

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)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Празднова Евгения Валерьевна

Ростов-на-Дону
2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Фуллерены и их растворы	12
1.1.1 Открытие фуллерена C ₆₀	12
1.1.2 Свойства C ₆₀	14
1.1.3 Концентрационная зависимость коэффициента диффузии фуллеренов в растворах	15
1.1.4 Исследования токсичности C ₆₀	16
1.1.5 Фототоксичность C ₆₀	18
1.1.6 Антиоксидантная активность C ₆₀	19
1.1.7 Антиоксидантная активность производных C ₆₀	23
1.1.8. Фуллеренолы	24
1.1.9 Взаимодействие C ₆₀ с ДНК	26
1.1.10 Методы модификации фуллеренов	29
1.2 Мембранотропные соединения	31
1.2.1 Сурфактин	31
1.3 Антиоксиданты	34
1.3.1 Классификация антиоксидантов	34
1.3.2. Наноантиоксиданты	38
1.4 Паракват – модельный индуктор окислительного стресса	39
1.5 Митохондрии, дыхательная цепь митохондрий и её продукты	40
1.6 <i>Escherichia coli</i> как модель митохондрий для изучения эффектов наночастиц	42
1.7 Биолюминесцентный тест	45
1.8 Спектрофотометрическое определение мутности культур бактерий	48

1.9	Определение частоты мутаций	49
1.9.1	Мутагены и антимутагены	49
1.9.2	Мутагенез у бактерий	51
1.9.3	Связь мутаций и RecA-опосредованного SOS-ответа	51
1.9.4	Механизмы устойчивости к рифампицину	52
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	54
2.1	Приготовление водных растворов C ₆₀	54
2.2	Синтез фуллеренола	54
2.3	Расчёт концентрации веществ через оптическую плотность, определённую при помощи спектрофотометрии	55
2.4	Измерение размеров наночастиц фуллерена C ₆₀ методом динамического рассеяния света	56
2.5	Оценка экспрессии с помощью биолюминесцентного теста	57
2.6	Измерение мутности культур бактерий с помощью спектрофотометра	60
2.7	Определение антимутагенной активности	60
2.8	Статистическая обработка данных	61
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
3.1	Изучение распределения размеров наночастиц фуллерена C ₆₀ методом динамического рассеяния света	63
3.2.	Синтез и характеристика фуллеренола	64
3.3	Определение концентраций сурфактина для использования в качестве ПАВ в биолюминесцентных тестах	67
3.4	Влияние C ₆₀ на экспрессию генов АОС и SOS-ответа	76
3.5.	Влияние фуллеренола на экспрессию гена <i>katG</i>	97
3.6	Антимутагенный эффект C ₆₀ <i>in vivo</i>	110
4	ОБСУЖДЕНИЕ	111
4.1.	Биологические эффекты фуллерена C ₆₀ и их механизмы	111
4.2.	Образование производных фуллерена в клетке	112

4.3. Образование агрегатов фуллеренов в растворе	114
4.4. Влияние сурфактина на вышеописанные процессы	116
4.5. Биодоступность и проникновение через мембраны	117
4.6. Влияние фуллерена на стабильность ДНК, экспрессию генов SOS- ответа и мутагенез	119
4.6.1. Прямое связывание с ДНК	120
4.6.2. Влияние антиоксидантов на подавление экспрессии стресс- индуцируемых генов <i>E. coli</i>	122
4.6.3. Снижение частоты спонтанного и индуцированного мутагенеза <i>E. coli</i>	124
ВЫВОДЫ	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	131
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	132

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

АО – антиоксиданты

АОС – антиоксидантная система

АФК – активные формы кислорода

Ацил-КоА – Ацетилкофермент А

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

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)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Среди множества новых наноматериалов особый интерес вызывает фуллерен C_{60} — 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 C_{60} 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 C_{60} в 2 % растворе TWEEN 80 проявляет антиоксидантную активность (Emelyantsev et al., 2019), а C_{60} 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 C_{60} может расширяться метаболитами кишечного микробиома, повышающими проницаемость клеточных мембран для наночастиц, в частности, сурфактином, за счёт повышения биодоступности C_{60} . Отсутствие геропротекторной активности C_{60} 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 C_{60} в медицине необходимо решить задачи получения его стабильного водного раствора (подбор солюбилизатора) и увеличения биодоступности. Это

требует исследования биологического действия C_{60} 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 был выявлен ряд 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 ограниченное количество повреждений ДНК и демонстрировать видозависимые результаты (Lan et al., 2014).

Открытие и производство большого количества искусственных НМ и их производных, а также разнообразие применяемых для них растворителей стимулирует разработку 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 *E. coli*, и влияния солубилизатора 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*.

В работе были использованы следующие генноинженерные штаммы: *E. coli* MG1655 (pKatG), *E. coli* MG1655 (pRecA), *E. coli* MG1655 (pColD), *E. coli* MG1655 (pSoxS), *E. coli* MG1655 (pFabA).

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 диоксидина 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 *Escherichia coli* под влиянием фуллерена C_{60} и фуллеренола $C_{60}(OH)_{36}$ в растворе сурфактина. С использованием генноинженерных 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 биосовместимый растворитель бактериального происхождения (сурфактин) для фуллерена C_{60} , ранее не применявшийся для растворения углеродных наночастиц.

Показано, что C_{60} в растворе сурфактина оказывает не только антиоксидантное, но и ДНК-протекторное и антимуtagenное действие. Т.о., при солубилизации 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} и его производные могут 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 солубилизатора для фуллерена C_{60} и для наибольшего увеличения проницаемости мембран для протекторов, не снижающих скорости роста *E. coli*.

Благодаря способности фуллерена C_{60} проникать через биологические мембраны, быть переносчиком протонов (Chistyakov, 2014) и взаимодействовать со свободными радикалами, обуславливающим 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 C₆₀ и его полигидроксированного производного, что указывает на их антиоксидантные свойства.

2) Солюбилизатор бактериального происхождения сурфактин увеличивает биодоступность фуллерена C₆₀ в водных растворах.

3) Растворы C₆₀ 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 статей в журналах, рецензируемых ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 151 странице 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).

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность за ценные рекомендации, помощь, и поддержку своему научному руководителю д.б.н., заведующей молодёжной лабораторией «Молекулярная генетика микробных консорциумов» Праздновой Е.В. Автор выражает глубокую признательность за содействие в работе Чистякову В.А., Белику Т.В., Чурилову М.Н., Амирджанову Ф.Ф., а также всем соавторам публикаций.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фуллерены и их растворы

1.1.1 Открытие фуллерена C₆₀

В 1985 г было впервые сообщено о фуллерене C₆₀ – новой молекуле, образованной в результате лазерной иррадиации графита (Kroto et al, 1985). Эта наночастица, состоящая из 60 атомов углерода, оказалась удивительно стабильной, со структурой, похожей на усечённый икосаэдр - полигон с 60-тью вершинами и 32-мя гранями, 12 из которых пятигранники и 20 шестигранники. Стабильность структуры C₆₀ была теоретически предсказана уже в 1970-х как в России (Бочвар, Гальперн, 1973), так и за рубежом (Osawa, 1970). Из всех аллотропных модификаций углерода, только фуллерены характеризуются молекулами, строго определенными по молекулярному весу. Молекула C₆₀ имеет все валентности, соответствующие двум одинарным связям и одной двойной, имеет много резонансных структур и выступает как ароматическая (Kroto et al., 1985). Бакминстерфуллерен C₆₀ – одна из самых тяжёлых молекул, для которых наблюдались в экспериментах волновые свойства (Arndt et al., 1999).

1.1.2 Свойства C₆₀

Фуллерены – единственная из аллотропных модификаций углерода, обладающая значительной растворимостью в некоторых органических растворителях (Безмельницын, Елецкий, Окунь, 1998). Это свойство объясняется их симметричной структурой, не имеющей острых выступов, что обеспечивает слабое взаимодействие молекул C₆₀ в агрегате и их растворение в органических веществах, содержащих в своей структуре ароматическое кольцо, близкое по форме 20 из 32 граней фуллерена (Безмельницын, Елецкий, Окунь, 1998). Фуллерен C₆₀ является неполярной и незаряженной молекулой (Foroutan, Boudaghi, Alibalazadeh, 2023).

В растворах фуллерены проявляют тенденцию к образованию кластеров из нескольких молекул. C₆₀ не растворяется в полярных растворителях, слабо растворим в ациклических углеводородах. В водных растворах снижение рН до 4

приводит к увеличению размеров агрегатов C_{60} (Ma, Bouchard, 2009). Наибольшая растворимость получена в ароматических растворителях и их производных (бензол, толуол, хлорбензол, дихлорбензол, пиридин), а также в сероуглероде (Schur, Zaginaichenko, Veziroglu, 2015). Фуллерены лучше растворяются в растворителях, удельная величина энтальпии испарения которых близка к соответствующему значению для фуллеренов ($\approx 100 \text{ кал}\cdot\text{см}^{-3}$) (Ruoff et al, 1993).

Важной и интересной особенностью поведения фуллерена C_{60} в растворах является нелинейная температурная зависимость их растворимости, впервые обнаруженная в работе Руофа и др. (Ruoff et al, 1993), в частности в гексане, толуоле и CS_2 в диапазоне температур от 200 до 400 К. При растворении C_{60} растворимость экспоненциально увеличивалась от 200 до 280-310 К в зависимости от растворителя, а затем резко снижалась, причём двукратное снижение растворимости (по сравнению с максимальным) при 340 К наблюдалось уже для всех растворителей). Эти данные были дополнены и подтверждены температурной зависимостью растворимости C_{60} в ксилоле, полученной в работе (Zhou et al., 1997).

Несмотря на различия до двух порядков в абсолютных значениях растворимости C_{60} в разных растворителях, относительный ход температурных зависимостей практически совпадает во всех случаях. Немонотонный характер температурной зависимости, которая достигает максимума при температуре 280 К, в частности, для CS_2 и значительно снижается при дальнейшем повышении температуры, наблюдается только для фуллерена C_{60} и не свойственен другим фуллеренам. Данное значимое различие в температурных зависимостях схожих по структуре молекул может говорить о возможности существования нескольких различных конкурирующих механизмов сольбилизации фуллеренов (Безмельницын, Елецкий, Окунь, 1998).

Склонность к образованию кластеров фуллеренами в растворах отражается на параметрах, определяющих их свойства при растворении. На рисунке 1 представлена концентрационная зависимость функции распределения кластеров фуллеренов в CS_2 по размерам. Из неё следует, что доля кластеров размером менее 5 нм резко возрастает с уменьшением концентрации от концентрации насыщения

($C_{\text{нас}}$). Наибольшая доля кластеров менее 5 нм наблюдается для концентрации, равной 1/100 от концентрации насыщения, для CS_2 равной 5,16 мг/мл (Sivaraman et al., 1992).

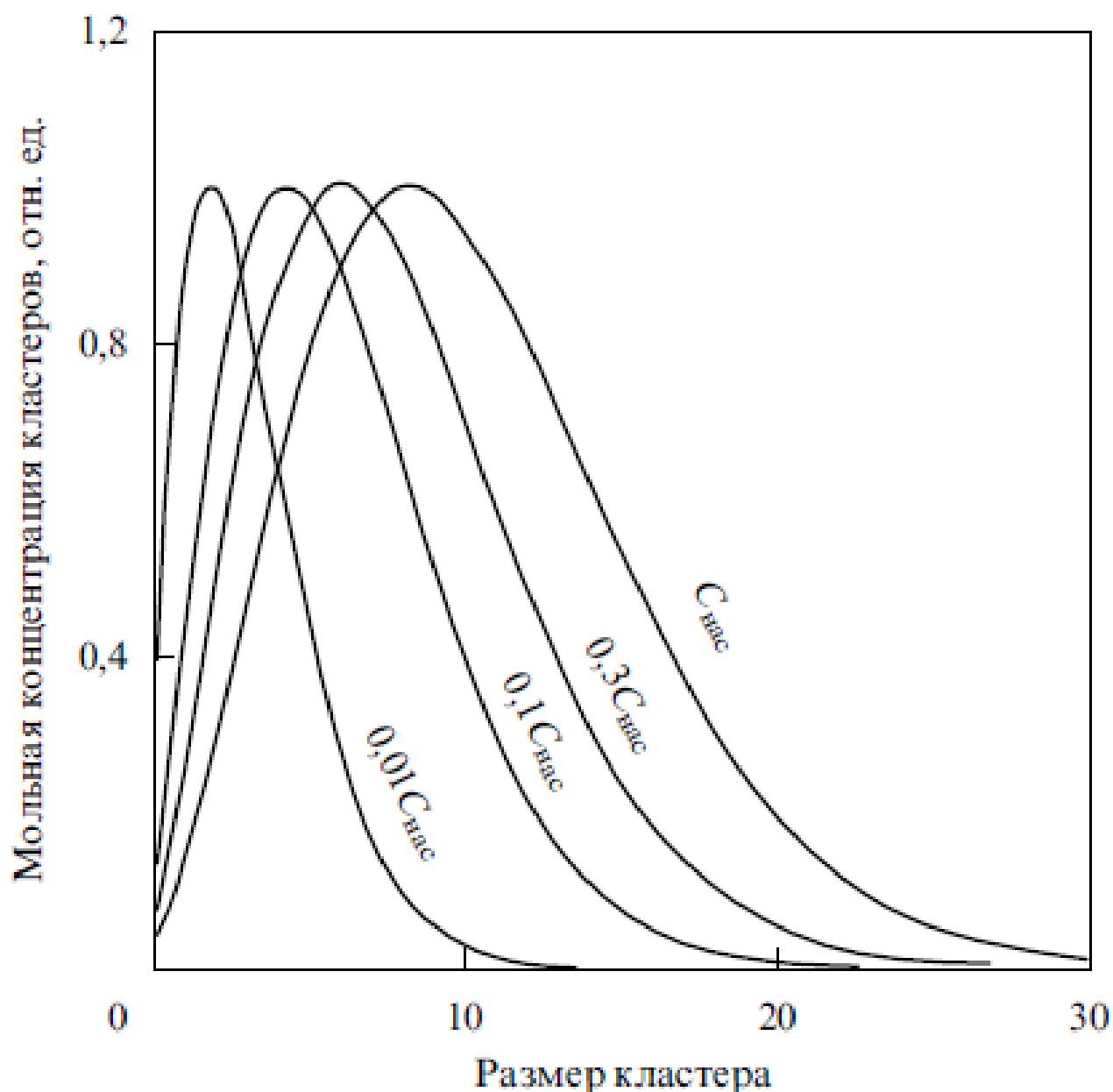


Рисунок 1 – Концентрационная зависимость функции распределения кластеров по размерам в растворе фуллерена C_{60} , вычисленная в рамках капельной модели кластера при $T = 350 \text{ K}$ ($87 \text{ }^\circ\text{C}$) (Безмельницын, Елецкий, Окунь, 1998).

Из этого можно сделать вывод, что и при использовании других растворителей для уменьшения размеров кластеров и расхода наноматериалов

нужно готовить растворы с концентрацией фуллерена C_{60} не менее чем на порядок меньше концентрации насыщения в данных растворителях.

1.1.3 Концентрационная зависимость коэффициента диффузии фуллеренов в растворах

В растворах фуллерены образуют кластеры, средний размер которых зависит от концентрации, соответственно, коэффициент диффузии фуллеренов в растворе также зависит от их концентрации (Безмельницын В. Н. и др., 1996). При концентрации на несколько порядков меньше концентрации насыщения $C_{нас}$ кластеры почти не образуются и коэффициент диффузии определяется соответствующим значением для единичной молекулы фуллерена. С ростом концентрации фуллеренов в растворе растет средний размер кластера, а следовательно, падает коэффициент диффузии фуллерена.

Результаты расчёта коэффициента диффузии C_{60} в толуоле от его концентрации представлены на рисунке 2.

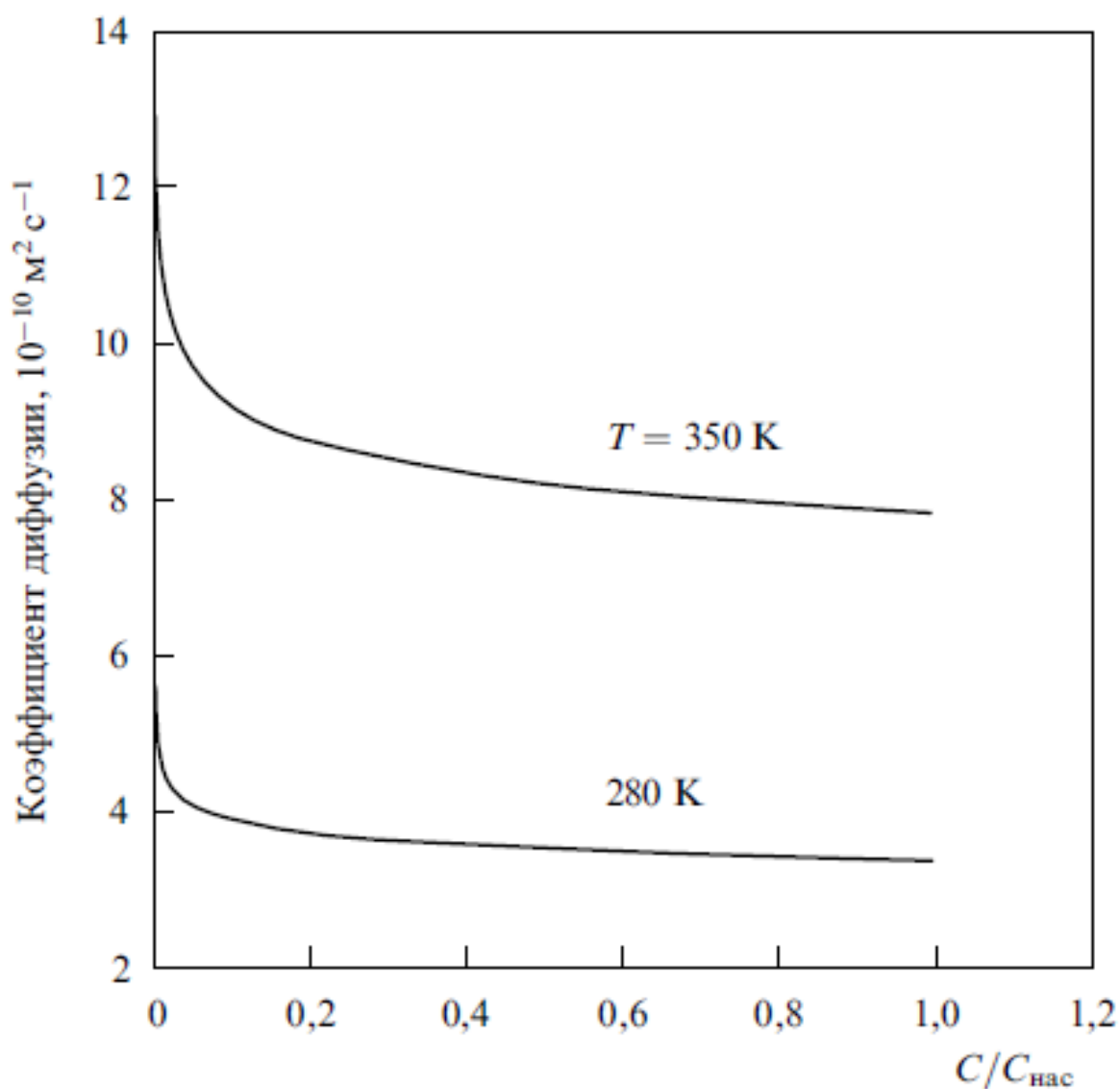


Рисунок 2 – Зависимость коэффициента диффузии фуллерена C_{60} в толуоле от концентрации (Безмельницын, Елецкий, Окунь, 1998).

График иллюстрирует, что образование кластеров в растворе, близком к насыщению, ведёт к снижению коэффициента диффузии приблизительно на 30 % по сравнению со значением для отдельной молекулы.

1.1.4 Исследования токсичности C_{60}

Поводом для научных споров и обсуждений стал вопрос о токсичности C_{60} . Во многих статьях авторы пытались обосновать тезис о токсичности самого немодифицированного фуллерена C_{60} (Christie M. Sayes et al., 2004; J. D. Fortner et al., 2005; Oberdörster, 2004). Но результаты, полученные их авторами, противоречат

полученным ранее данным (Tsuchiya и др., 1996) об отсутствии у C_{60} ярко выраженной токсичности. Однако, сам автор работы (Oberdörster, 2004) затем признал методические недостатки своих экспериментов, связанные с наличием в образцах достаточно большой концентрации тетрагидрофурана (Oberdörster и др., 2006).

Согласно (Sayes и др., 2005), водорастворимый nano- C_{60} , полученный растворением в тетрагидрофуране (THF) с последующим выпариванием, является цитотоксичным для человеческих дермальных фибробластов, клеток карциномы печени (HepG2) и нейрональных астроцитов за счёт опосредованного генерацией АФК перекисного окисления липидов, при этом не оказывая влияния на концентрацию ДНК и активность митохондрий.

В статье (Baun et al, 2008) подчёркивается, что в оценке опасности наноматериалов представляет важность не только собственная токсичность наноматериалов, но и взаимодействия с другими соединениями и свойства наночастиц в водных растворах.

C_{60} в кристаллическом виде (фуллереновые плёнки 10, 20, 30 мкг/см²) при отсутствии интенсивного освещения не проявлял токсического действия на клеточные культуры линии MA-104 (линия почечного эпителия зеленой мартышки), но при облучении галогеновой лампой проявлял мощное фототоксическое действие (Пиотровский и др., 2007). Водорастворимый комплекс C_{60} /ПВП был не только не токсичен, но и ослаблял токсическое действие самого ПВП (Tsuchiya и др., 1996). Авторы делают вывод, что проявление токсического действия фуллерена зависит от способа его растворения, применявшихся для этого ПАВ и/или модификаторов, степени диспергирования в растворе, условий биологического эксперимента (прооксидантные свойства при УФ-освещении, антиоксидантные без его применения).

1.1.5 Фототоксичность C₆₀

При поглощении видимого света и УФ-излучения молекула фуллерена переходит в синглетное возбужденное состояние, затем в долгоживущее триплетное возбужденное состояние (Franskevych et al., 2017; Markovic, Trajkovic, 2008). Триплетный фуллерен может реагировать непосредственно с кислородом путем передачи энергии с образованием высоко реакционноспособного синглетного кислорода, либо восстанавливаться биологическими восстановителями, такими как НАДН, глутатион или цистеин, с образованием анион-радикала фуллерена с последующим переносом электрона к кислороду, что приводит к образованию супероксидного радикала, который дисмутирует в пероксид водорода, из которого может быть образован гидроксильный радикал. Последняя реакция в меньшей степени характерна для немодифицированного C₆₀ и в большей – для водорастворимого производного C₆₀(ОН)₂₄ (Zhao et al., 2008).

Фуллерены являются очень эффективными генераторами синглетного кислорода с квантовым выходом ^sO₂, близким к единице. Они сильно поглощают свет в ультрафиолетовой и умеренно в видимой области спектра (Yamakoshi et al., 2003), что позволяет использовать их в фотодинамической терапии (Орлова и др., 2012).

В работе (Sirotkin et al., 2006) делается вывод, что в зависимости от приготовления водорастворимых форм меняется механизм вирулицидного действия фуллерена, предварительно подвергнутого УФ-облучению. C₆₀ в PVP действовал на вирус гриппа A/PR/8/34 (H1N1) преимущественно как мембранотропный агент на липидные компоненты капсида, а водный коллоидный раствор как фотосенсибилизатор, генерируя синглетный кислород.

Производные фуллерена C₆₀ и фуллеренола C₆₀(ОН)₈ с фолиевой кислотой были предложены для использования в качестве сенсора для ранней диагностики онкологии, т.к. имеют тенденцию проникать в клетки с высокой экспрессией фолатных рецепторов и высокий квантовый выход флуоресценции при облучении (Afreen et al., 2017; Ma et al., 2021).

1.1.6 Антиоксидантная активность C₆₀

Важным химическим свойством молекулы C₆₀ является наличие 30 двойных связей, что обеспечивает реакционную способность по отношению к свободным радикалам. В частности, 1 молекула C₆₀ может присоединять до 34 фотохимически образованных метильных радикалов (Krusic et al., 1991).

Биологическая активность C₆₀ может быть реализована благодаря: мембранотропности, позволяющей проникать в живые клетки; электронодефицитности, обеспечивающая возможность взаимодействовать со свободными радикалами (Пиотровский и др., 2007), 30 двойным углерод-углеродным связям на 1 молекулу (Krusic et al., 1991); нековалентное комплексообразование с веществами с ароматической группой в структуре (Skamrova et al., 2014).

В 2013 году коллективом исследователей (Chistyakov et al., 2013) была выдвинута гипотеза о способности фуллерена быть переносчиком протонов. Авторы полагали, что фуллерен способен поглощать протоны и приобретать положительный заряд, что позволяет ему проникать в митохондрии. Таким образом, образование супероксид-анион-радикала уменьшается за счет мягкого разобщения дыхания и фосфорилирования – этот механизм показан для ряда других антиоксидантов (Korshunov, Skulachev, Starkov, 1997). Теоретическое моделирование методом DFT показало, что таковой механизм имеет право на существование (Chistyakov et al., 2014).

На первом шаге было смоделировано взаимодействие одного протона и фуллерена. Протон был помещен за пределами C₆₀ над одним из пятиугольников, на расстоянии около 1 Å (10⁻¹⁰ м) от плоскости пентагона. В результате протон проник в фуллерен и оказался внутри на расстоянии около 1.1 Å от ближайшего атома углерода (рис. 3(a)). Далее, больше протонов были добавлены в эту систему. Первые два протона оказались на максимально возможном расстоянии друг от друга. Все остальные были равномерно распределены вокруг фуллерена. Во всех случаях протоны были “поглощены” фуллереном, до того, как седьмой протон был

добавлен в систему – он оттолкнулся от фуллерена. Следовательно, максимальное количество протонов внутри фуллерена равняется шести (рис. 3(б)).

DFT-симуляция позволила авторам предположить следующий механизм возможного переноса фуллереном C_{60} протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Молекулы C_{60} проникают в пространство между внутренней и наружной мембраной митохондрий, где избыток протонов формируется путем их электрохимического градиента. В этом компартменте фуллерены загружаются протонами и приобретают положительный заряд, распределённый по их поверхности. Такие “заряженные” частицы могут быть перемещены через внутреннюю мембрану митохондрии из-за разности потенциалов генерируемой внутренней оболочкой, используя электрохимический механизм, подробно описанный Скулачевым с соавторами (Skulachev V. et al., 2011). В этом случае трансмембранный потенциал понижается, что, в свою очередь, значительно снижает интенсивность производства супероксид анион-радикала.

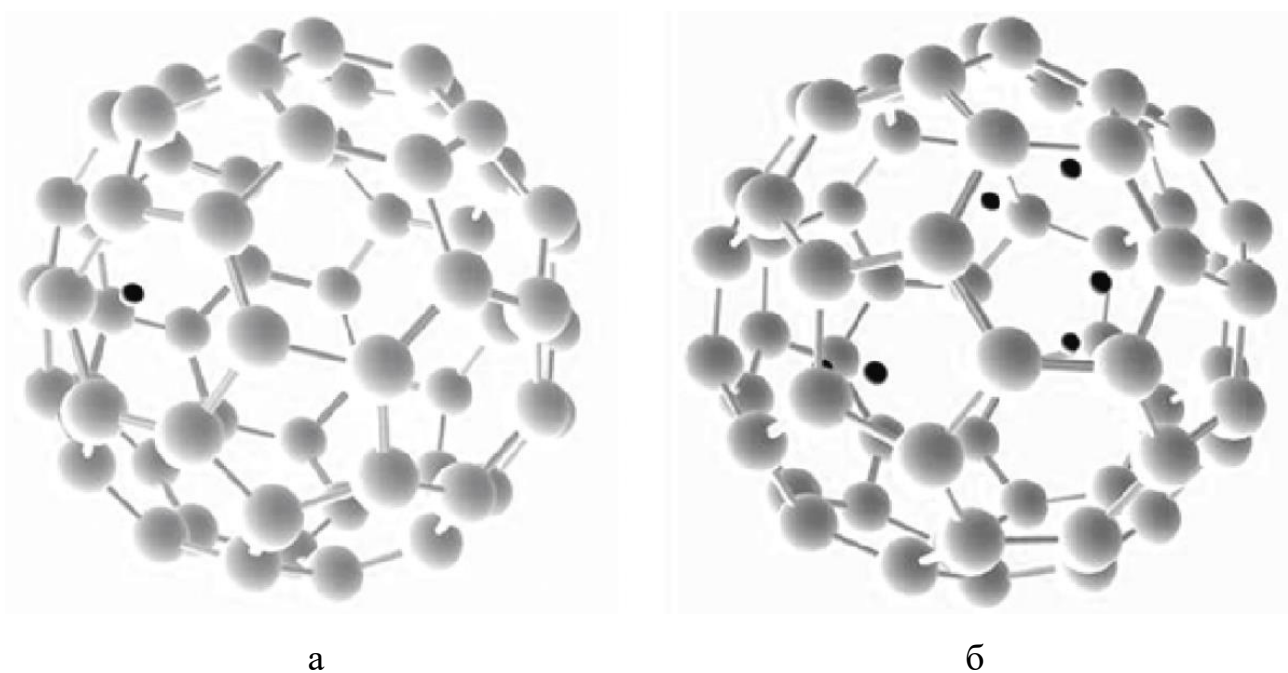


Рисунок 3 – Результаты DFT геометрической оптимизации для одного (а) и шести (б) протонов и фуллерена C_{60} . Изначально протоны были помещены снаружи фуллерена и затем конфигурация, обладающая минимумом суммарной энергии, была найдена в результате DFT геометрической оптимизации. В результате все

протоны оказались внутри фуллерена. Атомы углерода показаны серыми, протоны чёрными (Chistyakov et al., 2013)

Исследование (Kalacheva et al., 2015) подтвердило *in vivo* способность производных фуллерена, полиолметанфуллеренов, разобщать дыхание и фосфорилирование в митохондриях сахаромицетов *Yarrowia lipolytica*.

В 2012 году была опубликована статья Ваати и соавторов (Ваати et al., 2012), в которой описывались геропротекторные свойства фуллеренов. Исследование показывает, что пероральное введение C_{60} , растворенного в оливковом масле (0,8 мг / мл) в регулярных дозах (1,7 мг / кг массы тела) крысам не только не влечет за собой хроническую интоксикацию, но это почти в два удваивает их продолжительность жизни, влияние на продолжительность жизни в основном обусловлены ослаблением связанного с возрастом усиления окислительного стресса. Фармакокинетические исследования показывали, что растворенный C_{60} поглощается в желудочно-кишечном тракте и выводится в течение нескольких десятков часов. Влияние немодифицированного C_{60} , растворённого без использования токсичных ПАВ, на продолжительность жизни подчеркивает отсутствие хронической токсичности.

Однако, в исследовании (Grohn et al., 2021), проведённом на мышах, пероральное введение и внутрибрюшные инъекции C_{60} в оливковом масле не оказали значимого увеличения продолжительности жизни. При этом авторы подчёркивают, что необлучённый немодифицированный фуллерен в оливковом масле не вызывает острой токсичности на мышинной модели при внутрибрюшной инъекции, но при облучении флуоресцентной лампой дневного света (380–700 нм) в течение 4-8 дней образует токсиканты, которые могут вызывать значительную заболеваемость и смертность у мышей менее чем за 2 недели. Результаты антиоксидантной активности *in vitro* показали, что C_{60} значительно снижает окисление оливкового масла перекисью водорода / уксусной кислотой / серной кислотой.

В 2023 г. Ли и соавторами получены данные о том, что пероральное введение мышам C_{60} в оливковом масле 0,87 г/л уменьшило нейровоспаление в модели

болезни Паркинсона, вызванной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП). Приём фуллерена в оливковом масле нормализовывал состав микрофлоры кишечника и повысил выделение ею короткоцепочечных жирных кислот, восстанавливал целостность кишечного барьера и снижал системное воспаление на фоне введения МФТП. Также, методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) была показана способность C_{60} в оливковом масле поглощать гидроксильный радикал ($\bullet OH$) эффективнее оливкового масла (52,8 % против 18,1 % поглощенного $\bullet OH$) (Li et al, 2023).

В работе (Nozdrenko et al., 2021) внутрибрюшинные инъекции C_{60} снижали образование АФК и концентрацию антиоксидантных ферментов (GSH, CAT, и GPx) у крыс после мышечного утомления.

Добавление фуллерена C_{60} в еду самцам мышей в условиях индуцированного окислительного стресса митотоксином дезоксиниваленолом (DON) повысило общий антиоксидантный статус и активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в кишечнике и печени; увеличило высоту ворсинок кишечника и экспрессию белка плотных контактов эпителиальных клеток; нивелировал отрицательные эффекты DON на рост и массу тела мышей (Liao et al., 2021).

Согласно результатам исследования на культуре клеток фибробластов лёгких Homo Sapiens (Proskurnina et al., 2021), водный раствор C_{60} повышает экспрессию гена *nrf2*, и концентрацию кодируемого им транскрипционный фактора NRF2, положительно регулирующего экспрессию генов антиоксидантной защиты; а также экспрессию гена *pox4*, кодирующего важнейший источник внутриклеточных АФК, НАДФН-оксидазу.

C_{60} , растворенный в масле виноградных косточек, оказало связывал супероксидные радикалы и свободные радикалы 1,1-дифенил-2-тринитрофенилгидразина в свежесывороточных нейтрофилах человека. Пероральное введение C_{60} в масле виноградных косточек, заметно снизило уровень сывороточного воспалительного маркера CRP (С-реактивный белок) у здоровых собак породы бигль (Hui et al., 2023).

1.1.7 Антиоксидантная активность производных C₆₀

Производные C₆₀, такие как C₆₀(COOH)₆, могут проникать в биологические мембраны, оказывая большее снижение перекисного окисления липидов, вызванного гидроксильным и супероксидным радикалами, по сравнению с жирорастворимыми антиоксидантами, такими как альфа-токоферол (Wang et al., 1999).

В исследовании (Quick et al., 2008) производное фуллерена C₆₀, карбоксифуллерен C₆₀(C(COOH₂))₃, добавляемое в питьевую воду в дозировке 10 мг/кг веса в день мышам дикого типа начиная с возраста 12 месяцев, увеличило их продолжительность жизни на 11 % по сравнению с контрольной группой мышей, получавших питьевую воду с пищевым красителем соответствующего карбоксифуллерену цвета, а также предотвращало у 24-месячных мышей ассоциированное с возрастом повышение генерации супероксидного радикала митохондриями головного мозга и снижало возрастные отклонения памяти и обучения в поведенческом тесте “водный лабиринт Морриса”.

Цистин-C₆₀, производное фуллерена, с присоединёнными 5 молекулами серосодержащей аминокислоты цистина, показал высокую супероксид-устраняющую активность (89,5% в концентрации 1 мг/мл) и ещё более высокую устраняющую активность в отношении гидроксил-радикала (92,6 % в концентрации 1 г/л) (Hu et al., 2007).

В 2001 г. Shi с соавторами был продемонстрирован антиоксидантный эффект двух комплексов полифенолы-фуллерен C₆₀ в отношении стабильного радикала 2,2,6,6-tetramethyl piperidine-N-oxyl-ol (TEMPO), а также подчёркивалась хорошая растворимость полифенол-фуллеренов в полярных растворителях и эффективность устранения свободных радикалов (Shi и др., 2001) .

Авторы (Kalacheva et al., 2015) сообщили о дозозависимом снижении трансмембранного потенциала митохондрий полиол-метанофуллеренами C₆₀[C₁₃H₁₈O₄(OH)₄]₆ и C₆₀[C₉H₁₀O₄(OH)₄]₆, что говорит о снижении образования активных форм кислорода, в клетках сахаромецетов *Yarrowia lipolytica*, при этом снижалось не только среднее значение потенциала, но и кратно снижалась доля

клеток с высоким трансмембранным потенциалом по сравнению с интактными клетками.

1.1.8. Фуллеренолы

Фуллеренолы являются сильными многоосновными кислотами: экспериментально определенная константа диссоциации кислоты (pKa) для $C_{60}(OH)_{22-24}$ составляет $3,6 \pm 0,3$ (Semenov и др., 2011) или около 4 (Brant и др., 2007; Vileño и др., 2006). Проникновение из водной фазы и аккумуляция в липидных бислоях фуллеренолов, также как и агрегатов немодифицированного C_{60} , увеличивается со снижением pH: для фуллерола $C_{60}(OH)_{24}$ логарифм константы ассоциации изменяется от 2,45 при pH 7,4 до 3,55 при pH 4 (Hou и др., 2011). Фуллеренолы, как показано для $C_{60}(OH)_{24}$, могут индуцировать ионную проницаемость липидной бислоевой мембраны посредством образования ионных пор, и этот эффект также зависит от pH (Rokitskaya, Antonenko, 2016). Таким образом, фуллеренолы могут действовать как протонофоры.

В водных растворах фуллеренолы образуют слабо связанные агрегаты, и агрегация не влияет на распределение фуллеренолов между водными и липидными бислоями (Hou и др., 2011; Rokitskaya, Antonenko, 2016).

