

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ЕМЕЛЬЯНЦЕВ СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *ESCHERICHIA*
COLI, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ**

1.5.7. Генетика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону
2025

Работа выполнена в лаборатории экспериментального мутагенеза и на кафедре генетики Академии биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет».

Научный руководитель:

Празднова Евгения Валерьевна,

доктор биологических наук, заведующая молодёжной лабораторией «Молекулярная генетика микробных консорциумов» Академии биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

Официальные оппоненты:

Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики Московского физико-технического университета (МФТИ).

Марсова Мария Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «22» октября 2025 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета ЮФУ 801.01.07 по биологическим наукам на базе Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, к. 712.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. Ю.А. Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Р. Зорге, 21Ж и на сайте Южного федерального университета <https://hub.sfedu.ru/diss/show/1345904/>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Отзыв на автореферат в 2-х экз. (с указанием даты, полностью ФИО, учёной степени со специальностью, звания, организации, подразделения, должности, адреса, телефона, e-mail), заверенный печатью организации, просим направлять по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к.106, ученому секретарю диссертационного совета ЮФУ801.01.07 Бутенко Е.В., а также в формате .pdf на e-mail: evbutenko@sfedu.ru.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.В. Бутенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Среди множества новых наноматериалов особый интерес вызывает фуллерен C₆₀ — четвёртая аллотропная модификация углерода с уникальной сферической структурой, демонстрирующая интересные в фармакологическом плане биологические свойства. В работе 2012 года (Baati et al., 2012) показана геропротекторная активность C₆₀ на крысах, предположительно обусловленная его антиоксидантной активностью. Однако эти результаты не были подтверждены в последующих работах (Grohn et al., 2021), а в других работах обсуждается более слабая антиоксидантная активность, а нередко и токсичность фуллерена (Christie M. Sayes et al., 2004; J. D. Fortner et al., 2005; Oberdörster, 2004). Наши эксперименты показали, что фуллерен C₆₀ в 2 % растворе TWEEN 80 проявляет антиоксидантную активность (Emelyantsev et al., 2019), а C₆₀ в растворе сурфактина (внеклеточного метаболита пробиотических микроорганизмов) — антиоксидантную и ДНК-протекторную активность (Emelyantsev, Prazdnova, Chistyakov, 2024). Сурфактин является бактериальным биосурфактантом, повышающим проницаемость мембран клеток. Таким образом, спектр биологической активности C₆₀ может расширяться метаболитами кишечного микробиома, повышающими проницаемость клеточных мембран для наночастиц, в частности, сурфактином, за счёт повышения биодоступности C₆₀. Отсутствие геропротекторной активности C₆₀ в оливковом масле в исследовании (Grohn et al., 2021), возможно, связано с различиями в микробиоте и меньшим уровнем производства сурфактина (или других биосурфактантов) по сравнению с кишечной микрофлорой крыс в эксперименте (Baati et al., 2012).

Физические и химические свойства фуллерена позволяют предположить, что амбивалентность его свойств *in vivo* связана с биодоступностью, которая может сильно меняться в зависимости от условий. Для потенциального применения фуллерена C₆₀ в медицине необходимо решить задачи получения его стабильного водного раствора (подбор солюбилизатора) и увеличения биодоступности. Это требует исследования биологического действия C₆₀ на простых моделях, таких, как бактериальные биосенсоры. В биолюминесцентных штаммах *Escherichia coli* MG1655 репортёрные гены *lux-CDABE* поставлены под контроль промоторов генов АОС и SOS-ответа, что позволяет оценить влияние фуллерена на экспрессию генов *E. coli*, ассоциированных с окислительным стрессом. Такие модели необходимы для подбора эффективных доз и растворителей, а также для оценки потенциальных побочных эффектов.

Степень разработанности темы исследования. За последние несколько десятилетий был опубликован ряд работ, посвященных влиянию углеродных наночастиц на экспрессию генов, в т.ч. ассоциированных с окислительным стрессом, модельных организмов и культур клеток человека. Однако, во многих токсикологических исследованиях наноматериалов (НМ) на основе углерода было выявлено много несоответствий, вероятно, связанных с различиями в приготовлении растворов наночастиц, их концентрации и распределения по размерам, при том, что

свойства НМ зависят свойств от структуры и размеров. Более того, большинство токсикологических исследований обнаруживают 1 или ограниченное количество повреждений ДНК и давать видовозависимые результаты (Lan et al., 2014).

Открытие и производство большого количества искусственных НМ и производных, разнообразие их растворителей стимулируют разработку и применение более быстрых, экономичных и надежных анализов токсичности, в т.ч. генотоксичности и влияния на частоту мутагенеза.

Цели и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния фуллерена C_{60} на экспрессию стресс-индуцируемых генов и мутагенез у *Escherichia coli*, и влияния солюбилизатора сурфактина на эти эффекты.

Задачи исследования:

- 1) Подбор солюбилизатора (ПАВ), его концентраций и условий солюбилизации для получения суспензии фуллерена в биодоступной форме.
- 2) Изучение влияния фуллерена C_{60} и солюбилизаторов на параметры экспрессии генов SOS-ответа, с добавлением солюбилизатора сурфактина и без него.
- 3) Изучение влияния фуллерена C_{60} и фуллеренола $C_{60}(OH)_{36}$ на параметры экспрессии генов, ассоциированных с окислительным стрессом, с добавлением сурфактина и без него.
- 4) Определение влияния фуллерена C_{60} и солюбилизатора (сурфактина) на частоту спонтанного и индуцированного мутагенеза у *E. coli*.

Научная новизна. В данной работе впервые применён солюбилизатор природного происхождения, повышающий биодоступность фуллерена C_{60} и позволяющий ему проявить ДНК-протекторные и антимуtagenные свойства в живых клетках. Показано, что добавление метаболита бактериального происхождения, сурфактина, вызывает статистически значимое ДНК-протекторное действие C_{60} в отношении диоксида у *E. coli*. Данный солюбилизатор проявлял большую эффективность по сравнению со широко используемым поверхностно-активным веществом TWEEN-80.

В данной работе впервые изучены параметры экспрессии ассоциированных с окислительным стрессом генов *E. coli* под влиянием фуллерена C_{60} и фуллеренола $C_{60}(OH)_{36}$ в растворе сурфактина. С использованием генно-инженерных биосенсоров установлено влияние на индукцию экспрессии генов SOS-оперона (раннего и позднего SOS-ответа, контролируемых промоторами RecA и ColD, соответственно), гена каталазы KatG и оперона супероксиддисмутазы SoxS.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показано, что немодифицированный фуллерен C_{60} в 2 % TWEEN 80 оказывает антиоксидантное действие в отношении перекиси водорода, что проявляется в снижении экспрессии гена каталазы в присутствии перекиси водорода у *Escherichia coli*, но не защищает ДНК бактерий при действии диоксида.

Подобран физиологически совместимый растворитель бактериального происхождения (сурфактин) для фуллерена C_{60} , ранее не применявшийся для растворения фуллеренов.

Показано, что C_{60} в растворе сурфактина оказывает не только антиоксидантное, но и ДНК-протекторное и антимуtagenное действие. Т.о., при солюбилизации в сильных мембранотропных циклических липопептидах (например, сурфактине), благодаря увеличению биодоступности, углеродные наночастицы способны проявлять эффекты, которых не оказывают в широко применяемых ПАВ (TWEEN 80).

Практическая значимость. При проникновении в митохондрии по механизму, предложенному в работе (Chistyakov, 2014), фуллерен C_{60} может стать основой для нового типа лекарств. Фуллерены можно использовать как антиоксиданты, геропротекторы, для доставки лекарств и в фотодинамической терапии, но следует учитывать вышеописанные особенности водных растворов, влияние растворителя, размера агрегатов и интенсивного освещения, особенно УФ-спектра.

Определены концентрации сурфактина (метаболит пробиотических микроорганизмов) для использования в качестве солюбилизатора для фуллерена C_{60} и для наибольшего увеличения проницаемости мембран для протекторов, не снижающих скорости роста *E. coli*.

Благодаря свойствам фуллерена C_{60} проникать через биологические мембраны, быть переносчиком протонов (Chistyakov, 2014) и взаимодействовать со свободными радикалами, обуславливающие его протекторный эффект на *E. coli*, он может рассматриваться как митохондриально-направленный антиоксидант и ДНК-протектор.

Полученные данные также говорят о потенциале исследования фуллерена в комплексе с сурфактин-продуцирующими бациллярными пробиотиками на животных модельных организмах.

Положения, выносимые на защиту.

1) Экспрессия стресс-индуцируемых оперонов *E. coli*, вызванная генераторами АФК, снижается под действием фуллерена C_{60} и его полигидроксилированного производного, что указывает на их антиоксидантные свойства.

2) Солюбилизатор бактериального происхождения сурфактин увеличивает биодоступность фуллерена C_{60} в водных растворах.

3) Растворы C_{60} с добавлением сурфактина обладают ДНК-протекторным эффектом, а также способны снижать уровень спонтанного и индуцированного диоксидином мутагенеза у *E. coli*.

Апробация результатов исследований. Материалы, положенные в основу работы, были представлены на Международной научной конференции – школе молодых ученых «Smart Nanomaterials and X-ray Optics 2015: Modeling, Synthesis and Diagnostics»

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рецензируемых ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 151 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, выводов, списка литературы (231 источник). Иллюстрационный материал включает 69 рисунков, 3 таблицы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания (Южный федеральный университет, проект № 0852-2020-0029 и проект FENW-2023-0008).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление водных растворов C₆₀.

В экспериментах использовали немодифицированный фуллерен C₆₀ производства Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, США.

Фуллерен C₆₀ добавляли в растворы сурфактина 312,5·мг/л и TWEEN 80 2% в деионизированной воде и озвучивали ультразвуковым гомогенизатором Sonics Vibra-Cell VCX 130 при мощности 30 Вт импульсами 5/5 с в течение 10 мин с охлаждением для поддержания температуры не выше 320 К для оптимального растворения (Безмельницын, Елецкий, Окунь, 1998).

Расчёт концентрации веществ на основе оптической плотности, определённой при помощи спектрофотометрии. Концентрацию растворённых фуллеренов C₆₀ определяли по измеренной с помощью UV/Vis-спектрофотометра BECKMAN COULTER DU® 800 оптической плотности раствора. Измерение спектров поглощения и оптической плотности суспензий C₆₀ измеряли относительно растворов соответствующих растворителей.

Измерение размеров наночастиц фуллерена C₆₀ методом динамического рассеяния света. Отбирали супернатант озвученных водных растворов фуллерена в концентрации 1 г/л с солюбилизаторами после центрифугирования на приборе ELMi CM-50 со скоростью 14000 об/мин в течение 1 мин. Концентрацию растворённых фуллеренов C₆₀ измеряли с помощью UV/Vis-спектрофотометра BECKMAN COULTER DU® 800 по оптической плотности раствора. Т.к. C₆₀ находится в растворах в виде кластеров, средний размер и коэффициент диффузии которых зависит от концентрации (Безмельницын В. Н. и др., 1996), перед измерением распределения размеров наночастицы в разных растворителях выравнивали до концентрации в супернатанте до 100 мг/л.

Размерные характеристики агрегатов C₆₀ в растворах определяли методом DLC (динамического рассеивания света) (Лупанова, 2013) на приборе Nano-flex фирмы Microtrack.

