяет показать важную роль как локальных зарядов цитохрома *c*, так и зарядов в активных центрах других белков – партнеров цитохрома *c* в реакциях переноса электрона, влияющих на эффективность его взаимодействия с этими белками.

Выше упоминалось о том, что при нейтральных pH цитохром *c* несет на себе положительные заряды, которые обеспечивают его комплементарное взаимодействие с активным центром фермента цитохром *c*-оксидазы, имеющим, соответственно, отрицательные заряды. В силу этого ППФ катионной природы могут взаимодействовать непосредственно с данным активным центром цитохром *c*-оксидазы, а ППФ анионной природы могут взаимодействовать с цитохромом *c*. Все типы взаимодействия будут приводить к ингибированию функции цитохром *c*-оксидазы, что может вызывать нарушение процесса синтеза АТФ в митохондриях. В дополнение к этому, следует учитывать, что цитохром *c*-оксидаза является мембраносвязанным ферментом, и производные фуллеренов, обладающие мембранотропными свойствами, могут изменять свойства мембраны, в структуре

которой функционирует этот фермент. Таким образом, ППФ, сочетающие в себе гидрофобные и заряженные фрагменты, могут эффективно модулировать энергетический баланс клетки и запуск механизма апоптоза.

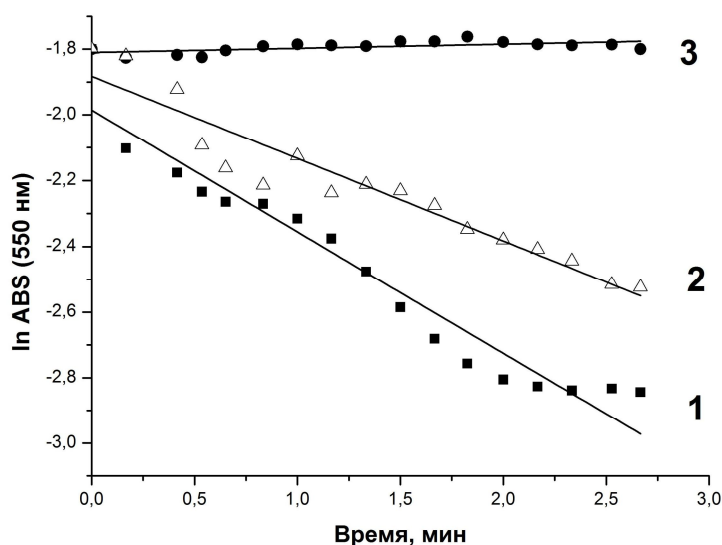


Рис. 11. Линейные анаморфозы кинетических кривых ферментативного окисления цитохрома *c* цитохром *c*-оксидазой в присутствии ППФ в концентрации 10^{-5} М.

1- Контроль;

2- ППФ анионной природы (на примере ППФ-6);

3- ППФ катионной природы (на примере ППФ-19);

ABS - оптическая плотность образцов, при $\lambda_{\text{abs}} = 550$ нм.

Из таблицы и рисунка 11 видно, что соединения с отрицательными зарядами ингибируют каталитическую активность цитохром *c*-оксидазы в среднем на 40%. (ППФ-1, 6, 7, 10, 11, 12, 17) В присутствии положительно заряженных производных наблюдается 100% ингибирование фермента (ППФ-18 и ППФ-19). На основании этого можно предположить, что отрицательно заряженные производные сорбируются на цитохроме *c*, что препятствует его взаимодействию с цитохром *c*-оксидазой, а положительно заряженные ППФ взаимодействуют преимущественно с активным центром цитохром *c*-оксидазы, взаимодействуя с его отрицательными зарядами и конкурируя с цитохромом *c* за места связывания.

Из анализа мембранотропных свойств ППФ и изменения каталитической активности цитохром *c*-оксидазы в присутствии ППФ была обнаружена выраженная корреляция между значениями констант скорости тушения флуоресценции эозина Υ производными фуллерена в водных растворах и в составе фосфолипидных мембран -

с одной стороны, и каталитической активностью фермента – с другой (коэффициент Пирсона равен -0.64 для водных растворов и -0.7 для мембран). Знак минус свидетельствует о том, что с ростом констант скорости тушения фосфоресценции зонда падает значение каталитической активности фермента. Корреляция с константами тушения эозина свидетельствует о том, что либо субстрат (цитохром *c*), либо каталитически активный центр цитохром *c*-оксидазы доступны ингибиторам со стороны водной фазы. Как говорилось выше, цитохром *c* – водорастворимый белок, который взаимодействует с ферментом из водной фазы, окружающей мембрану, а активный центр фермента локализован в полярных сайтах митохондриальной мембраны и экспонирован в водную фазу, что согласуется с обнаруженной корреляцией.