Авторы (Grebowski и др., 2020) синтезировали фуллеренол $C_{60}(OH)_{36}$ в отсутствие токсичных и ароматических растворителей методом генерации гидроксильных радикалов в щелочной среде (30% перекисью водорода в присутствии NaOH), предложенным Wang и соавторами (Wang и др., 2005). В модели индуцированной 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride пероксидации эритроцитов фуллеренол снижал перекисное окисление липидов (ПОЛ) мембран эритроцитов и проявлял синергию с синтетическим аналогом α -токоферола (PMHC, 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman), ещё сильнее снижая концентрацию продуктов окисления липидов относительно PMHC. Также $C_{60}(OH)_{36}$ снижал перекисное окисление мицелл MeLin (methyl linoleate, метилового эфира линолевой кислоты, являющейся жирной ненасыщенной кислотой) при pH 4,0; при pH 7,0 замедлял кинетику процесса окисления, при pH 10,0 не снижал перекисное окисление сам по себе, но проявлял синергетический эффект снижения

ПОЛ с аналогом α -токоферола (PMHC). Также, используя два флуоресцентных зонда, авторы обнаружили, что при pH 7,4 анионы фуллеренола включаются между фосфолипидных головок бислоя липосом.

Предварительная обработка фуллеренолом $C_{60}(OH)_{36}$ клеток кератиноцитов человека перед воздействием твёрдых частиц – загрязнителей воздуха снижала ингибировала повышение уровня АФК, снижала экспрессию фосфорилированной митоген-активируемой протеинкиназы, экспрессию белков, связанных с воспалением (циклооксигеназы-2, гем-оксигеназы-1 и простагландина E2) (Lee et al., 2019).

Согласно результатам работы (Grebowski et al., 2022), фуллеренол $C_{60}(OH)_{36}$ снижал окислительный стресс в суспензиях эритроцитов человека, подвергнутых ионизирующей радиации и защищал антиоксидантные ферменты эритроцитов человека от повреждения высокоэнергетическими электронами.

В высоких концентрациях (60 и 80 мкМ *in vivo*) $C_{60}(OH)_{36}$ оказывает негативное воздействие на функционирование нейронных сетей, ослабляя амплитуду, мощность и частоту тета-колебаний в нейронной сети гиппокампа самцов крыс линии Wistar и в концентрации 0,2 мкг/мкл вызывал эпилептические изменения в клетках срезов гиппокампа *in vitro* (Kazmierska-Grebowska et al., 2018).

Однако, полигидроксилированный фуллерен $C_{60}(OH)_{18}$ в концентрациях до 100 мкМ не оказывал влияние на работу нейронов и проявлял протекторное действие на нейроны гиппокампа самцов крыс Wistar в условиях окислительного повреждения, вызванного перекисью водорода и гидроперекисью кумена (Tsai, Chen, Chiang, 1997). Исследование фуллеренола $C_{60}(OH)_x(ONa)_y$ ($y \approx 6 - 8$, $x + y \approx 24$) в широком диапазоне концентраций выявило отсутствие влияния на выживаемость клеток нейронов гиппокампа крыс линии Wistar в концентрациях до 5 мкМ, снижение выживаемости при концентрациях выше 25 мкМ, дозозависимое увеличение активности каспаз 3 и 9 и апоптоз в концентрациях 50 – 200 мкМ (Zha et al., 2012).

В медицинском исследовании (Stankov et al., 2013) фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ оказывал цитопротекторное действие на линию клеток человеческой лейкемии в

условиях радиационного облучения, повышая экспрессию генов антиоксидантной защиты *gsta4* (глутатион S-трансфераза 4), *mnSod* (марганец-зависимая супероксид дисмутаза), *cat* (каталазы), а также антиапоптотических генов *bcl-2* и *bcl-xl*, повышая толерантность к радиотерапии лейкозных клеток K562. В отсутствие радиационного облучения $C_{60}(OH)_{24}$ повышал экспрессию только одного гена антиоксидантной защиты, *gsta4*.

Более гидроксильрованный фуллеренол, $C_{60}(OH)_{30}$ в концентрации 75 мг/л снижал на 20 % радиационную инактивацию фермента алкогольдегидрогеназы пекарских дрожжей при поглощённой дозе облучения 4,1 Гр/мин. Авторы делают вывод, что $C_{60}(OH)_{30}$ защищает фермент от инактивации радиацией за счёт конкуренции за радиационно-генерированные гидроксильные радикалы $\cdot OH$. В отсутствие облучения фуллеренол 75 мг/л не изменял активность необлученной алкогольдегидрогеназы после совместной инкубации в течение 24 ч. (Krokosz et al., 2014).

Также, фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ повышал экспрессию гена–положительного регулятора экспрессии генов антиоксидантной защиты Nrf2 в эпителиальных клетках линии A549, защищая их от индуцированного перекисью водорода окислительного стресса (Ye et al., 2014).

Исходя из этих данных, можно предположить наличие у фуллерена C_{60} и его производных антиоксидантной активности, доступной для детекции простыми методами биосенсоринга.

1.1.9 Взаимодействие C_{60} с ДНК

Фуллерен и его производные способны подавлять активность различных ферментов, инактивировать вирусы, взаимодействовать с ДНК. Однако различные производные фуллеренов отличаются по своим свойствам не только друг от друга, но и от исходных, немодифицированных соединений. Более того, исследования генотоксичности фуллерена C_{60} показывают противоположные результаты и имеют методологические недостатки, связанные с использованием токсичных растворителей.

Фуллерены почти нерастворимы в воде, и для их солюбилизации используются поверхностно-активные вещества (ПАВ). При использовании нетоксичного растворителя поливинилпирролидона (PVP) не происходит достоверного взаимодействия фуллерена с ДНК. Водорастворимые производные C₆₀, фуллеропирролидоны, представляющие собой фуллерен с 2-4 пиридиновыми кольцами на внешней стороне сферы, способны связываться с фосфатными группами ДНК *in vitro* (Takenaka et al., 1999).

Используя SOS-хромотест на *Escherichia coli* и тест рекомбинации на соматических клетках крыла дрозофилы, авторы (Babynin et al., 2002) не обнаружили мутагенного действия фуллерена C₆₀. При использовании спирта в качестве растворителя производные C₆₀: [61]dimethoxyphosphoryl[61]carbmethoxy-methanofullerene[60] (обозначенное как соединение 1), 1-methyl-2-(3,5-ditretbutyl-4-oxy-phenyl)3,4-fulleropyrrolidine) (соединение 3) оказали антимуtagenное действие относительно контроля растворителя; [61]dimethoxy phosphoryl[61]carbethoxy-methanofullerene[60] (соединение 2) в спирте и PVP, а также 1-methyl-2-(3,5-ditretbutyl-4-oxy-phenyl)3,4-fulleropyrrolidine) (соединение 3) в PVP увеличили частоту His⁺ ревертаций штамма BA13 *Salmonella typhimurium* (*hisG46 araD531 gal-uvrB/pKM101*) относительно контроля растворителя. Т.о., влияние производных фуллерена на частоту мутаций зависит от типа молекулярной группы, присоединённой к фуллереновому ядру и свойствами растворителей.

В работе (Lan и др., 2014) фуллерен C₆₀ в растворе PBS с 1 % бычьим сывороточным альбумином в качестве диспергента обрабатывали ультразвуком при мощности приблизительно 90 W в течение 15 мин, что является распространённым подходом в биотестировании (Gou, Onnis-Hayden, Gu, 2010). Результаты исследования (Lan и др., 2014) на цельноклеточных биосенсорах *E. coli* и *S. cerevisiae* с зелёным флуоресцентным белком – репортёром экспрессии генов, а также измерение экспрессии генов, связанных с репарацией ДНК, в культуре клеток лёгких человека A549 с помощью RT-qPCR, микроядерный тест и метод ДНК-комет показали генотоксичность C₆₀, в то время как тест Эймса дал отрицательные результаты. Однако суспензии C₆₀ готовили в растворе PBS с 1 %

бычьим сывороточным альбумином, т.е. без использования ПАВ для уменьшения размеров агрегатов и стабилизации дисперсной системы.

Согласно результатам (Jacobsen и др., 2008) C_{60} не влиял на частоту мутагенеза в локусе сII мышинных клеток лёгочного эпителия линии FE1-MutaTM Mouse, количество разрывов цепи ДНК, но повышал уровень formamidopyrimidine glycosylase (FPG)-чувствительных сайтов в 1,22 раза. Авторы делают вывод, что генотоксичность и мутагенность наночастиц сильнее всего коррелируют с размером пор, концентрацией неорганических веществ и, в меньшей степени, с содержанием ПАУ (полиароматические углеводороды) и площадью поверхности.

Отсутствие мутагенной и ДНК-повреждающей активности фуллерена C_{60} показало исследование (Mori et al., 2006). Согласно его результатам, смесь фуллеренов C_{60} и C_{70} в 0,5 % растворе натрий карбоксиметилцеллюлозы, содержащем 0,1% Tween 80 (вес/объем) не обладает мутагенным действием в тесте Эймса, не индуцирует хромосомные аберрации в клетках млекопитающих (культуре клеток китайского хомяка), не вызывают острую токсичность (доза 2000 мг/кг) *in vivo* у крыс линии Sprague–Dawley.

Исследование (Skamrova et al., 2014) выявило отсутствие токсического воздействия коллоидного раствора фуллерена C_{60} , полученного смешиванием насыщенного раствора C_{60} в толуоле с дистиллированной водой с последующим ультразвуковым выпариванием толуола и фильтрацией от нерастворившегося фуллерена, на клеточные мембраны и ядра клеток буккального эпителия человека.

В статье (Aly, Othman, Haridy, 2018) сообщается о антигенотоксической активности C_{60} в оливковом масле в тканях печени и сердца крысы при индукции генотоксичности циклофосфамидом (CP). Оливковое масло первого отжима (VOO) и C_{60} в нём снизили процент повреждений в цепях ДНК частоту хромосомных аберраций. Сердечные мышцы были более восприимчивы к генотоксичности, вызванной циклофосфамидом, и менее восприимчивы к C_{60} и оливковому маслу, чем ткани печени. Авторы подчеркивают потенциал исследования и разработки препаратов, содержащих C_{60} и VOO, в сочетании с CP и др. химиотерапевтическими средствами, для минимизации побочных эффектов,

вызываемых широко используемыми химиотерапевтическими агентами при лечении рака.

Оценка генотоксичности методом ДНК-комет показала, что концентрации 10-100 мкМ полигидроксилированного фуллерена $C_{60}(OH)_{22-24}$ не генотоксичны, однако более высокие концентрации (до 1 М) оказывают слабый генотоксический эффект (Ямалова, Агеев, 2021).

Результаты другого исследования (Захаров, Гапоненко, 2020) повреждения ДНК человеческих лимфоцитов методом ДНК-комет показало, что соединение C_{60} - $(L\text{-Аргинин})_8$ в концентрации 100 мкМ не генотоксично для лимфоцитов *Homo Sapiens*.

Таким образом, множество данных демонстрирует, что фуллерены не являются ДНК-тропными мутагенными веществами. Механизмы их антимуtagenного действия, отмеченного в нескольких работах, требуют дальнейшего изучения.

1.1.10 Методы модификации фуллеренов

В большинстве химических реакций C_{60} ведет себя как плохо делокализованный электронодефицитный полиолефин. C_{60} легко реагирует с нуклеофилами, например, с литий- или магний-органическими соединениями, аминами (Shi et al., 2001).

Несмотря на то, что C_{60} представляет собой трехмерную электронодефицитную слабую ароматическую систему, его реакция с электрофилами, характерная для ароматики, происходит нелегко. Однако C_{60} подвергается реакции присоединения, катализируемой кислотой Льюиса, с бензолом и толуолом с образованием полиаренфуллеренов (Olah et al., 1991). Ноке и соавторы провели реакции присоединения арена при кипячении смеси C_{60}/C_{70} с толуолом, ксилолом и другими аренами в присутствии $FeCl_3$ (Ноке et al., 1991).

Фуллеренолы (фуллерол, полигидроксилированные фуллерены) – это производные фуллерена с присоединёнными к атому углерода гидроксильными группами. Гидроксилирование делает фуллерены гидрофильными, позволяя их

применение в водных растворах без солюбилизаторов и стабилизаторов дисперсных систем. Фуллеренолы также имеют возможность дальнейшей химической модификации: увеличения числа гидроксильных групп (Kuo et al., 2020), добавления групп солевого типа с получением $C_n(OH)_xO_yNa_z$ (Semenov et al., 2016). Их считают наиболее перспективными водорастворимыми производными фуллеренов. Перспективы применения и свойства фуллеренола исследуются во многих областях прикладных наук, в частности в наномедицине, в т.ч. антиоксидантные свойства; в медицине как агенты противоопухолевой терапии, противовоспалительные и нейропротекторные средства, системы доставки лекарств, в биологии как противовирусные и противомикробные свойства, геропротекторы (Grebowski, Kazmierska, Krokosz, 2013; Wang et al., 2015).

В литературе представлено несколько методов синтеза фуллеренола из фуллерена C_{60} , приводящих к различным числам присоединённых гидроксильных групп на молекулу фуллерена.

1. Ультразвуковая обработка C_{60} в 30% перекиси водорода в реакторе, снабженном охлаждаемой циркуляционной водяной баней, которая поддерживала температуру внутри реактора близкой к комнатной, с получением $C_{60}(OH)_{44} \cdot 8H_2O$ (Afreeen et al., 2017).

2. Путь гидроксирования C_{60} без растворителя для синтеза фуллеренола, предложенный Ваном и коллегами (Wang et al., 2005), и его модификации. В данном методе генерация гидроксильных радикалов происходит при смешивании NaOH и 30% перекиси водорода. Чистый C_{60} (72 мг), гидроксид натрия (240 мг) и 30 % перекись водорода (180 мкл) тщательно измельчаются вместе в течение 15 или 25 минут в стеклянной ступке с получением $C_{60}(OH)_{16,4}$ (Wang et al., 2005) или $C_{60}(OH)_{36}$ (Grebowski et al., 2020).

3. Двухфазная реакция C_{60} в толуоле перекисью водорода в присутствии гидроксида тетрабутиламмония как катализатора фазового переноса. Смешение смеси происходит в течение 16 ч при 60 °C на воздухе, пока фиолетовый слой в толуоле не превратится в бесцветный прозрачный раствор, что означает

полигидроксилирование C₆₀ и переход из толуола в водную фазу (Kokubo et al., 2011).

1.2 Мембранотропные соединения

Мишенью мембранотропных соединений в клетке является плазматическая мембрана, в результате воздействия на которую происходит прямое или опосредованное изменение или разрушение мембранных структур (Горносталев, Рыбальченко, 2001).

Выделяют 4 вида мембранотропности:

1. Мембранная рецепция – накопление или специфическое связывание в мембранах без проникновения во внутрь клетки. Происходит прямой мембранотропный эффект.

2. Стимуляция или подавление биосинтетических мембранных процессов (изменение активности ферментов, ингибирование синтеза компонентов мембран).

3. Изменение барьерно-транспортных свойств мембраны.

4. Стимуляция или угнетение под влиянием ксенобиотиков сигнальных молекул.

1.2.1 Сурфактин

Сурфактин (химическая формула сурфактина C C₅₃H₉₃N₇O₁₃) представляет собой бактериальный циклический липопептид, производимый нерибосомальной пептидной синтетазой – сурфактин-синтетазой. В частности, его производят грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* (Празднова, Андриянов, Васильченко, 2018). Структура представляет собой длинную цепь β-гидрокси жирной кислоты, число атомов углерода в скелете которой варьируется от 13 до 15, связанную с пептидной петлёй из 7 аминокислотных остатков (рисунок 4). Наиболее распространённой последовательностью данного гептапептида является Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, включающая гидрофильные аминокислотные остатки аспартата (Asp) и глутамата (Glu), и гидрофобные аминокислоты валин (Val) и лейцин (Leu) (Santos, Silveira, Pereira, 2018).

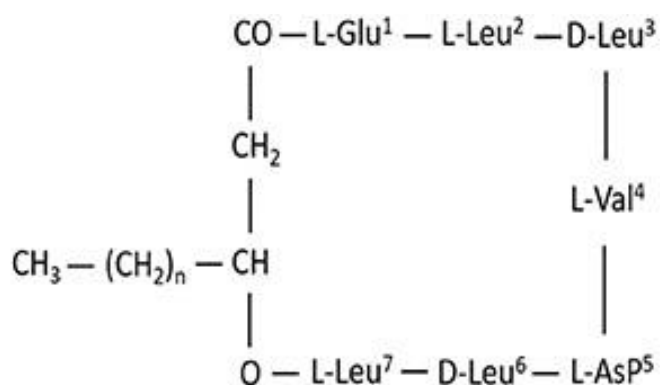


Рисунок 4— Первичная структура сурфактина (Han et al., 2008).

Сурфактин является внеклеточным метаболитом и требуется *B. subtilis* для роевого движения на плотной питательной среде. Делеционный мутант $\Delta srfAA$ исходно способной к роению *B. subtilis* 3610 утрачивал способность роиться (Kearns, Losick, 2003). Добавление сурфактина в концентрации 10 мкг/мл к дефицитным по синтезу сурфактина мутантам *Bacillus subtilis* 916 Δsrf восстанавливало их роевую подвижность (Luo et al., 2015).

Сурфактин проявляет противогрибковое, противовирусное, антибактериальное свойства; для *E. coli* минимальная ингибирующая концентрация составляет 3,125 мкг/мл (Abdelli et al., 2019). Является сильным поверхностно-активным веществом (Ishigami и др., 1995), способен снижать поверхностное натяжение воды с 72 до 27 мН/м в критической концентрации мицеллообразования (ККМ), определённой как «около 10 мкг/л» авторами (Yeh, Wei, Chang, 2005). Сурфактин имеет неспецифичный механизм биологического действия, повышая проницаемость мембран за счёт детергентного эффекта, оказываемого в концентрациях от 12 до 50 мкг/мл (Heerklotz, Seelig, 2001), что может являться следствием того, что ККМ сурфактина в зависимости от способа его получения находится в пределах 13-17 мкг/мл (Sen, Swaminathan, 2005). Авторами (Zhang et al., 2017) была подтверждена возможность использования сурфактина для увеличения всасывания инсулина в кишечнике при пероральном приёме.

Сурфактин сам по себе не обладает антиоксидантной активностью в отношении супероксид-радикала и перекиси водорода (Abdollahi et al., 2020; Tancredi et al., 2025); ингибирование радикалов оказывает в слишком высоких (для антиоксиданта) концентрациях – 103 мкг/мл или в смеси с плипастатинами (plipastatins) в концентрациях 500 мкг/мл (Dussert et al., 2022).

Поверхностно-активные вещества, благодаря амфифильности, способны вызывать гемолиз при определённой концентрации, называемой минимальной гемолитической концентрацией (МГК). МГК сурфактина в воде составляет 400 мг/л, при добавлении этанола 167 мл/л снижается до 100 мг/л (Morán, Martínez, Siñeriz, 2002).

В нанотехнологии сурфактин показал себя как мощный стабилизатор суспензий наночастиц. В исследовании (Reddy et al., 2009) наночастицы серебра, синтезированные (восстановлением AgNO_3 борогидридом натрия) в сурфактине 25 мг/л из *B. subtilis* (ВВК006), оставались стабильными в течение 2 месяцев, тогда как в контроле без сурфактина быстро образовывали крупные агрегаты. Авторы предполагают, что в стабилизации наночастиц возможно, играют роль имидные группы с неподелённой парой электронов, но не исключают стабилизацию наночастиц за счет мицеллярной структуры раствора сурфактина. О стабилизации наночастиц функциональными аминогруппами сообщалось в статье (Joshi и др., 2004).

В исследовании (Plaza et al., 2016) наночастицы серебра со средним размером агрегатов до 50 нм получали из нитрата серебра супернатантами сурфактин-синтезирующей *B. subtilis* Т-1, культивированной на патоке, среде LB и даже стоках пивоваренных заводов. Авторы (Kalishwaralal et al., 2008) сообщают о синтезе наночастиц серебра средним размером 40 нм восстановлением нитрата серебра супернатантами культур *B. licheniformis*, и полагают, что в восстановлении наночастиц серебра из AgNO_3 может участвовать бактериальная нитратредуктаза из *B. licheniformis*, являющейся также продуцентом одной из изоформ сурфактина – сурфактина С (Hornig et al., 2019) и биосурфактанта со схожей структурой, лихенезина (Gudina, Teixeira, 2022).

Использование сурфактина в качестве замены ПАВ позволит снизить экологическое загрязнение токсичными химически синтезируемыми солюбилизаторами (Santos, Silveira, Pereira, 2018).

1.3. Антиоксиданты

В литературе встречается несколько определений термина «антиоксиданты». В биологии антиоксидантами называют вещества, способные эффективно ингибировать или задерживать (Flieger et al., 2021) процессы свободнорадикального окисления других веществ в клетках (Карбышев, Абдуллаев. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие. М.: ФГБОУ ВО РНИМУ, 2018. С.23). Прикладное значение имеет определение: «Антиоксидант – это вещество, которое, присутствуя в низких, по сравнению с окисляемым субстратом, концентрациях, существенно задерживает или препятствует его окислению» (Halliwell, Gutteridge, 2015; Меньщикова, Зенков, 2016).

Свободный радикал – это реактивная молекула или часть молекулы, имеющая неспаренный электрон на внешней орбите. Свободные радикалы могут быть нейтральными или заряженными, называемыми ион-радикалами (Карбышев, Абдуллаев. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие. С.5). В результате реакции с антиоксидантами свободные радикалы переводятся в неактивную форму, в результате чего инициирование цепной реакции окисления замедляется, если вторичный радикал существенно менее активен, или полностью прекращается (Пискарев, Иванова, 2016). Таким образом, продукт реакции потенциального антиоксиданта с прооксидантом не должен быть свободным радикалом.

1.3.1 Классификация антиоксидантов

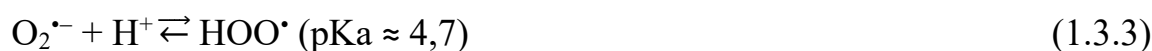
В зависимости от наличия или отсутствия каталитических функций антиоксиданты подразделяются на ферментативные и неферментативные. Ферментативные антиоксиданты, в частности супероксиддисмутаза (SODs), каталаза (Cat), глутатионпероксидаза (GPx) и глутатионредуктаза (GRd) в

аэробных организмах обеспечивают высокую эффективность антиоксидантной защиты (Flieger et al., 2021).

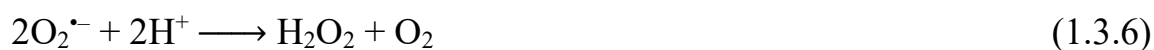
По механизму действия антиоксиданты классифицируют на превентивные и разрывающие свободнорадикальную цепную реакцию. Превентивные антиоксиданты снижают скорость инициации свободнорадикальных реакций, сопровождающихся разрывом связей и образованием свободных радикалов. К этому классу относят химические солнцезащитные фильтры (меланин, задерживающий до 90 % УФ-излучения; урокановая кислота, преобразующая УФ-свет в диапазоне длин волн 240-300 нм в тепло (Свиридова, Ищенко, 2006)), хелаторы металлов, гидропероксид-разлагающие агенты. Связывая ионы металлов переходной валентности (например, Fe^{2+}), хелаторы металлов могут предотвращать реакцию Фентона (реакция 1.3.1). Гидропероксид-разлагающие антиоксиданты, в частности каталаза (CAT) снижает иницирование, разлагая перекись водорода на нерадикальные продукты (реакция 1.3.2).



Супероксиддисмутазы и SOD-миметики (имитирующие ферментативную активность супероксиддисмутазы) можно отнести к превентивным антиоксидантам (Valgimigli, Baschieri, Amorati, 2018). Хотя при физиологических pH большая часть молекул супероксида депротонирована ($pK_a(HOO\cdot) = 4,7$), и проявляет свойства восстановителя, небольшое количество, в зависимости от внутриклеточного pH до 1 % протонированной формы (De Grey, 2002; Buettner, 2011), гидропероксильного радикала $HOO\cdot$, способного напрямую инициировать цепь окисления (реакция 1.3.3) (Bedard et al., 2001).



Супероксиддисмутазы и SOD-миметики как восстанавливаются, так и окисляются супероксидом по механизму пинг-понга – попеременного восстановления супероксидом (реакция 1.3.4) и окисления протонированной формой супероксида (реакция 1.3.5) переходного металла каталитического центра (Goldstein, Czapski, 1991). Таким образом, супероксид диспропорционируется до молекулярного кислорода и перекиси водорода (суммарное уравнение реакции (1.6.6)) (Goldstein, Czapski, 1991).



Антиоксиданты, разрывающие свободнорадикальную цепную реакцию замедляют и блокируют цепь окисления, конкурируя с реакциями распространения окисления, реагируя с пероксильными радикалами быстрее, чем они могут окислять вещества клетки с образованием неактивных продуктов. Типичная реакция между антиоксидантом (АН) и пероксильным радикалом (ROO•) представляет собой перенос атома водорода Н с образованием перекиси водорода и радикала антиоксиданта (А•), который захватывает второй ROO• и образует нерадикальные продукты. При отсутствии регенерирующих систем большинство антиоксидантов, разрывающих цепь, расходуется во время реакции, поэтому они реагируют стехиометрически. Единственная важная реакция антиоксидантов, разрывающих цепь, — реакция с пероксильными радикалами, в то время как реакции с другими радикалами, образующимися во время автоокисления, менее значимы. Реакция радикала R• с кислородом O₂ настолько быстра, что вероятность его перехвата антиоксидантом в низких концентрациях невелика. Иницирующие цепную реакцию радикалы HO• и RO• имеют очень высокую реакционную способность по отношению к любой органической молекуле, в итоге экзогенный антиоксидант, по определению присутствующий в клетке в небольших

количествах, не может оказывать высокие значения протекторного действия из-за низкой вероятности встречи с данными радикалами.

Молекула (АН) может выступать в роли антиоксиданта, разрывающего цепь, если она соответствует следующим критериям:

- 1) Обладает высокой реакционной способностью по отношению к пероксильным радикалам ($\text{ROO}\cdot$).
- 2) Образует радикал ($\text{A}\cdot$), который не способствует дальнейшему развитию процесса автоокисления.
- 3) Остаётся стабильной при воздействии воздуха.

Одними из лучших представителей этого класса антиоксидантов: они способны быстро связывать по два пероксильных радикала на одну молекулу. Полифенолы, содержащие несколько фенольных групп, могут показывать ещё большую эффективность.

По происхождению АО делят на агенты эндогенного происхождения и экзогенного. К эндогенным относятся коэнзим Q10, глутатион, α -липоевая кислота и другие соединения, синтезируемые в организме. К экзогенным антиоксидантам, поступающим с пищей, относятся витамины А, С, Е, каротиноиды, полифенолы (включая флавоноиды) (Зиятдинова, Будников, 2015), а также их синтетические аналоги — низкомолекулярные соединения (например, убихинон, глутатион) и микроэлементы, такие как селен (Шахмарданова et al., 2016).

Также по происхождению АО делят на природные и синтетические. К хорошо изученным природным антиоксидантам, разрывающим цепную реакцию окисления, относятся токоферолы (витамин Е), флавоноиды, стильбены (например, ресвератрол) и аскорбиновая кислота (витамин С). Кроме того, Среди синтетических аналогов выделяют ионол (бутилгидрокситолуол, ВНТ) и бутилгидроксианизол (ВНА) (Valgimigli, Baschieri, Amorati, 2018), являющихся жирорастворимыми. Расчёты и экспериментальные результаты показали, что антирадикальный потенциал ВНТ выше ВНА и тролокса, водорастворимого аналога токоферола, широко используемого в качестве положительного контроля и эквивалента антиоксидантной активности (Boulebd, 2020).

По механизму действия антиоксиданты также делят на антиоксиданты прямого и косвенного действия. N-ацетилцистеин относится одновременно к антиоксидантам опосредованного действия благодаря наличию свободной тиольной группы, и прямого действия, т.к. является предшественником внутриклеточного глутатиона (Симонова, 2013).

1.3.2. Наноантиоксиданты

Наноантиоксиданты представляют собой наноматериалы, способные замедлять скорость автоокисления за счёт улавливания радикалов, инициирующих цепные реакции окисления, либо за счёт снижения частоты событий инициации. К числу пищевых антиоксидантов, таких как витамин E, каротин, селен, глутатион и полифенолы, проявляется значительный интерес в качестве фармакологических средств для снижения уровня активных форм кислорода (ROS) и профилактики заболеваний, связанных с окислительным стрессом (Valgimigli, Baschieri, Amorati, 2018).

Однако результаты клинических исследований, направленных на оценку эффективности добавления в пищу токоферола, селена или каротина для снижения риска развития рака, зачастую не подтверждают их защитного действия и даже указывают на возможное повышение риска смертности. Одной из ключевых причин таких неожиданных результатов считается неспособность большинства традиционных антиоксидантов достигать биологически значимых мишеней в организме (Morry, Ngamcherdtrakul, Yantasee, 2017).

В этом контексте наноантиоксиданты открывают новые перспективы: их можно специально разрабатывать для обеспечения высокой стабильности по сравнению с низкомолекулярными соединениями, предотвращения быстрого метаболического выведения и прицельной доставки к определённым участкам организма. В целом, наноматериалы могут обладать собственными антиоксидантными свойствами (Morry, Ngamcherdtrakul, Yantasee, 2017) или выступать как пассивные носители для доставки, в т.ч. с высвобождением, известных низкомолекулярных антиоксидантов (тролокса, куркумина, кофеина, галловой кислоты, ВНТ) (Valgimigli, Baschieri, Amorati, 2018).

Примерами наноматериалов с собственными антиоксидантными свойствами являются наночастицы оксида церия (CeO_2), кремния, платины, фуллерен C_{60} . Благодаря переменной валентности церия наночастицы CeO_2 нейтрализуют АФК в окислительно-восстановительном цикле между Ce^{3+} и Ce^{4+} (Morry, Ngamcherdtrakul, Yantasee, 2017). С увеличением концентрации от 20 до 1000 мг/л и уменьшением максимальных размеров агрегатов до 30 нм антиоксидантная активность наночастиц диоксида церия увеличивается (Пугачевский и др., 2023). Наночастицы платины нейтрализуют АФК благодаря большому количеству электронов на поверхности и SOD-подобной каталитической активности. Фуллерен C_{60} считается мощным антиоксидантом благодаря наличию делокализованных π -электронов в 20 ароматических кольцах из атомов углерода, активно реагирующих со свободными радикалами (Morry, Ngamcherdtrakul, Yantasee, 2017). Наночастицы кремния снижают окислительный стресс, поглощая АФК и свободный гидроксильный радикал (Hao et al., 2014).

1.4 Паракват – модельный индуктор окислительного стресса

Паракват (1,1'-диметил-4,4'-дипиридилий дихлорид) – производное виологена (метил виологен). Широко известный гербицид, в сельском хозяйстве используется для борьбы с сорняками (Bromilow, 2004), в токсикологических исследованиях используется для моделирования окислительного стресса, вызванного супероксидным радикалом (Bus, Gibson, 1984). Роль кислорода в токсичности параквата была доказана в опытах с кишечной палочкой, факультативным анаэробом. Паракват обладает бактериостатическим действием в условиях аэробного культивирования *E. coli* (Davison, Papirmeister, 1971), но не ингибирует рост в строго анаэробных условиях (Fisher, Williams, 1976).

В присутствии сильных восстановителей (Michaelis, Hill, 1933), паракват подвергается одноэлектронному восстановлению до паракват-радикала, накапливающегося и стабильному только в анаэробных условиях, в т.ч. в живых клетках (Hassan, Fridovich, 1979). В аэробных условиях паракват-радикал не

накапливается, быстро реагируя с кислородом O_2 , в результате чего образуется супероксидный радикал O_2^- , который является главным фактором токсичности параквата (Hassan, Fridovich, 1979), и затем восстанавливается паракват-радикалом до перекисного (пероксильного) радикала O_2^{-2} , в водных растворах при низких и нормальных значениях pH находящегося в виде перекиси водорода H_2O_2 . Также наличие параквата в среде приводит к образованию перекиси водорода в живых клетках за счёт действия супероксид дисмутазы (у организмов, имеющих рабочий ген данного фермента), катализирующую реакцию дисмутации супероксидного аниона до кислорода O_2 и перекиси водорода.

В присутствии комплексного железа, например сульфата железа (II), и в биологических системах с перекисью водорода происходит реакция Фентона (реакция 1.4.1), в результате которой происходит образование гидроксильного радикала и гидроксидного иона (Bus, Gibson, 1984; Winterbourn, 1995):



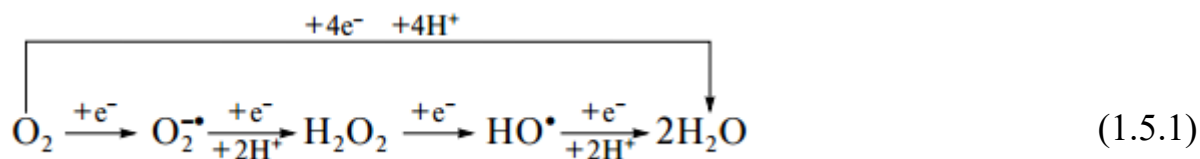
В итоге токсическое действие параквата в аэробных условиях реализуется не только за счёт короткоживущего супероксидного радикала, но и через последующее образование гидроксильного радикала.

1.5 Дыхательная цепь митохондрий и её продукты

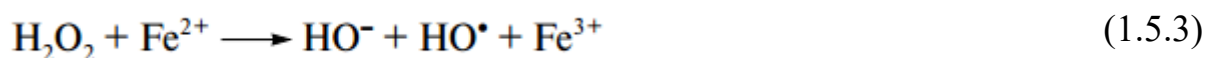
Митохондрии – это цитоплазматические органеллы эукариот, "энергетические фабрики клетки", главная функция которых заключается в синтезе АТФ.

Из-за несовершенного функционирования дыхательной цепи митохондрий, особенно комплексов I и III (Murphy, 2009), кроме полного четырехэлектронного восстановления молекулы O_2 до воды всегда происходит и неполное – одно–трехэлектронное восстановление с последовательным образованием активных форм кислорода (АФК). Это свободный радикал-анион супероксид O_2^- , перекись

водорода H_2O_2 и наиболее активный радикал – гидроксил HO^\bullet (реакции (1.5.1 – 1.5.3)):



Донорами электрона могут быть Fe^{2+} , Cu^+ или семихиноны, а для второй и третьей реакций – также и $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Скулачѐв, 1999):



В комплексе I супероксид $\text{O}_2^{\bullet-}$ образуется в результате действия двух механизмов: прямой перенос электронов на кислород с восстановленного флавинмоноклеотида (FMNH_2); обратный перенос электронов от CoQH_2 комплекса II в комплекс I с восстановлением NAD^+ до NADH в сайте FMN (флавинмоноклеотида) с последующим переносом электрона на кислород. Доля FMNH_2 по отношению к другим формам (окисленной FMN и полухинону FMNH), и соответственно, процент образования супероксида, определяется соотношением NADH/NAD^+ (восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (NADH) к окисленной NAD^+). Уровень образования супероксида при обратном переносе электронов, вероятно, является самым высоким из возможных в митохондриях.

Комплекс III при переносе электронов с CoQH_2 (кофермент Q восстановленный) на цитохром c и при действии антимицина продуцирует супероксид в результате реакции O_2 с CoQH (частично восстановленный кофермент Q) (Murphy, 2009).

АФК – главные мутагены аэробных клеток. Повышенный уровень АФК ускоряет старение, повышают риск канцерогенеза, сокращает продолжительность жизни (Скулачѐв, 1999). Естественная защита осуществляется двумя принципиально разными механизмами: 1) снижением образования первой АФК – путем уменьшения O_2 в клетке или его более быстрого использования дыхательной цепью ввиду снятия ее контроля $\Delta\mu\text{H}^+$, 2) функционированием антиоксидантной

системы (АОС) (Кулинский, 1999). Митохондриальная антиоксидантная система человека включает марганцевую супероксиддисмутазу, пероксиредоксин III, митохондриальный тиоредоксин и митохондриальную тиоредоксинредуктазу, Все эти белки, за исключением тиоредоксинредуктазы, индуцируются окислительным стрессом (Rabilloud et al., 2001).

1.6 *Escherichia coli* как модель митохондрий для изучения эффектов наночастиц

Согласно симбиотическая гипотеза происхождения эукариотических клеток, клеткой-хозяином в эволюции клетки эукариотического типа послужил анаэробный прокариот, способный лишь к амебоидному движению. Переход к аэробному дыханию связан с появлением в клетке митохондрий, произошедших путем изменений симбионтов — аэробных бактерий, проникших в клетку-хозяина и сосуществовавших с ней. Серьезным доводом в пользу симбиотического происхождения митохондрий, центриолей и хлоропластов является то, что перечисленные органеллы имеют собственную ДНК (Ярыгин, 2003). Более того, митохондрии обладают некоторыми свойствами прокариот:

- геном митохондрий небольшой, как и у прокариот;
- ДНК, как правило, имеет кольцевую форму;
- в митохондриальных генах человека есть общий промотор и один полицистронный транскрипт, как в оперонах прокариот;
- инициаторной тРНК является тРНК^{фмет};
- нет ядра, ограниченного ядерной мембраной;
- митохондриальные гены человека не имеют интронов;
- константы рибосом в митохондриях человека - 55S, большая субъединица имеет константу 39S, а малая — 28S, в то время как соответствующие эукариотические константы: 80S, 60S и 40S (Иванов, 2006);
- размножаются бинарным делением, делясь иногда независимо от деления клетки, никогда не синтезируются *de novo*.

Escherichia coli – граммотрицательная палочковидная бактерия, широко используемая в качестве модельного организма в микробиологических исследованиях. *E. coli* относится к тому же типу (Протеобактерии), что и предположительный предок митохондрий, сходные размеры, так же, как и митохондрии имеет внешнюю и внутреннюю мембраны и, что важно для токсикологических тестов, собственную антиоксидантную систему с аналогичными антиоксидантными ферментами, что позволяет использовать данный вид бактерий как модель митохондрий. Для использования в данном исследовании особенно важны следующие особенности:

1. Митохондрии, по-видимому, произошли от α -протеобактерий посредством эндосимбиоза, сохранив двойные мембраны, кольцевую ДНК и механизмы деления (например, гомологи FtsZ) (Boguszewska et al., 2020).