Оценка экспрессии с помощью биолюминесцентного теста. Изучение биологических свойств фуллерена C₆₀ проводилось на модельном биологическом объекте – *Escherichia coli*. Биолюминесцентные штаммы *E. coli* MG1655, несут плазмиды с генами-репортёрами *lux-CDABE*, поставленными под контроль промоторов генов АОС и SOS-ответа и ген устойчивости к ампициллину *bla*.

Биолюминесцентные штаммы *E. coli* растили на среде LB с добавлением ампициллина (Маниатис, Фрич, Сэмбрук, 1984) 100 мкг/мл. Ночную культуру разводили свежей LB с ампициллином до плотности 0,01—0,1 единицы Мак-Фарланда, затем культивировали в термостате при 37 °С 1,5 ч, после чего аликвоты переносили в

стерильные ячейки микропланшета (в экспериментах с веществами-протекторами по 80 мкл, по 90 мкл – в отсутствие протекторов). Контролем растворителя служили ячейки с добавлением в культуру только солюбилизаторов – сурфактина либо TWEEN 80 (2%). После добавления сурфактина, TWEEN 80 и растворов C₆₀ инкубировали в течение 30 мин в 96-луночном микропланшете при температуре 37 ± 0.2 °С. Затем в ячейки планшета добавлялись индукторы: пероксид водорода и паракват в концентрации 10⁻³ М; диоксидин 2,25·10⁻⁵ М. Микропланшет помещали в мультимодальный ридер FLUOstar Omega и инкубировали при 37 °С. Интенсивность биолюминесценции измерялась каждые 10 мин.

Фактор индукции SOS ответа (I^S) вычисляли по формуле:

$$I = \frac{L_e}{L_c} - 1 \quad (1)$$

где: L_e – интенсивность люминесценции пробы с индуктором (в условных единицах); L_c – интенсивность люминесценции контрольной пробы (в условных единицах).

Измерение мутности культур бактерий с помощью спектрофотометра.

Для определения влияния диапазона концентраций сурфактина на кривые роста *E. coli* ночные культуры растили, как и для биолюминесцентного теста, затем аликвотировали по 90 мкл в ячейки микропланшета. Деионизированная вода, сурфактин и пентахлорфенол были добавлены в объёме 10 мкл непосредственно перед экспериментом. Измерение оптической плотности культуры на длине волны 600 нм проводилось на приборе FLUOstar Omega каждые 10 мин при температуре 37 ± 0.2 °С.

Определение антимутагенной активности.

Мазок петлёй с единичной колонии *E. coli* MG1655 разводили в 700 мкл LB, вортиксовали и раскапывали по 100 мкл и растили в течение 18–20 часов в термостатируемом шейкере при 37 °С в пробирках с добавлением:

Контроль: 100 мкл стерильного физраствора и: 100 мкл стерильного физраствора; 100 мкл сурфактина в стерильном физрастворе (контроль растворителя); 100 мкл C₆₀ 0,1 г/л в сурфактине в стерильном физрастворе;

Опыт: 100 мкл 2,25·10⁻⁴ М индуктора мутагенеза (диоксидина) в стерильном физрастворе и: 100 мкл стерильного физраствора; 100 мкл сурфактина в стерильном физрастворе; 100 мкл C₆₀ 0,1 г/л в сурфактине в стерильном физрастворе.

На следующий день разводили свежей LB до 1 единицы МакФарланда (3·10⁸ колониеобразующих единиц (КОЕ)), и производили последовательные десятичные разведения культуры в физрастворе. Выполняли поверхностный посев 100 мкл разведённых культур на плотную питательную среду LB с добавлением и без добавления рифампицина и инкубировали 48 ч при 37 °С, затем подсчитывали число КОЕ. Частоту мутаций определяли путем деления количества КОЕ, выращенных в чашках с рифампицином, на количество КОЕ, выращенных в чашках без антибиотика (Rosche, Foster, 2000).

Антимутагенную активность вычисляли по формуле:

$$A = \left(1 - \frac{w_p}{w_c}\right) 100\%, \quad (2)$$

где w_p – частота мутаций на чашках с рифампицином и протектором, w_c – частота мутаций на чашках с рифампицином и контролем растворителя.

Статистическая обработка данных.

Статистическую значимость определяли по t-критерию Стьюдента для независимых выборок при $p < 0,05$. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Расчеты производились в программе Microsoft Excel с надстройкой Real Statistics.

Среднеквадратичное отклонение коэффициента индукции вычисляли как статистическую ошибку частного по формуле:

$$S_{\bar{z}} = |\bar{I}| \sqrt{\left(\frac{S_{Le}}{L_e}\right)^2 + \left(\frac{S_{Lc}}{L_c}\right)^2} \quad (3)$$

где индексы e и c относятся к опыту и контролю соответственно.

Статистически значимые отличия от контроля определяли по значениям доверительных интервалов, рассчитанных по формуле:

$$\left(\bar{I} - t_{кр} \times \frac{s}{\sqrt{n}}; \bar{I} + t_{кр} \times \frac{s}{\sqrt{n}}\right) \quad (4)$$

где \bar{I} – среднее значение коэффициента индукции; $t_{кр}$ определяется по таблице распределения Стьюдента.

Для анализа зависимости протекторного эффекта от концентрации использовался линейный коэффициент корреляции (коэффициент Пирсона). Интерпретацию выходных значений коэффициента корреляции осуществляли согласно методике (Королькова, Минина, 2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение распределения размеров наночастиц фуллерена C₆₀ методом динамического рассеяния света.

Результаты измерения размеров агрегатов фуллерена C₆₀ в 2 % растворе TWEEN 80 показаны на рисунке 1. Гистограмма показывает, что большинство агрегатов (94,41%) имеют размеры в диапазоне от 4 до 10 нм, причем большинство (54,07%) агрегатов C₆₀ имеют размер от 6 до 8 нм; только 3,87% агрегатов имеют меньшие диаметры до 5 нм.

Распределение размеров наночастиц фуллерена C₆₀ в сурфактине показано на рисунке 2. Большинство агрегатов имеют размеры от 100 до 1000 нм, средний диаметр 302 нм. Однако, в биомедицине к наночастицам относят и агрегаты диаметром до нескольких сотен нанометров, мелкодисперсность которых достаточна для обеспечения повышенного мембранотропного эффекта (Vauthier, Bouchemal, 2009).

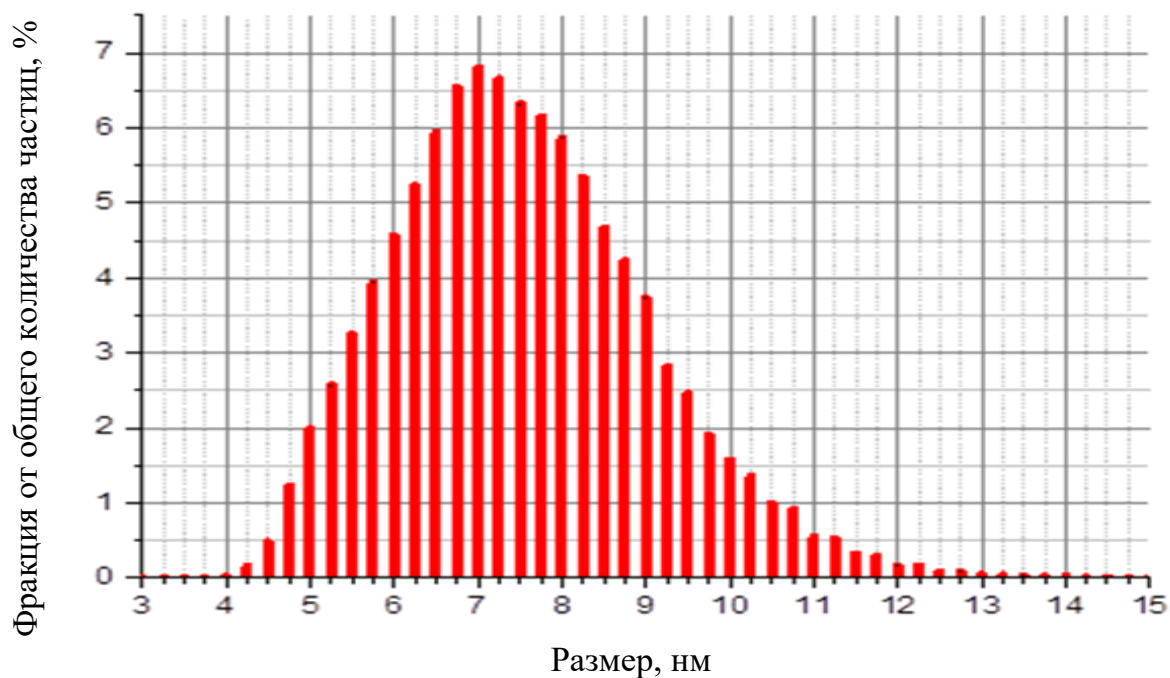


Рисунок 1 – Распределение агрегатов фуллерена C_{60} по размерам в 2 % растворе TWEEN 80 в воде.

Таким образом, солюбилизация ультразвуковым дисмембратором в TWEEN 80 обеспечивает меньший размер наночастиц фуллерена, чем в сурфактине. Несмотря на то, что средний размер агрегатов (302 нм) C_{60} в сурфактине больше 100 нм, в биологических исследованиях данные суспензии относят к растворам наночастиц.

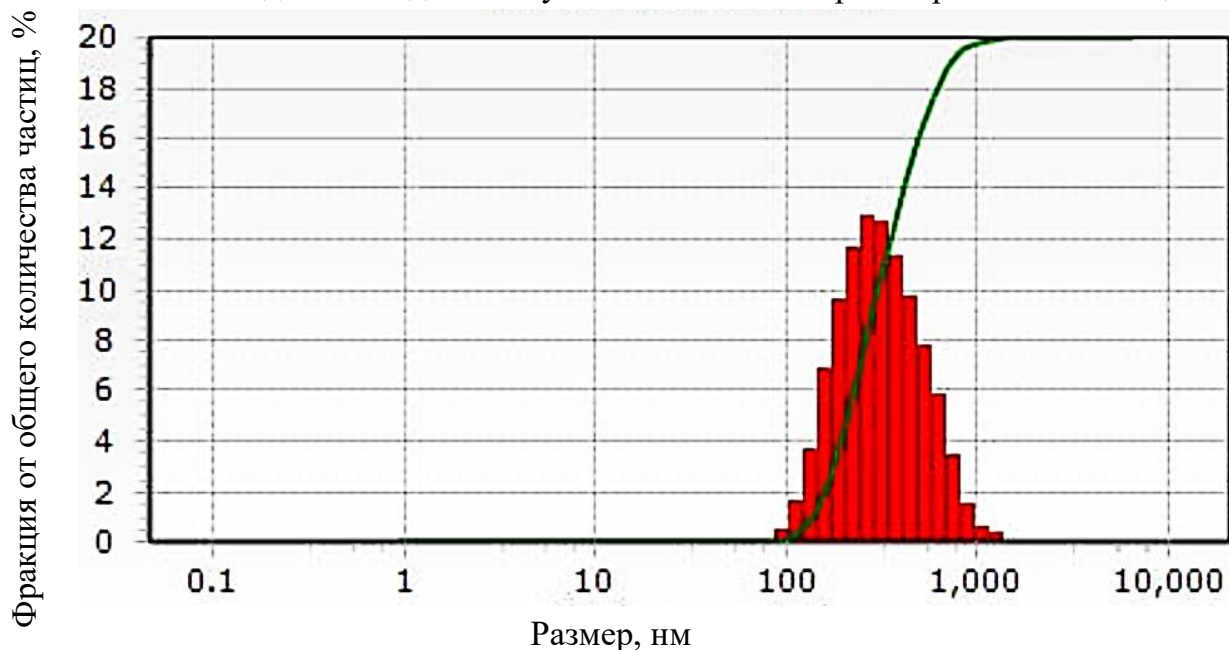


Рисунок 2 – Распределение агрегатов фуллерена C_{60} по размерам в водном растворе сурфактина 312,5 мг/л.