Таким образом, ППФ, имеющие отрицательные и положительные заряды на аддендах, взаимодействуя с положительными зарядами цитохрома *c* и отрицательными зарядами активного центра фермента, вызывают ингибирование каталитической активности цитохром *c*-оксидазы в реакции окисления цитохрома *c*.

	Константы скорости тушения фосфоресценции эозина Y ($M^{-1} \cdot c^{-1}$)		Константы равновесия комплекса 2.7-Br-профлавин:ППФ (M^{-1})			Константы равновесия комплекса пирен:ППФ (M^{-1})		Ингибирование ХЛ (%)**	Каталитическая активность цитохром c-оксидазы в % от контроля	Относит. активность MAO в % от контроля	
	$K_{грас}$	$K_{дип}$	$K_{грас}$	$K_{дип}$	K_{394nm}	K_{475nm}	A			B	
ППФ-1	$0.31 \cdot 10^8$	$0.05 \cdot 10^8$	$5.83 \cdot 10^5$	$3.60 \cdot 10^5$	$1.37 \cdot 10^5$	$1.34 \cdot 10^5$	19	57	386	82	
ППФ-2	$0.39 \cdot 10^8$	$0.34 \cdot 10^8$	$2.85 \cdot 10^5$	$1.30 \cdot 10^5$	$0.37 \cdot 10^5$	$0.46 \cdot 10^5$	15	86	144	12	
ППФ-3	$0.54 \cdot 10^8$	$0.14 \cdot 10^8$	$4.21 \cdot 10^5$	$1.95 \cdot 10^5$	$2.59 \cdot 10^5$	$3.30 \cdot 10^5$	18	-	322	78	
ППФ-4	$0.03 \cdot 10^8$	$<10^6$	$2.63 \cdot 10^5$	$2.02 \cdot 10^5$	$0.90 \cdot 10^5$	$0.89 \cdot 10^5$	23	120	28	21	
ППФ-5	$0.09 \cdot 10^8$	$0.06 \cdot 10^8$	$6.64 \cdot 10^5$	$3.20 \cdot 10^5$	$0.91 \cdot 10^5$	$0.95 \cdot 10^5$	52	131	117	52	
ППФ-6	$0.09 \cdot 10^8$	$0.11 \cdot 10^8$	$4.47 \cdot 10^5$	$2.85 \cdot 10^5$	$0.59 \cdot 10^5$	$0.57 \cdot 10^5$	22	47	103	31	
ППФ-7	$0.02 \cdot 10^8$	$<10^6$	$10.00 \cdot 10^5$	$6.10 \cdot 10^5$	$2.58 \cdot 10^5$	$2.98 \cdot 10^5$	29	50	114	95	
ППФ-8	$0.09 \cdot 10^8$	$0.06 \cdot 10^8$	$5.26 \cdot 10^5$	$2.90 \cdot 10^5$	$0.54 \cdot 10^5$	$0.58 \cdot 10^5$	27	97	108	114	
ППФ-9	$0.45 \cdot 10^8$	$0.42 \cdot 10^8$	$20.00 \cdot 10^5$	$10.00 \cdot 10^5$	10^5	$0.87 \cdot 10^5$	70	100	108	110	
ППФ-10	$0.61 \cdot 10^8$	$0.59 \cdot 10^8$	$20.00 \cdot 10^5$	$8.30 \cdot 10^5$	$1.08 \cdot 10^5$	$1.28 \cdot 10^5$	71	79	70	120	
ППФ-11	$0.97 \cdot 10^8$	$0.84 \cdot 10^8$	$10.00 \cdot 10^5$	$7.00 \cdot 10^5$	$0.69 \cdot 10^5$	$0.83 \cdot 10^5$	67	57	155	91	
ППФ-12	$0.39 \cdot 10^8$	$0.28 \cdot 10^8$	$0.60 \cdot 10^5$	$0.38 \cdot 10^5$	$0.53 \cdot 10^5$	$0.49 \cdot 10^5$	28	62	178	66	
ППФ-13	$0.52 \cdot 10^8$	$0.29 \cdot 10^8$	$0.25 \cdot 10^5$	$0.09 \cdot 10^5$	$0.23 \cdot 10^5$	$0.39 \cdot 10^5$	19	129	72	73	
ППФ-14	$<10^6$	$<10^6$	$0.95 \cdot 10^5$	$0.60 \cdot 10^5$	$0.36 \cdot 10^5$	$0.41 \cdot 10^5$	5	89	203	85	
ППФ-15	$<10^6$	$<10^6$	$0.80 \cdot 10^5$	$0.45 \cdot 10^5$	$0.86 \cdot 10^5$	$0.88 \cdot 10^5$	10	101	239	65	
ППФ-16	$0.89 \cdot 10^8$	$0.30 \cdot 10^8$	$0.95 \cdot 10^5$	$0.43 \cdot 10^5$	$0.90 \cdot 10^5$	10^5	37	98	-	-	
ППФ-17	$>10^{10}$	$>10^{10}$	$*3.35 \cdot 10^5$	$*1.03 \cdot 10^5$	$3.06 \cdot 10^5$	$3.46 \cdot 10^5$	5	64	-	-	
ППФ-18	$2.00 \cdot 10^9$	$1.60 \cdot 10^9$	$*3.49 \cdot 10^5$	$*1.55 \cdot 10^5$	$1.25 \cdot 10^5$	$1.83 \cdot 10^5$	28	0	362	181	
ППФ-19	$0.90 \cdot 10^9$	$0.74 \cdot 10^9$	$*3.28 \cdot 10^5$	$*0.57 \cdot 10^5$	$1.53 \cdot 10^5$	$2.20 \cdot 10^5$	22	0	62	86	
CoCl ₂	$0.28 \cdot 10^9$	$0.30 \cdot 10^9$	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fe(C ₂ H ₅) ₂	-	$0.85 \cdot 10^9$	-	-	-	-	-	-	-	-	