2. Общие окислительно-восстановительные системы. И митохондрии, и *E. coli* используют схожие цепи переноса электронов (ЦПЭ) для производства энергии, что делает их восприимчивыми к сопоставимым механизмам окислительного стресса (Govindan et al., 2015). Митохондрии и *E. coli* генерируют активные формы кислорода (АФК) посредством активности ЦПЭ.

3. Фуллерен C₆₀ проникает в мембраны *E. coli* посредством механизмов пассивной диффузии и протонной проводимости, аналогичных транспорту внутренней мембраны митохондрий (Boguszewska et al., 2020; Emelyantsev et al., 2019). Это позволяет напрямую оценить:

- Динамику локализации
- Стабилизацию мембранного потенциала
- Протонофороподобную активность

Основные элементы сходства обобщены в Таблице 1.

Таблица 1. Сопоставление митохондрии и *E. coli* как ее модели

Метаболический путь	Компонент <i>E. coli</i>	Аналог в митохондриях
Окислительный стресс	SoxRS/SOS система	Nrf2/ARE сигналинг
Нарушения фолдинга белков	Белки теплового шока	UPR
Регуляция апоптоза	Каспазоподобные протеазы	Цитохром С

Исследования с использованием инфицированных EPEC клеток демонстрируют, что эффекторы *E. coli* (например, Map, EspZ) напрямую манипулируют белками деления/слияния митохондрий (DRP-1, MFN1/2), подтверждая сохранение сигнальных путей между разными царствами живой природы (Li et al., 2022; Roxas et al., 2022).

Бактериальные модели обеспечивают быстрый и высокопроизводительный скрининг для:

- Эффектов состояния агрегации фуллеренов;
- Концентрационно-зависимых переходов антиоксидантов/прооксидантов;
- Кинетики взаимодействия мембран.

Таким образом, хотя *E. coli* и не обладает митохондриальной сложностью, ее консервативные основные системы и экспериментальная доступность делают ее подходящей моделью для начальных исследований фуллеренов и других подобных наночастиц, особенно при изучении фундаментальной окислительно-восстановительной биологии и мембранных взаимодействий.

Для дальнейших исследований, несомненно, потребуется валидация в эукариотических моделях.

1.7 Билюминесцентный тест

Методы определения биологической активности *in vivo* используют в качестве живых моделей модельные организмы, культуры клеток или половые клетки, а для регистрации активности используют те же физико-химические методы, что и химические методы определения, например фотометрические, хемилюминесцентные, флуоресцентные, электрохимические (Хасанов, Рыжова, Мальцева, 2004).

Обилие новых химических соединений, которые по мере появления необходимо проверять на генетическую активность, обусловило разработку относительно простых, дешёвых и надёжных методов и тест-систем для скрининга большого числа соединений. Для детекции уже известных токсических агентов, оценке токсичности или антиоксидантного действия новых химических веществ и наноматериалов широко используются Lux-биосенсоры.

Билюминесцентный анализ с использованием Lux-биосенсоров *E. coli* MG1655 (pKatG) и (pSoxS) можно отнести к методам определения антиоксидантной активности с использованием биологических маркеров (Хасанов, Рыжова, Мальцева, 2004), и при этом способ регистрации антиоксидантной активности относится к люминесцентным методам, а для нормализации свечения по мутности бактериальной культуры используется фотометрия – определение оптической мутности на длине волны 600 нм (Gou, Onnis-Hayden, Gu, 2010; Onnis-Hayden et al., 2009). Самым популярным методом билюминесцентного анализа является выращивание бактериальных культур биосенсоров в жидких питательных средах и добавление потенциальных антиоксидантов непосредственно к культуре клеток (Vazhenov et al., 2023).

Lux-биосенсор — это бактериальная клетка, содержащая гибридную плазмиду (рис. 5), в состав которой встроены два основных элемента: регуляторный участок (промотор и оператор) и гены-репортеры. В качестве репортеров используются гены *luxCDABE*, изолированные из геномов светящихся бактерий и кодирующие люциферазу (*luxAB*) и редуктазу (*luxCDE*), а в качестве регуляторных элементов – различные индуцируемые промоторы, сформированные

в процессе эволюции и специфически реагирующие на наличие в среде химического вещества определенного типа. По индукции люминесценции определённого биолюминесцентного штамма можно судить об увеличении экспрессии гена с соответствующим промотором.

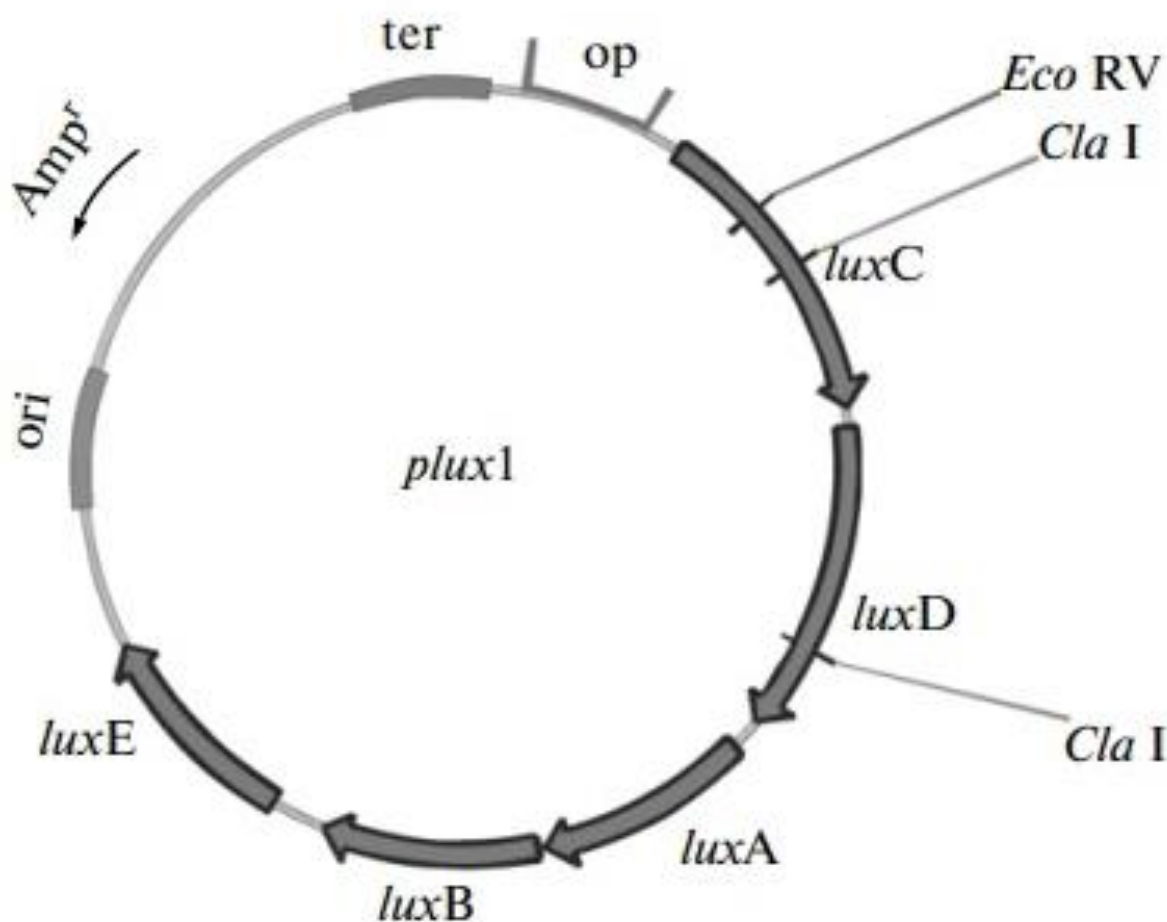
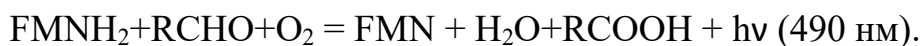


Рисунок 5 – Структура плазмиды Lux-биосенсора. Гены *lux*-CDABE — гены-репортеры, *op* — регуляторный элемент (Завильгельский, Котова, Манухов, 2012).

Lux-биосенсоры характеризуются как специфичностью, так и высокой чувствительностью, что определяется особенностью взаимодействия белка-рецептора (репрессора или активатора транскрипции) с тестируемым химическим веществом.

Бактериальные люциферазы являются гетеродимерами (состоят из α - и β -субъединиц) и катализируют окисление длинноцепочечного альдегида RCHO

(природный субстрат – тетрадеканаль) кислородом воздуха с помощью восстановленного флавинмононуклеотида:



Реакция сопровождается выделением кванта сине-зелёного света ($\lambda_{\text{max}} = 490$ нм) (Завильгельский, Котова, Манухов, 2012).

У *E. coli* выделяют несколько крупных регулонов, гены которых одновременно экспрессируются в результате действия на клетку специфических токсических агентов: SOS-регулон (реакция на повреждение ДНК хромосомы), регулон теплового шока (реакция на повреждение белков) и два регулона окислительного стресса (реакция на активные формы кислорода). Регулон окислительного стресса *soxRS* находится под контролем регуляторных белков SoxR, сенсора супероксид-аниона (O_2^-) и активатора транскрипции эффекторных генов, SoxS (Gaudu et al., 1997). Регуляторным белком – сенсором перекиси водорода в регулоне *oxyRS* – является OxyR, контролирующей транскрипцию группы генов, в состав которых входят *oxyS* (регуляторная РНК), *katG* (каталаза), *gorA* (глутатионредуктаза) и др. (Storz et al, 1999). Плазмида pColD содержит SOS-промотор гена *sda* (colicin D activity) и регуляторный участок-репрессор *cdr* (Ghersa и др., 1988), что приводит к закрытости промотора в норме и высокой амплитуде ответа при добавлении генотоксических агентов (Котова, Манухов, Завильгельский, 2009).

В плазмиде pFabA репортёрные гены находятся под промотором гена *fabA*, кодирующий β -гидроксидеканоил-ацилпереносящий белок (β -hydroxydecanoyl-acyl-carrier-protein), ключевой фермент в образовании двойных связей в жирных кислотах в мембранах *E. coli* (Khmelevtsova et al., 2024). Ген *fabA* позитивно регулируется геном *fadR*, продукт которого является репрессором генов-регуляторов деградации жирных кислот и транскрипционным фактором их биосинтеза. При превышении количества ненасыщенных жирных кислот, необходимых для производства мембраны, длинноцепочечные молекулы ацил-КоА накапливаются и связываются с белком FadR, отделяя его от промотора *fabA*. В случае недостатка ненасыщенных жирных кислот, вызванного повреждением

мембран, уровень длинноцепочечных ацил-КоА будут низким, белок FadR свяжется с оператором *fabA*, и экспрессия *fabA* повысится (Choi, Gu, 1999). Таким образом, биосенсоры с плазмидой pFabA-lux применяются для детекции мембранотропных агентов (Завильгельский, Котова, Манухов, 2012; Khmelevtsova et al., 2024; Гергерт, Попова, 2025).

Биолюминесценция — частный случай хемилюминесценции, катализируемой биологическими катализаторами – ферментами, представляет собой свечение некоторых живых организмов (морские бактерии, светляки, специализированные органы глубоководных рыб). В последнее время часто используют выделенные биолюминесцентные системы *in vitro*. Обычно это одна люминесцентная реакция или система реакций, катализируемых ферментами. Ферменты биолюминесцентных реакций называются люциферазами. Люциферазы катализируют реакцию (обычно это реакция окисления), завершающуюся образованием электронно-возбужденных состояний и испусканием кванта света.

Люциферазы широко используются в качестве репортеров для определения регуляции во времени промоторов как у прокариот (бактериальная люцифераза) (Condee, Summers, 1992; Francis, Gallagher, 1993), так и у эукариот (светляковая люцифераза) (Wet De et al., 1987). Испускание света, происходящее в результате катализируемой бактериальной люциферазой окислительной реакцией, легко выявляется как *in vitro*, так и *in vivo*, для этого требуются недорогие субстраты, легко абсорбирующиеся через клеточные мембраны. Люциферазные репортёры более чувствительны, чем другие репортерные ферментные системы (Schultz, Yarus, 1990), более того, активность генов с помощью них можно отслеживать непрерывно в режиме реального времени без повреждения клетки Т.о., это экономически эффективная и чувствительная система оценки экспрессии генов *in vivo*.

1.8 Спектрофотометрическое определение мутности культур бактерий

В отличие от стандартов МакФарланда, спектрофотометр непосредственно измеряет мутность культуры через оптическую плотность. Корреляция

поглощения света с массой бактерий очень хорошая для разбавленных суспензий бактерий, и вероятно, сохраняется независимо от размера клеток несмотря на отсутствие прямой связи абсорбции с КОЕ). Однако в концентрированных суспензиях корреляция поглощения света к сухой массе больше не соблюдается (Sutton, 2006).

Прямая зависимость между оптической плотностью (OD, optical density) и концентрацией клеток наблюдается для $OD \leq 0,4$. Поскольку более высокие значения OD больше не пропорциональны плотности клеток, их зависимость от времени даёт искажённую кривую роста в верхнем диапазоне. Если рост культуры приближается к критической $OD \approx 0,4$, образцы должны быть разбавлены стерильной питательной средой перед измерением на определенный коэффициент разбавления, d . Затем измеренное значение делится на d , чтобы получить рассчитанную оптическую плотность, OD_{corr} (OD corrected) (Widdel, 2007).

1.9 Определение частоты мутаций

1.9.1 Мутагены и антимутагены

В настоящее время мутации определяются как наследуемые изменения генетического материала. Мутации вызывают как качественные, так и количественные изменения в геноме организма. В многоклеточных организмах мутации ДНК также могут привести к раку или мозаицизму (Абилев, Глазер, 2021).

Мутагенность – это индукция постоянных изменений (мутаций) в генотип организма. Генотоксичность, согласно определению Международного агентства по изучению рака (МАИР) включает прямые и косвенные воздействия на ДНК (Абилев, Глазер, 2021). «Генотоксичность» является более широким понятием, чем мутагенность, и описывает способность соединений влиять на структуру ДНК или клеточный аппарат и топоизомеразы, отвечающие за топологию ДНК (Słoczyńska et al., 2014). Генотоксические эффекты на ДНК не всегда связаны с мутациями (Eastmond et al., 2009).

Мутации классифицируют на спонтанные, возникающие независимо от внешней среды, и индуцированные, возникающие под действием мутагенов (Абилев, Глазер, 2021).

По происхождению мутагены делят на: физические (ионизирующие и тепловое излучения, ультрафиолетовые лучи), химические (аналоги азотистых оснований, алкилирующие и интеркалирующие агенты, свободные радикалы, соединения, образующие аддукты с ДНК) и биологические мутагены (вирусы, мобильные генетические элементы) (Słoczyńska et al., 2014; Абилев, Глазер, 2021).

По механизму действия мутагены делят на:

– мутагены прямого действия, или реакционноспособные мутагены, непосредственно взаимодействующие с ДНК (азид натрия, акридин и его производные, доксорубицин, этилметансульфонат, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин(MNNG));

– мутагены косвенного действия, или промутагены, метаболизирующиеся в клетке в химические вещества, напрямую повреждающие ДНК (бенз(а)пирен (БП), N-ацетил-2-аминофлуорен (AAF), циклофосфамид).

Антимутагены – это вещества, способные нейтрализовать действие мутагенов или снизить частоту мутаций. В зависимости от механизма действия антимутагены классифицируются на:

– антиоксиданты (например, липоевая кислота, галловая кислота) — нейтрализуют активные формы кислорода (АФК);

– ингибиторы активации мутагенов — блокируют ферменты, превращающие промутагены в мутагены;

– перехватчики — связываются с мутагенами до их взаимодействия с ДНК (например, галловая кислота, цистеин);

– многофункциональные антимутагены — действуют через несколько механизмов (например, экстракты растений).

Антимутагены могут предотвращать рак и другие заболевания, связанные с повреждением ДНК. Некоторые антимутагены (например, производные ксантона)

исследуются как потенциальные химиопрофилактические агенты (Słoczyńska et al., 2014).

1.9.2 Мутагенез у бактерий

Для получения мутации в культуре бактерий требуется достаточно большое конечное число клеток, минимальная величина которого зависит от плотности культуры и скорости мутаций. Если частота мутаций высока, то можно использовать небольшой объём культуры в бульоне, а если скорость низкая, то необходимо использовать больший объём (Pore et al., 2008).

На скорость мутации может влиять фаза роста клетки. Для определения частоты мутаций обычно используют клетки, растущие в экспоненциальной фазе (Billington, McHugh, Gillespie, 1999). Однако авторы (Laurence, Volker, Siegfried, 2003) сообщают, что частота мутаций у *E. coli* повышена в стационарной фазе по сравнению с экспоненциальной фазой. Первоначальный инокулят клеток должен содержать клетки, которые находятся в одной фазе цикла роста, чтобы сравнить предполагаемые скорости.

Повышенная частота мутагенеза может ускорять адаптацию патогенов к клеткам хозяина или приобретение устойчивости к антибиотикам, и таким образом, представляет интерес для клинической микробиологии и органов здравоохранения (Galán и др., 2007). В то же время некоторые антибиотики в низких дозах могут увеличивать антибиотикоустойчивость бактерий, действуя как химические мутагены. В частности, диоксидин в концентрации $2,25 \times 10^{-5}$ М повышает частоту мутаций антибиотикорезистентности к рифампицину *E. coli* ATCC 25922 в 2 раза, *E. coli* MG1655 в 6 раз; к ципрофлоксацину *E. coli* ATCC 25922 в 6 раз; к азитромицину *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 в 4 раза (Мазанко и др., 2016).

1.9.3 Связь мутаций и RecA-опосредованного SOS-ответа.

Вызванное генотоксическими агентами повреждение ДНК может быть восстановлено посредством эксцизионной репарации нуклеотидов или

гомологичной рекомбинации (Cirz et al., 2005). RecA – это небольшой белок молекулярной массой 38 кДа, встречающийся почти у всех бактерий и сохранившийся у эукариот, в т.ч. человека; он специфически связывает одноцепочечную ДНК с образованием нуклеопротеиновой нити в присутствии АТФ (Michel, 2005; Ушаков, 2010). Филаменты RecA-одноцепочечной ДНК играют важную роль в этих процессах, катализируя внедрение гомологичной последовательности в разрыв цепи ДНК; также они играют важную роль в индуцированной мутации, связывая репрессор генов SOS-ответа LexA и вызывая его автопротеолитическую активность. После автопротеолиза LexA больше не репрессирует около 30 генов, белковые продукты которых способствуют восстановлению повреждений ДНК, задержке деления клеточного цикла и мутации (Cirz и др., 2005). В частности, достаточное снижение клеточной концентрации репрессора LexA приводит к транскрипции генов, кодирующих Pol II (*polB*), Pol IV (*dinB*) и Pol V (*umuD* и *umuC*), которые представляют собой три ДНК-полимеразы, которые необходимы для возникновения мутации в ответ на повреждение ДНК (Bull, Lombardo, Rosenberg, 2001; Pham et al., 2001; Tompkins et al., 2003).

1.9.4. Механизмы устойчивости к рифампицину

Резистентность микроорганизмов к антибиотикам может быть:

врождённой (отсутствие молекулы-мишени, ферментативная инактивация или низкая проницаемость мембран для антибиотика);

ненаследуемой (фенотипической) – изменения в метаболизме, приводящие к понижению чувствительности к антибиотику; формирование биоплёнок;

приобретённой – мутации или горизонтальный перенос генов (Martinez, 2014).

Приобретённая устойчивость *Micobacterium tuberculosis* к рифампицину обусловлена мутациями в участке RRDR (rifampin resistance determining region) гена *rpoB*, кодирующем 27 аминокислот. Возникновение мутаций в отличающихся у *E. coli* и *M. tuberculosis* парах оснований участка RRDR не приводит к резистентности к рифампицину, что может свидетельствовать об отсутствии значимых различий в

механизме формирования устойчивости у этих видов и проводить определение частоты мутаций к рифампицину на *E. coli* (Musser, 1995; Somoskovi, Parsons, Salfinger, 2001).

Мутация (D654Y) в гене *groB* *E. coli*. увеличивает осмоотолерантность и производство сукцината и др. органических кислот (Xiao et al., 2017).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 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 в хладоэлементе. Исследовалось влияние фуллеренов в растворах в концентрациях от 10⁻⁵ до 10⁻² г/л. Охлаждение требовалось для предотвращения закипания растворов солюбилизаторов и предотвращения снижения растворимости фуллерена в них вследствие нагрева растворов выше 320 К (Безмельницын, Елецкий, Окунь, 1998).

2.2 Синтез фуллеренола

Фуллеренол (полигидроксифуллерен) C₆₀(ОН)₃₆ был синтезирован методом без растворителя, по методике (Grebowski et al., 2020). Фуллеренол был получен путем измельчения чистого фуллерена C₆₀ (24 мг, 33,3 мкмоль), твердого NaOH (80 мг, 2 ммоль) и 200 мкл 10 М H₂O₂ (2 ммоль) пестиком в ступке на воздухе при комнатной температуре в течение 25 минут, затем проводилась дополнительная инкубация реакционной смеси при 60 °С в твердотельном термостате в течение 20 минут, неочищенная смесь растворялась в 16,7 мл деионизированной воды и проводился гидролиз в течение 24 часов. Затем смесь фильтровали через шприцевой фильтр с гидрофильной мембраной с размером пор 0,45 мкм. Фильтрат осаждали добавлением раствора 5 М NaCl и центрифугированием при 14100 g в течение 30 минут, затем промывали раствором 5 М NaCl три раза для полного удаления NaOH.

2.3 Расчёт концентрации веществ через оптическую плотность, определённую при помощи спектрофотометрии

Концентрацию растворённых фуллеренов C₆₀ определяли по измеренной с помощью UV/Vis-спектрофотометра BECKMAN COULTER DU® 800 оптической плотности раствора.

При прохождении через вещество свет поглощается. Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера, интенсивность I света, прошедшего через слой, и интенсивность I_0 света, падающего на него, связаны между собой соотношением:

$$I = I_0 e^{-kcl}, \quad (2.1)$$

где $e \approx 2,72$ - основание натурального логарифма, k - коэффициент пропорциональности, характерный для данного вещества и для данной длины волны, l - толщина поглощающего слоя, c - концентрация вещества, поглощающего свет.

Единица измерения концентрации поглощающего вещества $[c]$ = моль/л; толщина $[l]$ - см; молярного коэффициента поглощения $[\varepsilon_\lambda]$ = л/(моль·см).

Для практических приложений закон (1) записывается в виде:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\xi_\lambda cl}, \quad (2.2)$$

где величина ε_λ – молярный коэффициент поглощения на длине волны λ .

Показатель степени в формуле (2.2), взятый с обратным знаком, называют оптической плотностью.

$$D = \xi_\lambda cl \quad (2.3)$$

Для определения концентраций измеряли оптическую плотность D . Коэффициент пропускания T определяется как отношение интенсивностей прошедшего через образец и падающего на образец света:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.4)$$

Оптическую плотность D можно определить из формулы (2) и выразить через коэффициент пропускания:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} \quad (2.5)$$

T и D – безразмерные величины.

Из формулы (2.3) следует, что концентрация поглощающего вещества равна:

$$c = \frac{D}{\xi_{\lambda} l} \text{ [моль/л]}. \quad (2.6)$$

Измерение спектров поглощения и оптической плотности суспензий C_{60} измеряли относительно растворов соответствующих растворителей.

2.4 Измерение размеров наночастиц фуллерена C_{60} методом динамического рассеяния света

Отбирали супернатант озвученных водных растворов фуллерена в концентрации 1 г/л с солюбилизаторами (TWEEN 80 или сурфактин) после центрифугирования на приборе ELMİ CM-50 со скоростью 14000 об/мин в течение 1 мин. В результате крупные агрегаты C_{60} оказались на дне пробирки, а мелкие остались в растворе. Концентрацию растворённых фуллеренов C_{60} измеряли с помощью UV/Vis-спектрофотометра BECKMAN COULTER DU® 800 по оптической плотности раствора. Поскольку C_{60} 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 C_{60} в растворах определяли методом DLC (динамического рассеивания света) (Лупанова, 2013) на приборе Nano-flex фирмы Microtrack.

2.5 Оценка экспрессии с помощью биолюминесцентного теста

Изучение биологических свойств фуллерена C₆₀ проводилось на модельном биологическом объекте – *Escherichia coli*.

Для изучения антиоксидантной и ДНК-протекторной активности проводились биолюминесцентные тесты. 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*. Список использованных в работе штаммов и промоторов-регуляторных элементов репортёрных генов представлен в таблице 2.

Таблица 2. Штаммы и промоторы, являющиеся регуляторным элементом репортёрных генов биолюминесцентных биосенсоров *E. coli* MG1655.

Штамм	Промотор	Продукт, функция гена	Детектируемое вещество/ явление:	Индуктор
<i>E. coli</i> MG1655 (pFabA)	fabA	FabA (3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase) ацилпереносящий белок, ключевой фермент в образовании двойных связей в жирных кислотах мембран (Heath, Rock, 1996)	Повреждения мембран, экспрессия генов биосинтеза и репарации мембран	Пента-хлор-фенол
<i>E. coli</i> MG1655 (pRecA)	recA	RecA белок, активация генов раннего SOS-ответа (Butala et al., 2012), гомологичной рекомбинации (Erental, Sharon, Engelberg-Kulka, 2012)	Повреждения ДНК	Диоксиды н
<i>E. coli</i> MG1655 (pColD)	cda (colicin D activity)	Колицин D (Ghersa et al., 1988), активация генов позднего SOS-ответа (Butala et al., 2012)	Повреждения ДНК	Диоксиды н

Штамм	Промотор	Продукт, функция гена	Детектируемое вещество/ явление:	Индуктор
<i>E. coli</i> MG1655 (pKatG)	<i>katG</i>	Каталаза-пероксидаза фермент с каталазной и пероксидазной активностью (Singh et al., 2008)	Перекись/ окислительный стресс	Перекись водорода
<i>E. coli</i> MG1655 (pSoxS)	<i>soxS</i>	Транскрипционный активатор регулона супероксидного ответа, включающий не менее 10 генов, таких как <i>sodA</i> (Amabile-Cuevas, Demple, 1991; Blattner et al., 1993)	супероксид/ окислительный стресс	Паракват (метил виологен)

Для подбора солубилизаторов и оценки их влияния на экспрессию гена *fabA*, и следовательно, детергентного действия ПАВ использовали биосенсор повреждения мембран *E. coli* MG1655 (pFabA) (Sazykin и др., 2016; Khmelevtsova и др., 2024). Пентахлорфенол – известный детергент и биоцид (Fiege et al., 2000), был использован как положительный контроль для оценки влияния на бактерий мембранотропных веществ.

Для изучения биологического влияния фуллерена C₆₀ в условиях генотоксического стресса были использованы штаммы *E. coli* MG1655 с SOS-индуцибельными промоторами P_{recA} и P_{colD}, детектирующими проникновение в клетку ДНК-повреждающих агентов, для изучения окислительного стресса – с промоторами P_{katG} и P_{soxS}, индуцируемыми пероксидами и супероксид-анион-радикалом соответственно (Vazhenov и др., 2023).

Промотор P_{recA} частично открыт в отсутствие генотоксического стресса, т.к. белок RecA необходим для осуществления гомологичной рекомбинации.

Промотор ColD обладает по сравнению с p_{recA} более высоким коэффициентом индукции за счёт меньшей открытости SOS-промотора P_{cdsA} в отсутствие стресса. Помимо SOS-регуляции репрессором I_{exA}, экспрессия оперона Colicin D контролируется репрессором (cdr), котранскрибирующимся с *cdsA*, но

терминирующимся раньше и предотвращающим перепроизводство колицина D в отсутствие стресса (Ghersa и др., 1988).

В качестве индукторов генотоксического стресса использовали диоксидин в концентрации $2,25 \cdot 10^{-5}$ М, окислительного стресса – перекись водорода 10^{-3} М и паракват 10^{-3} М, в аэробных условиях вызывающий образование супероксидного радикала O_2^- (Hassan, Fridovich, 1979).

1,4-диоксид 2,3-хиноксалиндиметанола (диоксидин) – антибактериальный препарат ДНК-повреждающего механизма действия за счёт генерации активных форм кислорода (Попов и др., 2013), в т. ч. супероксида (Чистяков В. А. и др., 2015) и, возможно, перекиси водорода (Мазанко и др., 2016).

Штаммы растили на лизогенной среде (LB) по Миллеру (10 г/л пептона, 10 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта) с добавлением ампициллина 100 мкг/мл (Маниатис, Фрич, Сэмбрук, 1984). Ночную культуру, в зависимости от штамма, разводили свежей LB с ампициллином до плотности 0,01—0,1 единицы Мак-Фарланда, измерения плотности культуры проводились при помощи денситометра DEN-1B («Biosan»), затем растили в термостате при 37 °С 1,5 ч, после чего аликвоты этой культуры (в экспериментах с веществами-протекторами по 80 мкл, по 90 мкл – в отсутствие протекторов) переносили в стерильные ячейки микропланшета. Контрольными были ячейки с добавлением в культуру только солюбилизаторов – сурфактина либо TWEEN 80 (2%) (контроль растворителя). После добавления сурфактина, TWEEN 80 и растворов фуллерена дополнительно инкубировали в течение 30 мин в 96-луночном микропланшете в термостате при температуре 37 ± 0.2 °С. Затем в ячейки планшета добавлялись индукторы: пероксид водорода в концентрации 10^{-3} М; диоксидин $2,25 \times 10^{-5}$ М.

Микропланшет помещали в мультимодальный ридер FLUOstar Omega с термостатом и инкубировали при 37 °С. Интенсивность биолюминесценции измерялась каждые 10 мин.

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

$$I = \frac{L_e}{L_c} - 1 \quad (2.7)$$

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

L_c – интенсивность люминесценции контрольной пробы (в условных единицах).

Протекторную активность (P) вычисляли по формуле:

$$P = \left(1 - \frac{I_e}{I_c}\right) \times 100\% \quad (2.8),$$

где I_e и I_c – коэффициенты индукции люминесценции в присутствии и отсутствии растворов наночастиц, соответственно.

2.6 Измерение мутности культур бактерий с помощью спектрофотометра

Для определения влияния диапазона концентраций сурфактина на кривые роста *E. coli* ночные культуры биолюминесцентных штаммов растили, как и для биолюминесцентного теста, затем аликвотировали по 90 мкл в стерильные ячейки микропланшета. Деионизированная вода, растворы сурфактина и пентахлорфенола 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.

2.7 Определение антимуtagenной активности

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

Контроль: 100 мкл стерильного физраствора и: 100 мкл стерильного физраствора; 100 мкл сурфактина в стерильном физрастворе (контроль растворителя); 100 мкл C_{60} 0,1 г/л в сурфактине в стерильном физрастворе;

Опыт: 100 мкл $2,25 \cdot 10^{-4}$ М индуктора мутагенеза (диоксидина) в стерильном физрастворе и: 100 мкл стерильного физраствора; 100 мкл сурфактина в

стерильном физрастворе; 100 мкл C_{60} 0,1 г/л в сурфактине в стерильном физрастворе.

На следующий день разводили свежей LB до 1 единицы МакФарланда (3×10^8 КОЕ), измеряя оптическую плотность с помощью денситометра DEN-1В 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 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:

$$A = \left(1 - \frac{w_p}{w_c}\right) 100\%, \quad (2.9)$$

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

2.8 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:

$$S_{\bar{z}} = |\bar{I}| \sqrt{\left(\frac{s_{Le}}{Le}\right)^2 + \left(\frac{s_{Lc}}{Lc}\right)^2} \quad (2.10)$$

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

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

$$\left(\bar{I} - t_{кр} \times \frac{s}{\sqrt{n}}; \bar{I} + t_{кр} \times \frac{s}{\sqrt{n}}\right) \quad (2.11)$$

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

Для анализа зависимости протекторного эффекта от концентрации использовался корреляционный анализ с использованием методов параметрической статистики, а именно линейного коэффициента корреляции (коэффициента Пирсона). Линейный коэффициент корреляции характеризует тесноту и направление связи между двумя коррелируемыми признаками в случае наличия между ними линейной зависимости.

Линейный коэффициент корреляции можно вычислить по формуле:

$$r_{x,y} = \frac{\sum(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (2.12)$$

Линейный коэффициент корреляции изменяется в пределах от -1 до 1 : $[-1 \leq r \leq 1]$. Интерпретацию выходных значений коэффициента корреляции осуществляли согласно (Королькова, Минина, 2017).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Изучение распределения размеров наночастиц фуллерена C₆₀ методом динамического рассеяния света

Результаты измерения размеров агрегатов фуллерена C₆₀ в 2 % растворе TWEEN 80 показаны на рисунке 6. 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. Необходимо было убедиться, что отклонение в размерах кластеров было достаточно малым, поскольку фуллерены могут иметь разные свойства в зависимости от размера агрегатов, например, в статье (Lyon et al., 2006) было обнаружено, что больший размер агрегата связан с более низкой антибактериальной активностью.

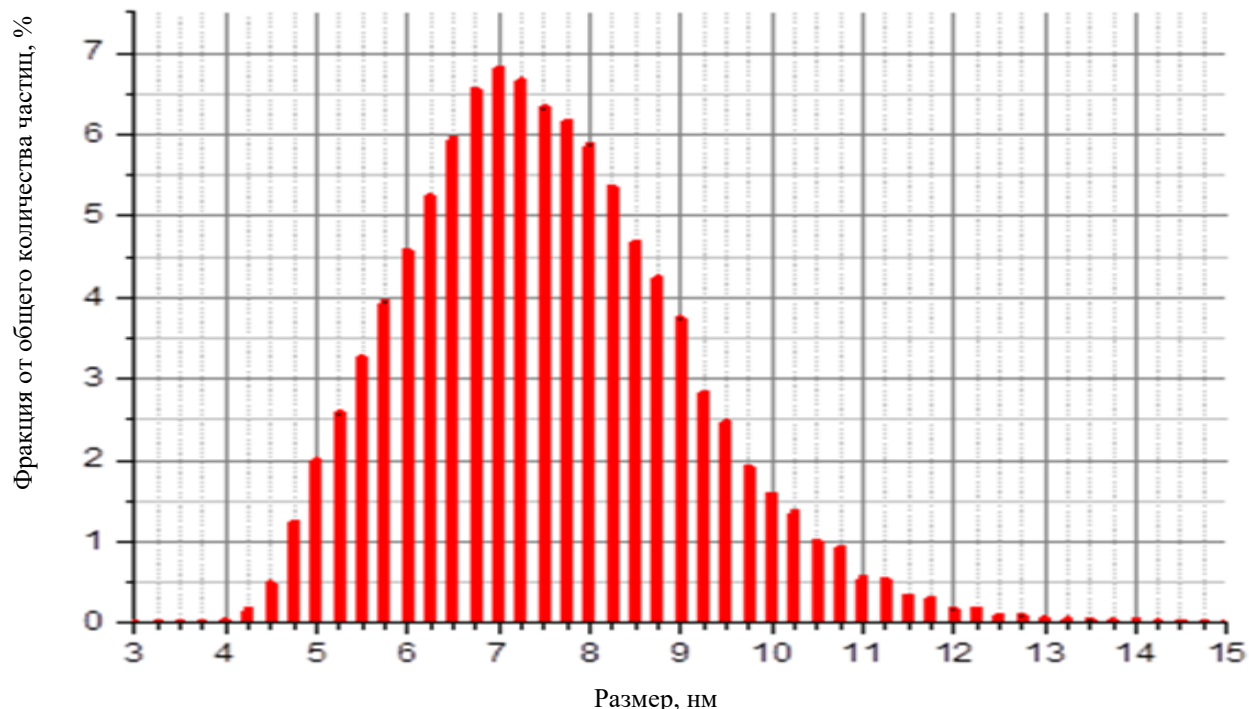


Рисунок 6 – Распределение агрегатов фуллерена C₆₀ по размерам в 2 % растворе TWEEN 80 в воде.

Распределение размеров наночастиц фуллерена C_{60} в сурфактине показано на рисунке 7. Большинство агрегатов имеют размеры от 100 до 1000 нм, средний диаметр 302 нм, т.е. с физической точки зрения C_{60} в сурфактине является суспензией субмикронных частиц. Однако, в биомедицине к наночастицам относят и агрегаты диаметром до нескольких сотен нанометров, мелкодисперсность которых достаточна для обеспечения повышенного мембранотропного эффекта (Vauthier, Bouchemal, 2009).