Определение концентраций сурфактина для использования в качестве ПАВ в билюминесцентных тестах. Для определения биосовместимой концентрации сурфактина были использованы билюминесцентные штаммы *E. coli* MG1655 с промотором pFabA (рисунок 3, а, б). Концентрация сурфактина 31,25 мг/л не оказывает влияния на скорость роста относительно контроля – деионизированной воды (diH_2O),

более высокие концентрации подавляют рост. Пентахлорфенол (ПХФ) – положительный контроль подавляющих рост бактерий мембранотропных веществ. МИК – минимальная ингибирующая концентрация

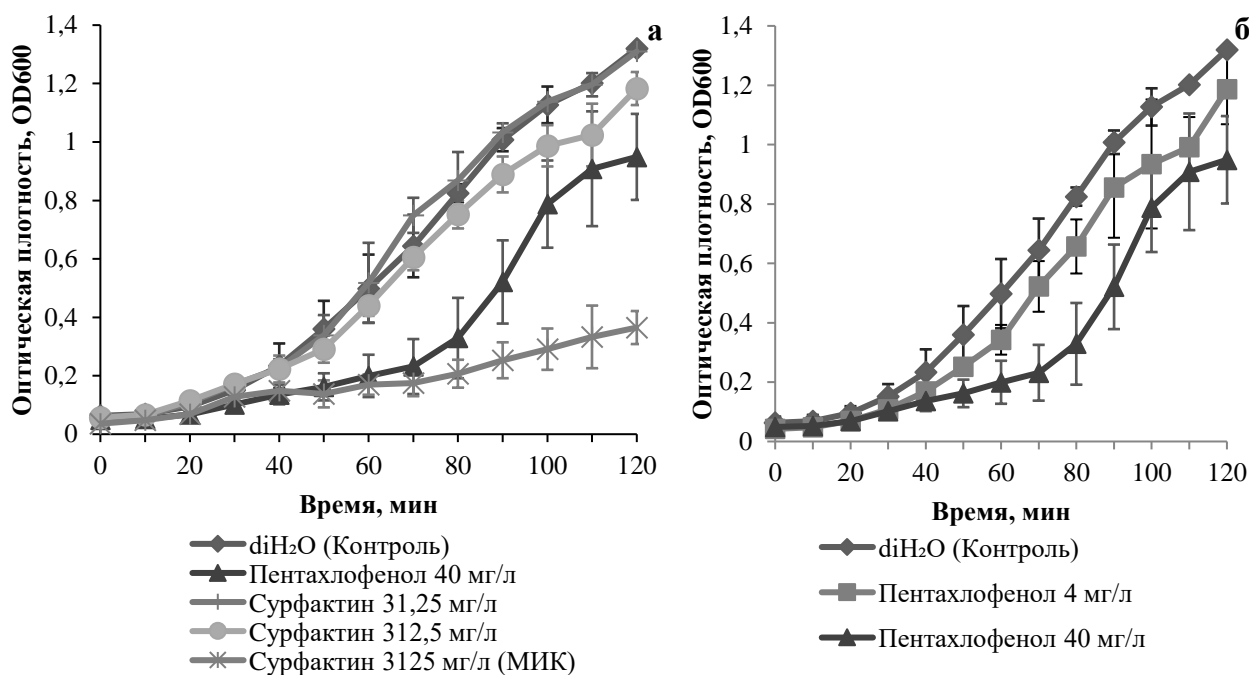


Рисунок 3 – Влияние сурфактина (а) и пентахлорфенола (б) на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pFabA), $p < 0,05$ (б).

Значимое повышение экспрессии гена *fabA* штамма *E. coli* MG1655 pFabA-lux относительно контроля, а следовательно, повреждение мембран, оказали концентрации сурфактина 312,5 и 3125 мг/л (рисунок 4).

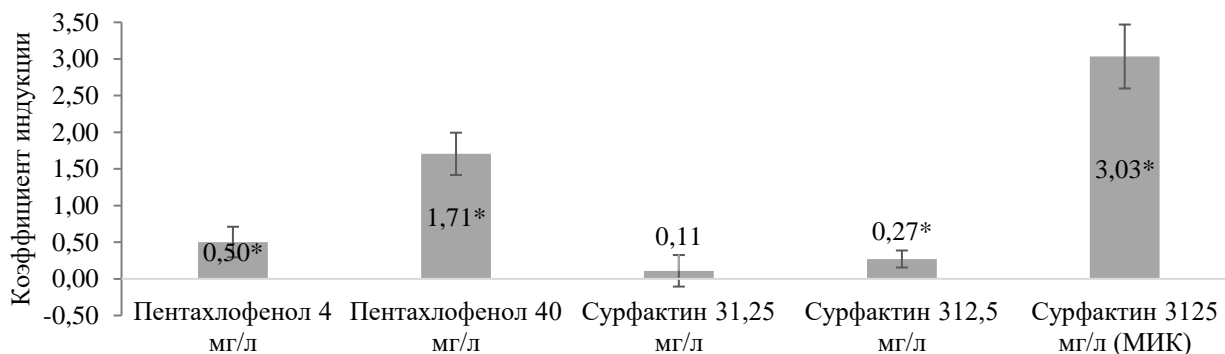


Рисунок 4 – Максимальная индукция экспрессии гена *fabA* штамма *E. coli* MG1655 (pFabA) концентрациями сурфактина и пентахлорфенола, $p < 0,05$.

Для оценки влияния увеличения концентраций сурфактина в опытах с генотоксическими веществами проводили тесты с использованием биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA). Концентрации сурфактина в этом опыте выше критической концентрации мицеллообразования (17 мг/л) (Sen, Swaminathan, 2005) и ниже МИК (3125 мг/л) (рисунок 4). Концентрация сурфактина 31,25 мг/л не оказала влияния на скорость роста в присутствии и отсутствии диоксидина $2,25 \cdot 10^{-5}$ М, концентрации 100 мг/л и выше статистически значимо снижают скорость роста (рис. 5, а, б).

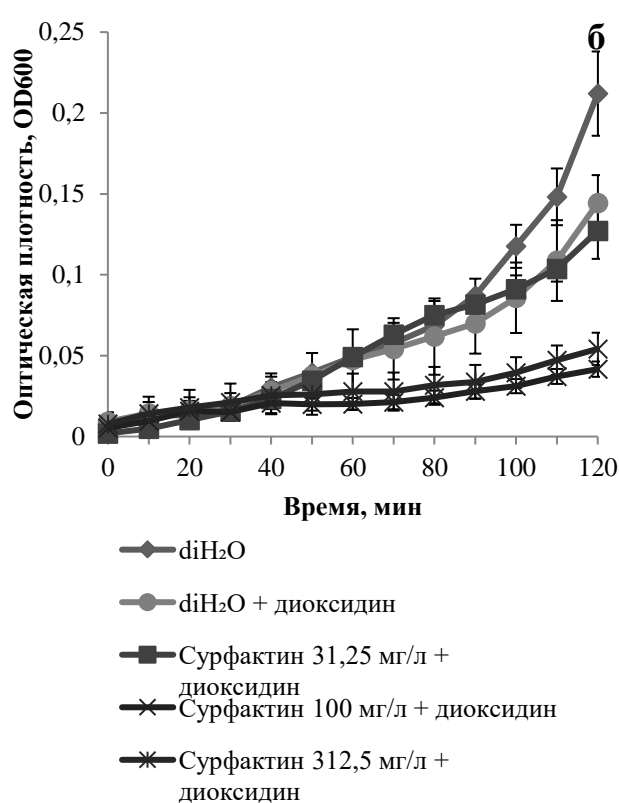
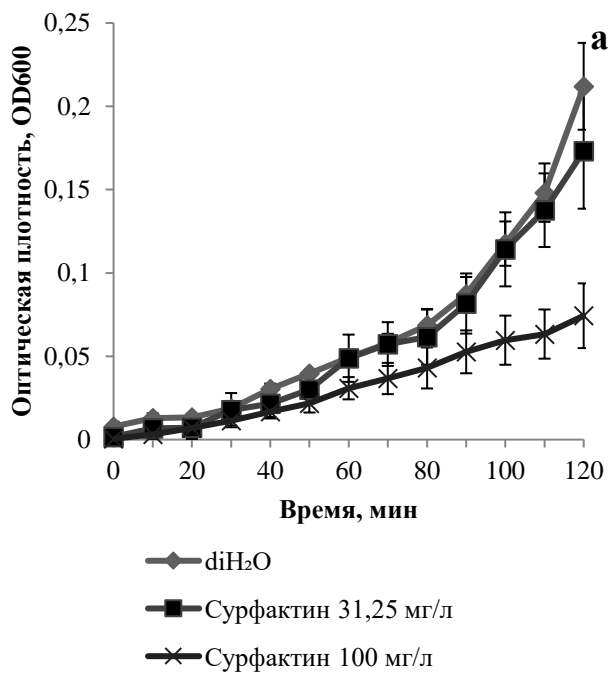


Рисунок 5 – Влияние сурфактина на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в отсутствии (а) и присутствии диоксилина (б).

Статистически значимое повышение экспрессии гена *recA* относительно диоксилина оказывали концентрации сурфактина 50 мг/л и 312,5 мг/л (с добавлением диоксилина). Необходимо отметить, что повышение концентрации сурфактина в пределах биосовместимых не оказывает протекторного действия, а усиливает генотоксическое действие диоксилина (рисунок 6).