* - значения констант для флуоресценции эозина Y; ** - значение контроля принято за 100%

ВЫВОДЫ

1. Методами триплетных и флуоресцентных зондов показано, что все ППФ эффективно взаимодействуют с фосфолипидными мембранами. Обнаружено, что константы скорости тушения флуоресценции заряженных триплетных зондов и константы равновесия комплексов краситель:ППФ, измеренные по тушению флуоресценции, как в водных растворах, так и в структуре мембран существенно зависят от зарядов фуллереновых производных, что позволяет оценивать электростатический заряд ППФ.
2. Предложен способ количественной оценки мембранотропности производных фуллеренов по значениям констант скорости тушения флуоресценции триплетных зондов производными фуллеренов и констант равновесия комплексов краситель:ППФ в структуре мембран.
3. Установлено, что ряд исследованных ППФ обладает выраженной антиоксидантной активностью, при этом наиболее эффективное антирадикальное действие проявляют производные фуллеренов с отрицательными зарядами на аддендах. Из оценки корреляции между константами равновесия для комплексов ППФ с различными флуоресцентными зондами и антирадикальной активностью соединений сделан вывод, что ингибирование ПОЛ фуллереновыми производными преимущественно осуществляется в области полярных головок фосфолипидов.
4. С помощью метода триплетных зондов определен эффективный заряд цитохрома *c* в реакциях переноса электрона. Установлено, что анионные и катионные ППФ в разной степени ингибируют реакцию окисления цитохрома *c* цитохром *c*-оксидазой, при этом наиболее эффективными ингибиторами являются катионные производные.
5. Выявлено избирательное действие водорастворимых ППФ на каталитическую активность мембраносвязанных ферментов окислительного дезаминирования биогенных аминов: MAO-A и MAO-B головного мозга крыс. Из анализа эффектов влияния ППФ на активность MAO-A и MAO-B можно предположить, что водорастворимые полизамещенные производные фуллеренов могут рассматриваться в качестве потенциальных препаратов нейропротекторного действия.

Список публикаций по теме диссертации:

1. Жохова (Полетаева) Д.А., Котельникова Р.А., Романова В.С., Богданов Г.Н., Файнгольд И.И., Мищенко Д.В., Коновалова Н.П., Котельников А.И. «Гибридные наноструктуры на основе фуллеренов для химиотерапии злокачественных опухолей». Первая школа-семинар молодых ученых. «Органические и гибридные наноматериалы». Иваново. 2008. С. 142-143.
2. Жохова (Полетаева) Д.А., Котельникова Р.А., Котельников А.И., Богданов Г.Н., Мищенко Д.В., Романова В.С., Андреев С.М., Куц А.А. «Нанобионика биологически активных производных фуллерена C₆₀». Тезисы докладов на Всероссийской школе семинаре для студентов, аспирантов, молодых ученых «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы». Белгород. 2008.
3. Жохова (Полетаева) Д.А., Котельникова Р.А., Романова В.С., Файнгольд И.И., Коновалова Н.П., Баринов А.В., Мищенко Д.В., Богданов Г.Н., Берсенева Е.Н., Котельников А.И. «Локализация фуллеренил-эозина в злокачественных опухолях животных». Всероссийская научная конференция с международным участием «Нанотехнологии в онкологии 2008». Москва. С. 128-129.
4. Котельникова Р.А., Романова В.С., Файнгольд И.И., Коновалова Н.П., Баринов А.В., Мищенко Д.В., Богданов Г.Н., Берсенева Е.Н., Рубцов А.Ю., Жохова (Полетаева) Д.А., Котельников А.И. Локализация фуллеренил-эозина в злокачественных опухолях животных - Российский биотерапевтический журнал. 2008, 3, 7, с. 99.
5. Полетаева Д.А., Котельникова Р.А., Мищенко Д.В., Романова В.С., Григорьев В.В., Петрова Л.Н., Иванова Т.А., Бачурин С.О., Котельников А.И. «Молекулярные механизмы нейропротекторного действия гибридных структур на основе фуллерена C₆₀». IX ежегодная международная молодежная конференция ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика». Москва. 2009.
6. R. A. Kotel'nikova, D. V. Mishchenko, D. A. Zhokhova (Poletaeva), A. V. Barinov, N. S. Goryachev, A. Yu. Rybkin, G. N. Bogdanov, V. N. Varfolomeev, V. S. Romanova, and A. I. Kotel'nikov. Luminescent Techniques in Investigation of the Biological Properties of Fullerene-Based Hybrid Nanostructures. High Enrgy Chemistry. 2009, 43, № 7, pp. 582-586.
7. Котельников А.И., Котельникова Р.А., Романова В.С., Коновалова Н.П., Богданов Г.Н., Файнгольд И.И., Мищенко Д.В., Полетаева Д.А., Баринов А.В., Рубцов А.Ю., Сашенкова Т.Е., Берсенева Е.Н. Фуллерены и их производные в наноонкологии. Российский биотерапевтический журнал. 2010, 2, с. 72-73.
8. Файнгольд И.И., Котельникова Р.А., Коновалова Н.П., Романова В.С., Мищенко Д.В., Полетаева Д.А., Богданов Г.Н., Котельников А.И. Антиоксидантная активность гибридных структур на основе фуллерена C₆₀ и их применение в экспериментальной химиотерапии. Российский биотерапевтический журнал. 2010, 2, с. 80-82.
9. Полетаева Д.А., Корнев А.Б., Файнгольд И.И., Хакина Е.А., Смолина А.В., Рыбкин А.Ю., Котельникова Р.А., Богданов Г.Н., Трошин П.А., Котельников А.И. «Мембранотропные свойства полизамещенных водорастворимых

- производных фуллеренов». Успехи химической физики: сб. тезисов докладов на Всероссийской молодежной конференции. Черноголовка. 2011. С.47.
10. Poletaeva D.A., Kotel'nikova R.A., Troshin P.A., Schmitt F.-J., Kornev A.B., Khakina E.A., Eichler H.J., Renger G., Kotelnikov A.I. «Localisation of water soluble polysubstituted fullerene derivatives in membrane of phosphatidylcholine liposomes». Сборник тезисов II Международной Интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии». 2011. С. 272-276.
 11. Полетаева Д.А., Котельникова Р.А., Котельников А.И., Трошин П.А., Корнев А.Б., Хакина Е.А. «Локализация водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов в структуре мембран фосфатидилхолиновых липосом». Труды 54-й научной конференции МФТИ «Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе». Москва. 2011. С. 204-205.
 12. Григорьев В.В., Петрова Л.Н., Иванова Т.А, Котельникова Р.А, Богданов Г.Н, Полетаева Д.А., Файнгольд И.И., Мищенко Д.В., Романова В.С. Котельников А.И, Бачурин С.О. Исследование нейропротекторного действия гибридных структур на основе фуллерена C₆₀. Известия РАН, серия «Биологическая», 2011, №2, с. 163-170.
 13. Л.В.Татьяненко, О.В.Доброхотова, Р.А.Котельникова, Д.А.Полетаева, Д.В.Мищенко, И.Ю.Пихтелева, Г.Н.Богданов, В.С.Романова, А.И.Котельников. Влияние гибридных производных фуллерена C₆₀ на активность Ca²⁺-Mg²⁺-АТФазы СР и фосфодиэстеразы цГМФ. Журнал биомедицинской химии, 2009, т.5, с.519-526.
 14. Котельникова Р.А., Файнгольд И.И., Полетаева Д.А., Мищенко Д.В., Романова В.С., Штолько В.Н., Богданов Г.Н., Рыбкин А.Ю., Фрог Е.С., Смолина А.В., Куц А.А., Федорова Н.Е., Котельников А.И. Антиоксидантные свойства водорастворимых аминокислотных производных фуллеренов и их роль в ингибировании герпес-вирусной инфекции. Известия академии наук, сер. Химическая, 2011, № 6, с. 1146-1150.