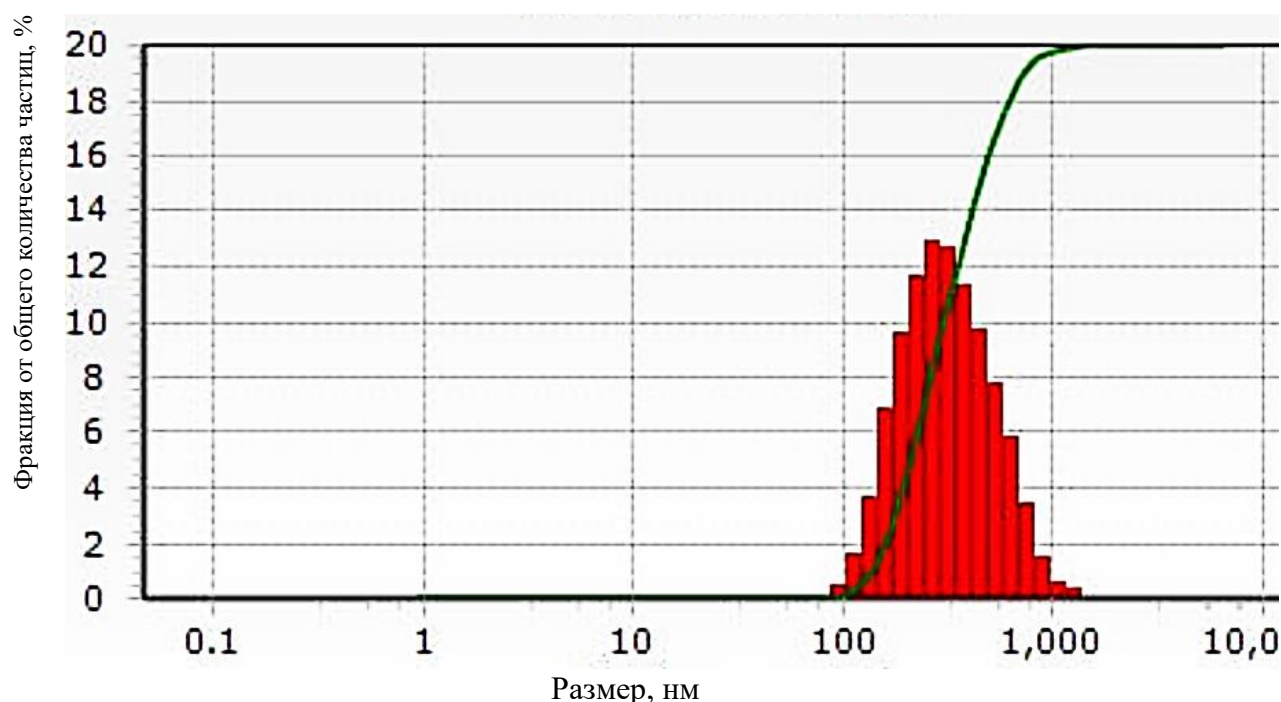


Рисунок 7 – Распределение агрегатов фуллерена C_{60} по размерам в водном растворе сурфактина 312,5·мг/л.

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.

3.2. Синтез и характеристика фуллеренола

Перед синтезом фуллеренола измеряли поглощение суспензии исходного C_{60}

10 мг/л в воде в УФ-видимой области спектра. Результаты измерения спектра поглощения фуллерена C_{60} в УФ-видимой области спектра представлены на рисунке 8. На рис.9 присутствуют характерные пики поглощения фуллерена C_{60} на 265 и 345 нм (Franskevych et al., 2017).

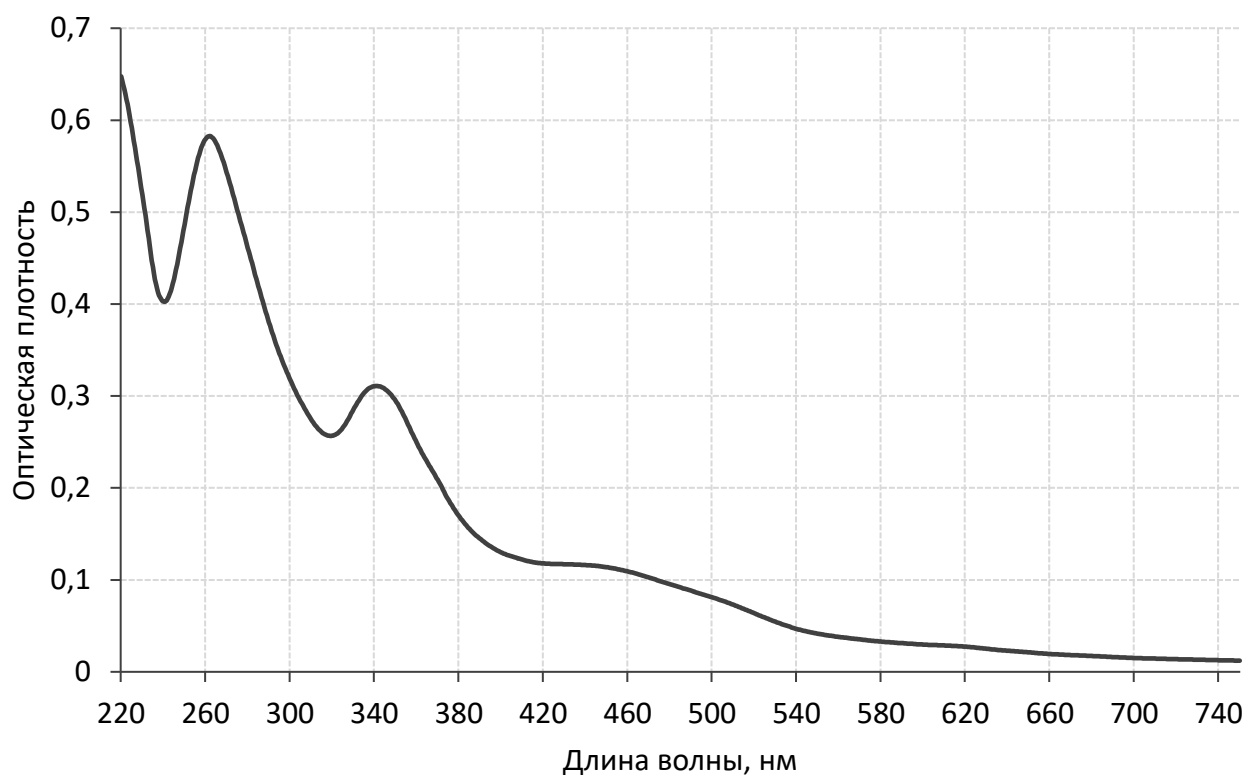


Рисунок 8 – Спектр поглощения в УФ-видимой области спектра суспензии фуллерена C_{60} 10 мг/л в деионизированной воде.

После проведения реакции гидроксирования в отсутствие растворителя и последующих фильтрации и очистки измеряли спектр поглощения в УФ-видимом диапазоне с помощью мультимодального ридера Fluostar Omega, измеряя оптическую плотность супернатанта (рис. 9). Можно видеть изменение спектра поглощения в виде изменения кривизны спектра на длине волны 280 нм с исчезновением характерных для фуллерена C_{60} пиков на 265 и 345 нм, что согласуется со спектрами из литературы (Lichota, Szabelski, Krokosz, 2022) (рис. 10).

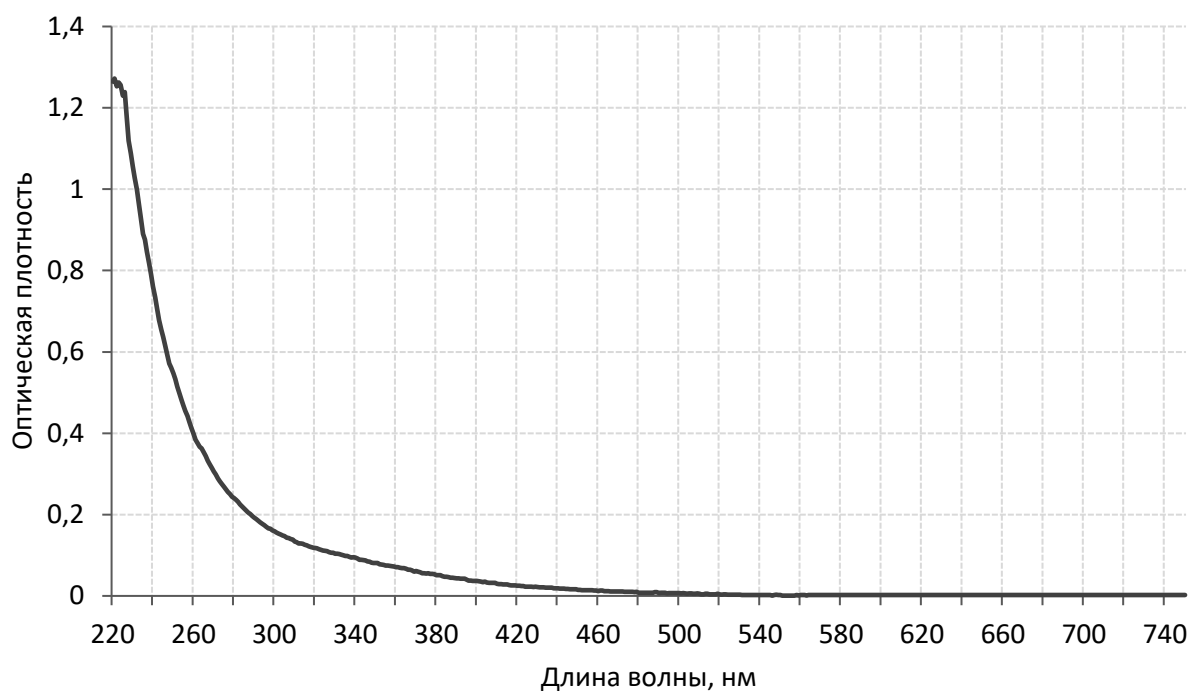


Рисунок 9 – Спектр поглощения раствора полученного фуллеренола в деионизированной воде в УФ-видимой области спектра.

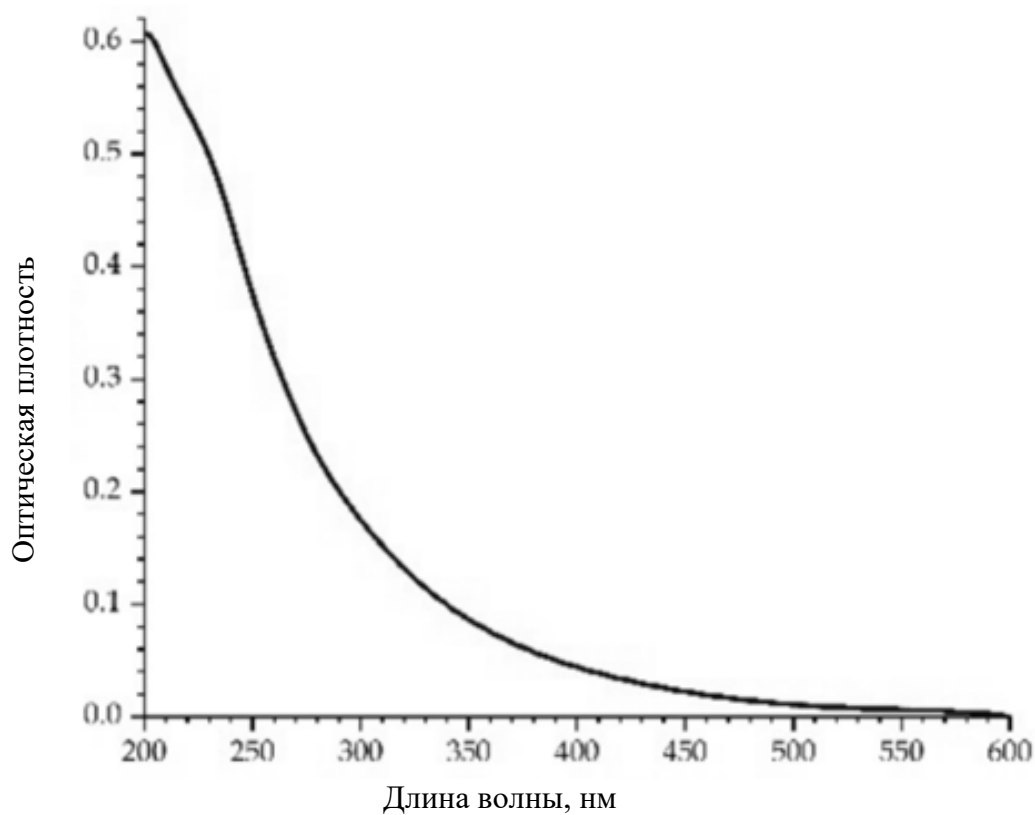


Рисунок 10 – Спектр поглощения фуллеренола $C_{60}(OH)_{36}$ в фосфатном буфере в УФ-видимой области спектра (Lichota, Szabelski, Krokosz, 2022)

Высушенный нанопорошок фуллеренола растворяли для дальнейших экспериментов в стерильной деионизированной воде или в водном растворе сурфактина 312,5·мг/л.

Фуллеренол 1,3 г/л в воде и водном растворе сурфактина не выпадал в осадок, вследствие кислотности раствора (рН4,5) подщелачивали NaOH до рН7 и доводили растворителями до концентрации 1 г/л.

3.3 Определение концентраций сурфактина для использования в качестве ПАВ в биолюминесцентных тестах

Для определения методом фотометрии с помощью мультимодального планшетного ридера FLUOstar Omega биосовместимой концентрации сурфактина, не оказывающей влияния на скорость роста бактериальных биосенсоров были использованы биолюминесцентные штаммы *E. coli* MG1655 с промотором pFabA (рис. 11–12). Концентрация сурфактина 31,25·мг/л не оказывает влияния на скорость роста относительно контроля – деионизированной воды (diH₂O), более высокие концентрации статистически значимо снижают скорость роста, прямой зависимости снижения от дозы не наблюдается. Пентахлорфенол (ПХФ) – положительный контроль подавляющих рост бактерий мембранотропных веществ (рис. 13).

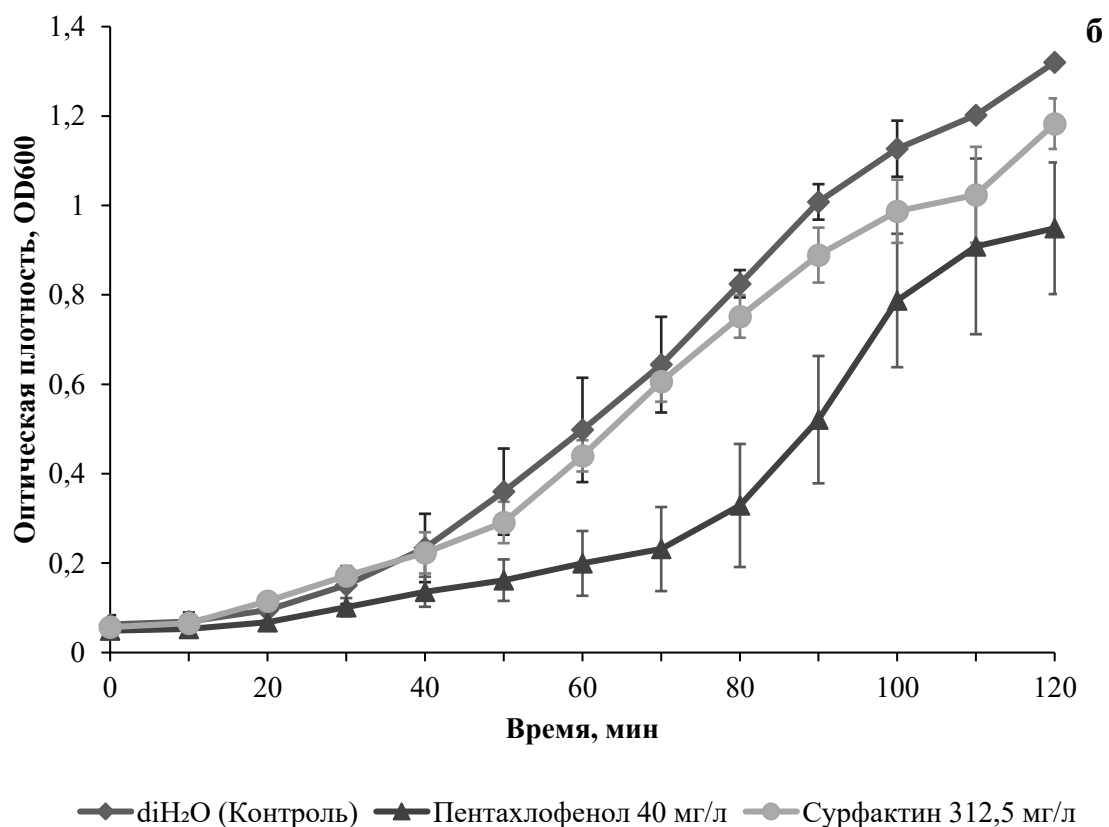
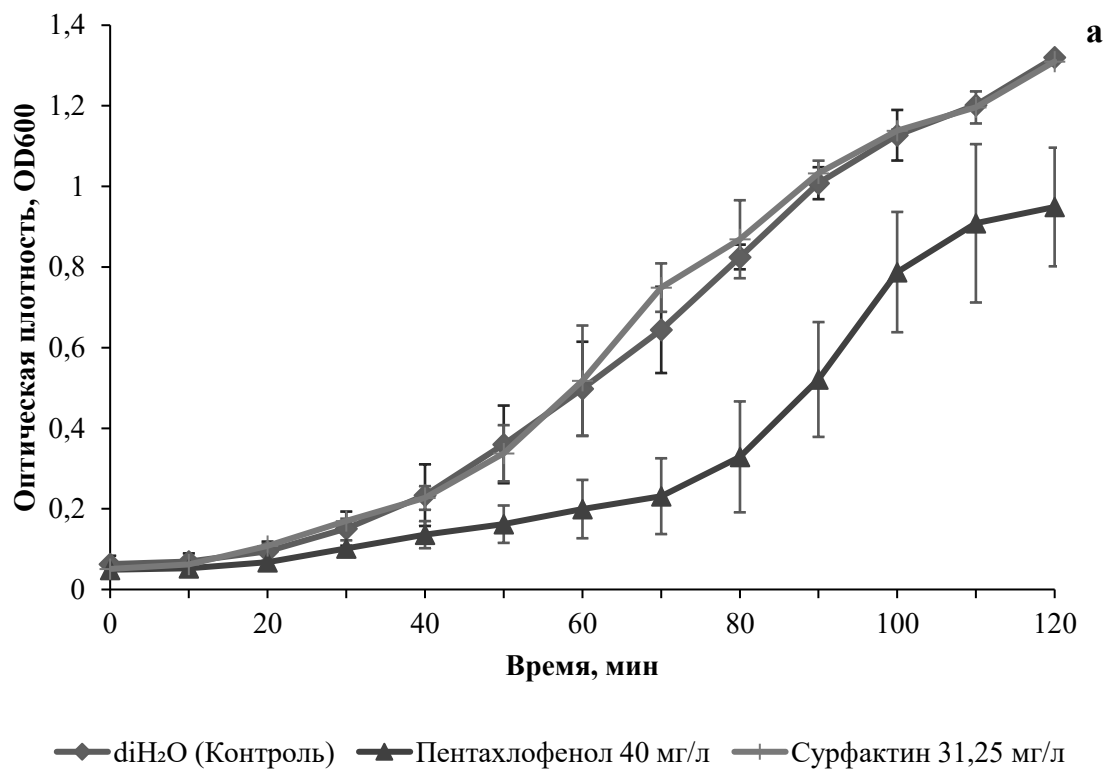


Рисунок 11 а, б, – Влияние сурфактина 31, 25 и 312, 5 мг/л на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pFabA), $p < 0,05$ (а).

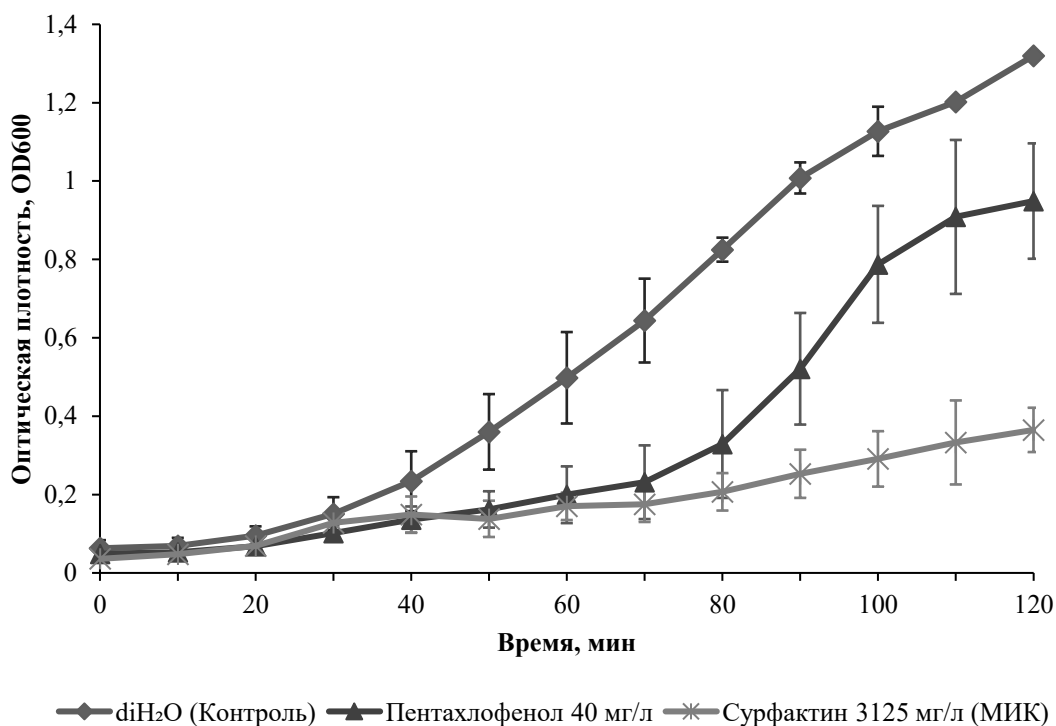


Рисунок 12 – Влияние сурфактина 3125 мг/л на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pFabA), $p < 0,05$

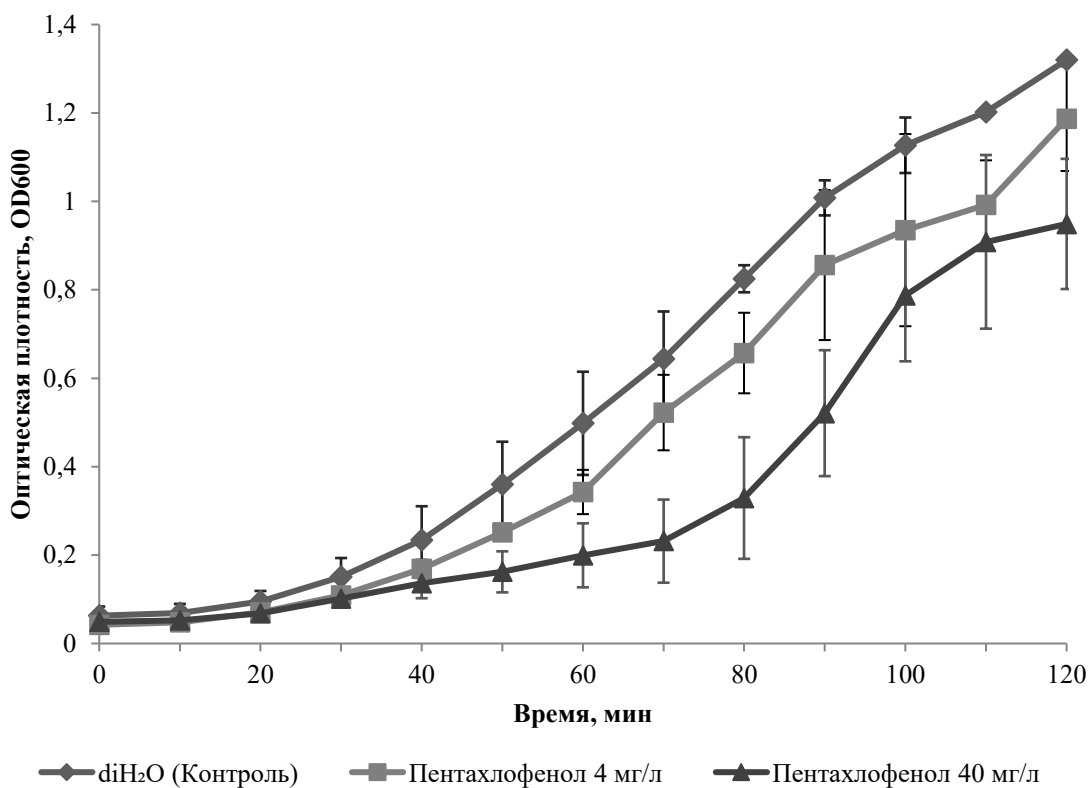


Рисунок 13 – Влияние концентраций пентахлорофенола на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pFabA), $p < 0,05$.

Значимое повышение экспрессии гена *fabA* штамма *E. coli* MG1655 (pFabA) относительно контроля, а следовательно, повреждения мембран, оказали концентрации сурфактина 312,5 и 3125 мг/л (рисунок 14).

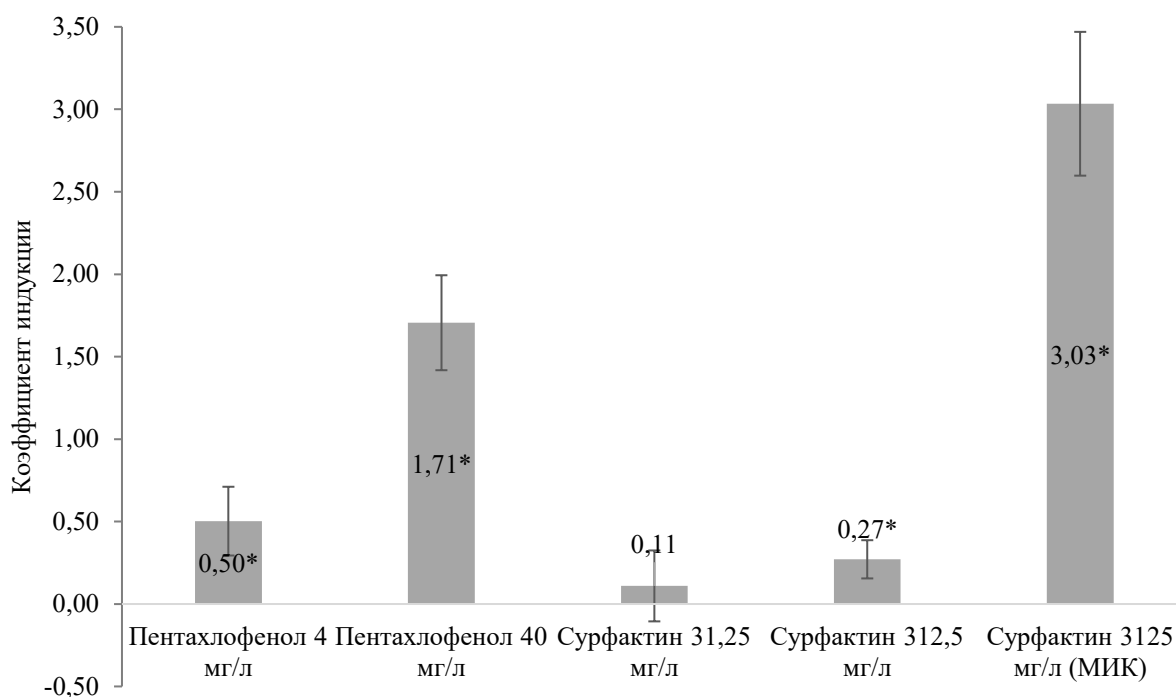


Рисунок 14 – Максимальная индукция экспрессии гена *fabA* штамма *E. coli* MG1655 (pFabA) концентрациями сурфактина и пентахлорфенола, $p < 0,05$. МИК – минимальная ингибирующая концентрация.

Для определения влияния увеличения концентраций сурфактина в опытах с генотоксическими веществами был поставлен билюминесцентный тест с использованием биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA), концентрация диоксида 2,25·10⁻⁵ М, в ходе которого происходило измерение оптической плотности культуры и билюминесценции каждые 10 мин. Все использованные концентрации сурфактина в этом опыте выше критической концентрации мицеллообразования (17 мг/л) (Sen, Swaminathan, 2005) и ниже минимальной ингибирующей концентрации (3125 мг/л) (рис. 15–18).

Концентрация сурфактина 31,25 мг/л не оказала влияния на скорость роста в присутствии и отсутствии диоксида, концентрации 100 мг/л и выше статистически значимо снижают скорость роста, прямой зависимости снижения от дозы не наблюдается (рисунок 19).

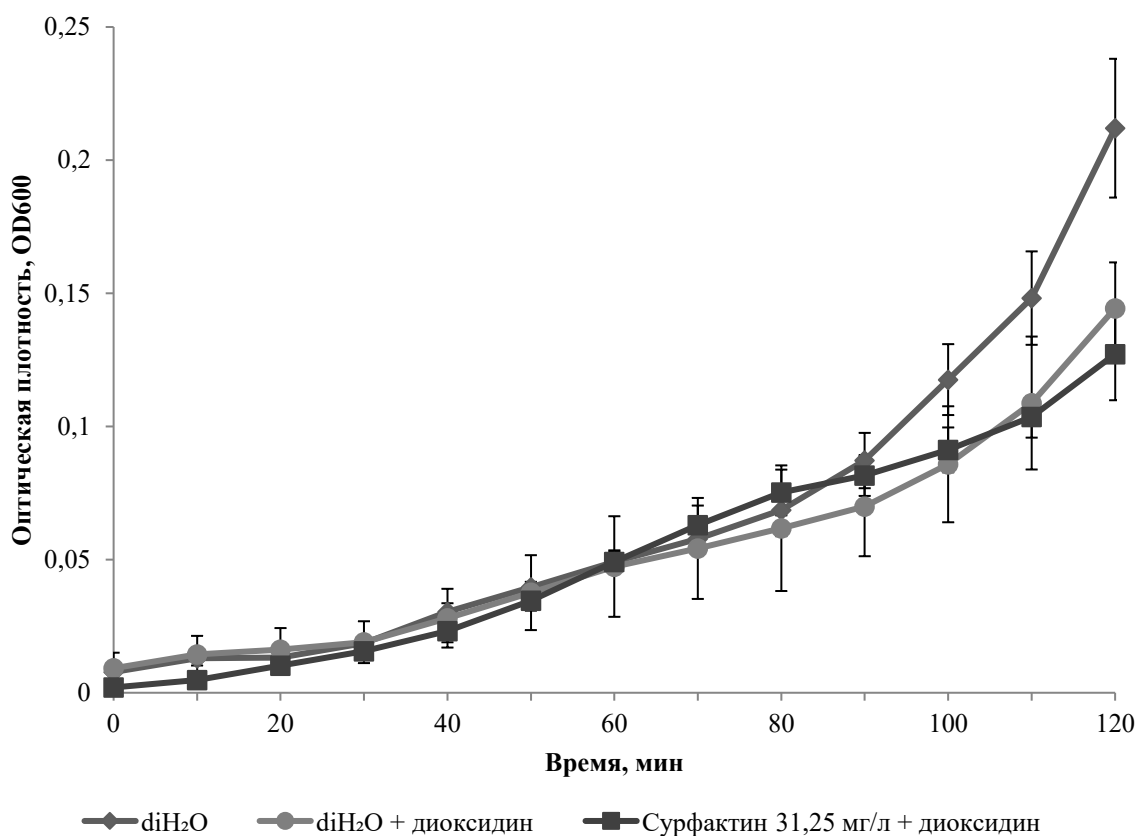


Рисунок 15 – Влияние сурфактина 31,25 мг/л на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии диоксидина (б).

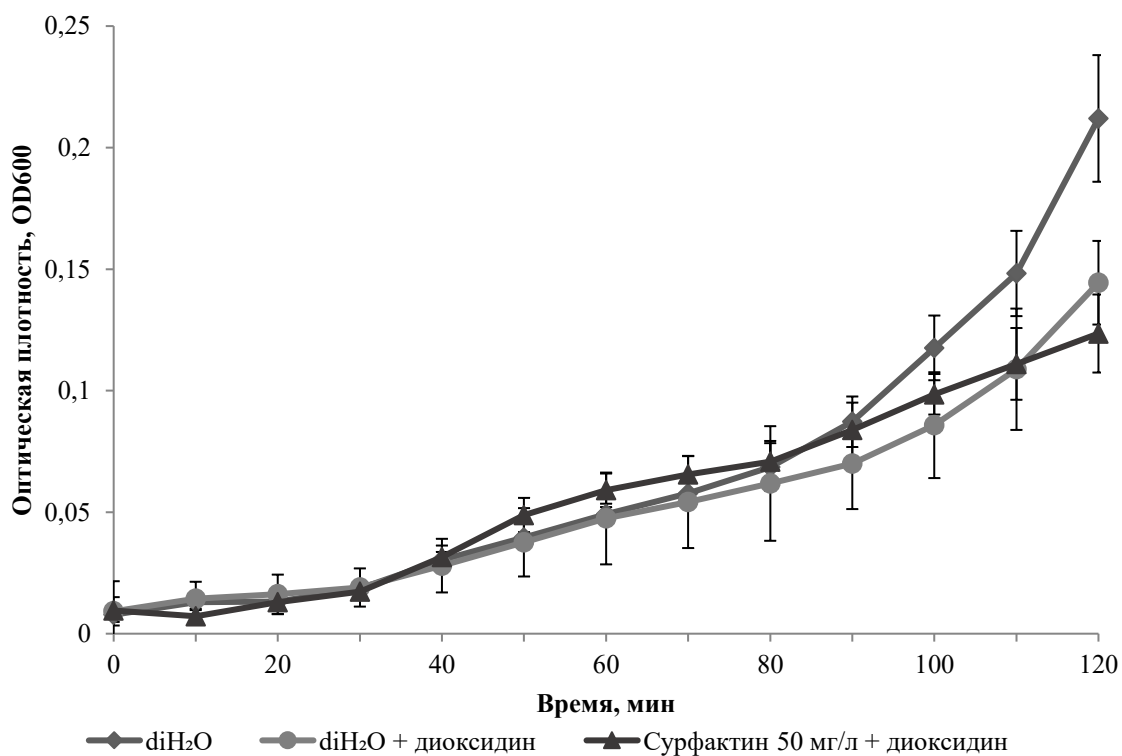


Рисунок 16 – Влияние сурфактина 50 мг/л на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии диоксидина.

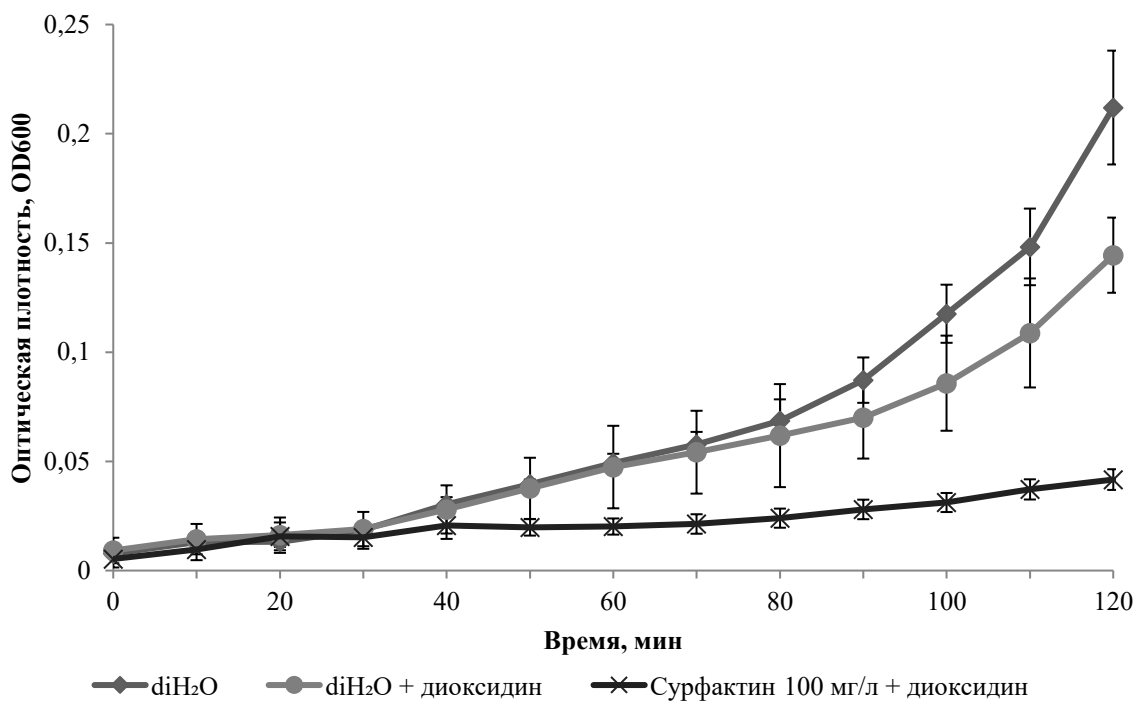


Рисунок 17 – Влияние сурфактина 100 мг/л на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии диоксидина (б).