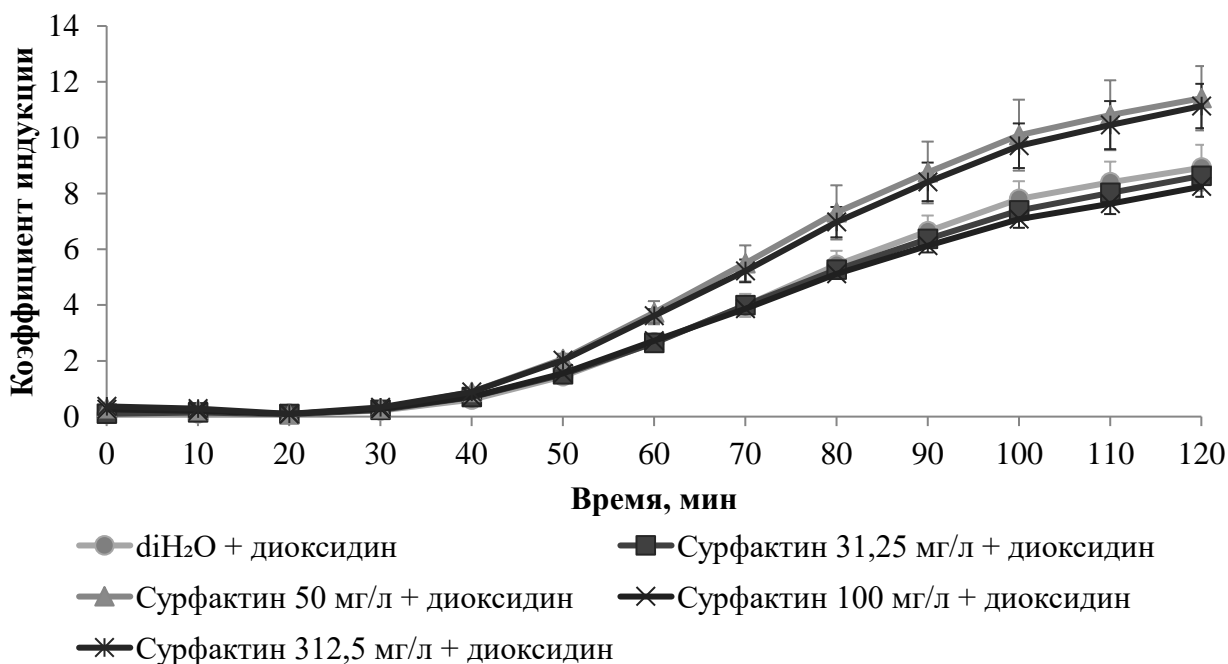


Рисунок 6 – Индукция экспрессии гена *recA* биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии сурфактина и диоксилина.

Исходя из полученных данных, для использования в качестве солубилизатора в опытах с токсическими веществами достаточно использовать концентрацию сурфактина 31,25 мг/л.

Влияние C_{60} на экспрессию генов АОС и SOS-ответа.

Для изучения биологического влияния фуллера C_{60} в условиях генотоксического стресса были использованы бактериальные биосенсоры с промоторами *pRecA*, *pColD*, окислительного стресса – с промоторами *pKatG* и *pSoxS*, в качестве индуктора биолюминесценции и факторов генотоксичности и окислительного стресса использовали диоксидин в концентрации $2,25 \times 10^{-5}$ М, перекись водорода 10^{-3} М и паракват 10^{-3} М.

Для предварительного скрининга протестировали концентрации C_{60} 0,01 – 10 мг/л в TWEEN 80 (2 %) и сурфактине 31,25 мг/л с использованием биосенсора *E. coli* MG1655 *pRecA*. Все протестированные концентрации C_{60} в TWEEN 80 (2 %) не оказали влияния на индукцию экспрессии гена *recA* относительно контроля растворителя. К тому же TWEEN 80 оказывал влияние на индукцию экспрессии *recA* относительно контроля (рисунок 7).

Концентрации C_{60} 0,01 – 10 мг/л в TWEEN 80 (2 %) не оказали снижения максимальной индукции экспрессии *katG* биосенсора *E. coli* MG1655 *pKatG* относительно контроля растворителя в присутствии перекиси водорода (рис. 7). C_{60} в концентрациях 0,1 – 10 мг/л в 2 % растворе TWEEN 80 оказывал слабое значимое снижение индукции экспрессии гена *katG* на 10 минуте опыта (рис. 8).

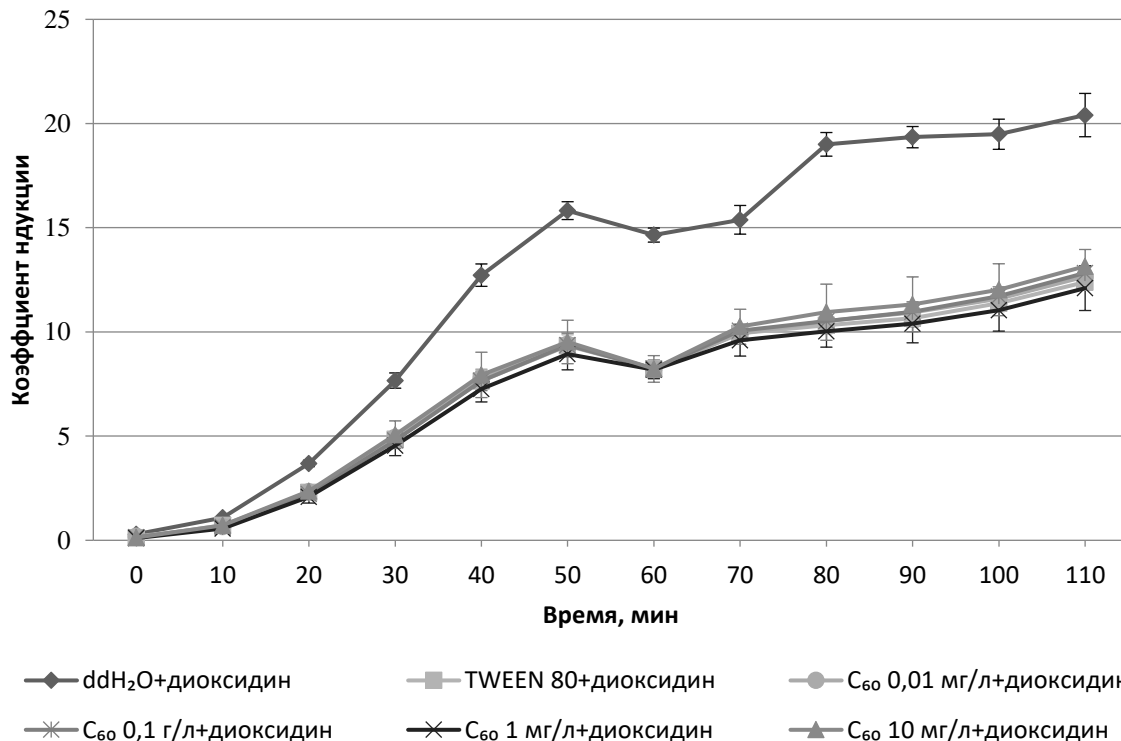


Рисунок 7 – Влияние фуллера C_{60} 0,01 – 10 мг/л в 2 % растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *recA* диоксидином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (*pRecA*), $p < 0,05$.

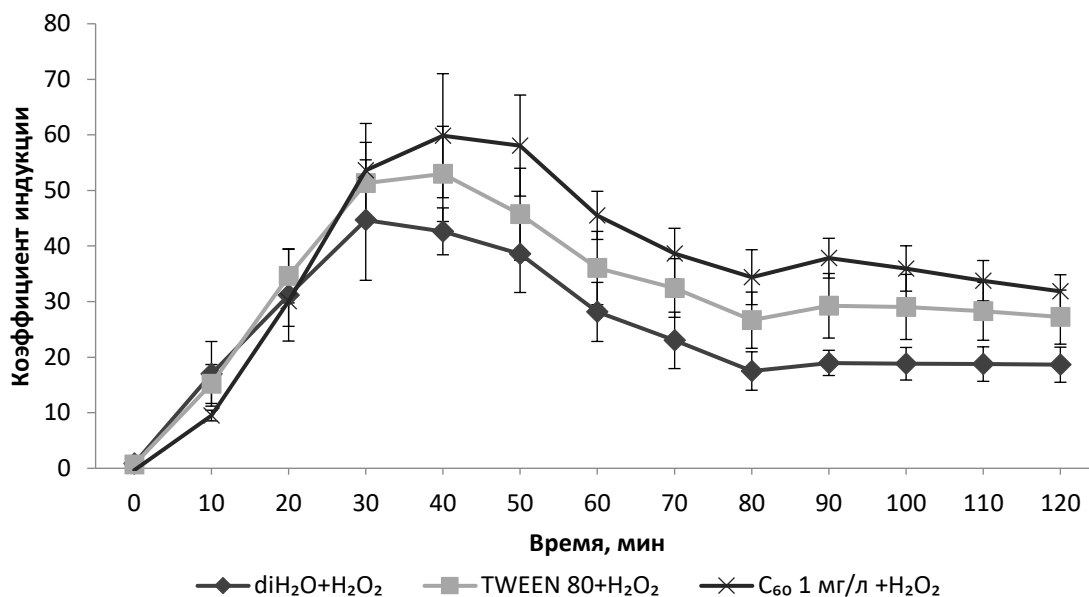


Рисунок 8 – Влияние C₆₀ 0,1 мг/л в 2 % TWEEN 80 на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

В водном растворе сурфактина концентрации C₆₀ 1 и 10 мг/л оказали статистически значимое снижение индукции экспрессии гена *recA* относительно контроля растворителя. Используемая для солюбилизации фуллерена концентрация сурфактина 31,25 мг/л не оказала статистически значимого влияния на индукцию биолюминесценции диоксидином относительно деионизированной воды (diH₂O), и влияние C₆₀ оценивались относительно данной концентрации (контроль растворителя).

Чтобы выяснить, имеется ли дозовая зависимость протекторного эффекта от концентрации фуллерена C₆₀ в сурфактине, были проведены биолюминесцентные тесты с концентрациями C₆₀ 1 и 10 мг/л и промежуточными с шагом 2,5 мг/л (рис. 8 а, б; 9 а, б).

Было установлено, что ДНК-протекторный эффект C₆₀ в диапазоне концентраций от 1 до 10 мг/л в сурфактине не имеет дозовой зависимости (рис. 10).

Таким образом, биологическая активность фуллерена в отношении штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) проявляется в растворе сурфактина в качестве солюбилизатора, но не в растворе TWEEN 80.

Затем провели тест с использованием штамма *E. coli* MG1655 (pColD), обладающим более высоким коэффициентом индукции (Котова, Манухов, Завильгельский, 2009). Концентрации C₆₀ 0,01 и 0,1 мг/л не оказали снижения индукции экспрессии гена *colD* по сравнению с сурфактином в присутствии диоксида. Для диапазона концентраций C₆₀ 1 – 10 мг/л наблюдалось снижение индукции экспрессии гена *colD* относительно солюбилизатора и контроля (diH₂O) (графики индукций с концентрациями C₆₀ 2,5 – 7,5 мг/л не приведены). Результаты представлены на рисунке 11.

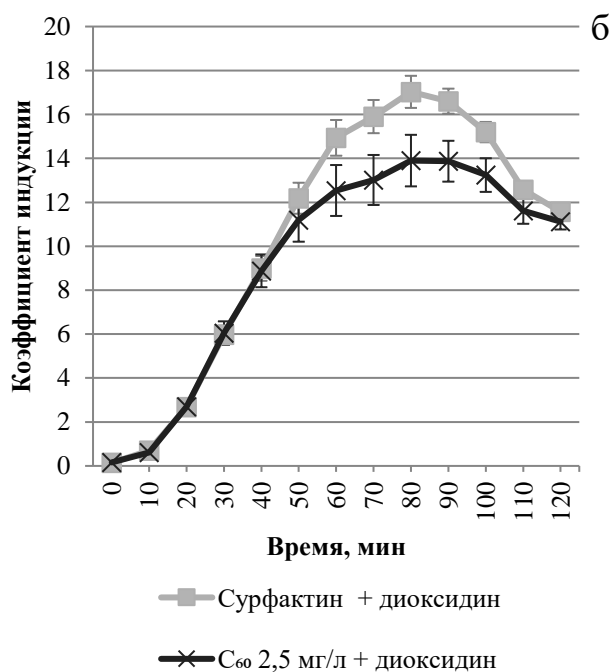
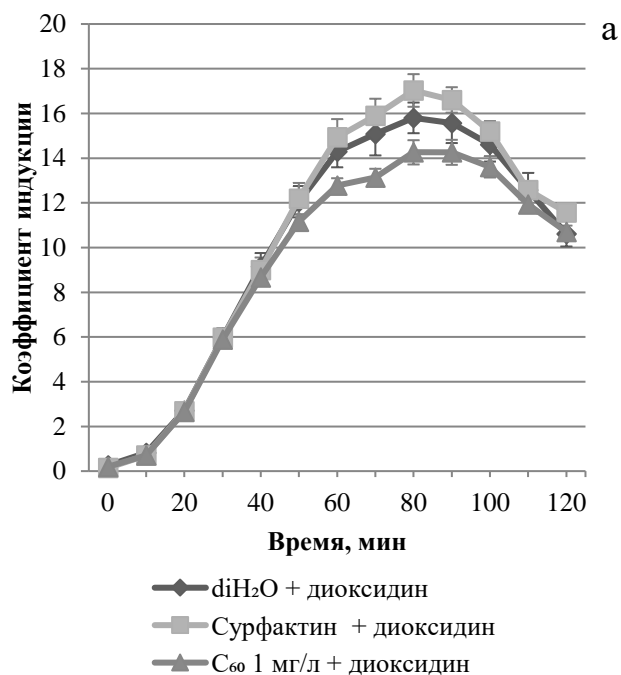


Рисунок 8 а, б – Снижение индукции экспрессии гена *recA* штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) фуллереном С₆₀ в концентрациях 1 (а) и С₆₀ 2,5 мг/л (б) в водном растворе сурфактина 31,25 мг/л в присутствии диоксидина (p<0,05).

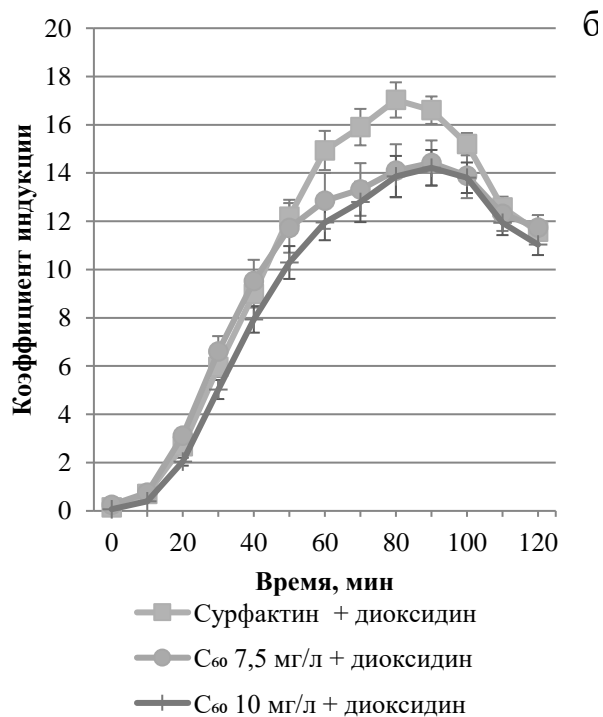
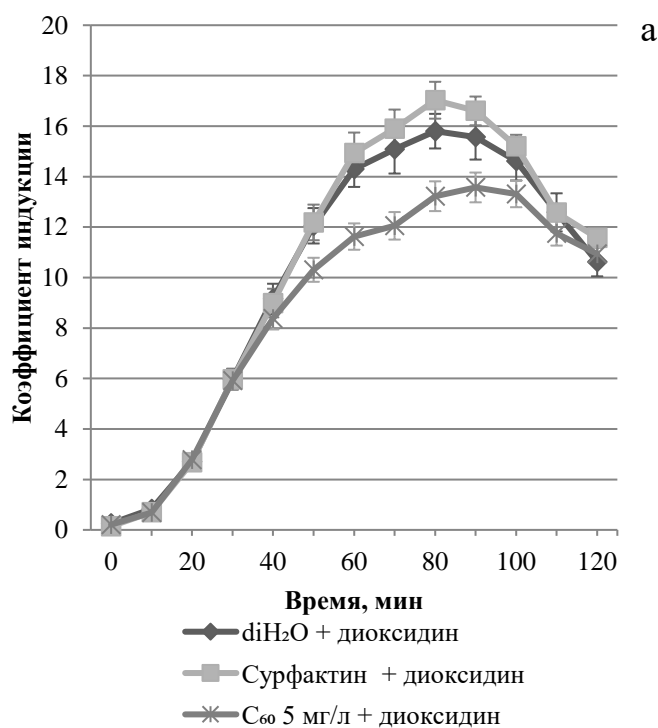


Рисунок 9 а, б – Снижение индукции экспрессии гена *recA* штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) фуллереном С₆₀ в концентрациях 5 (а) и С₆₀ 7,5 мг/л (б) в водном растворе сурфактина 31,25 мг/л в присутствии диоксидина (p<0,05).

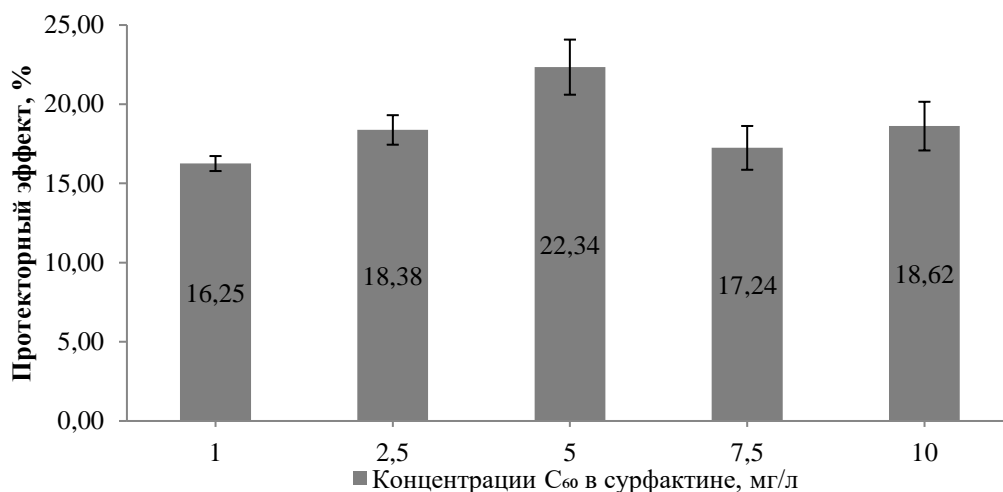


Рисунок 10 – ДНК-протекторный эффект C₆₀ в сурфактине во время максимальной индукции (80 мин) диоксицином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA), p<0.05.

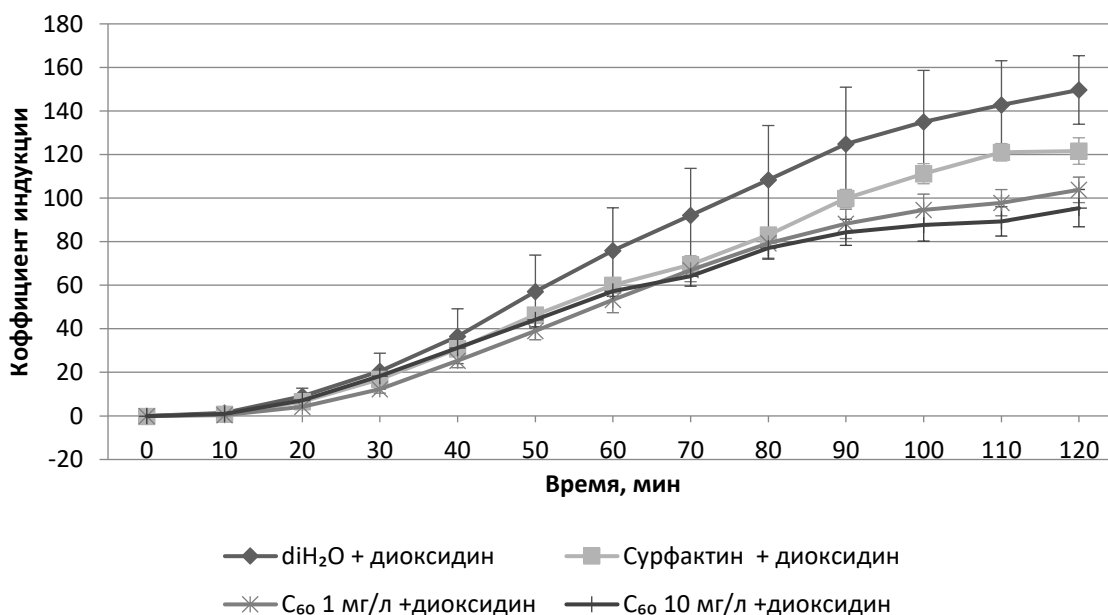


Рисунок 11 – Снижение индукции экспрессии гена *colD* штамма *E. coli* MG1655 (pColD) относительно контроля растворителя фуллереном C₆₀ в растворе сурфактина в присутствии диоксицина, p<0,05.

Концентрации C₆₀ 1 – 10 мг/л на биосенсоре *E. coli* MG1655 (pColD) оказали близкий по значениям к полученному на биосенсоре *E. coli* MG1655 (pRecA) ДНК-протекторный эффект (рисунки 12 и 13) в сурфактине, который также не имеет прямой дозовой зависимости.

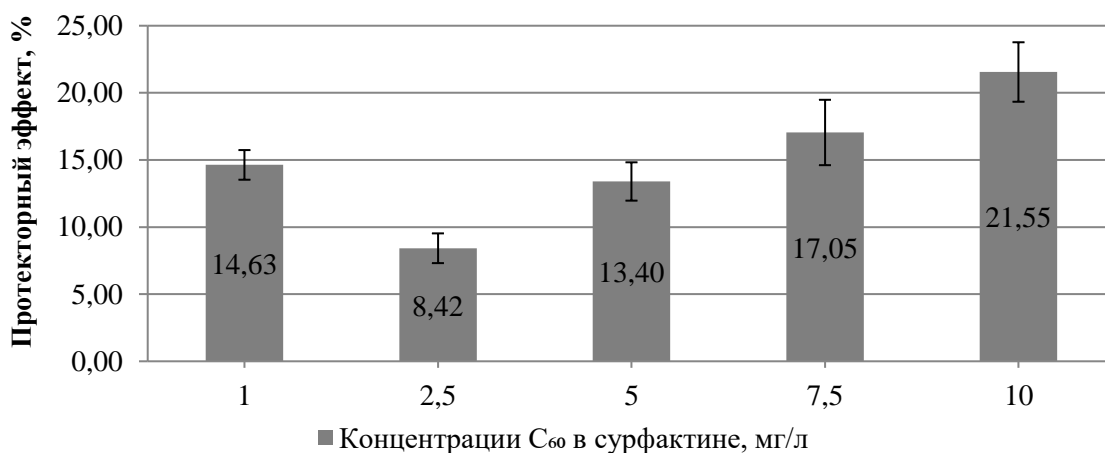


Рисунок 12 – ДНК-протекторный эффект C₆₀ в сурфактине во время максимальной индукции (120 мин) диоксидином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pColD), p<0.05.