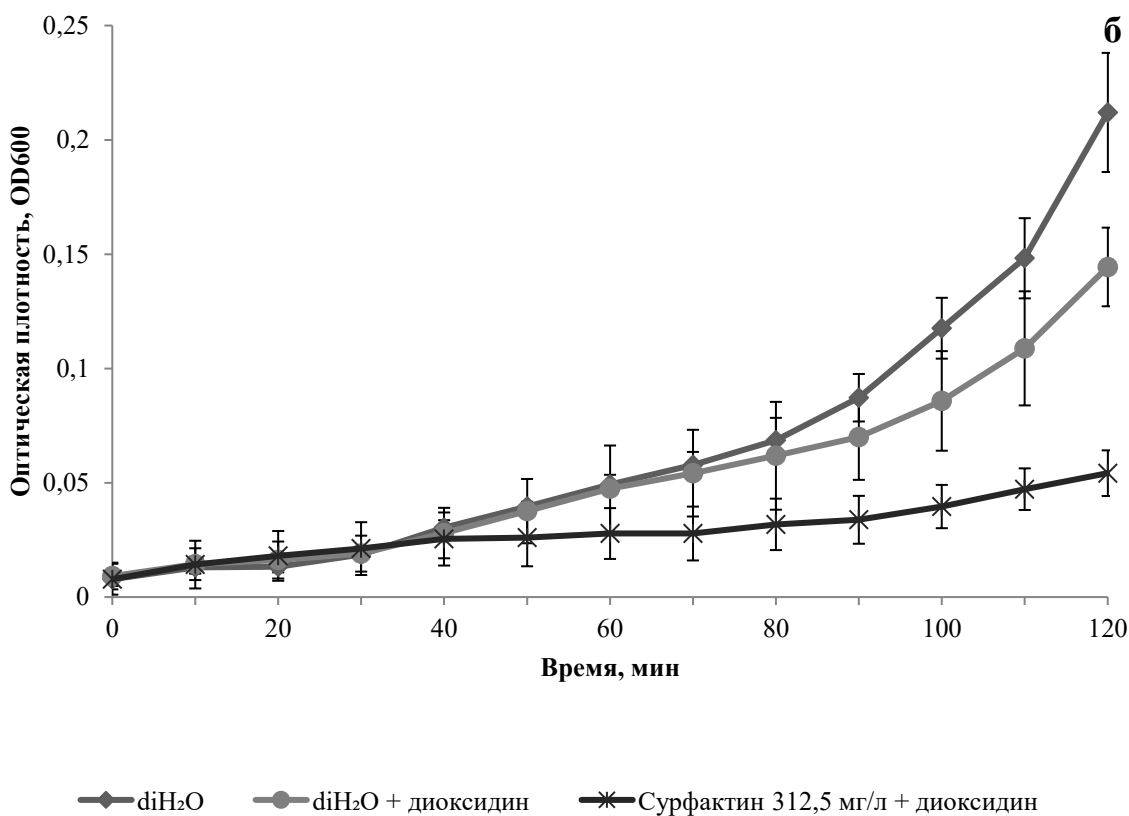


Рисунок 18 – Влияние сурфактина 312,5 мг/л на рост биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии диоксидина (б).

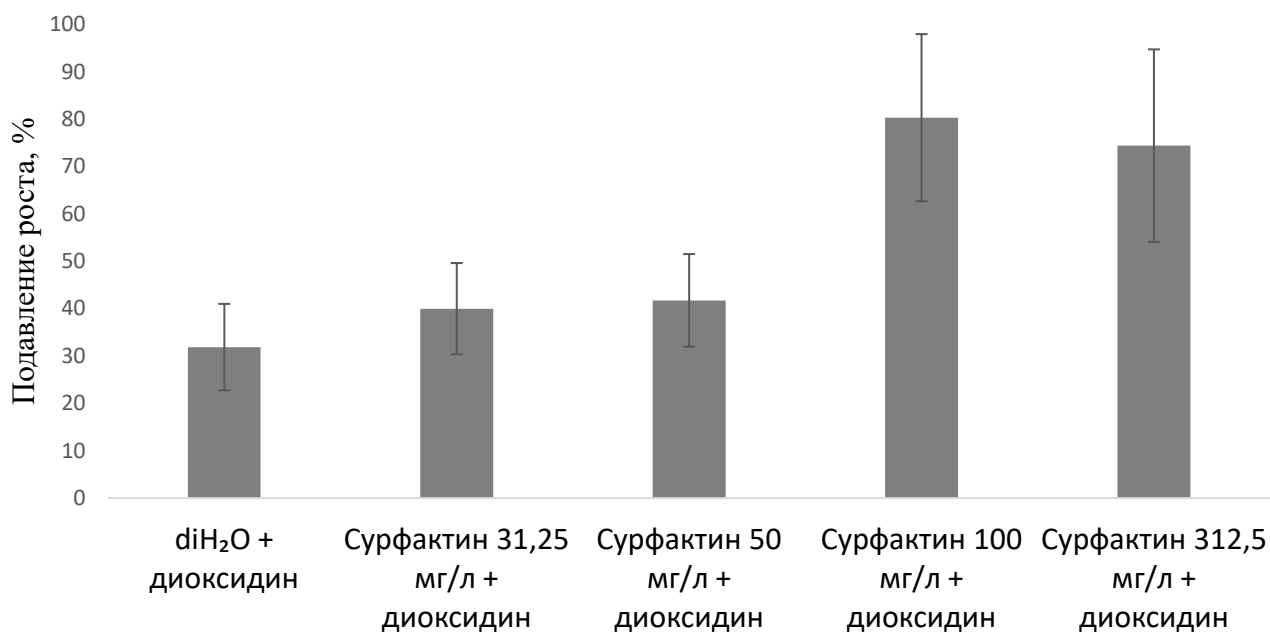


Рисунок 19 – Влияние сурфактина на подавление роста в конечной точке (120 мин) биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии диоксида.

Статистически значимое повышение экспрессии гена *recA* относительно диоксида оказывали концентрации сурфактина 50 мг/л и 312,5 мг/л (с добавлением диоксида). Необходимо отметить, что повышение концентрации сурфактина в пределах биосовместимых не оказывает протекторного действия, а усиливает генотоксическое действие диоксида (рис. 20 – 23).

Исходя из полученных данных, для использования в качестве солубилизатора в опытах с токсическими веществами достаточно использовать концентрацию сурфактина 31,25 мг/л, для наибольшего увеличения проницаемости мембран для протекторов и лекарств без снижения скорости роста – 312,5 мг/л. Дальнейшее увеличение концентрации сурфактина не приведёт к пропорциональному увеличению количества мицелл в единице объёма, т.к. на плато мицеллообразования сурфактин выходит при концентрации 0.28 мМ (290,2 мг/л) (Нап и др., 2008).

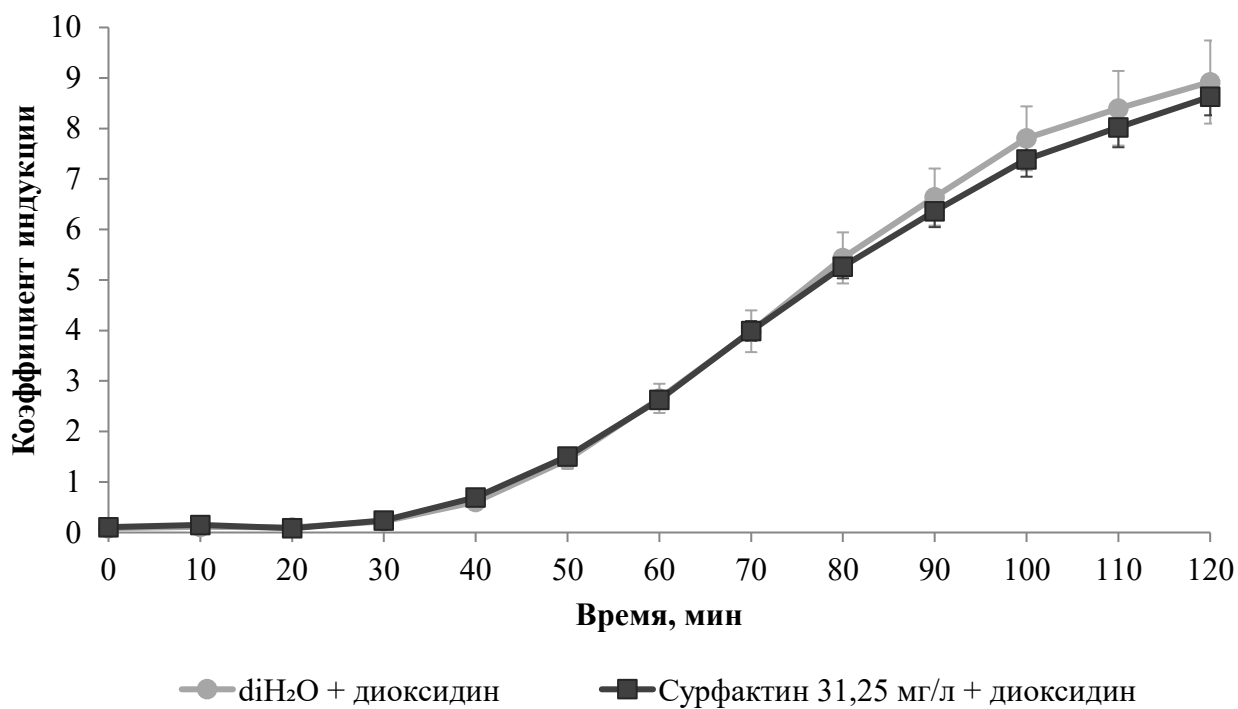


Рисунок 20 –Индукция экспрессии гена *recA* биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии сурфактина 31,25 мг/л и диоксидина.

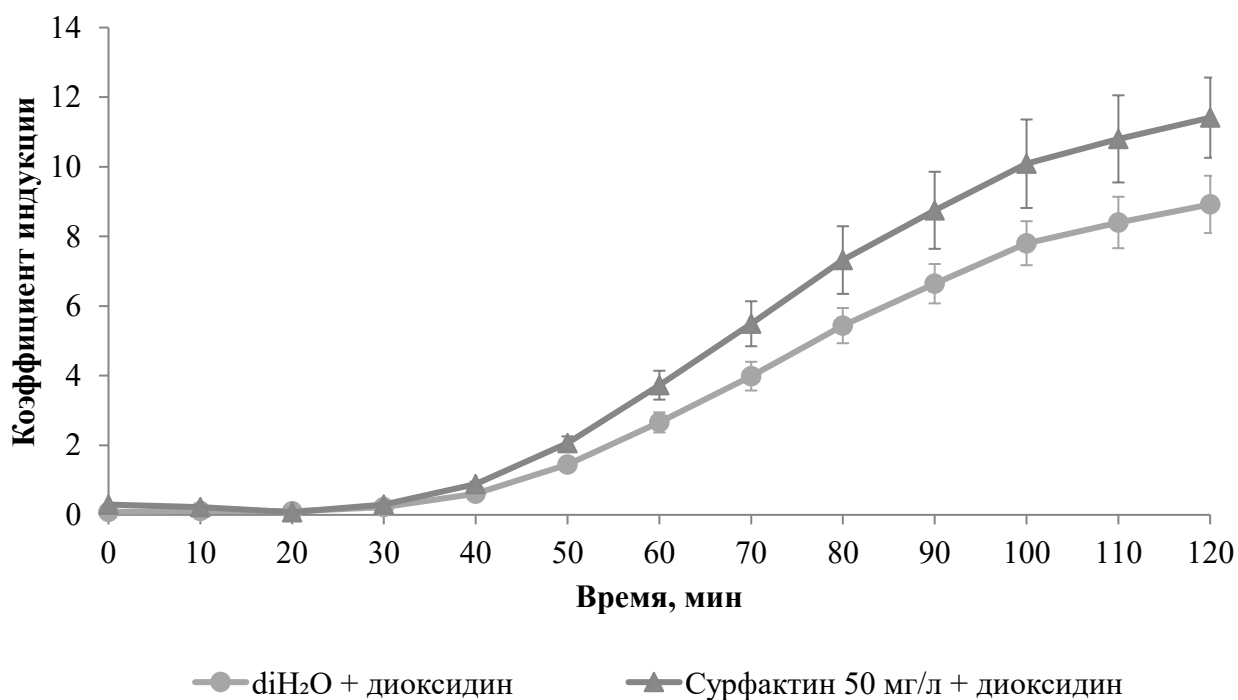


Рисунок 21 – Индукция экспрессии гена *recA* биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии сурфактина 50 мг/л и диоксидина.

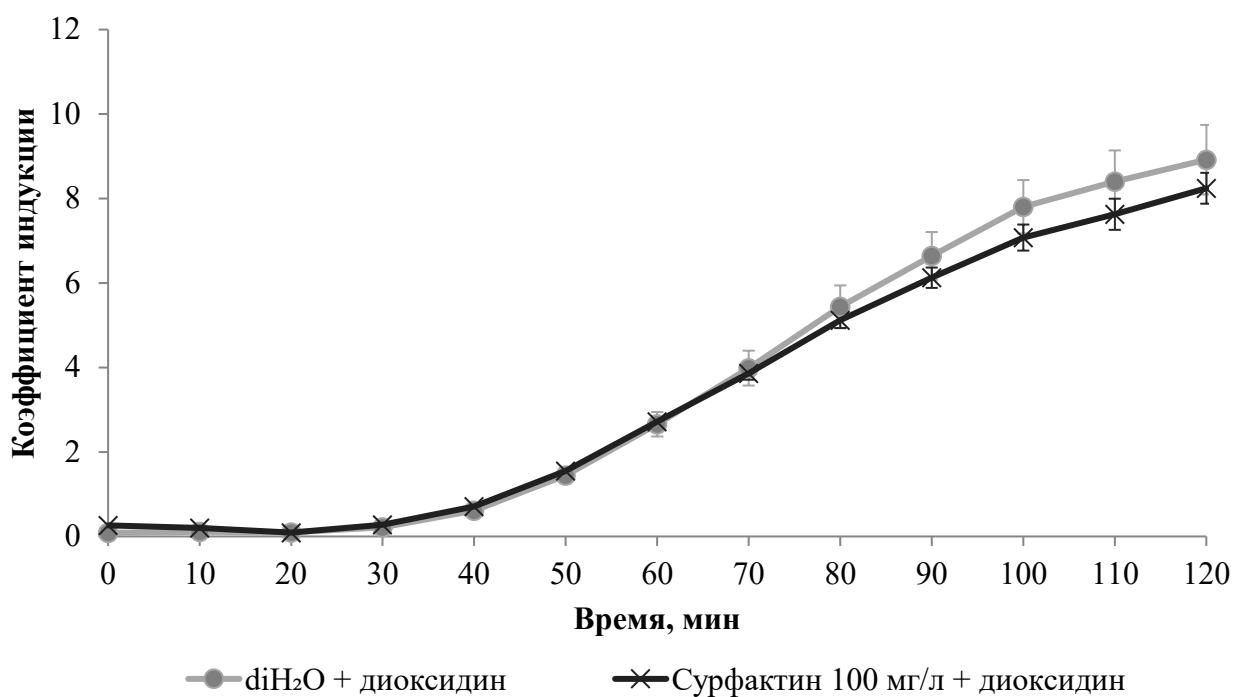


Рисунок 22 – Индукция экспрессии гена *recA* биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии сурфактина 100 мг/л и диоксидина.

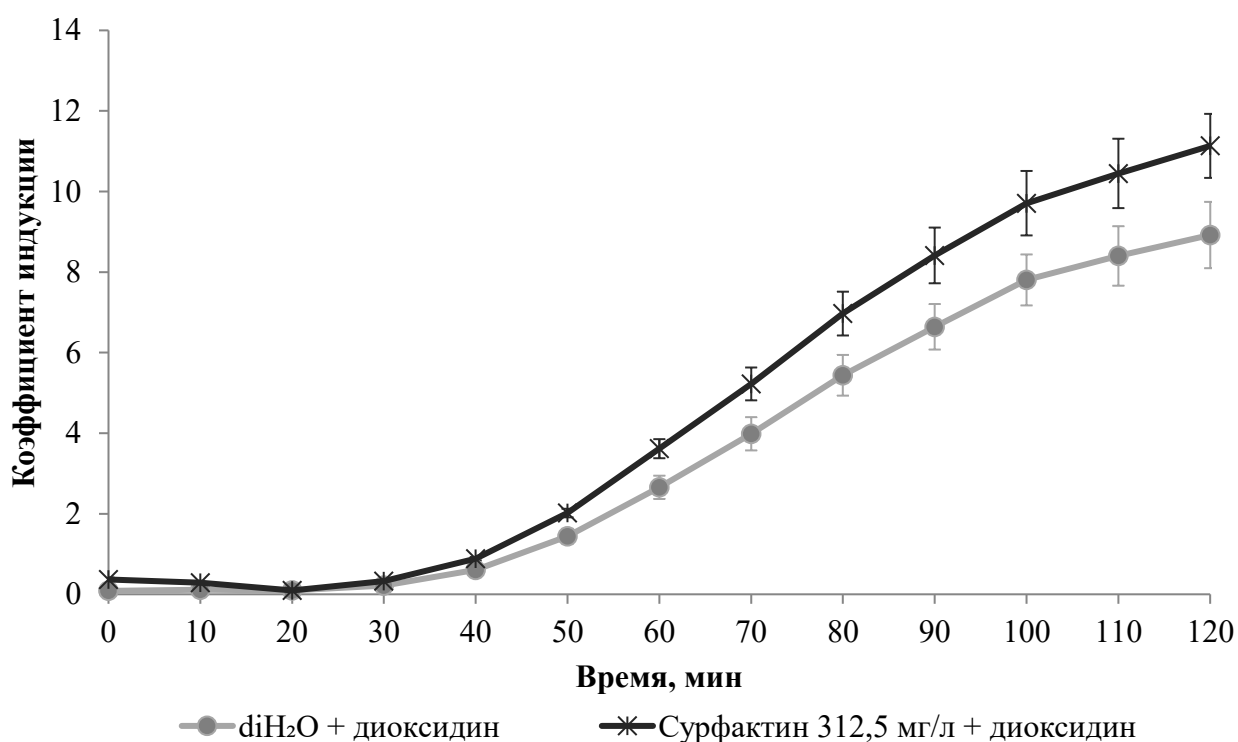


Рисунок 23 – Индукция экспрессии гена *recA* биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) в присутствии сурфактина 312,5 мг/л и диоксидина.

3.4 Влияние C₆₀ на экспрессию генов АОС и SOS-ответа

Для изучения биологического влияния фуллерена C₆₀ 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 C₆₀ 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 C₆₀ в TWEEN 80 (2%) не оказали статистически значимого влияния на индукцию экспрессии гена *recA* относительно контроля растворителя. К тому же TWEEN 80 оказывал влияние на индукцию экспрессии *recA* относительно контроля (рисунок 24–27).

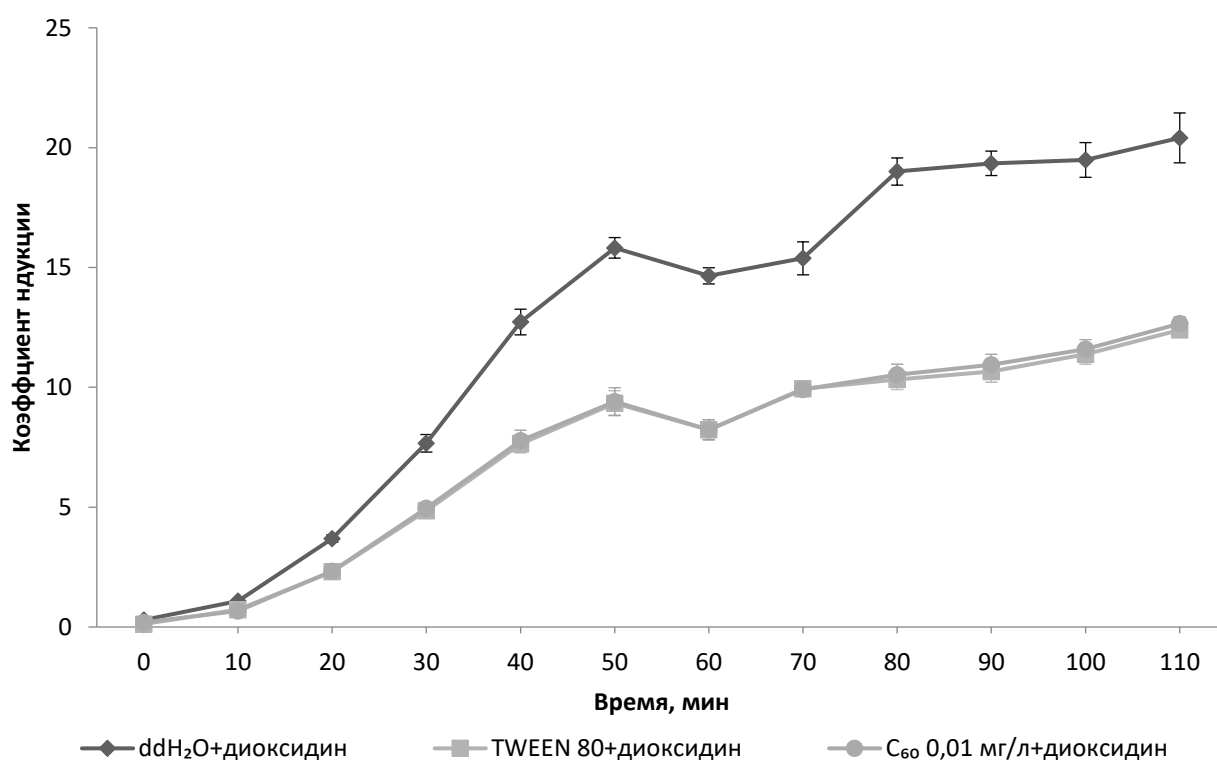


Рисунок 24 – Влияние фуллерена C₆₀ 0,01 мг/л в 2 % водном растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *recA* диоксидином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA), $p < 0,05$.

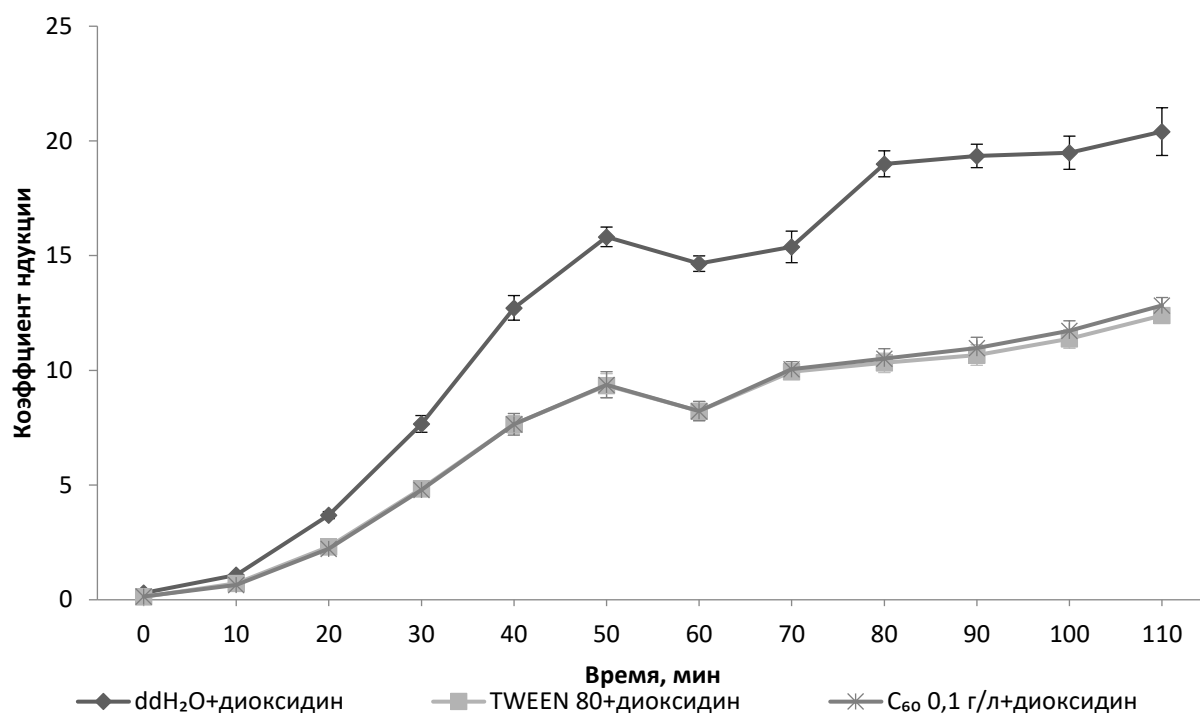


Рисунок 25 – Влияние фуллерена C₆₀ 0,1 мг/л в 2 % водном растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *recA* диоксидином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA), p<0,05.

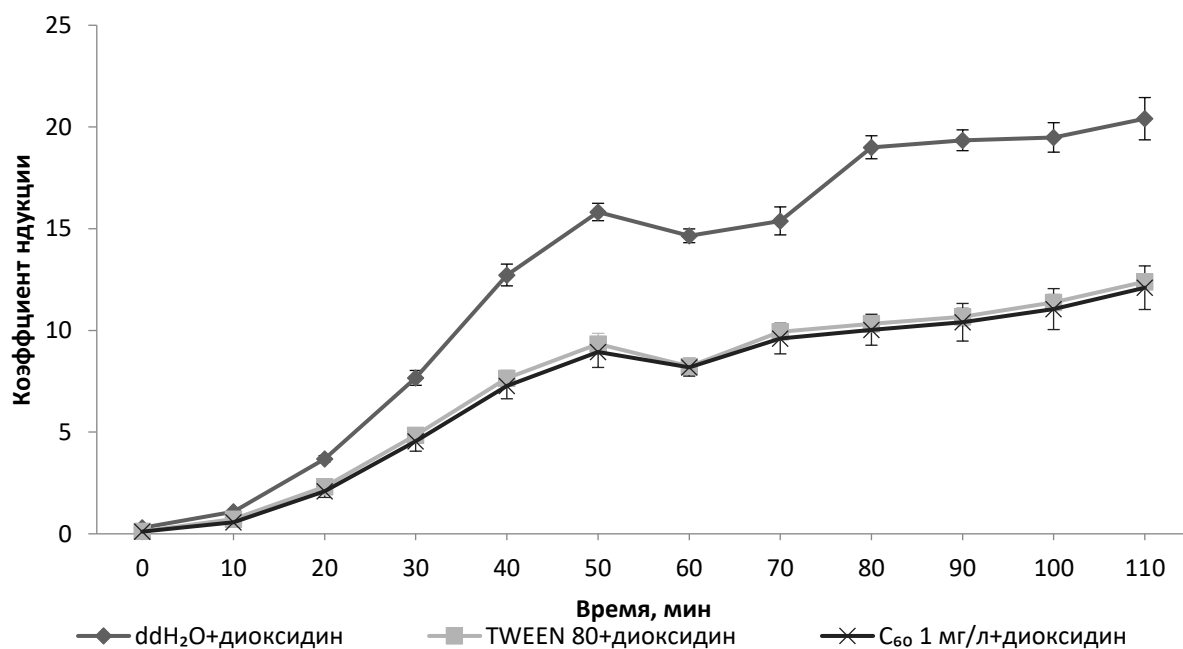


Рисунок 26 – Влияние фуллерена C₆₀ 1 мг/л в в 2 % водном растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *recA* диоксидином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA), p<0,05.

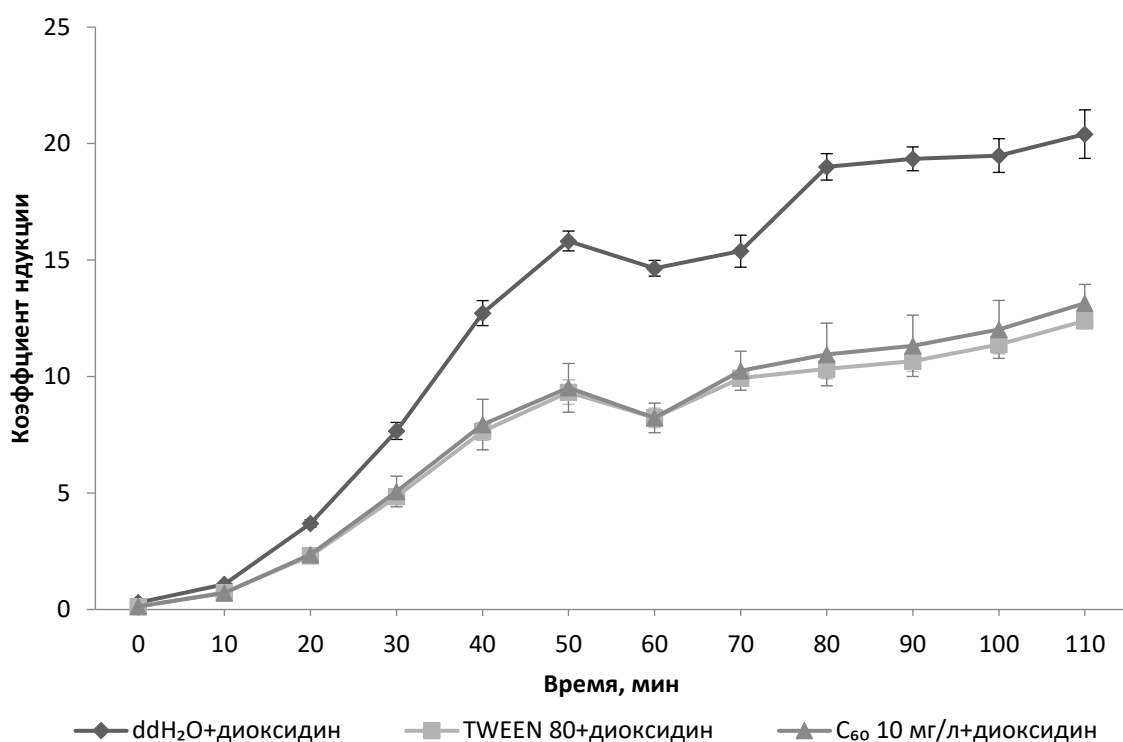


Рисунок 27 – Влияние фуллерена C₆₀ 10 мг/л в 2 % водном растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *recA* диоксином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA), p<0,05.

Для предварительного скрининга антиоксидантного эффекта протестировали концентрации C₆₀ 0,01 – 10 мг/л в TWEEN 80 (2%) с использованием биосенсора *E. coli* MG1655 pKatG. Все протестированные концентрации C₆₀ в TWEEN 80 (2%) не оказали статистически значимого снижения максимальной индукции экспрессии *katG* относительно контроля растворителя в присутствии перекиси водорода (рис. 28–31). К тому же TWEEN 80 оказывал влияние на индукцию относительно положительного контроля (деионизированная вода с перекисью водорода) (рис. 28). C₆₀ в концентрациях 0,1 – 10 мг/л в 2 % водном растворе TWEEN 80 оказывал слабый статистически значимый антиоксидантный эффект только на 10 минуте опыта, что проявляется в снижении индукции экспрессии гена *katG* (рис. 29–31).

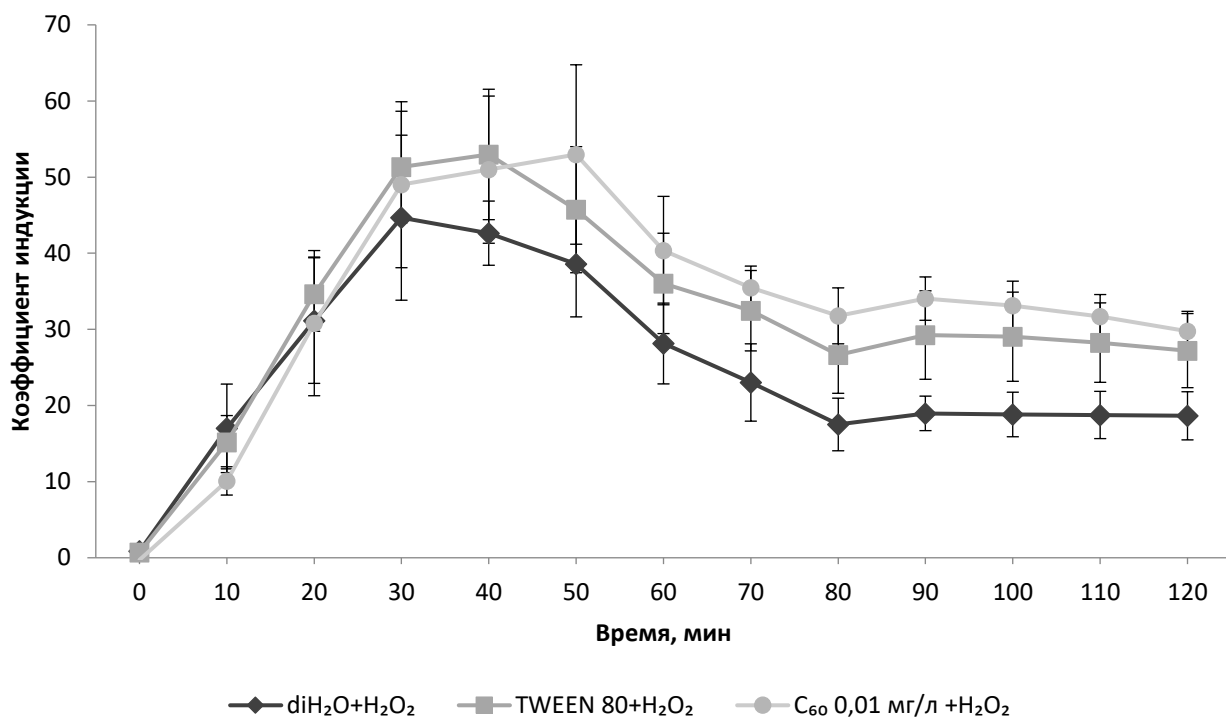


Рисунок 28 – Влияние фуллерена C₆₀ 0,01 мг/л в 2 % водном растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

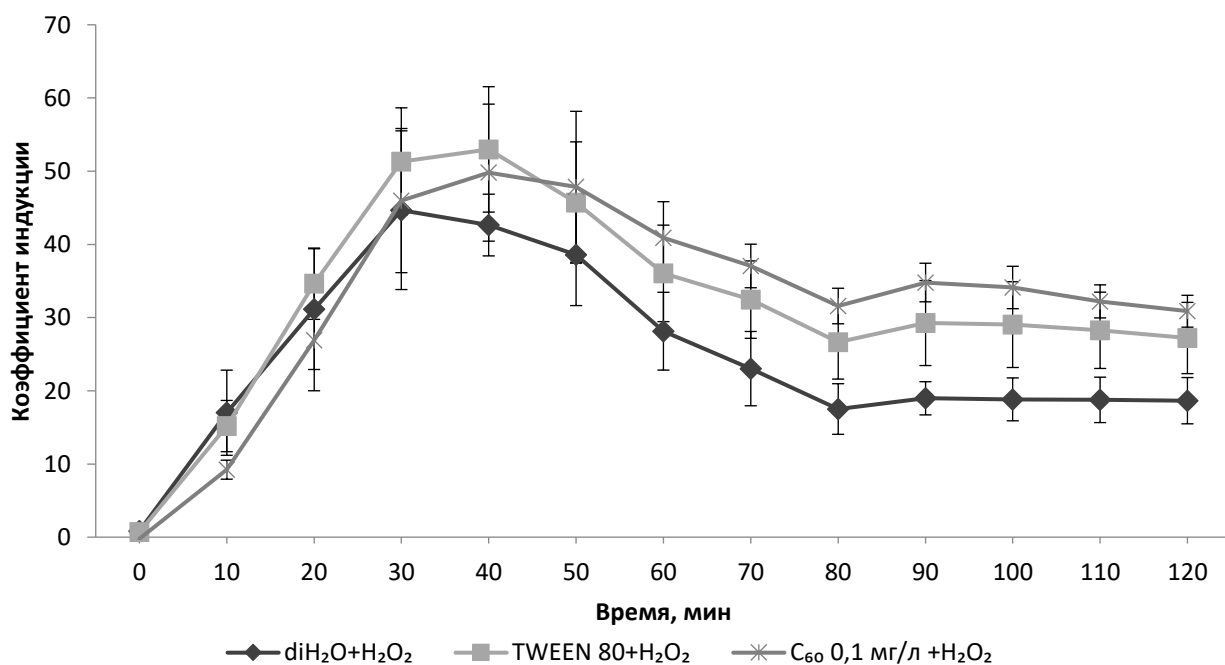


Рисунок 29 – Влияние фуллерена C₆₀ 0,1 мг/л в 2 % водном растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

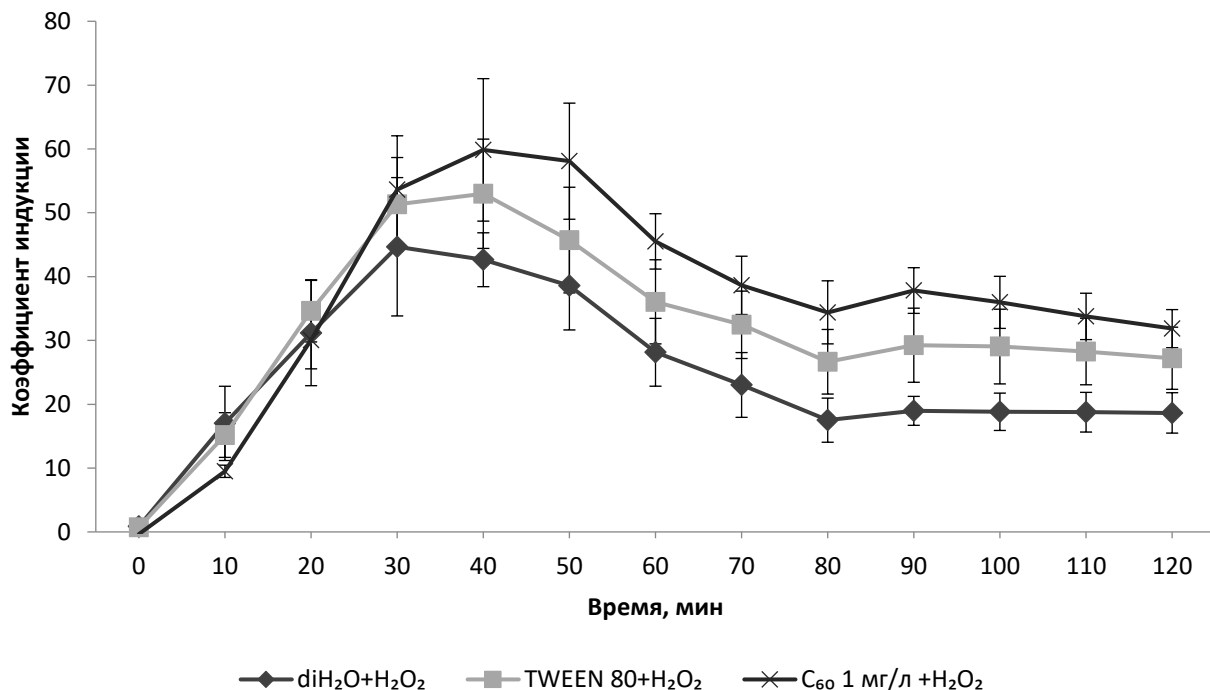


Рисунок 30 – Влияние фуллерена C₆₀ 1 мг/л в 2 % водном растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

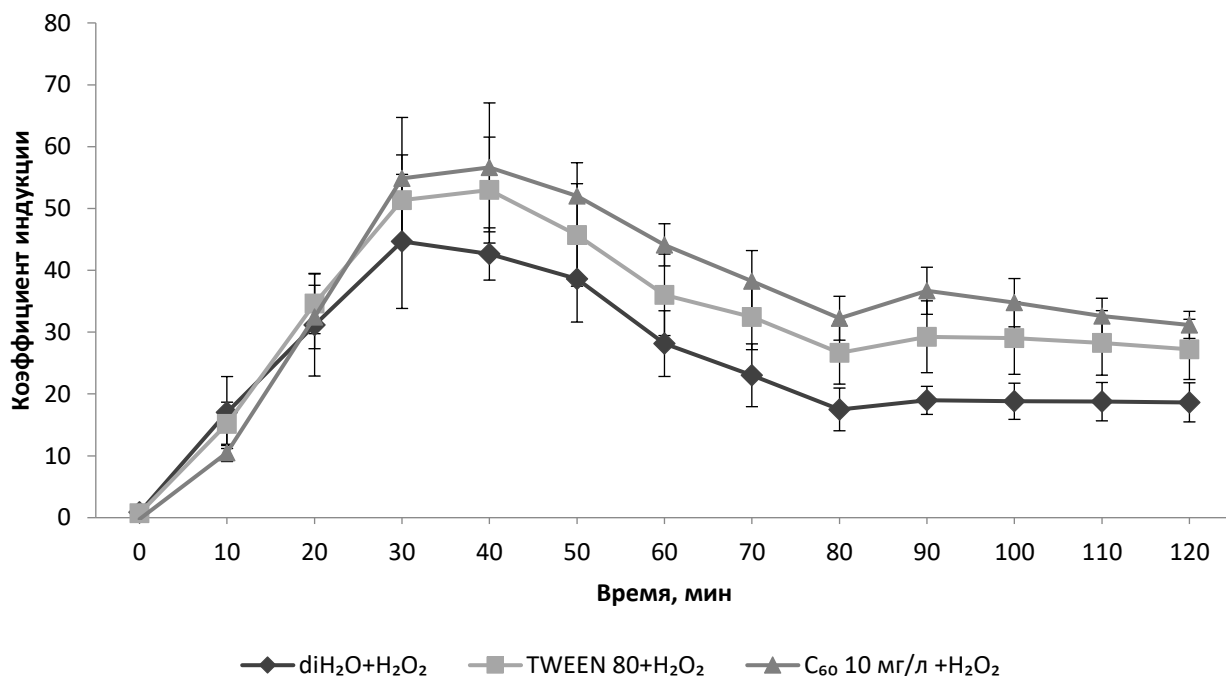


Рисунок 31 – Влияние фуллерена C₆₀ 10 мг/л в 2 % водном растворе TWEEN 80 относительно контроля растворителя на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

В водном растворе сурфактина концентрации C_{60} 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 (diH_2O), и влияние C_{60} оценивались относительно данной концентрации (контроль растворителя).

Чтобы выяснить, имеется ли дозовая зависимость протекторного эффекта от концентрации фуллерена C_{60} в растворе сурфактина, были проведены биолюминесцентные тесты с концентрациями C_{60} 1 и 10 мг/л и промежуточными с шагом 2,5·мг/л (рис. 32–36). Было установлено, что ДНК-протекторный эффект C_{60} в диапазоне концентраций от 1 до 10 мг/л в растворе сурфактина не имеет дозовой зависимости, как можно видеть на рисунках 37 и 38. Максимальное значение ДНК-протекторного эффекта составило 24,22 % для концентрации C_{60} 5 мг/л.

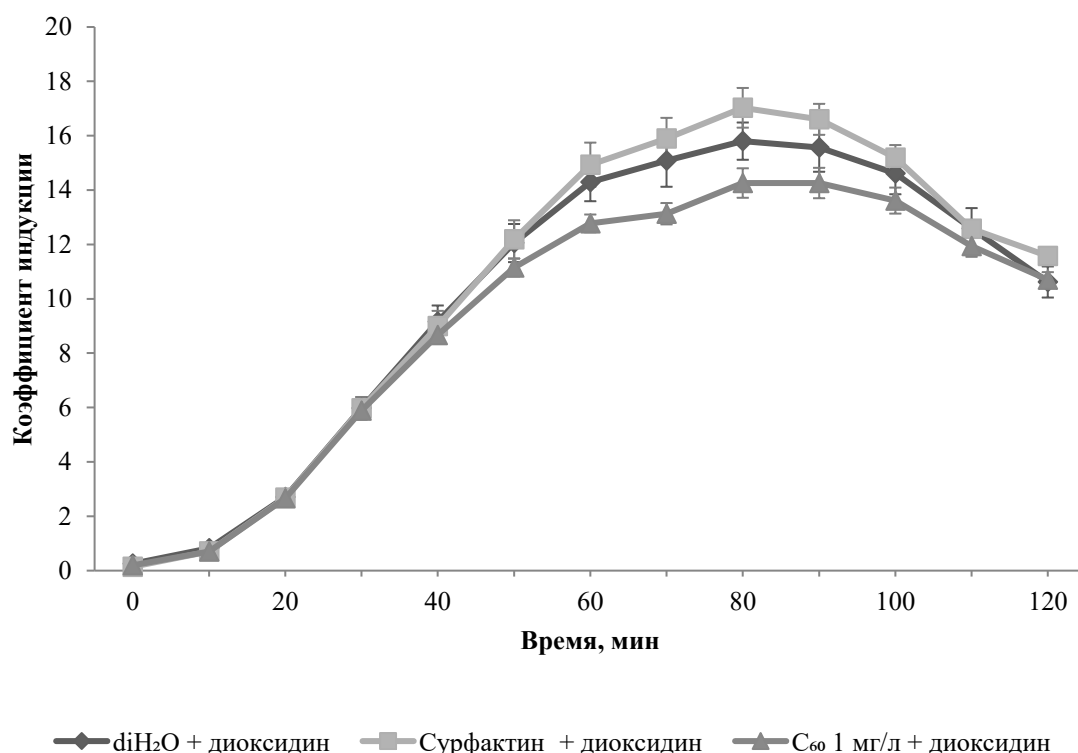


Рисунок 32 – Снижение индукции экспрессии гена *recA* штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) фуллереном C_{60} в концентрации 1 мг/л (б), в водном растворе сурфактина 31,25 мг/л в присутствии диоксида (p<0,05).

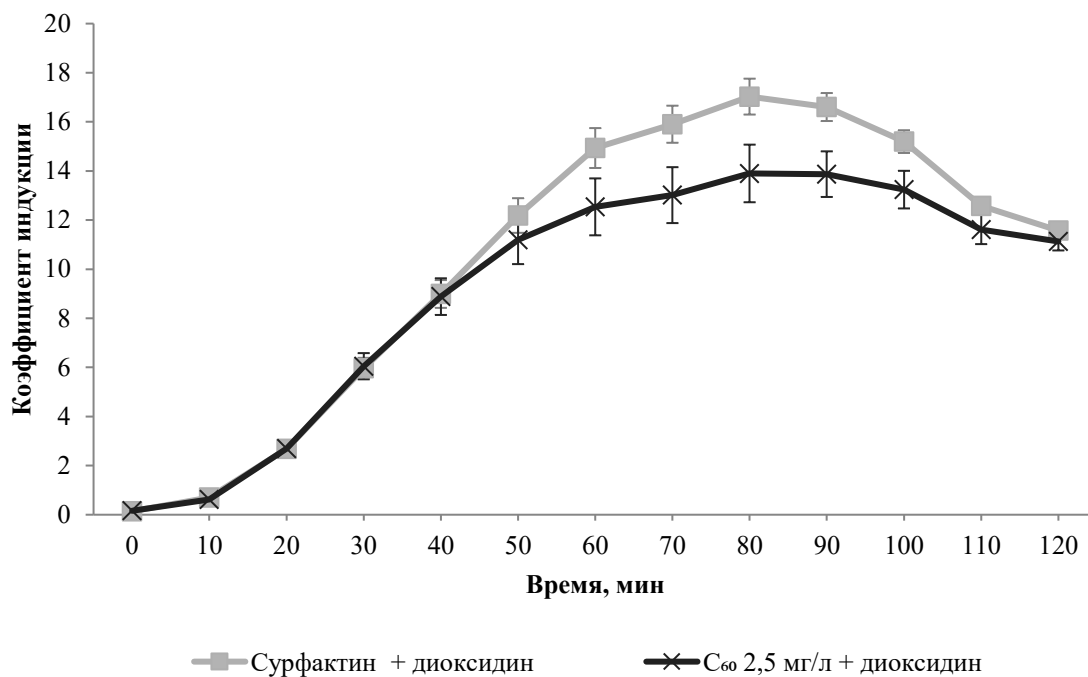


Рисунок 33 – Снижение индукции экспрессии гена *recA* штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) фуллереном C₆₀ в концентрации 2,5 мг/л (б), в водном растворе сурфактина 31,25 мг/л в присутствии диоксидина (p<0,05).

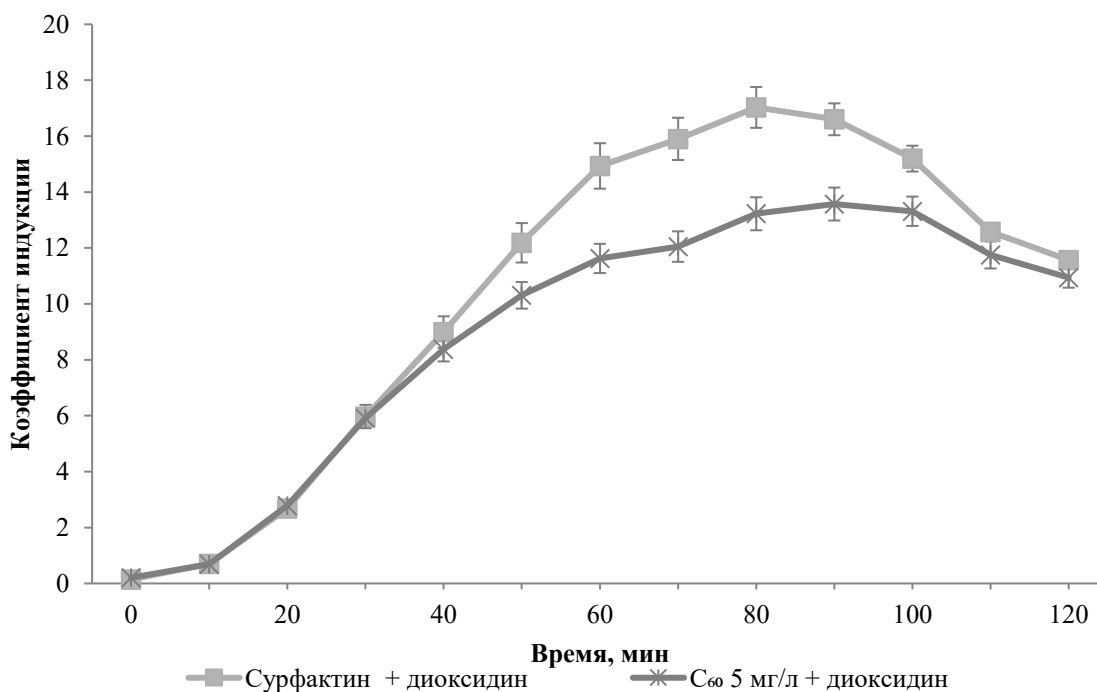


Рисунок 34 – Снижение индукции экспрессии гена *recA* штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) фуллереном C₆₀ в концентрации 5 мг/л, в водном растворе сурфактина 31,25 мг/л в присутствии диоксидина (p<0,05).

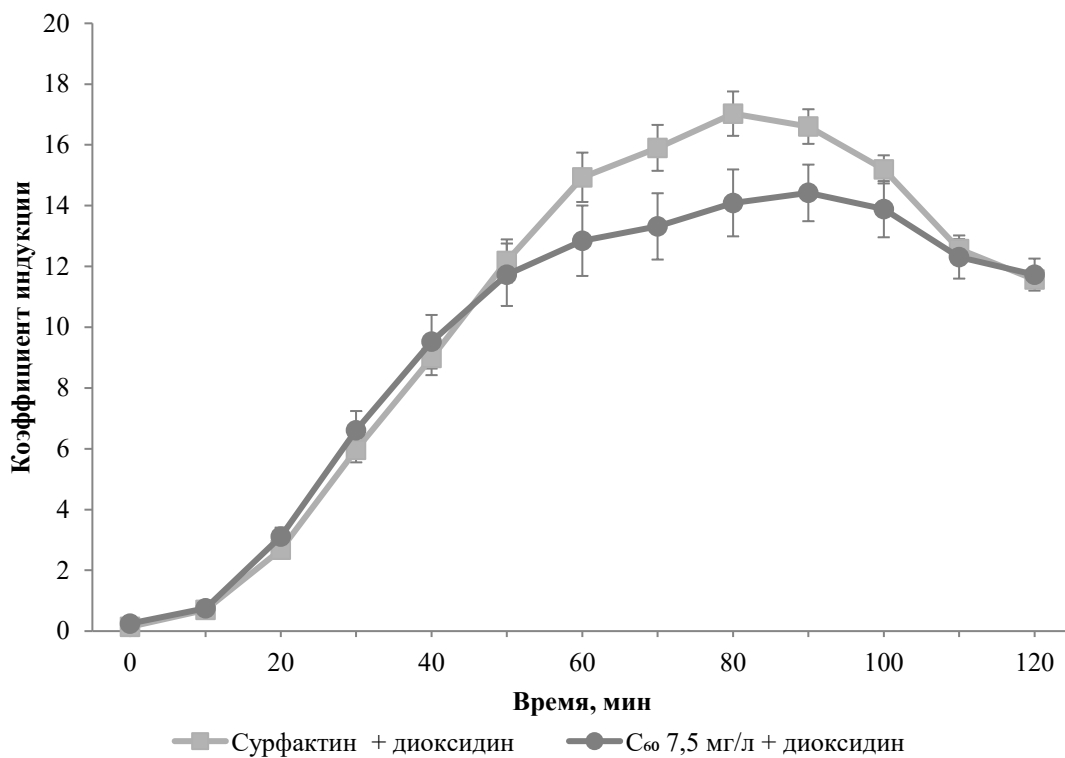


Рисунок 35 – Снижение индукции экспрессии гена *recA* штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) фуллереном C₆₀ в концентрации 7,5 мг/л, в водном растворе сурфактина 31,25 мг/л в присутствии диоксидина (p<0,05).

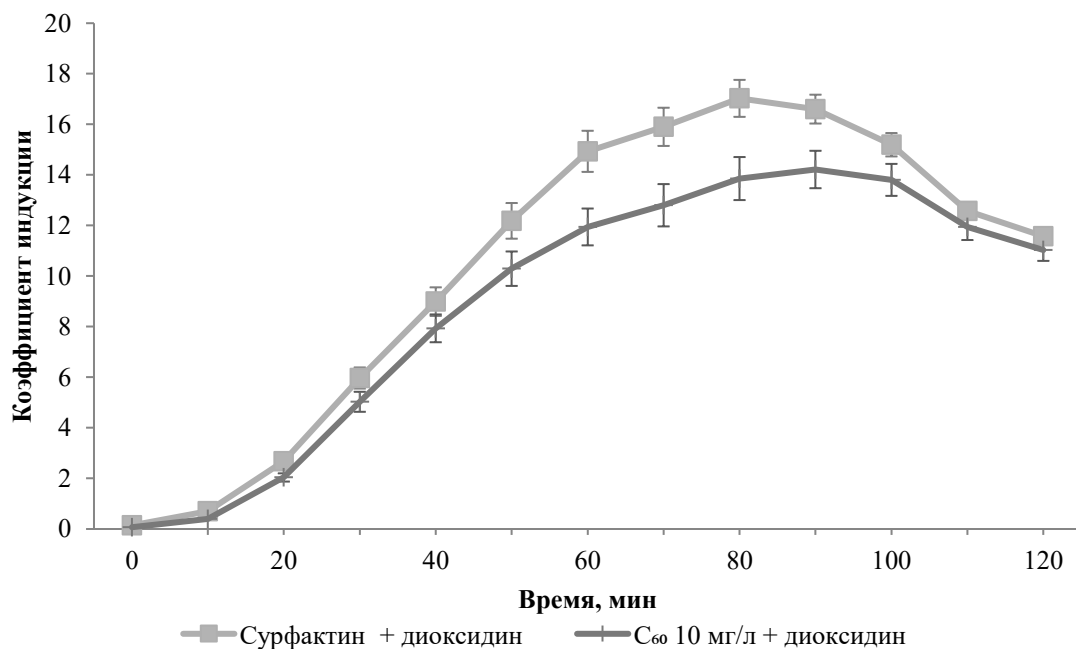


Рисунок 36 – Снижение индукции экспрессии гена *recA* штамма *E. coli* MG1655 (pRecA) фуллереном C₆₀ в концентрации 10 мг/л, в водном растворе сурфактина 31,25 мг/л в присутствии диоксидина (p<0,05).

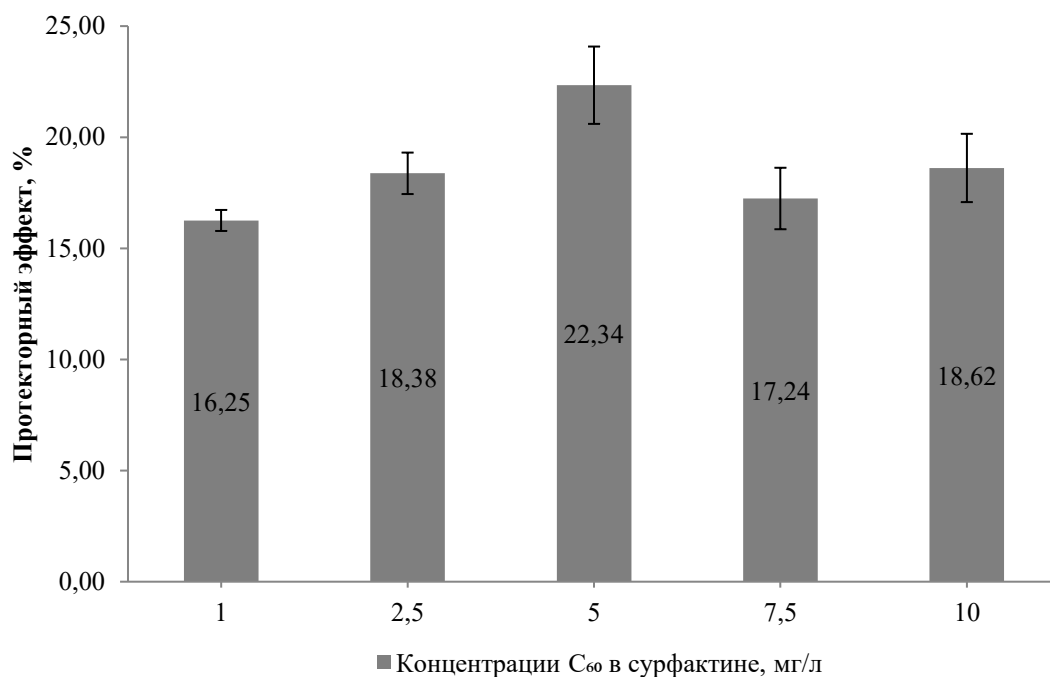


Рисунок 37 – ДНК-протекторный эффект S_{60} в сурфактине во время максимальной индукции экспрессии гена *recA* (80 мин) диоксидином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA), $p < 0,05$.

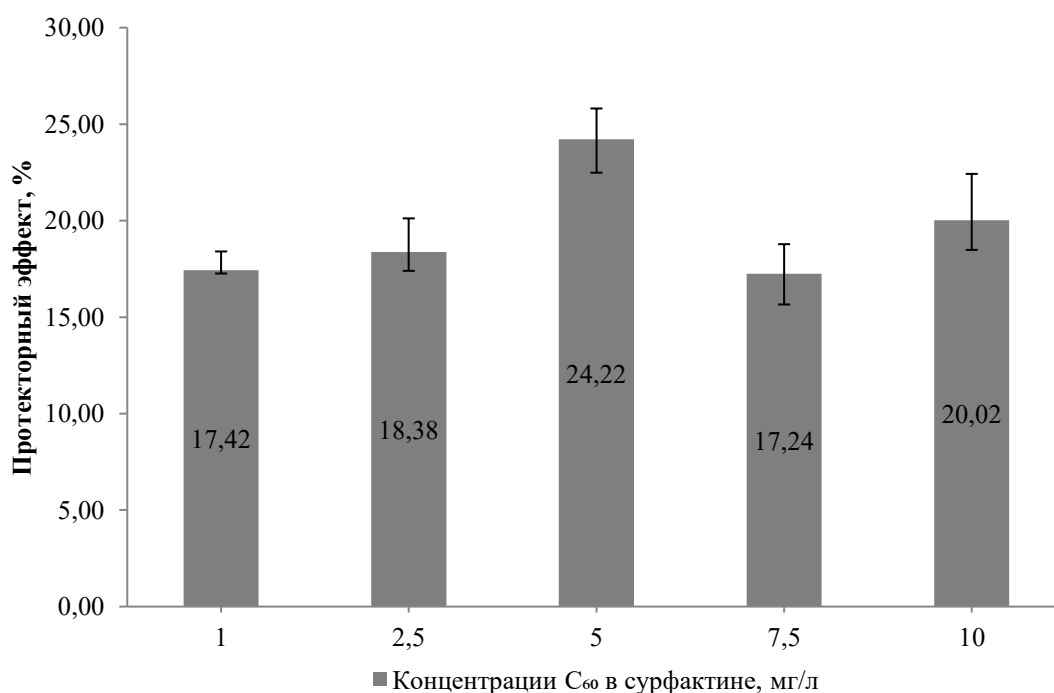


Рисунок 38 – Максимальный ДНК-протекторный эффект S_{60} в растворе сурфактина в отношении диоксидина. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pRecA), $p < 0,05$.

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

Затем провели биоллюминесцентный тест с использованием штамма *E. coli* MG1655 (pColD), обладающим более высоким коэффициентом индукции (Котова, Манухов, Завильгельский, 2009). Результаты представлены на рисунках 39–42. Концентрации фуллерена C_{60} 0,01 и 0,1 мг/л не оказали статистически значимого снижения индукции экспрессии гена *colD* по сравнению с контролем растворителя (сурфактином) в присутствии диоксидина, как и в опыте с использованием биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA). Для диапазона концентраций C_{60} 1 – 10 мг/л наблюдалось статистически значимое снижение индукции экспрессии гена *colD* относительно солубилизатора и контроля (diH_2O) (графики индукций с концентрациями C_{60} 2,5–7,5 мг/л не приведены).

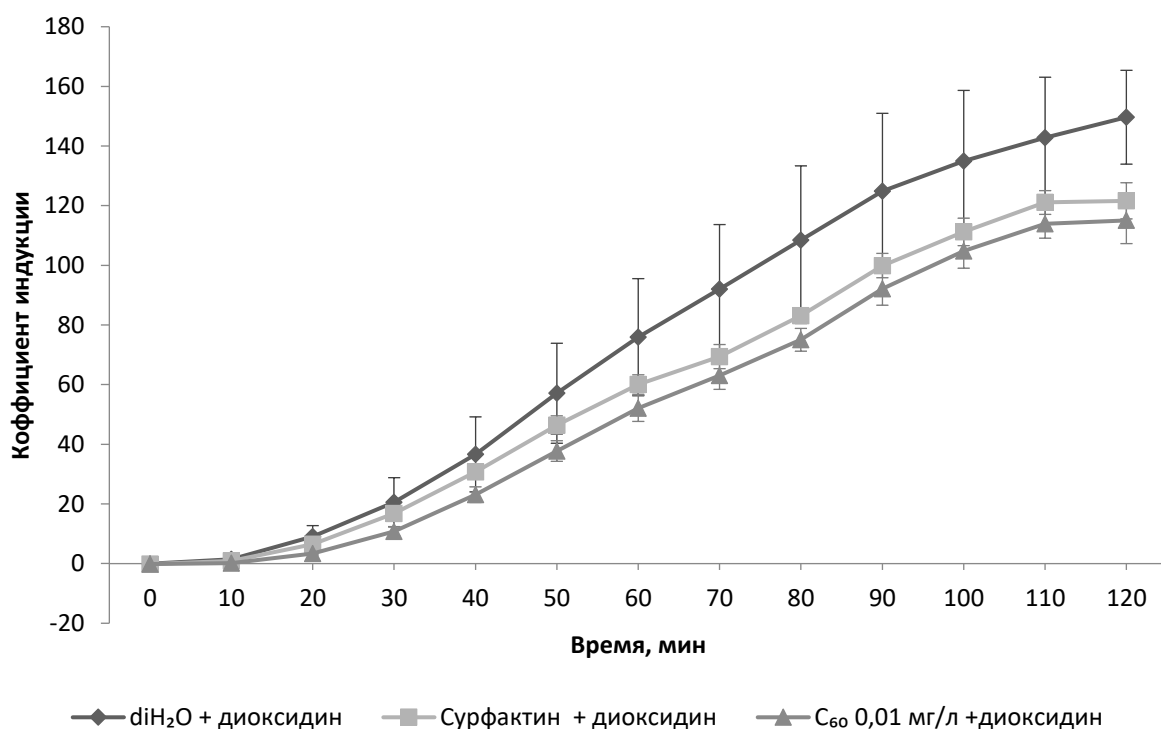


Рисунок 39 – Индукция экспрессии гена *colD* в присутствии диоксидина и фуллерена C_{60} 0,01 мг/л в растворе сурфактина. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pColD), $p < 0,05$.

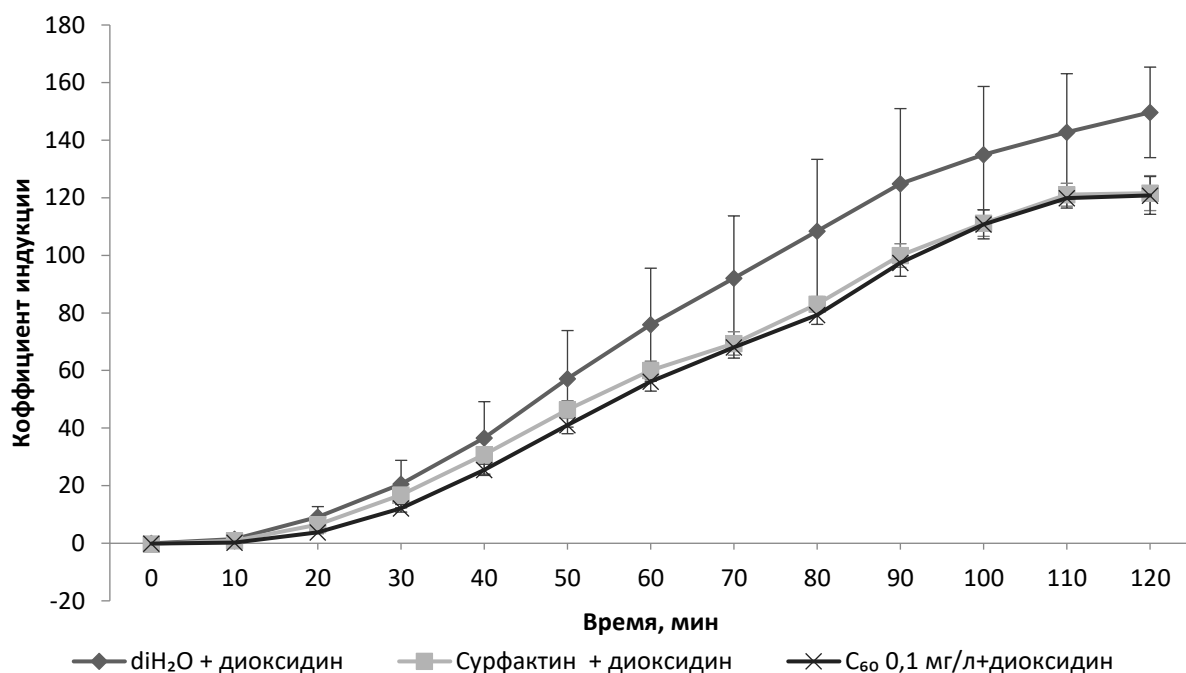


Рисунок 40 – Индукция экспрессии гена *colD* в присутствии диоксидина и фуллерена C₆₀ 0,1 мг/л в растворе сурфактина. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pColD), p<0,05.

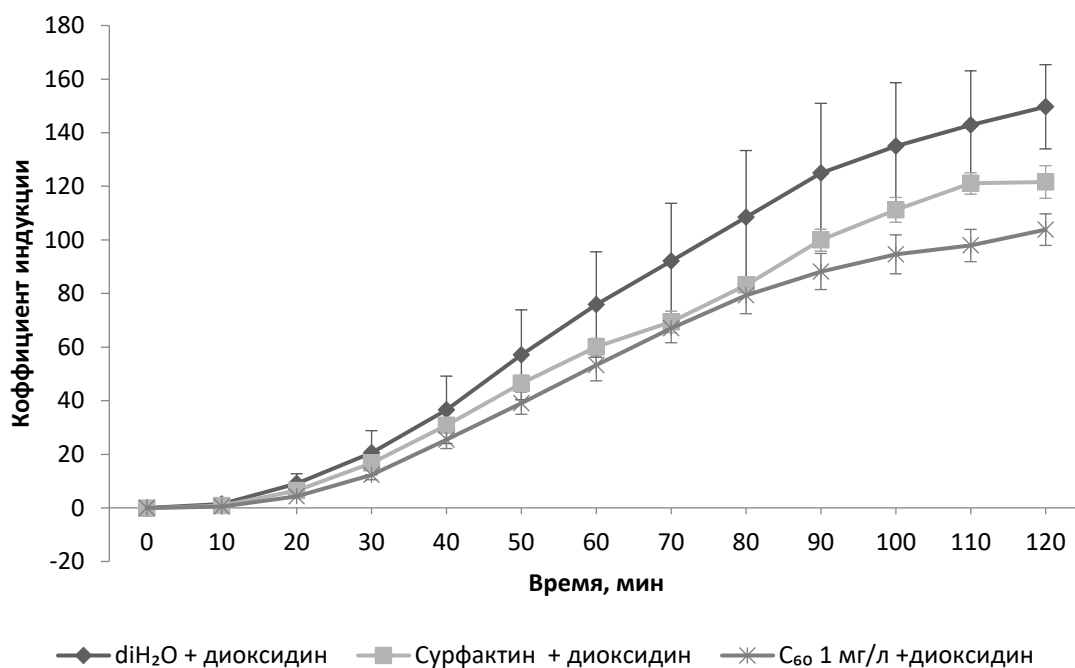


Рисунок 41 – Снижение индукции экспрессии гена *colD* штамма *E. coli* MG1655 (pColD) относительно контроля растворителя фуллереном C₆₀ в концентрации 1 мг/л, в растворе сурфактина в присутствии диоксидина (p<0,05).

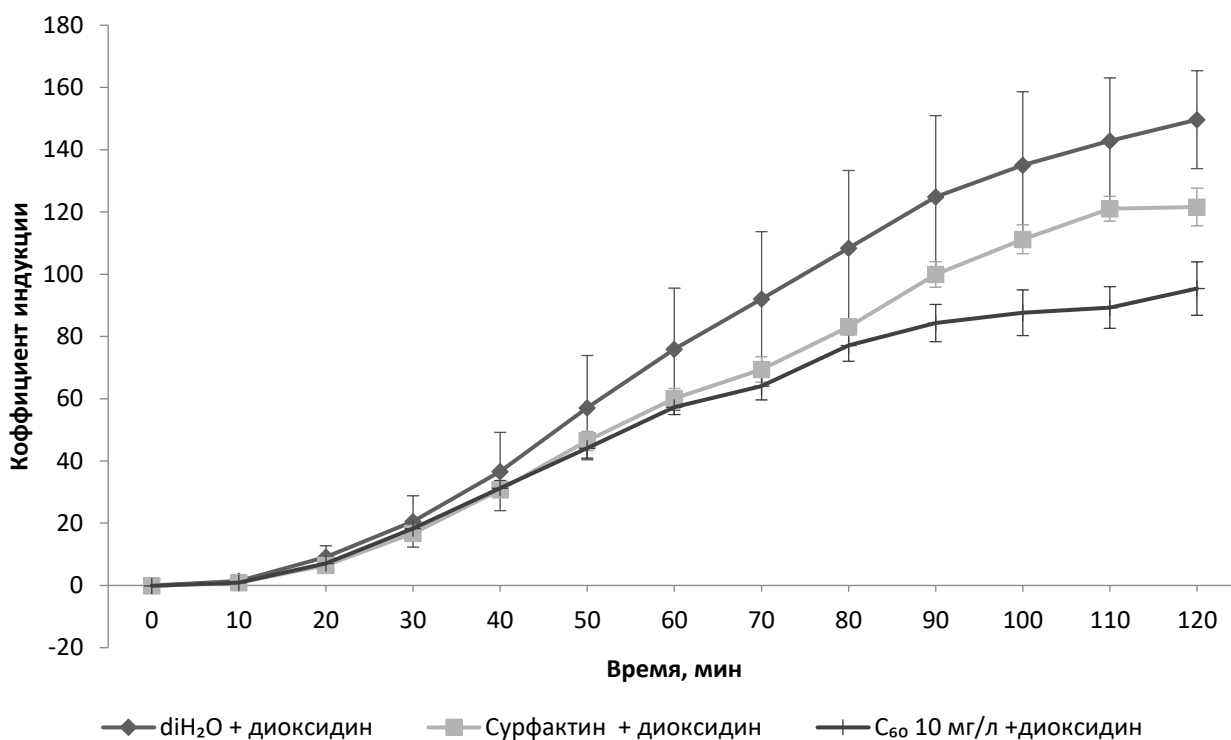


Рисунок 42 – Снижение индукции экспрессии гена *colD* штамма *E. coli* MG1655 (pColD) относительно контроля растворителя фуллереном C₆₀ в концентрации 10 мг/л, в растворе сурфактина в присутствии диоксида (p<0,05).

Концентрации C₆₀ 1 – 10 мг/л в растворе сурфактина при тестировании на биосенсоре *E. coli* MG1655 (pColD) оказали близкий по значениям к полученному на биосенсоре *E. coli* MG1655 (pRecA) ДНК-протекторный эффект (рисунки 43 и 44), который также не имеет прямой дозовой зависимости. Максимальное значение ДНК-протекторного эффекта составило 26,23 % для концентрации C₆₀ 10 мг/л.

Таким образом, ДНК-протекторный эффект C₆₀ на обоих штаммах-биосенсорах, детектирующих повреждения ДНК, проявляется только при использовании сурфактина как солюбилизатора.

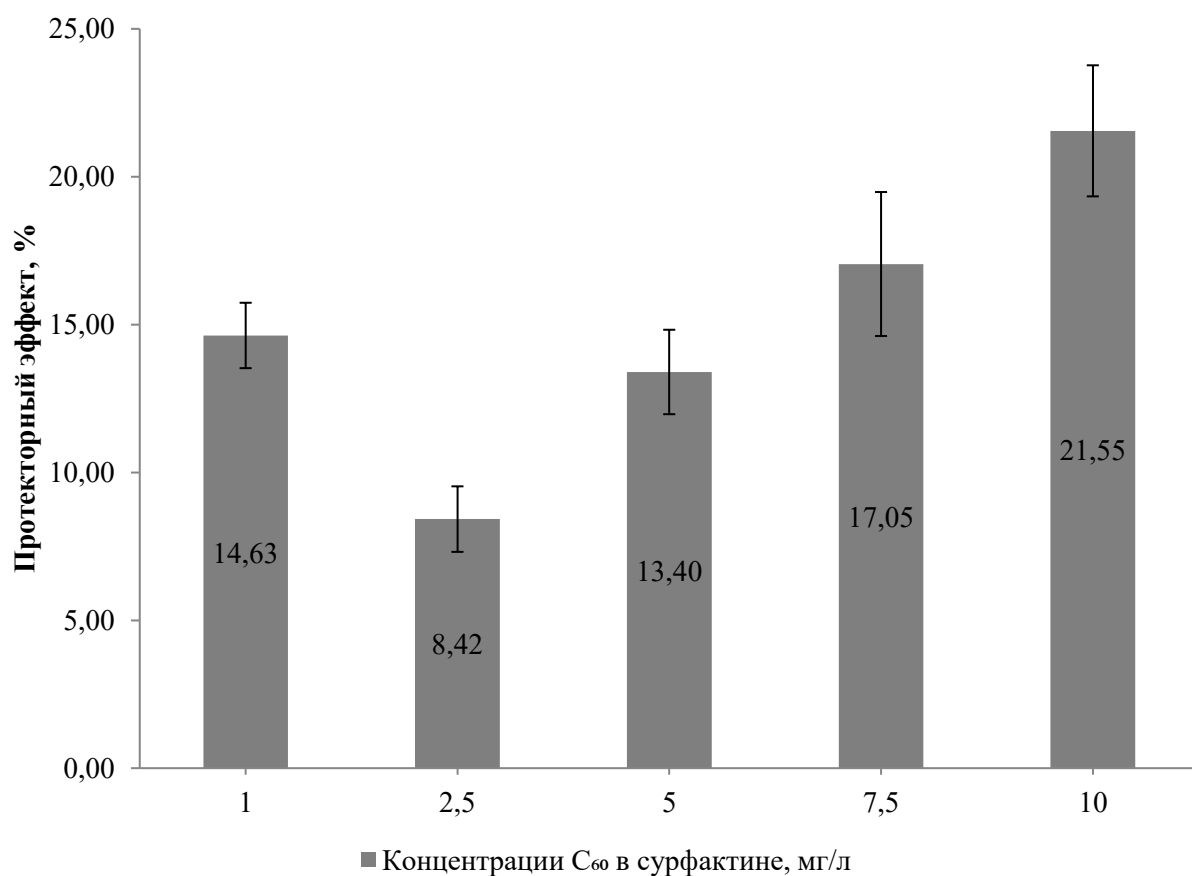


Рисунок 43 – ДНК-протекторный эффект S_{60} в сурфактине во время максимальной индукции (120 мин) диоксидином биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pColD), $p < 0,05$.