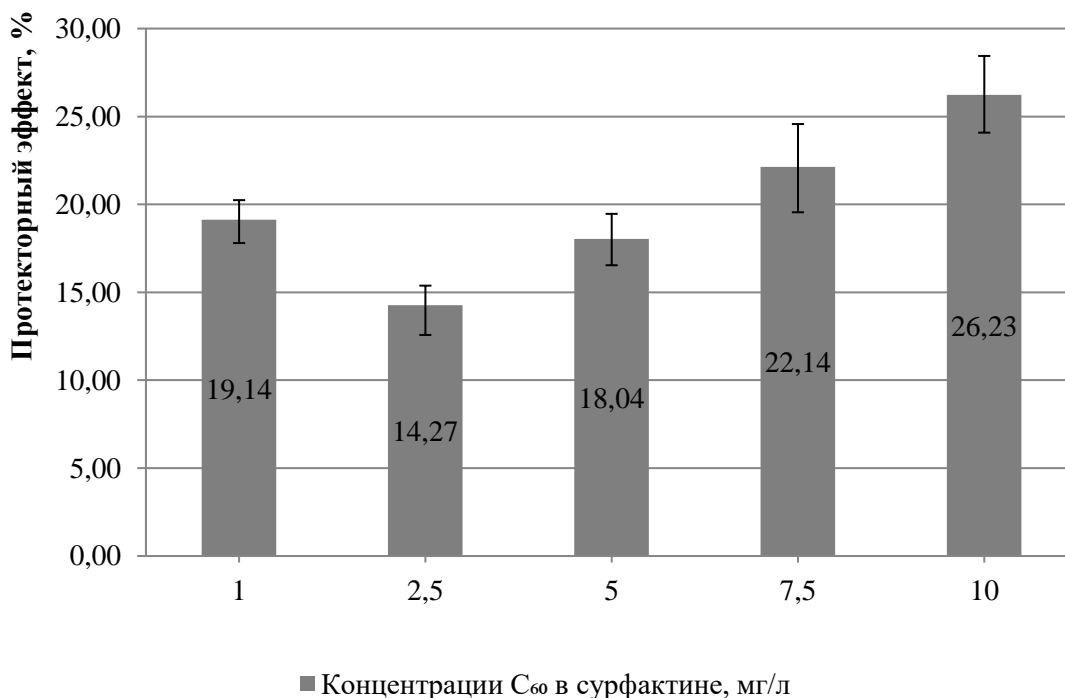


Рисунок 13– Максимальный ДНК-протекторный эффект C₆₀ в сурфактине. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pColD), p<0.05.

Т.о., ДНК-протекторный эффект C₆₀ на обоих штаммах-биосенсорах, детектирующих повреждения ДНК, проявляется только при использовании сурфактина как солилизатора.

Для проверки гипотезы об антиоксидантном механизме ДНК-протекторного действия фуллерена C₆₀ был поставлен билюминесцентный тест с использованием штаммов *E. coli* MG1655 (pKatG) и *E. coli* MG 1655 (pSoxS). Как видно из рисунков 14, 15 концентрации C₆₀ в сурфактине, оказавшие ДНК-протекторное действие, проявляют антиоксидантный эффект в отношении перекиси водорода.

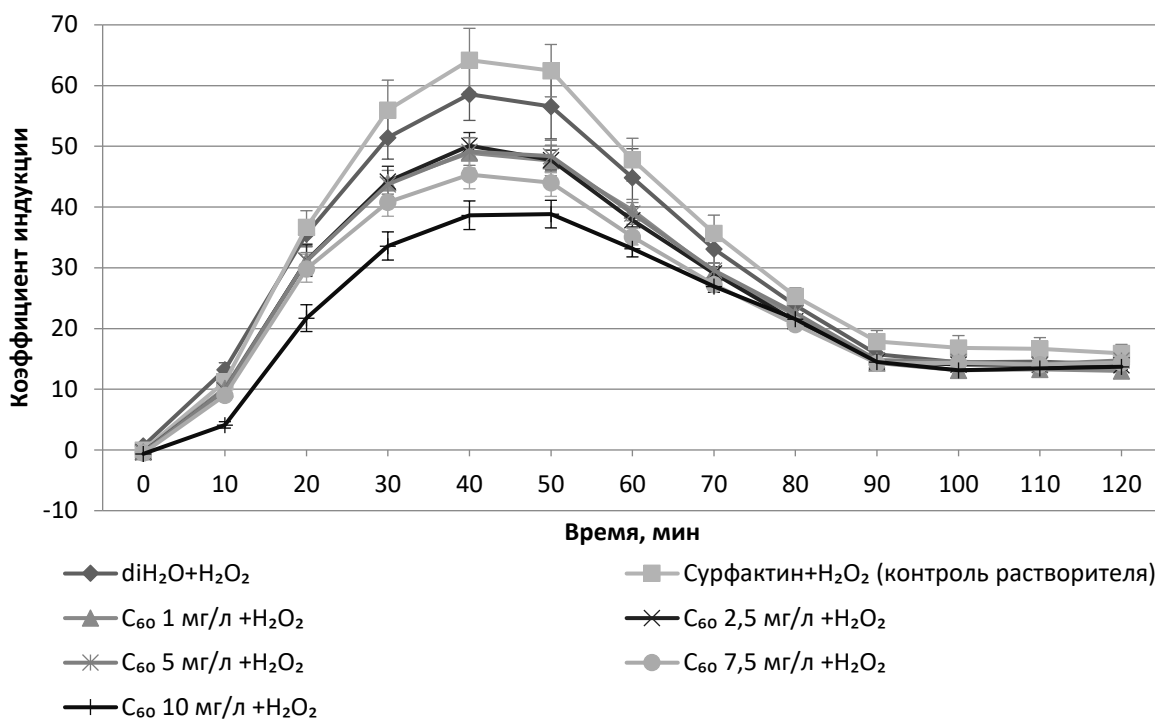


Рисунок 14 – Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) фуллереном C₆₀ в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода, p<0,05.

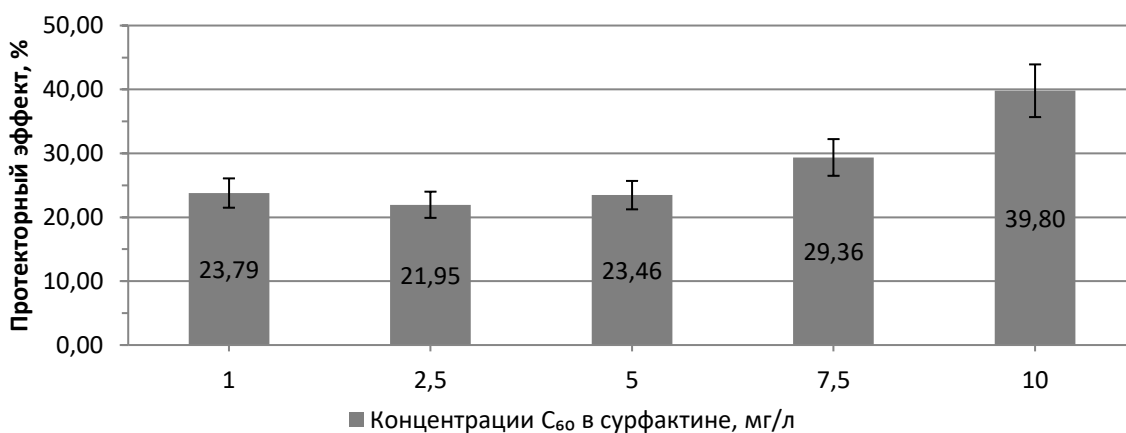


Рисунок 15 – Протекторный (антиоксидантный) эффект C₆₀ в сурфактине во время максимальной индукции (40 мин) перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0.05.

Коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллерена и оказываемым ими протекторным эффектом в отношении H₂O₂ во время максимальной индукции и концентрацией C₆₀ составил 0,884, что означает сильную прямую связь, т.е. антиоксидантный эффект C₆₀ является дозозависимым.

Биолюминесцентный тест с биосенсором супероксид-анион-радикала, *E. coli* MG1655 (pSoxS), показал отсутствие влияния сурфактина на индукцию стандартным индуктором (параquat 10⁻³ M) до 110 мин (рисунок 16). C₆₀ в концентрации 1 мг/л в не оказал влияния на индукцию относительно сурфактина. C₆₀ в концентрациях 2,5 – 10

мг/л оказал снижение индукции относительно контроля растворителя и дозозависимый протекторный эффект (графики индукций с концентрациями C_{60} 2,5 – 7,5 мг/л не приведены) (рисунки 16 и 17). C_{60} в концентрации 10 мг/л также оказал снижение индукции относительно контроля (деионизированная вода с паракватом).

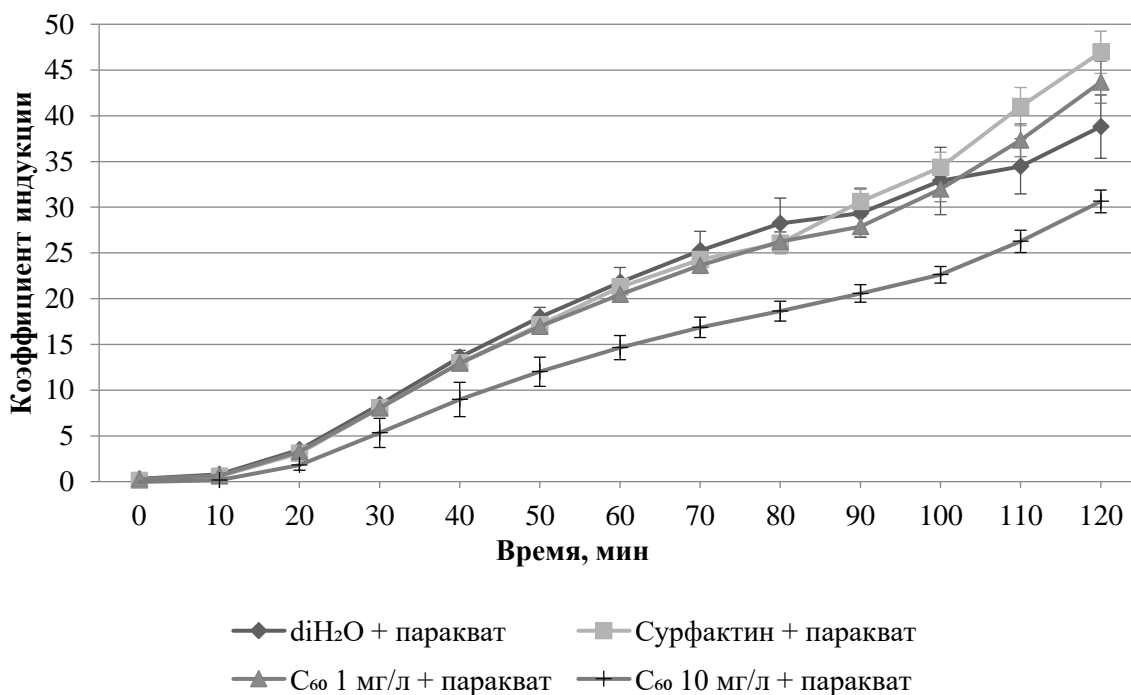


Рисунок 16. Снижение индукции экспрессии гена *soxS* биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pSoxS) относительно контроля (diH₂O) и контроля растворителя фуллереном C₆₀ в растворе сурфактина в присутствии параквата, $p < 0,05$.