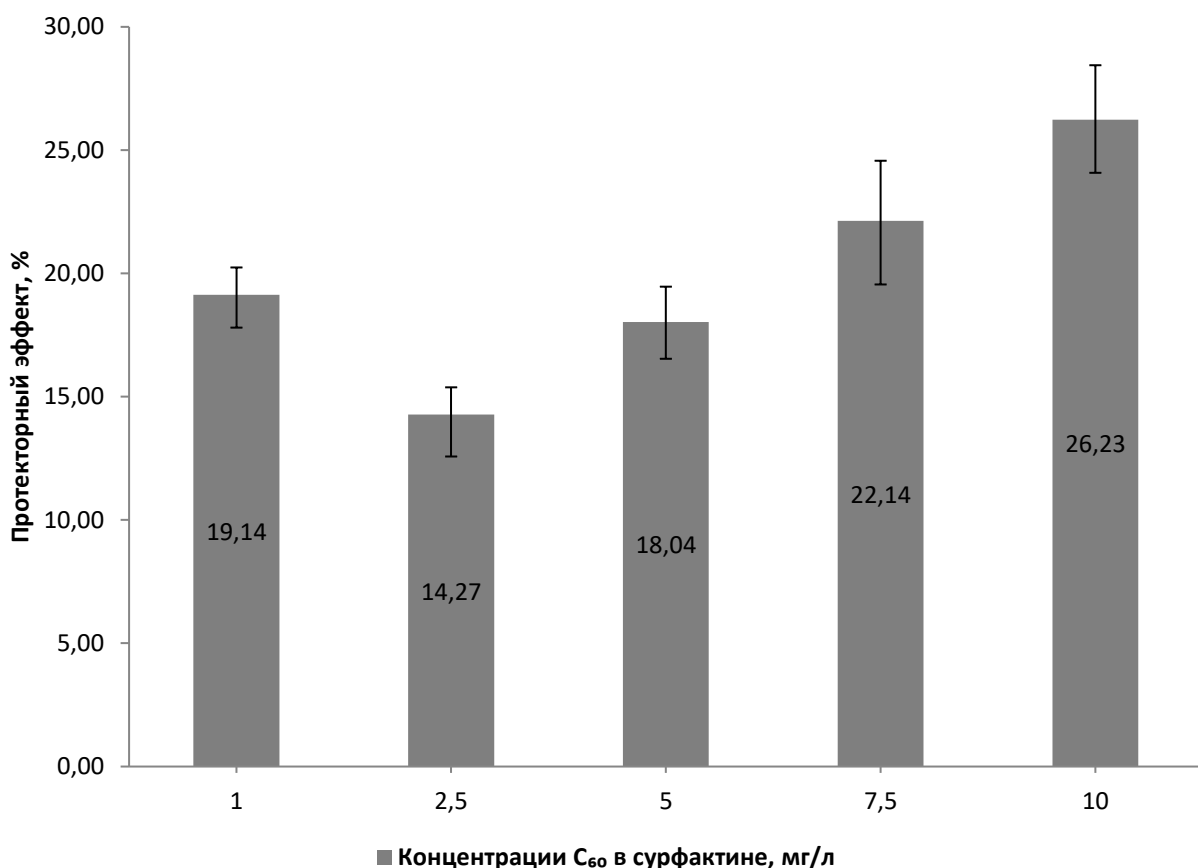


Рисунок 44 – Максимальный ДНК-протекторный эффект C₆₀ в сурфактине. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pColD), p<0,05.

Для проверки гипотезы об антиоксидантном механизме ДНК-протекторного действия фуллерена C₆₀ был поставлен биолюминесцентный тест с использованием штаммов *E. coli* MG1655 (pKatG) и *E. coli* MG 1655 (pSoxS). Как видно из рисунков 45–49, концентрации C₆₀ в сурфактине, оказавшие ДНК-протекторное действие, проявляют антиоксидантный эффект в отношении перекиси водорода относительно контроля и контроля растворителя, что проявляется в снижении индукции экспрессии гена *katG*. Сурфактин сам по себе не оказывает антиоксидантный эффект в отношении перекиси водорода. Максимальное значение протекторного (антиоксидантного) эффекта составило 40,81 % для концентрации C₆₀ 10 мг/л (рис. 50, 51).

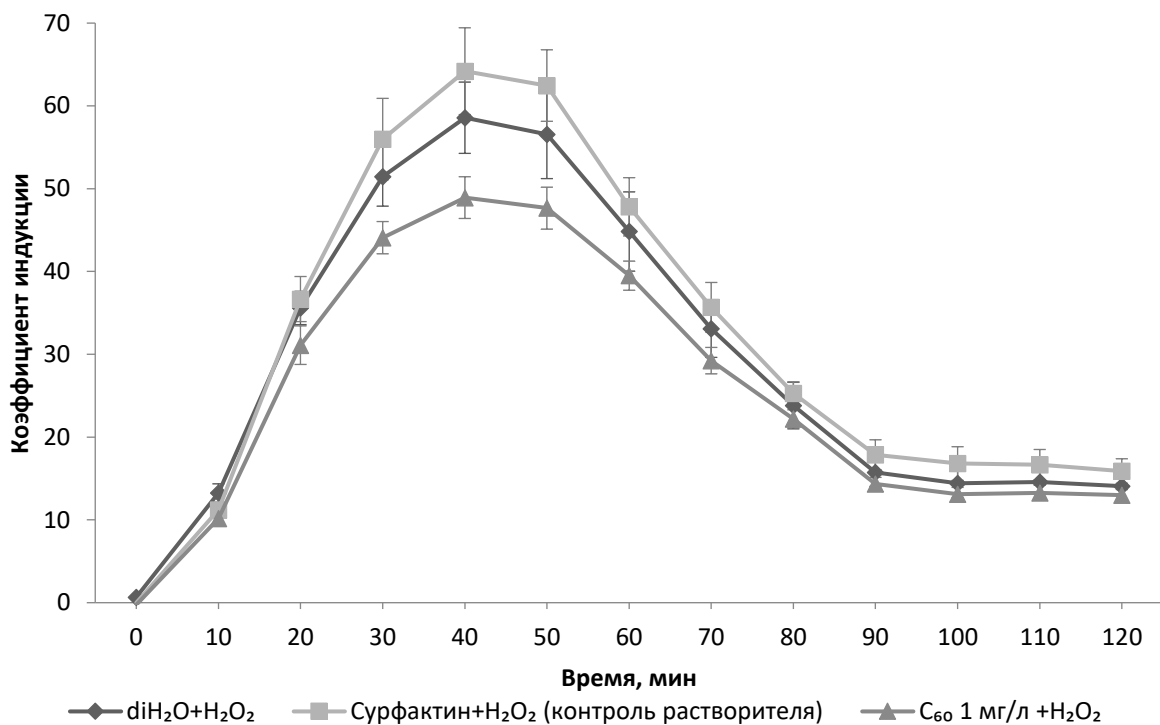


Рисунок 45 – Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) фуллереном C₆₀ в концентрации 1 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

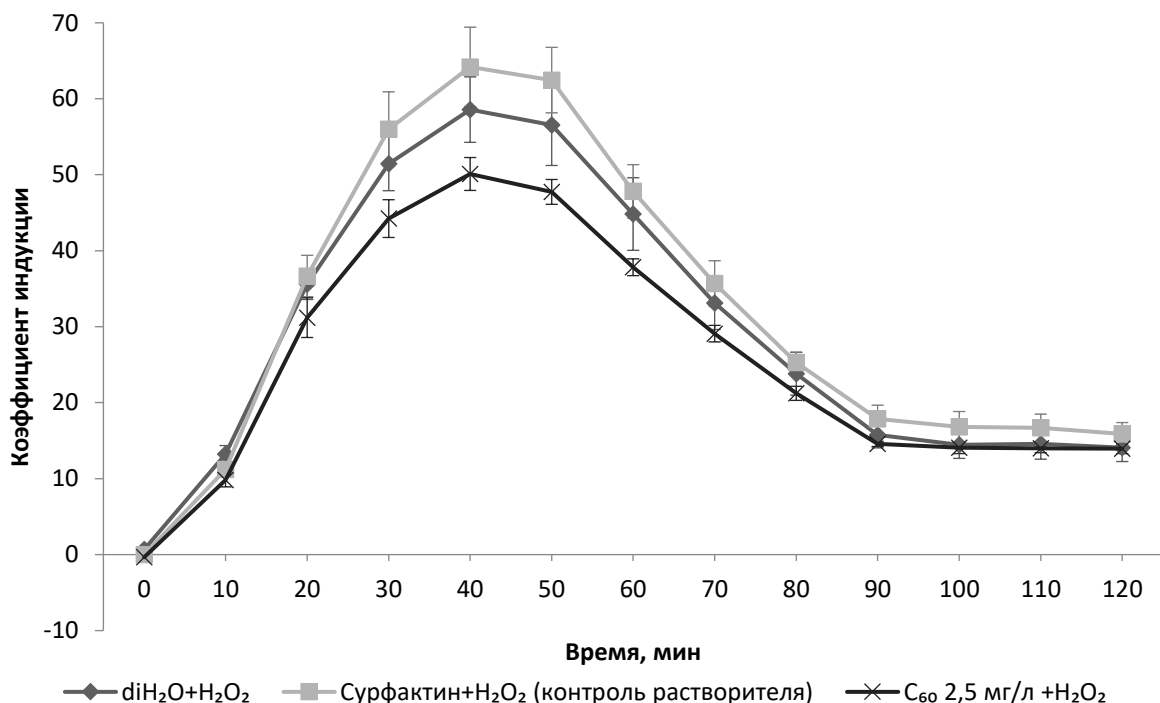


Рисунок 46 – Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) фуллереном C₆₀ в концентрации 2,5 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

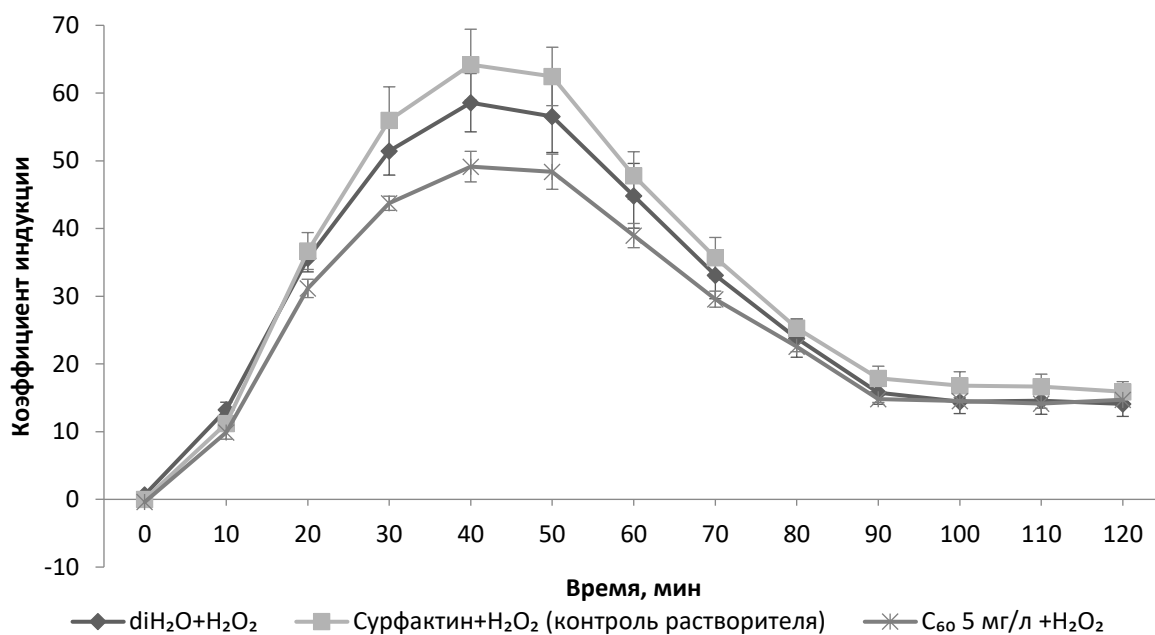


Рисунок 47 –Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) фуллереном C₆₀ в концентрации 5 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

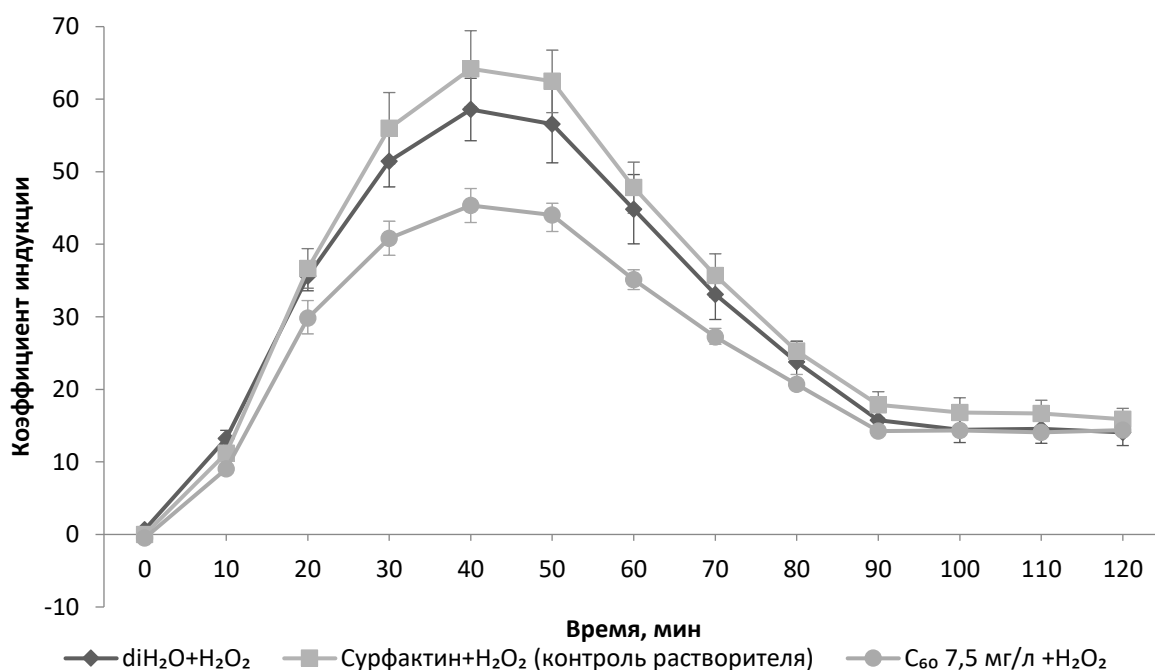


Рисунок 48 –Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) фуллереном C₆₀ в концентрации 7,5 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

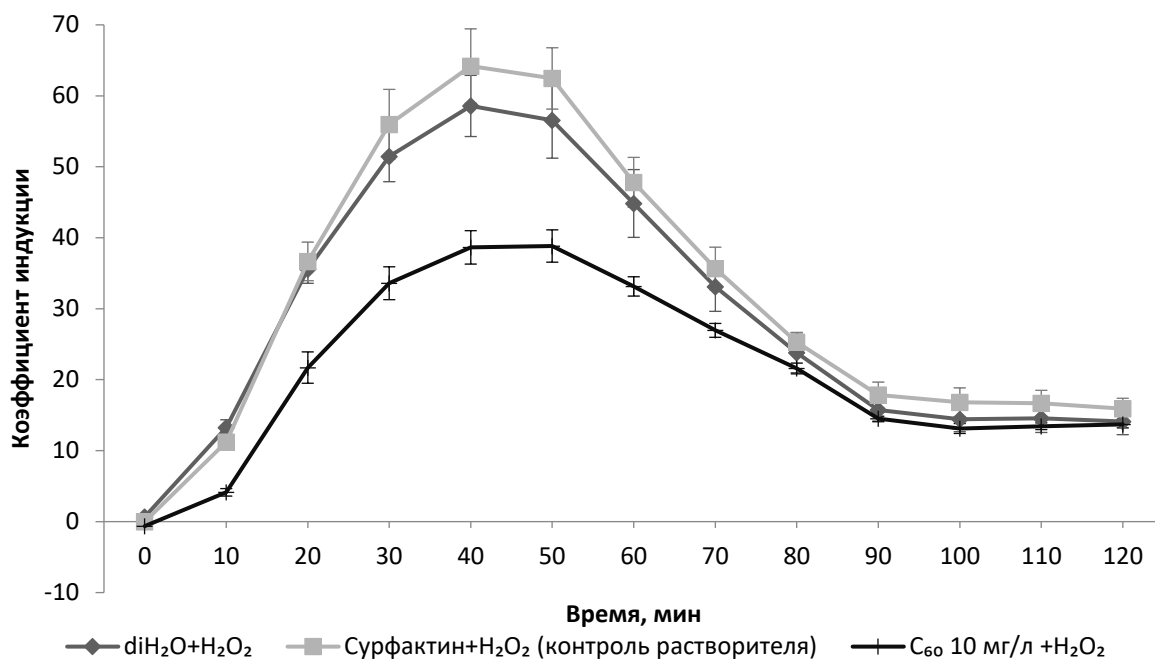


Рисунок 49 –Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) фуллереном C₆₀ в концентрации 10 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

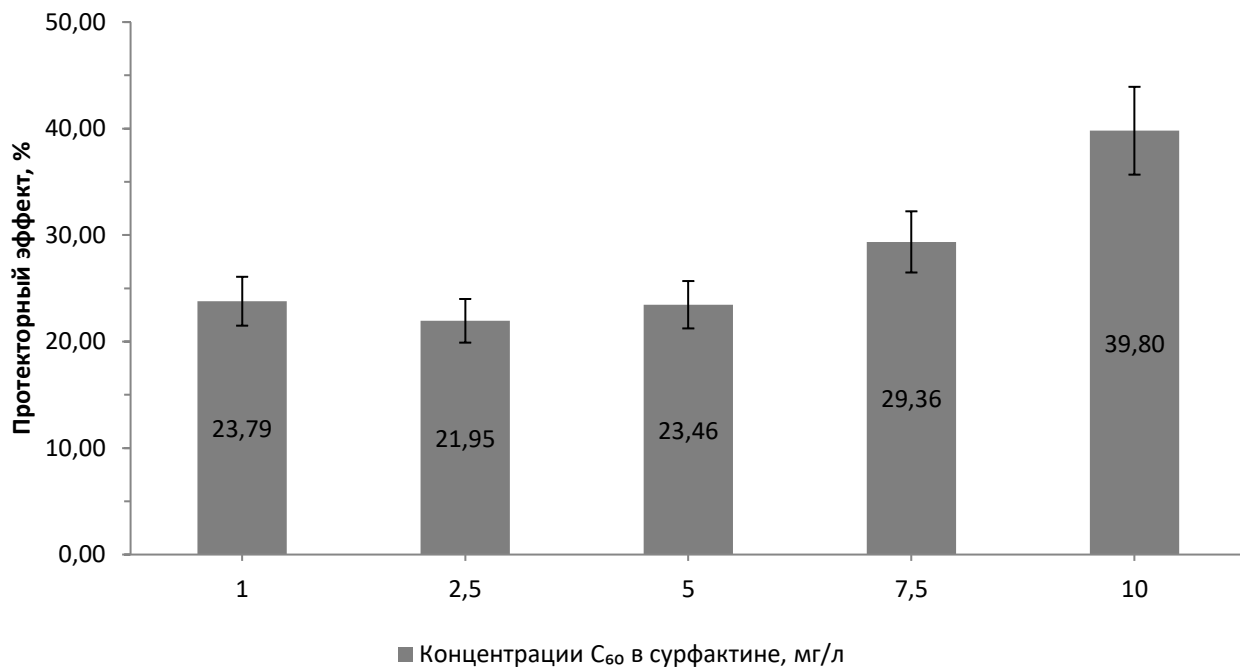


Рисунок 50 – Протекторный (антиоксидантный) эффект C₆₀ в сурфактине во время максимальной индукции (40 мин) перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

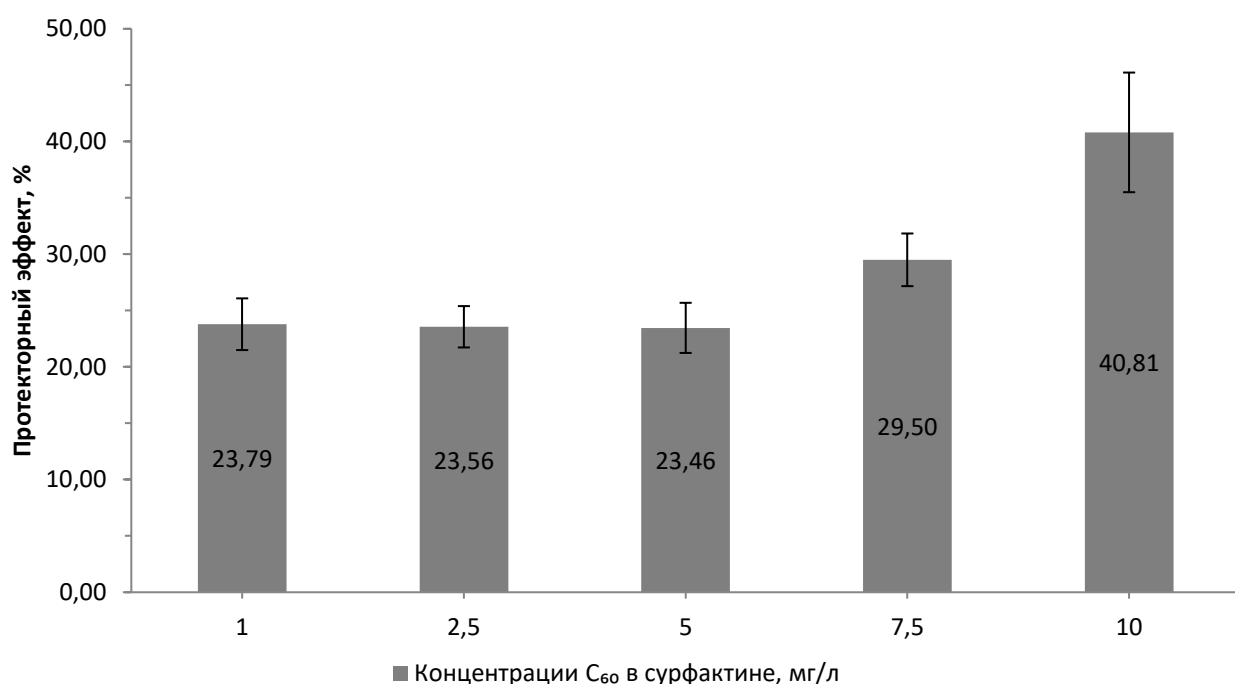


Рисунок 51 – Максимальный протекторный (антиоксидантный) эффект C₆₀ в сурфактине в отношении перекиси водорода, $p < 0,05$. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655(pKatG).

Коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллерена и оказываемым ими протекторным эффектом в отношении перекиси водорода во время максимальной индукции и концентрацией фуллерена составил 0,884; коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллерена и оказываемым ими максимальным протекторным эффектом в отношении перекиси водорода равен 0,874, 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 (метилвиологен) 10^{-3} M) до 110 мин (рисунок 52). C₆₀ в концентрации 1 мг/л в сурфактине не оказал статистически значимого влияния на индукцию экспрессии *soxS* относительно контроля растворителя и протекторный эффект (рисунок 52). C₆₀ в концентрациях 2,5 – 10 мг/л оказал антиоксидантный эффект в отношении перекиси водорода

относительно контроля растворителя, что проявляется в снижении индукции экспрессии *soxS* относительно контроля растворителя (графики индукций с концентрациями 2,5–7,5·мг/л не приведены) (рисунок 53). С₆₀ в концентрации 10 мг/л также оказал статистически значимое снижение индукции экспрессии *soxS* относительно контроля (деионизированная вода с паракватом).

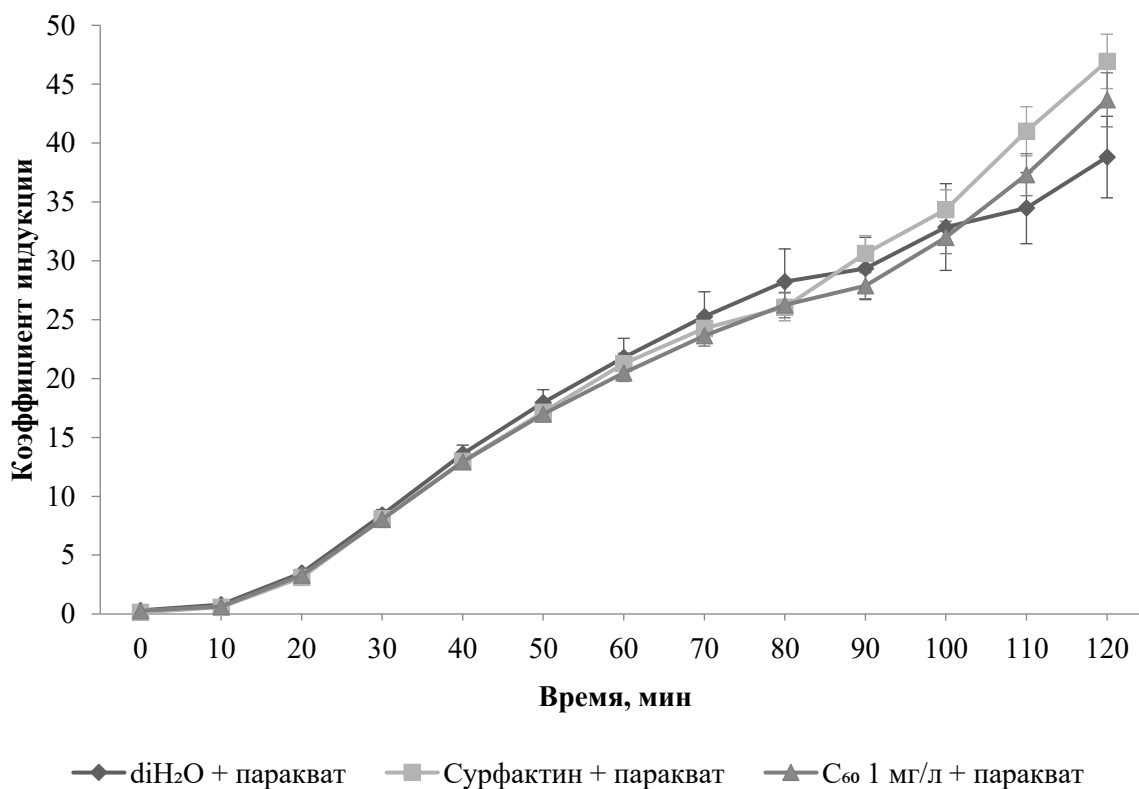


Рисунок 52. Отсутствие влияния на индукцию экспрессии гена *soxS* паракватом ($p < 0,05$) паракватом биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (*pSoxS*) относительно контроля (diH_2O) и контроля растворителя фуллереном С₆₀ в концентрации 1 мг/л в растворе сурфактина в присутствии параквата ($p < 0,05$).

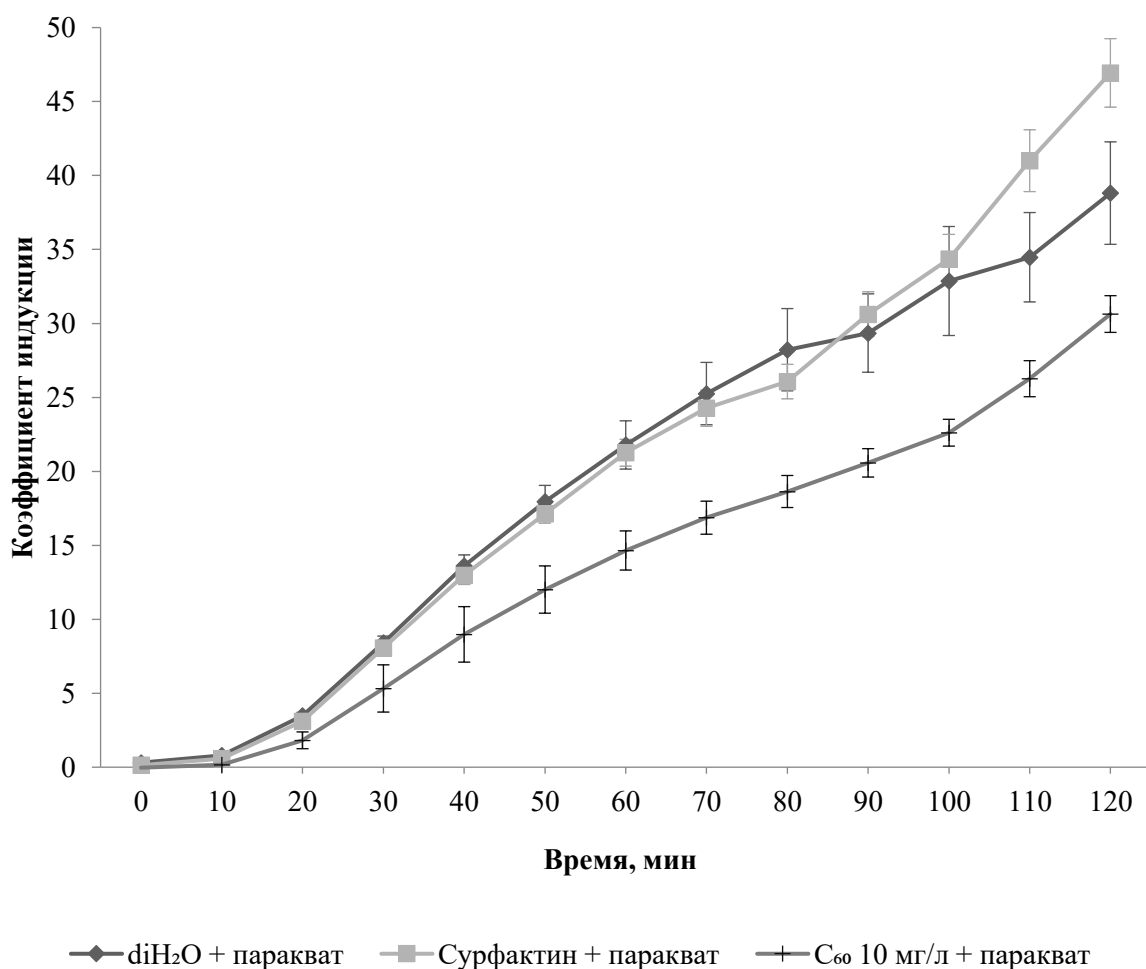


Рисунок 53. Снижение индукции экспрессии гена *soxS* биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pSoxS) относительно контроля (diH₂O) и контроля растворителя фуллереном C₆₀ в концентрации 10 мг/л в растворе сурфактина в присутствии параквата (p<0,05).

Максимальное значение протекторного (антиоксидантного) эффекта составило 35,94 % для концентрации C₆₀ 10 мг/л (рис. 55).

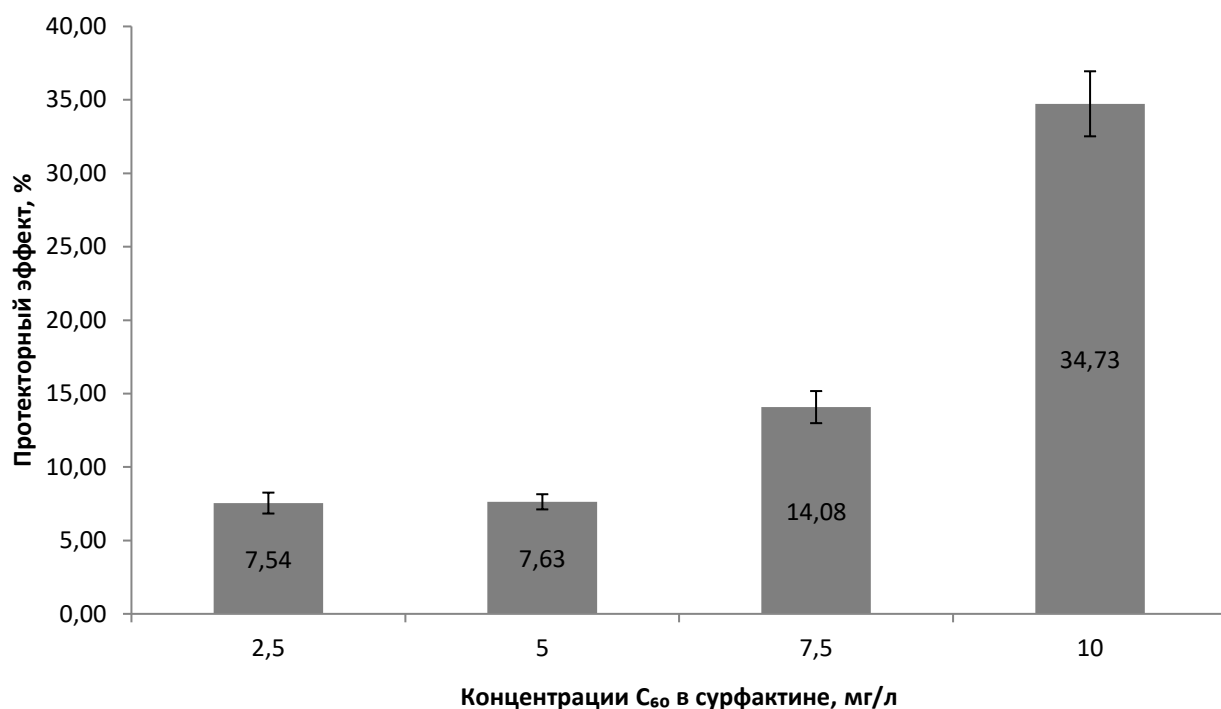


Рисунок 54 – Протекторный (антиоксидантный) эффект C₆₀ в сурфактине во время максимальной индукции (120 мин) паракватом биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pSoxS), p<0,05.

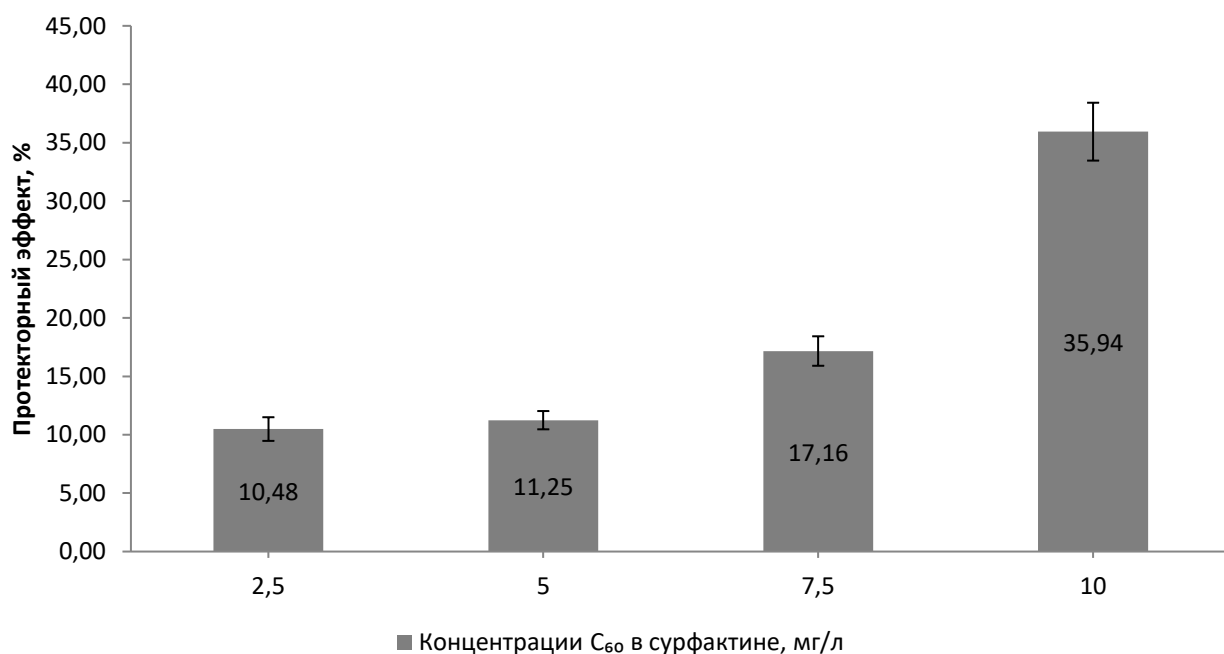


Рисунок 55 – Максимальный протекторный (антиоксидантный) эффект C₆₀ в сурфактине в отношении параквата, p<0,05. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pSoxS).

Коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллерена и оказываемым ими протекторным эффектом в отношении параквата во время максимальной индукции и концентрацией фуллерена составил 0,884 (так же, как и между значениями концентраций фуллерена и оказываемым ими антиоксидантным эффектом в отношении перекиси водорода); коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллерена и оказываемым ими максимальным протекторным эффектом в отношении параквата равен 0,895, что означает сильную прямую связь, т.е. антиоксидантный эффект C_{60} в отношении супероксид анион-радикала является дозозависимым.