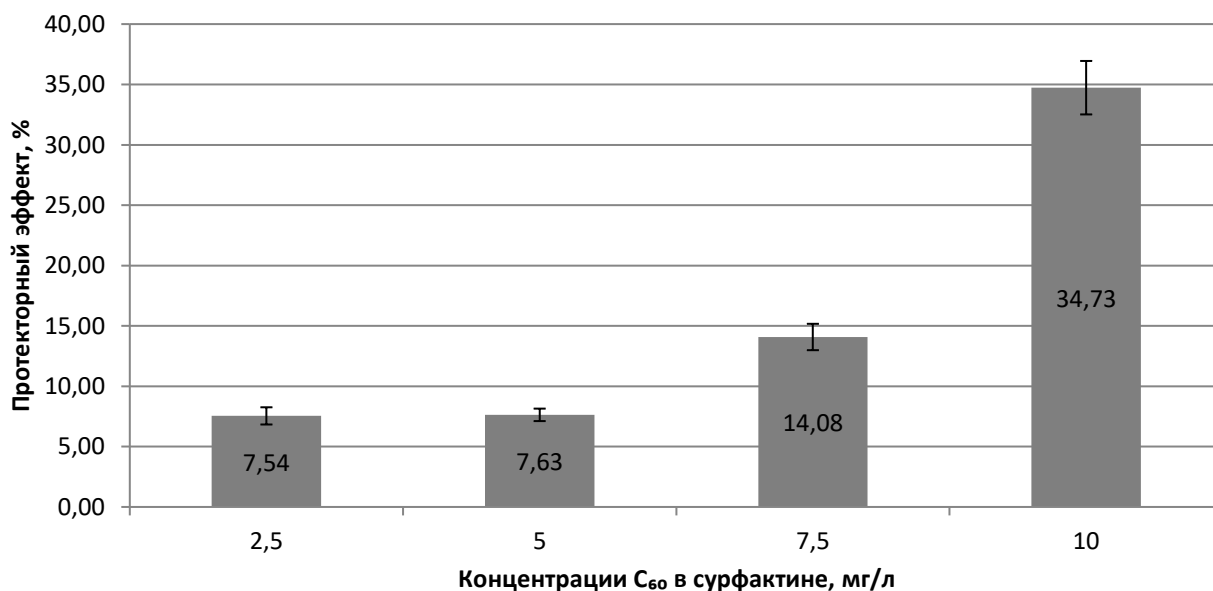


Рисунок 17 – Протекторный (антиоксидантный) эффект C₆₀ в сурфактине во время максимальной индукции (120 мин) паракватом биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pSoxS), $p < 0,05$.

Коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллерена и оказываемым ими протекторным эффектом в отношении параквата во время

максимальной индукции составил 0,884, что означает сильную прямую связь, т.е. антиоксидантный эффект C_{60} в отношении супероксид анион-радикала является дозозависимым. Т.о., концентрации, которые оказывают ДНК-протекторное действие, демонстрируют и антиоксидантный эффект.

Влияние фуллеренола на экспрессию гена *katG*

Для изучения влияния фуллеренола $C_{60}(OH)_{36}$ в условиях окислительного стресса был использован бактериальный биосенсор с промотором *pKatG*. Растворы фуллеренола 1 – 10 мг/л в воде и 2,5 – 10 мг/л в водном растворе сурфактина оказали антиоксидантный эффект в отношении перекиси водорода, что проявляется в статистически значимом снижении индукции экспрессии гена *katG* относительно контроля в присутствии перекиси водорода (рис. 18).

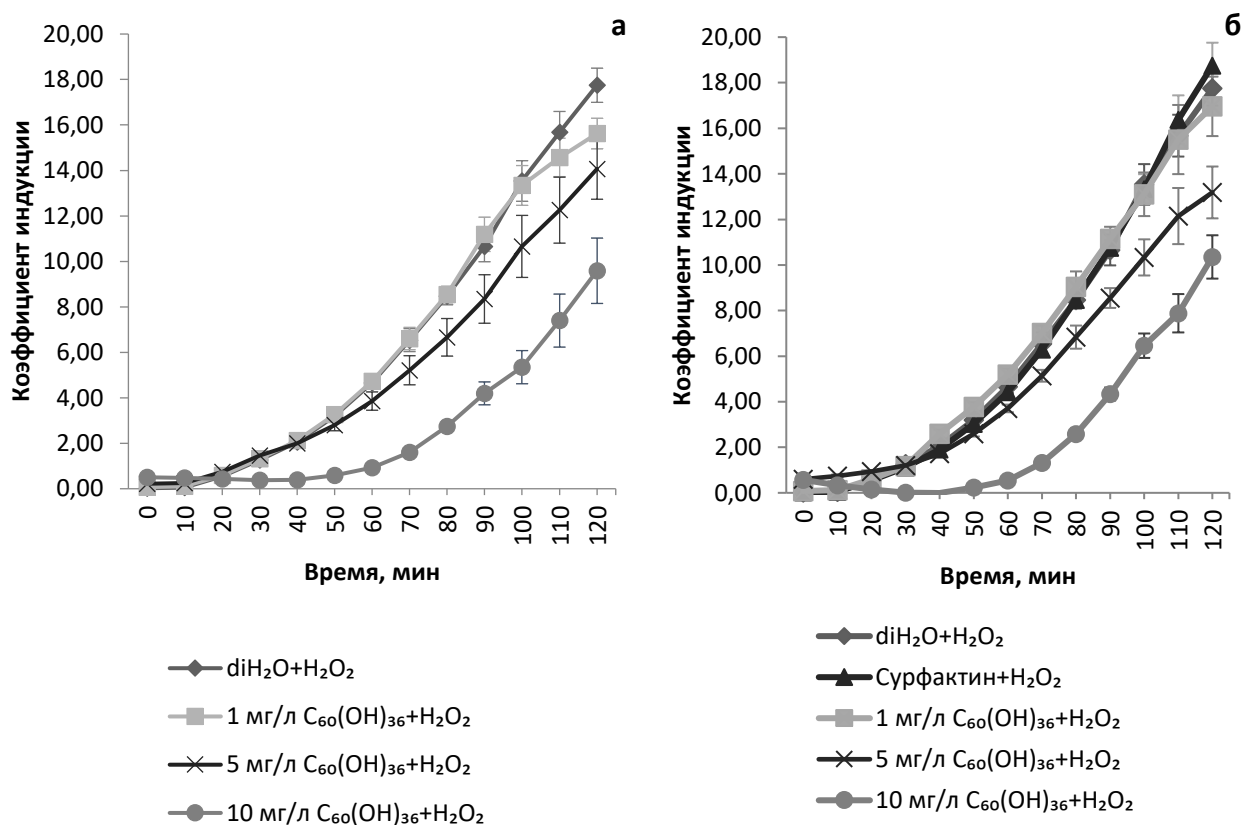


Рисунок 18 – Влияние растворов фуллеренола $C_{60}(OH)_{36}$ в воде (а) и растворе сурфактина (б) на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (*pKatG*), $p < 0.05$.

Было установлено, что антиоксидантный эффект $C_{60}(OH)_{36}$ в диапазоне концентраций от 1 до 10 мг/л в растворе сурфактина имеет дозозависимую зависимость, как можно видеть на рисунке 19.

Кoeffициент корреляции между значениями концентраций фуллеренола в воде и оказываемым ими протекторным эффектом в отношении перекиси водорода во время максимальной индукции составил 0,980; кoeffициент корреляции между значениями концентраций фуллеренола в водном растворе сурфактина и оказываемым ими протекторным эффектом в отношении перекиси водорода во время максимальной

индукции и концентрацией фуллерена составил 0,970, что означает сильную прямую связь, т.е. антиоксидантный эффект $C_{60}(OH)_{36}$ является дозозависимым.

Фуллеренол в отсутствии и в присутствии сурфактина оказал близкие по значениям антиоксидантный эффект, что и фуллерен в сурфактине, таким образом, сурфактин играет роль солиubilизатора и мембранотропного вещества, и не увеличивает антиоксидантное действие фуллерена.

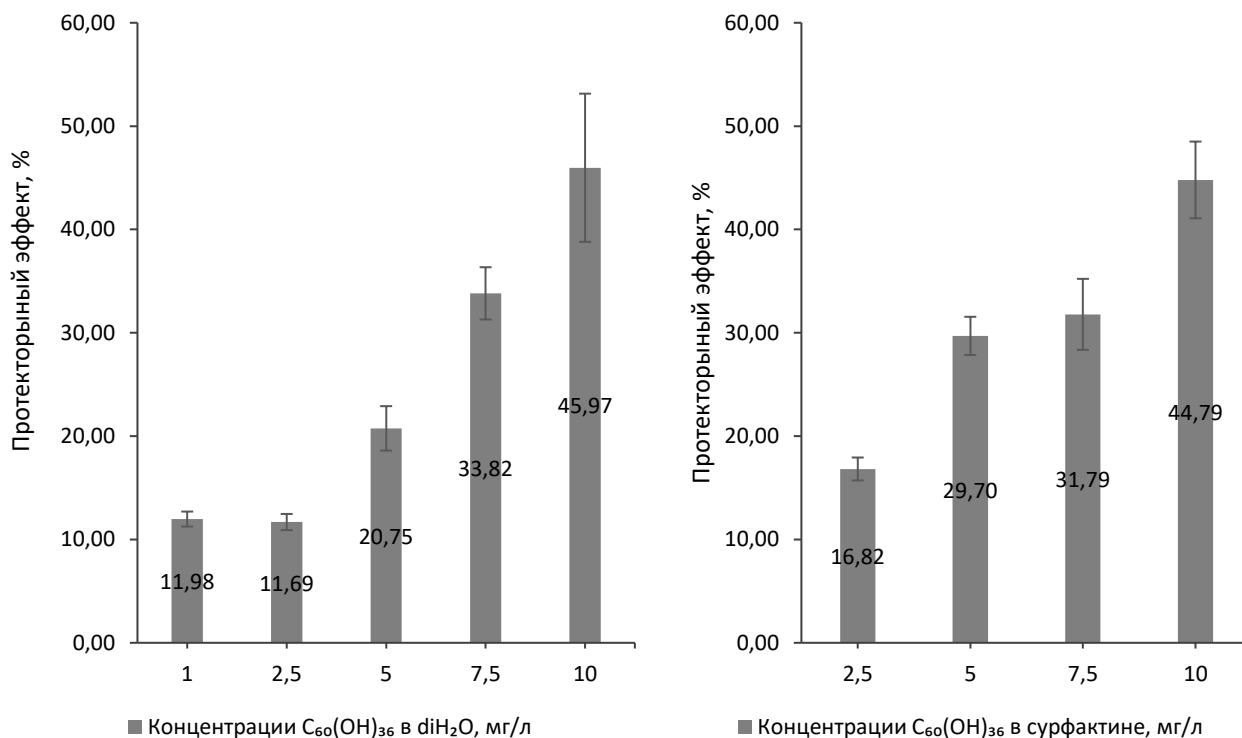


Рисунок 19 – Протекторный (антиоксидантный) эффект $C_{60}(OH)_{36}$ в воде (а) и растворе сурфактина (б) в отношении перекиси водорода во время максимальной индукции, $p < 0,05$. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655(pKatG).

Антимутагенный эффект C_{60} *in vivo*.

Концентрация C_{60} 10 мг/л в сурфактине статистически значимо снижает частоту как спонтанного, так и индуцированного диоксином мутагенеза устойчивости *E. coli* к рифампицину. Сурфактин (контроль растворителя) не оказывает статистически значимого влияния на частоту мутаций (таблица 1).

Таким образом, C_{60} снижает уровень индуцированного мутагенеза на 60,23 % относительно контроля растворителя, на 45,2 % относительно индуктора; уровень спонтанного мутагенеза на 59,77 % относительно контроля растворителя, на 44,19 % относительно контроля.

Из представленных данных можно видеть, что фуллерен C_{60} обладает антимутагенным и ДНК-протекторным действием (максимальная ДНК-протекторная активность – 26,23 %), одним из механизмов которого является антиоксидантная активность фуллерена (максимальная активность 40,81 % против перекиси водорода, 35,94 % против супероксид-анион-радикала).

Таблица 1 – Влияние фуллерена C₆₀ в сурфактине на выживаемость и частоту мутагенеза *E. coli* MG1655.

	Рост на среде без рифампицина			Рост на среде с рифампицином		
	Разведение	Среднее число КОЕ	Выживаемость, %	Разведение	Среднее число КОЕ	Частота мутаций
Контроль	10 ⁻⁵	171,67±8,50	100,00	10 ⁻¹	48,33±3,06	(2,82±0,56)×10 ⁻⁵
Сурфактин	10 ⁻⁵	106,67±7,57	62,14	10 ⁻¹	41,67±2,52	(3,91±0,90)×10 ⁻⁵
C ₆₀ в сурфактине	10 ⁻⁵	116,67±5,86	67,96	10 ⁻¹	18,33±2,89	(1,57±0,65)×10 ⁻⁵
Индуктор	10 ⁻⁵	51,67±5,51	30,10	10 ⁻¹	60,00±3,61	(11,61±3,53)×10 ⁻⁵
Сурфактин + индуктор	10 ⁻⁵	16,67±1,53	9,71	10 ⁻¹	26,67±2,08	(16,00±4,79)×10 ⁻⁵
C ₆₀ в сурфактине + индуктор	10 ⁻⁵	18,33±0,58	10,68	10 ⁻¹	11,67±0,58	(6,36±0,93)×10 ⁻⁵

Подтверждением этого является дозовая зависимость протекторного эффекта C₆₀ в отношении одной из АФК – перекиси водорода. Механизмом протекторного эффекта в отношении перекиси водорода может быть присоединение гидроксильного иона, компонента диссоциации перекиси водорода (Afreen et al., 2017; Emelyantsev et al., 2019; Li et al., 2023); в отношении супероксидного радикала может быть присоединение продукта частичного восстановления супероксида, гидроксильного радикала, по двойным связям фуллерена C₆₀. Показано, что C₆₀ способен присоединять большое количество радикалов на молекулу (J. et al., 1991), включая трихлорметилпероксильный радикал CCl₃OO•, защищая печень крыс от продуктов метаболизма четырёххлористого углерода (Gharbi и др., 2005). Также известно, что фуллерены и их производные, фуллеренолы, также способны действовать как мощный поглотитель радикалов (Gharbi et al., 2005) и снижать уровень АФК *in vivo* при действии индукторов окислительного стресса, например Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) (Cong et al., 2015).

Согласно (Arndt и др., 1999), размер агрегатов C₆₀ и концентрация раствора могут зависеть друг от друга. В исследовании (Lyon et al., 2006) было обнаружено, что размер агрегатов влияет на биологическую активность. Это может быть объяснением отклонений в дозовой зависимости протекторного эффекта фуллерена при разбавлении растворов на порядок и выше. Исходя из результатов измерения распределения размеров агрегатов фуллерена C₆₀, средний размер агрегатов в сурфактине (302 нм) в 43 раза больше, чем в TWEEN 80 (7 нм), соответственно, логично было ожидать слабый или же отсутствие биологического эффекта – однако C₆₀, солюбилизированный в сурфактине оказывает ДНК-протекторный эффект, а в TWEEN 80 - нет. Следовательно, можно предположить, что активизация C₆₀ в сурфактине связана не столько с солюбилизацией, сколько с повышением биодоступности за счет повышения проницаемости мембран. Эта гипотеза позволяет объяснить, почему в эксперименте

Vaati и соавт. (Vaati et al., 2012), в котором фуллерен C₆₀ в оливковом масле продлевал жизнь крыс. Возможно, сурфактин или другие биосурфактанты, выделяемые кишечной микробиотой, приводили к увеличению проницаемости мембран и всасыванию фуллерена в желудочно-кишечном тракте. Сурфактин продуцируют многие пробиотические бактерии, такие, как *B. subtilis* (Lee и др., 2012; Mohammadipour и др., 2009), *Bacillus clausii* (Liu et al., 2020), а также представители рода *Lactobacillus* (Nelson и др., 2020) – компоненты нормальной микробиоты кишечника млекопитающих (Urdaci, Bressollier, Pinchuk, 2004) и крыс в частности (Klimina et al., 2019).

Отсутствие влияния C₆₀ в оливковом масле на продолжительность жизни и здоровье мышей в исследовании (Grohn et al., 2021), возможно, связано с различиями в микробиоте и меньшим уровнем производства сурфактина (либо других биосурфактантов) по сравнению с кишечной микрофлорой крыс в эксперименте (Vaati et al., 2012).

Подобранная для использования в качестве солюбилизатора для фуллерена C₆₀ концентрация сурфактина ниже минимальной концентрации, при которой сурфактин проявляет гемолитическую активность (50 мг/л) (Santos, Silveira, Pereira, 2018). Сурфактин в данной концентрации не токсичен, что открывает перспективу использования суспензий фуллерена в сурфактине на животных.

ВЫВОДЫ

1. Установлена биосовместимая концентрация сурфактина для использования в качестве солюбилизатора для фуллерена C₆₀. Эта концентрация (31,25 мг/л) не оказывает влияния на кривую роста *E. coli*, не вызывает повреждения мембран и не влияет на экспрессию стресс-индуцируемых оперонов.

2. C₆₀ в растворе биосовместимой концентрации сурфактина снижает индуцированную окислительным стрессом экспрессию генов SOS-ответа у *E. coli*, таким образом, демонстрируя протекторные свойства. Растворы с другим солюбилизатором такого эффекта не оказали.

3. Концентрации C₆₀ оказавшие ДНК-протекторное действие, и фуллеренол C₆₀(ОН)₃₆ проявляют антиоксидантный эффект. Они вызывают снижение индукции экспрессии генов антиоксидантных ферментов (каталазы и супероксиддисмутазы) веществами-индукторами окислительного стресса. Таким образом, одним из механизмов ДНК-протекторного действия C₆₀ является антиоксидантный.

4. C₆₀ в растворе биосовместимой концентрации сурфактина снижает частоту как спонтанного, так и индуцированного диоксидином мутагенеза у *E. coli*. При этом сурфактин сам по себе не влияет на частоту спонтанного и индуцированного мутагенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе определена концентрация сурфактина для использования в качестве солюбилизатора для фуллерена C₆₀ и для наибольшего увеличения проницаемости биомембран для протекторов. Показано, что C₆₀ в

сурфактине вызывает статистически значимое ДНК-протекторное и антимуtagenное действие в отношении диоксида у *Escherichia coli*, тогда как аналогичный раствор в TWEEN-80 не демонстрирует ДНК-протекторных свойств. Таким образом, ДНК-протекторное действие C₆₀ проявляется только в присутствии сурфактина.

Благодаря способности фуллерена C₆₀ проникать через биологические мембраны, быть переносчиком протонов и взаимодействовать со свободными радикалами, обуславливающей его протекторный эффект на *E. coli*, он может рассматриваться также и как митохондриально-направленный антиоксидант и ДНК-протектор, поскольку имеется эволюционно-обусловленное сходство между строением мембран прокариот и митохондрий.

Фуллерен C₆₀, таким образом, может стать основой для нового типа лекарств. Фуллерены можно использовать как антиоксиданты, геропротекторы, для доставки лекарств и в фотодинамической терапии, но следует учитывать вышеописанные особенности водных растворов, влияние растворителя, размера агрегатов и интенсивного освещения, особенно УФ-спектра.

Полученные данные также говорят о потенциале использования фуллерена в комплексе с сурфактин-продуцирующими пробиотиками.

Статьи, опубликованные в журналах, входящих в базы данных международных индексов научного цитирования Scopus, Web of Science, RSCI:

1. Biological Effects of C₆₀ Fullerene Revealed with Bacterial Biosensor—Toxic or Rather Antioxidant? / S. Emelyantsev, E. Prazdnova, V. Chistyakov, I. Alperovich // Biosensors. – 2019. – Vol. 9, №. 2. – P. 81. – DOI 10.3390/bios9020081. (**Категория 1**)
2. Antioxidant, DNA-protective, and SOS inhibitory activities of Enterococcus durans metabolites / M. P. Kulikov, V. N. Statsenko, E. V. Prazdnova, S. A. Emelyantsev // Gene Reports. – 2022. – Vol. 27. – P. 101544. – DOI 10.1016/j.genrep.2022.101544. (**Категория 3**)
3. Emelyantsev, S. Solubilizer of bacterial origin surfactin increases the biological activity of C₆₀ fullerene / S. Emelyantsev, E. Prazdnova, V. Chistyakov // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2025. – Vol. 72, № 2. – P. 311-319. – DOI 10.1002/bab.2665 (**Категория 1**).

Публикации в сборниках трудов конференций

4. Емельянцева, С. А. Использование генномодифицированных бактерий для оценки биологических свойств углеродных наночастиц / С. А. Емельянцева, Е. В. Празднова // Генетика - фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции : материалы VIII научно-практической конференции с международным участием, Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 г. – Ростов-на-Дону; Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2019. – С. 120-121.
5. Models for Studying the Effects of Probiotics Based on *Caenorhabditis Elegans* / A. Kuznetsova, S. Emelyantsev, D. Rudoy [et al.] // XIV International Scientific Conference “INTERAGROMASH 2021”, [February 24–26, 2021, Rostov-on-Don] : Precision Agriculture and Agricultural Machinery Industry, Vol. 1. / A. Beskopylny, M. Shamtsyan

(Eds). – Springer, 2022. – P. 102-110. – (Lecture Notes in Networks and Systems, Vol. 246).
– DOI 10.1007/978-3-030-81619-3_11.

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

АО – антиоксиданты

АОС – антиоксидантная система

АФК – активные формы кислорода

Ацил-КоА – Ацетилкофермент А

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

НМ – наноматериалы

ОС - окислительный стресс

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПХФ - пентахлорфенол

УЗ – ультразвук

УФ – ультрафиолетовый спектр излучения

C₆₀ – бакминстерфуллерен C₆₀

DFT –теория функционала плотности (Density Functional Theory)