Таким образом, можно отметить, что концентрации, которые оказывают ДНК-протекторное действие, демонстрируют и антиоксидантный эффект.

3.5. 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*.

Концентрации водных растворов фуллеренола 1 – 10 мг/л с промежуточным шагом 2,5 мг/л в сурфактине оказали антиоксидантный эффект в отношении перекиси водорода, что проявляется в статистически значимом снижении индукции экспрессии гена *katG* относительно контроля в присутствии перекиси водорода (рис. 56 – 60).

Максимальное значение протекторного (антиоксидантного) эффекта составило 52,80 % для концентрации $C_{60}(OH)_{36}$ 10 мг/л (рис. 62).

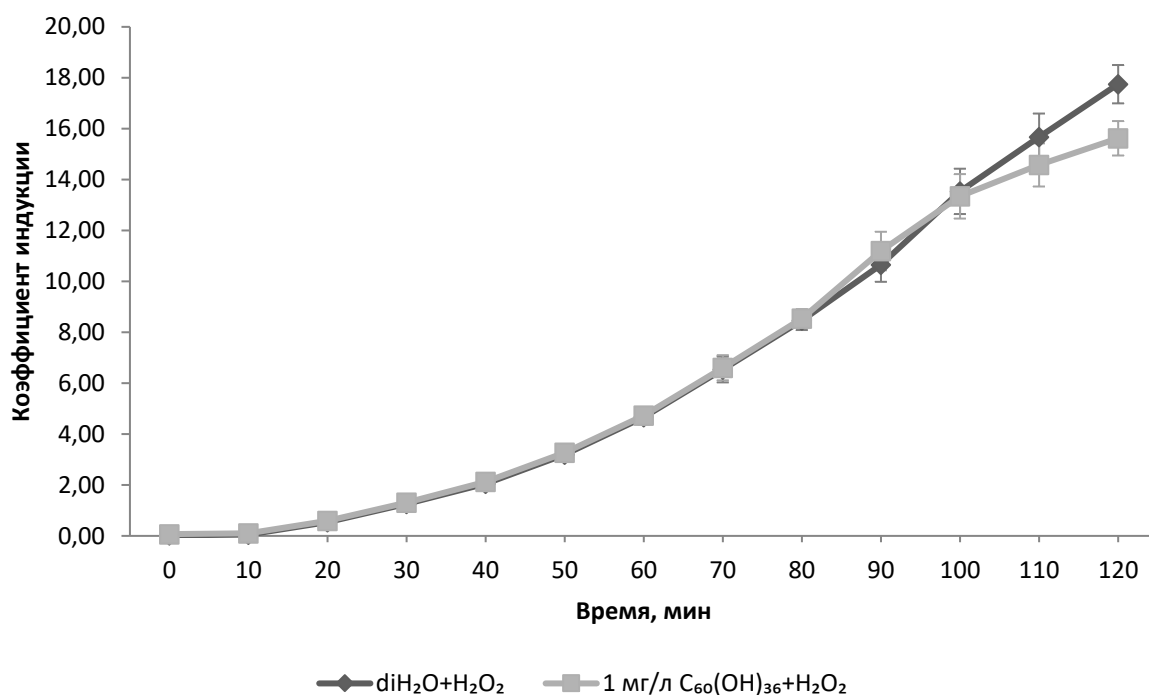


Рисунок 56 – Влияние водного раствора фуллеренола C₆₀(OH)₃₆ 1 мг/л относительно положительного контроля на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

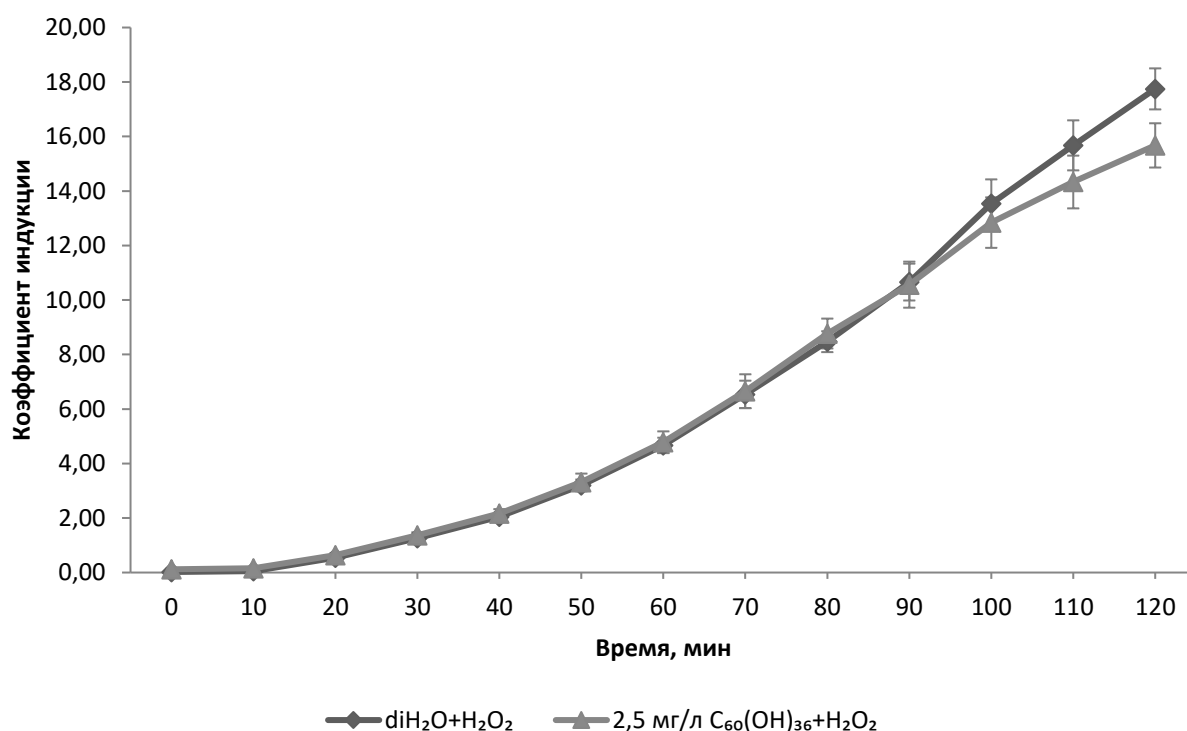


Рисунок 57 – Влияние водного раствора фуллеренола C₆₀(OH)₃₆ 2,5 мг/л относительно положительного контроля на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

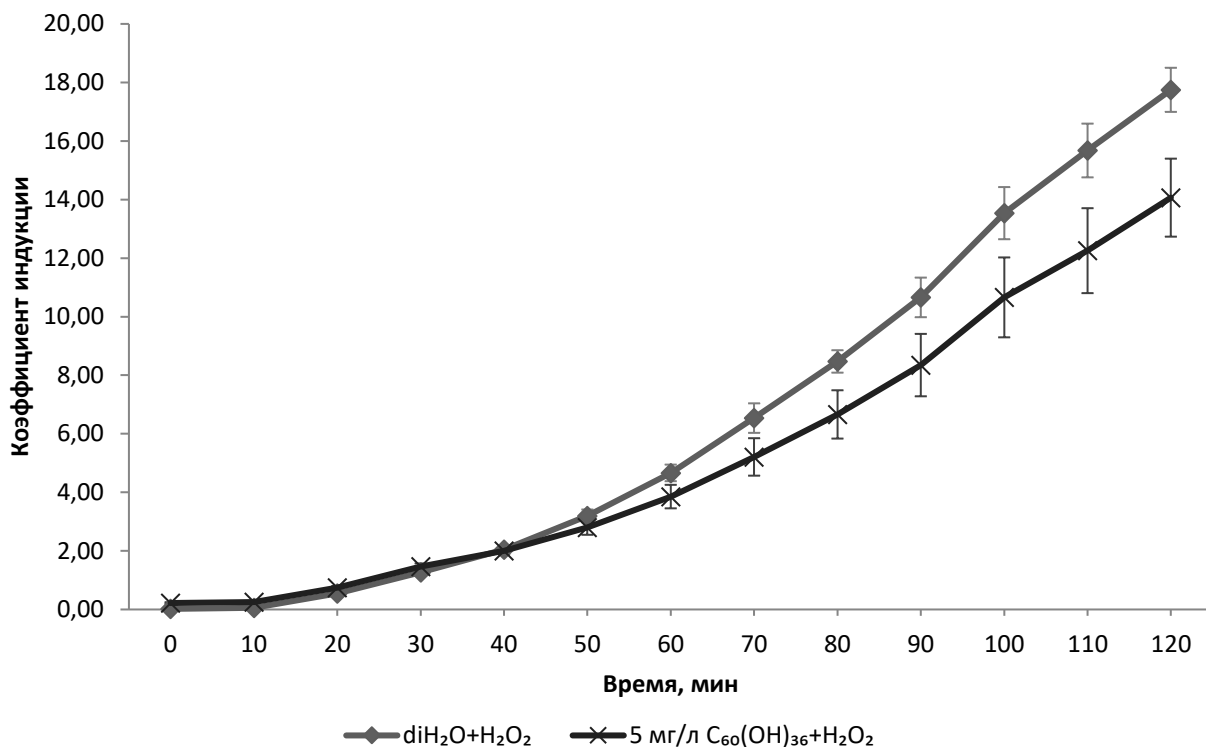


Рисунок 58 – Влияние водного раствора фуллеренола C₆₀(OH)₃₆ 5 мг/л относительно положительного контроля на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

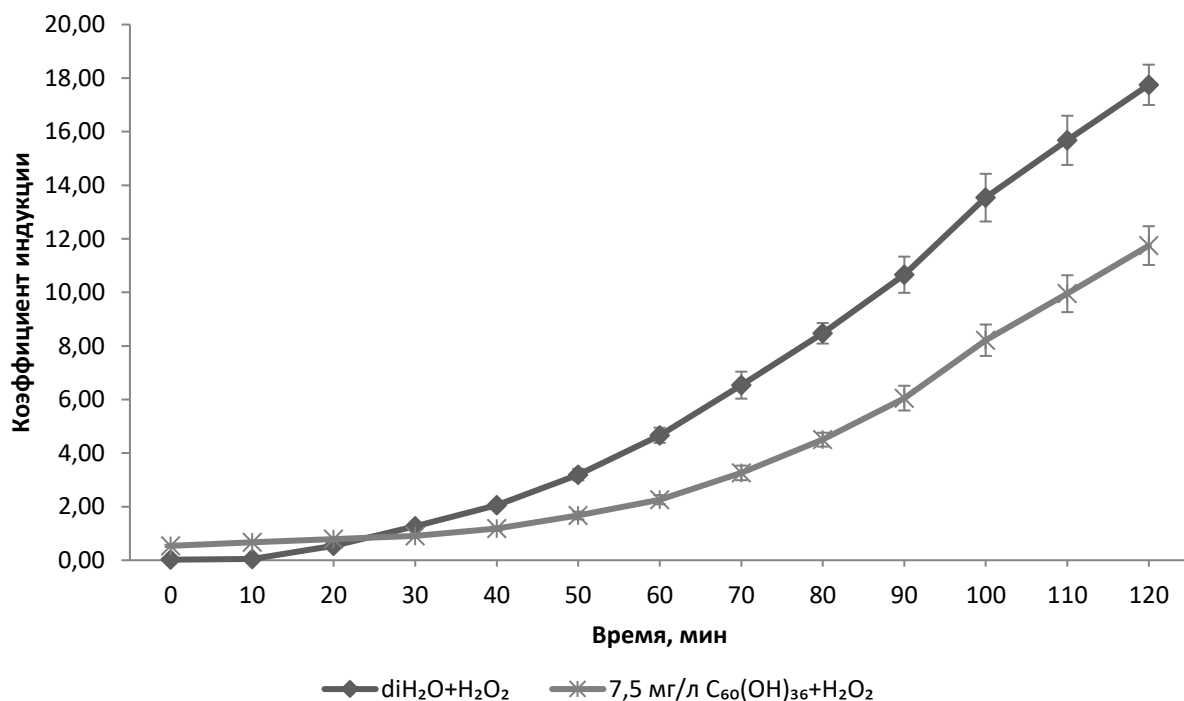


Рисунок 59 – Влияние водного раствора фуллеренола C₆₀(OH)₃₆ 7,5 мг/л относительно положительного контроля на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

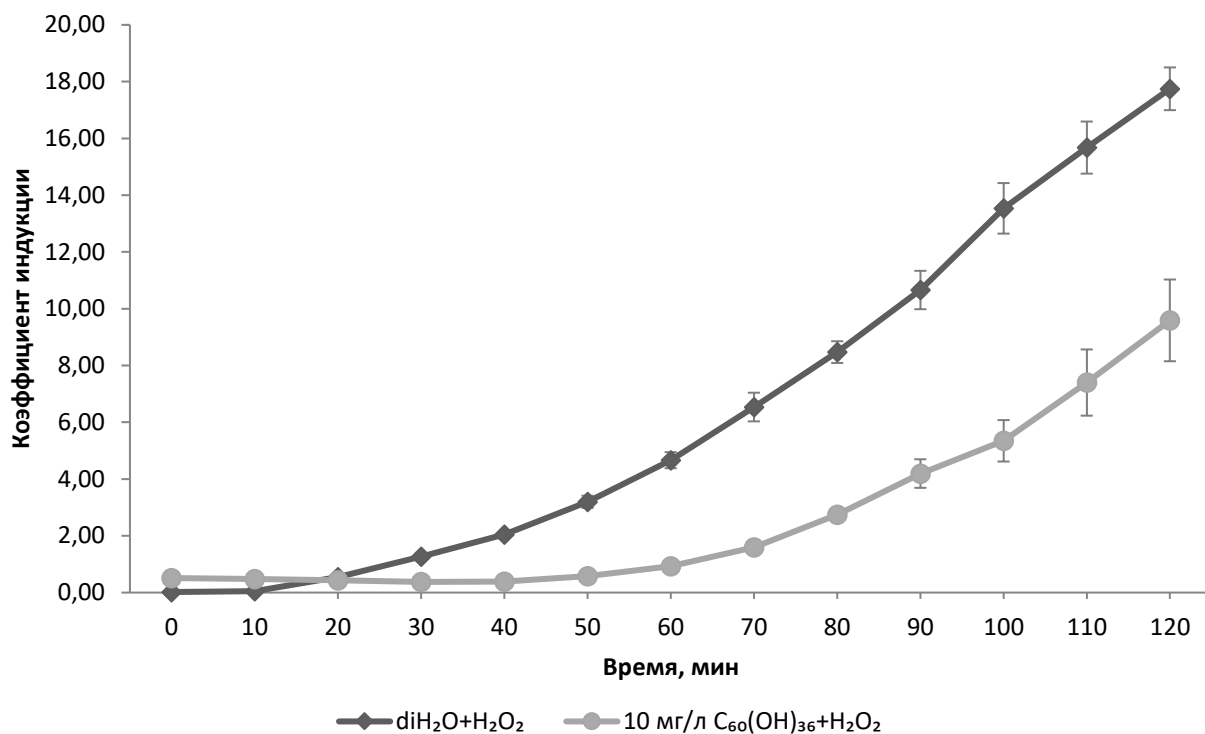


Рисунок 60 – Влияние водного раствора фуллеренола C₆₀(OH)₃₆ 10 мг/л относительно положительного контроля на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), p<0,05.

Было установлено, что антиоксидантный эффект C₆₀(OH)₃₆ в диапазоне концентраций от 1 до 10 мг/л в сурфактине имеет дозозависимую зависимость, как можно видеть на рисунках 61 и 62.

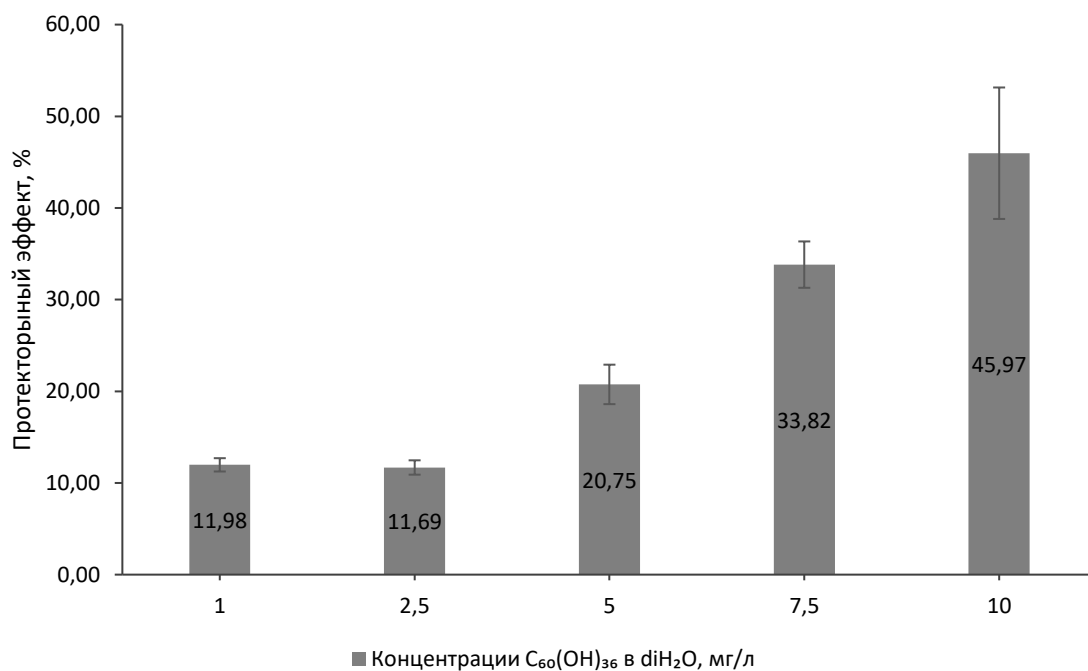


Рисунок 61 – Протекторный (антиоксидантный) эффект $C_{60}(OH)_{36}$ во время максимальной индукции (120 мин) перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG), $p < 0,05$.

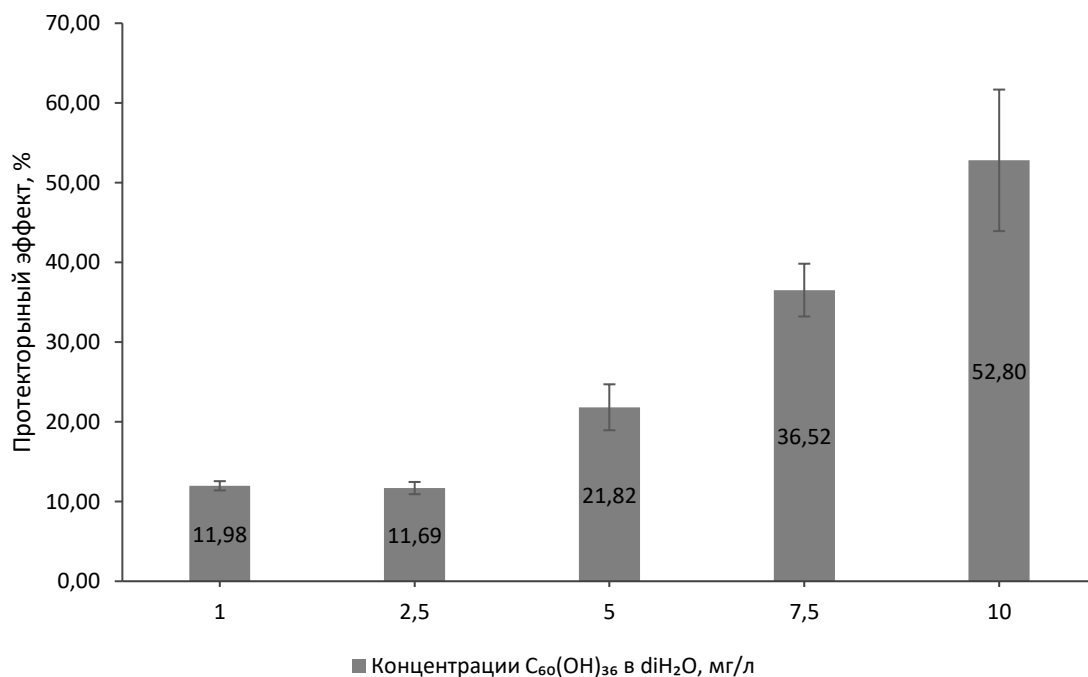


Рисунок 62 – Максимальный протекторный (антиоксидантный) эффект $C_{60}(OH)_{36}$ в отношении перекиси водорода, $p < 0,05$. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655(pKatG).

Коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллеренола и оказываемым ими протекторным эффектом в отношении перекиси водорода во время максимальной индукции составил 0,980; коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллеренола и оказываемым им максимальным протекторным эффектом в отношении перекиси водорода равен 0,976, что означает сильную прямую связь, т.е. антиоксидантный эффект $C_{60}(OH)_{36}$ является дозозависимым.

Затем для оценки влияния сурфактина на антиоксидантную активность фуллеренола поставили биолюминесцентный тест с фуллеренолом, растворённым в сурфактине 31,25 мг/л, как в опытах с немодифицированным C_{60} .

Используемая для солубилизации фуллерена концентрация сурфактина 31,25 мг/л не оказала статистически значимого влияния на индукцию экспрессии *katG* перекисью водорода относительно деионизированной воды (diH_2O), и влияние $C_{60}(OH)_{36}$ оценивались относительно данной концентрации (контроль растворителя) (рис. 63–67).

Фуллеренол $C_{60}(OH)_{36}$ в концентрации 1 мг/л в водном растворе сурфактина не оказал статистически значимого влияния на индукцию экспрессии *katG* относительно контроля растворителя (рисунок 63). Концентрации $C_{60}(OH)_{36}$ 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 растворителя в присутствии перекиси водорода (рис. 64 – 67).

Максимальное значение протекторного (антиоксидантного) эффекта составило 51,88 % для концентрации $C_{60}(OH)_{36}$ 10 мг/л в водном растворе сурфактина (рис. 69).

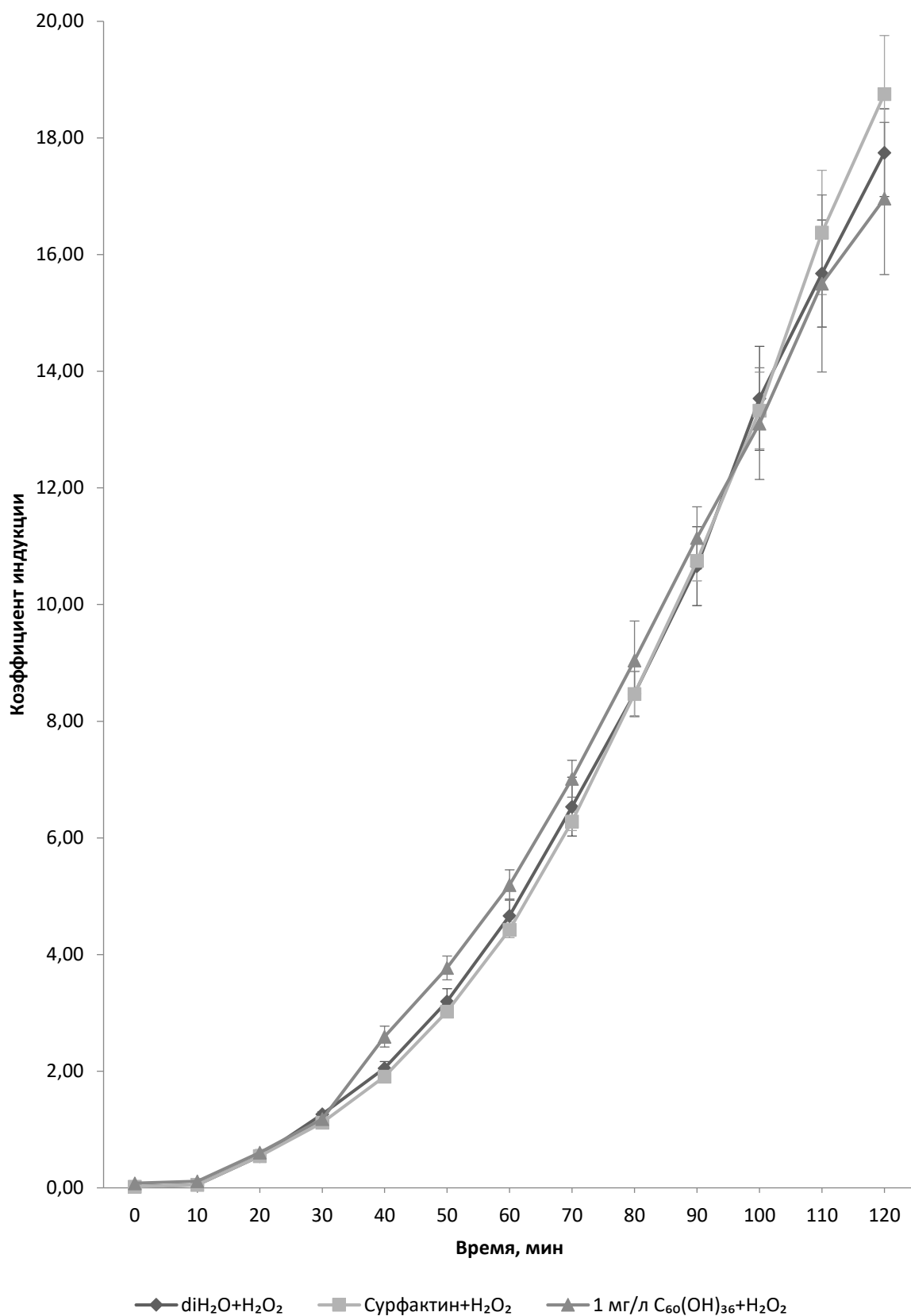


Рисунок 63 – Отсутствие влияния фуллеренола C₆₀(OH)₃₆ 1 мг/л в растворе сурфактина относительно положительного контроля на индукцию экспрессии гена *katG* перекисью водорода биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pKatG).

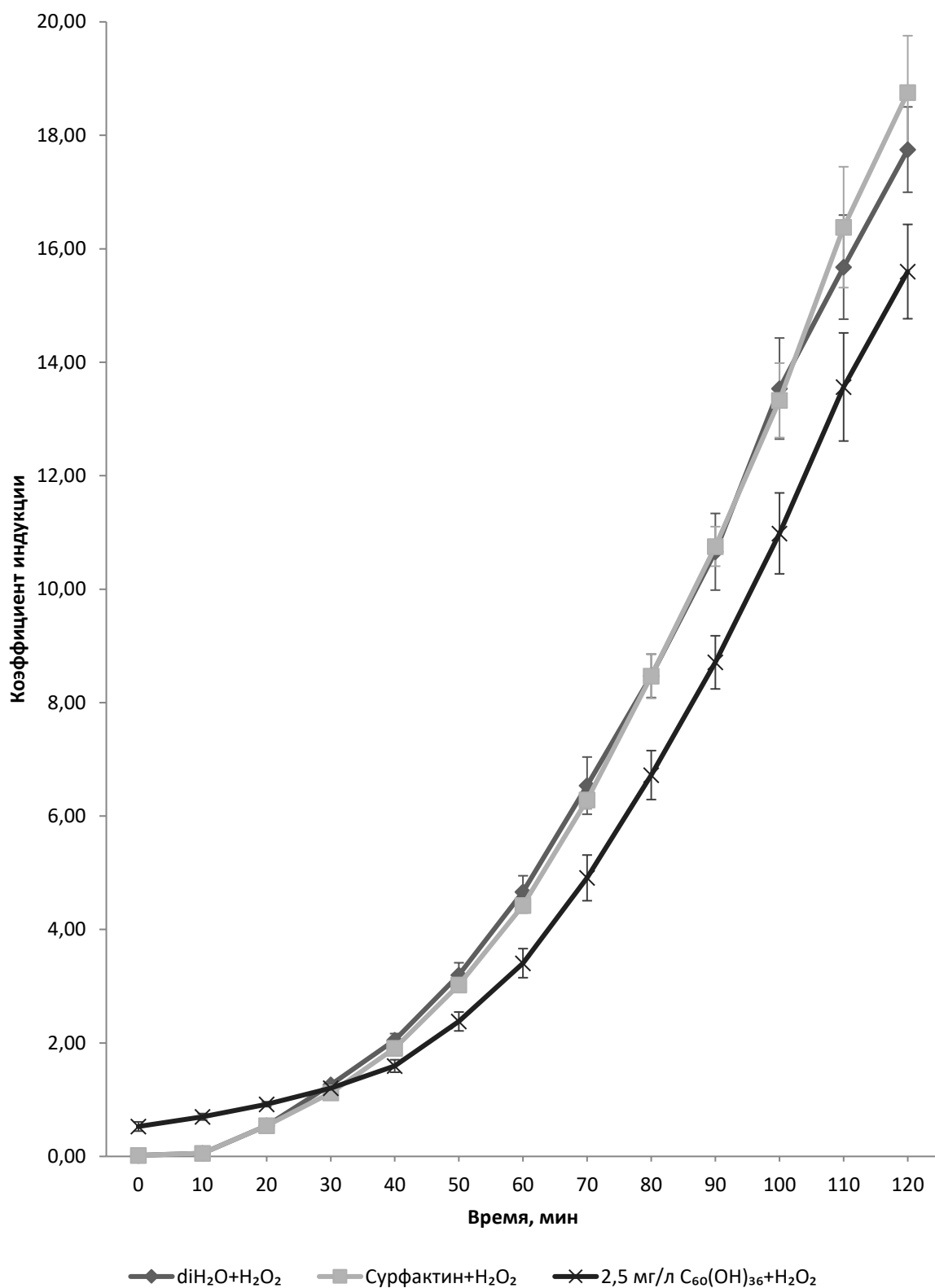


Рисунок 64 – Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) относительно контроля растворителя фуллеренолом C₆₀(OH)₃₆ в концентрации 2,5 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

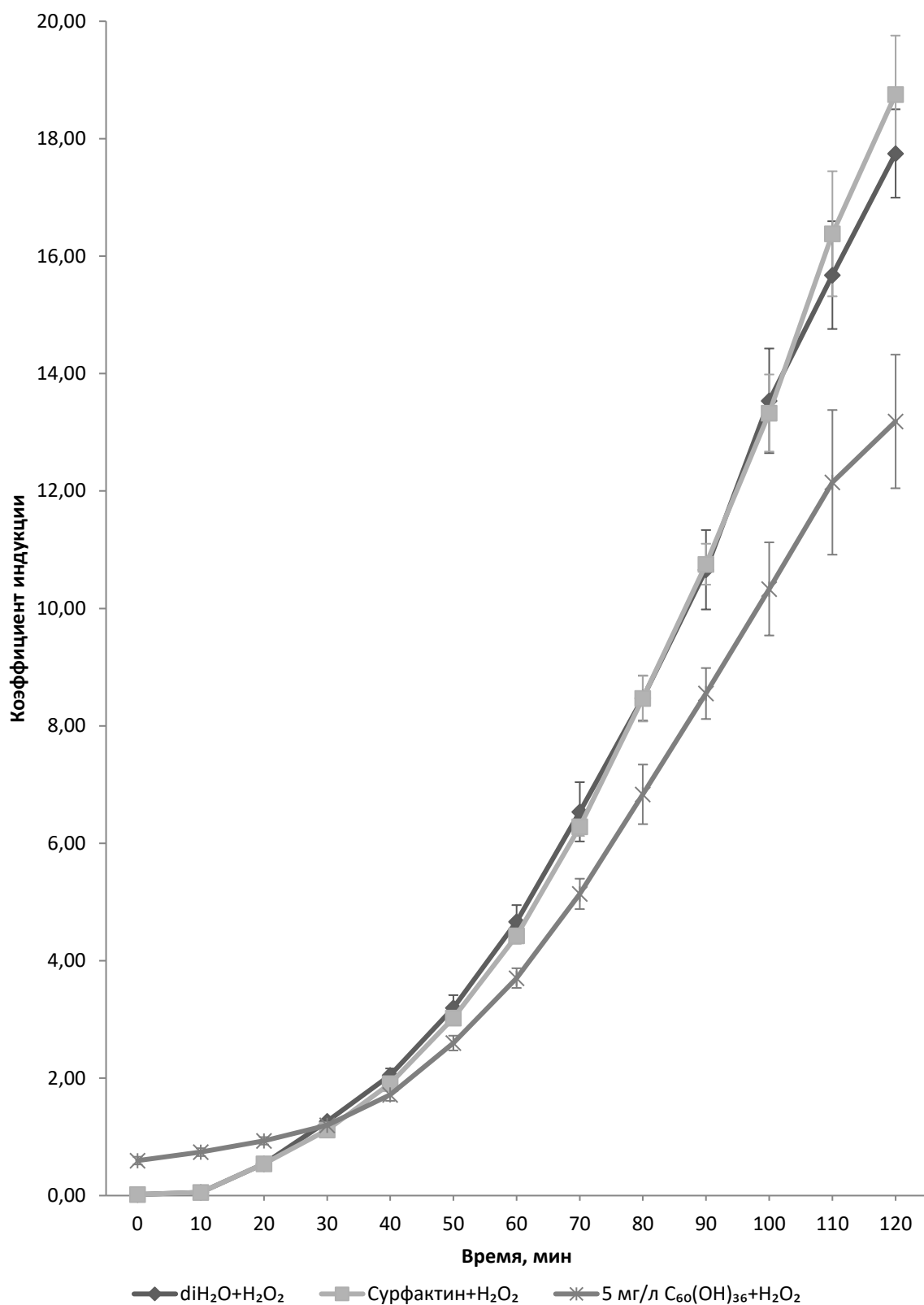


Рисунок 65 – Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) относительно контроля растворителя фуллеренолом C₆₀(OH)₃₆ в концентрации 5 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

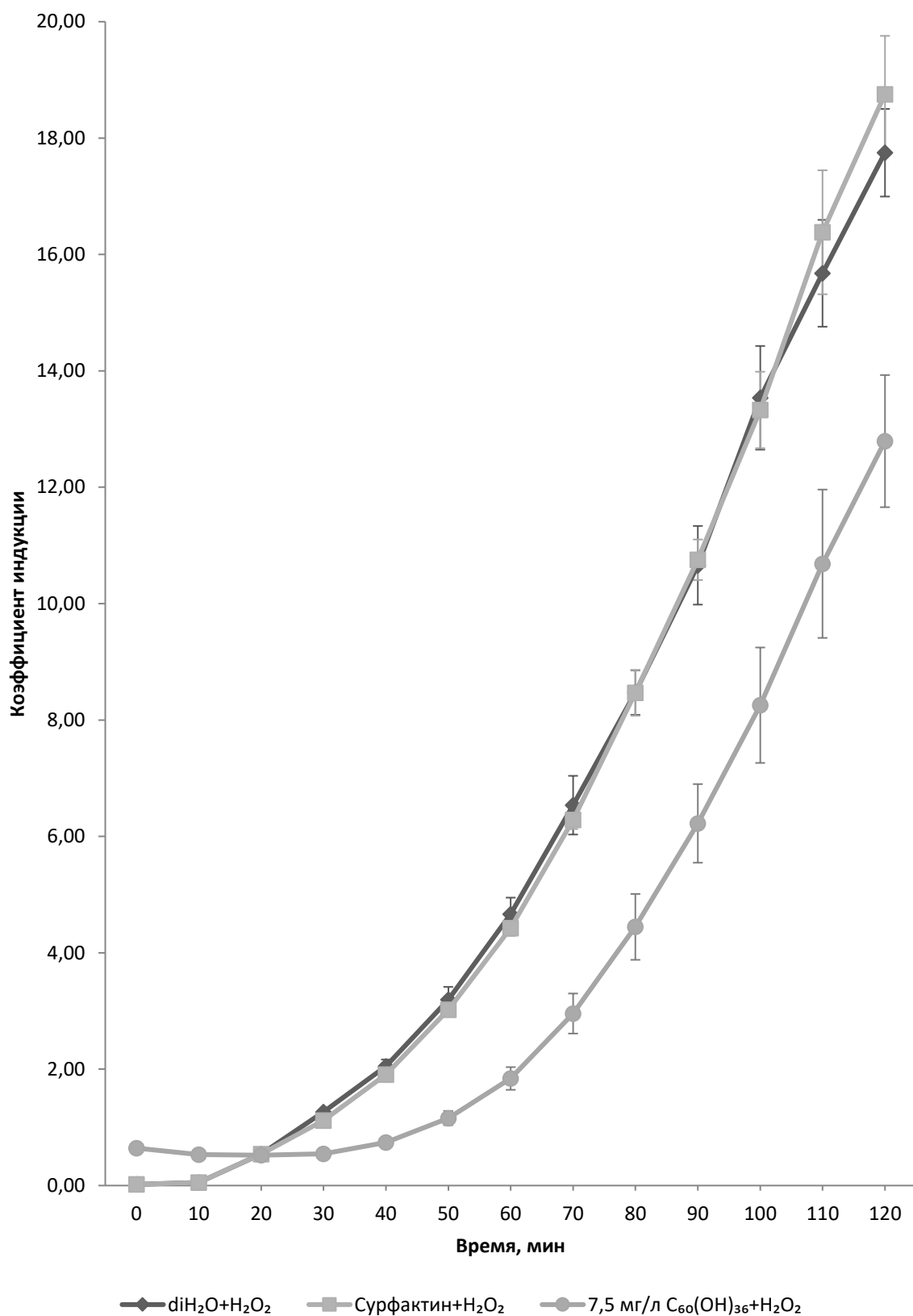


Рисунок 66 – Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) относительно контроля растворителя фуллеренолом C₆₀(OH)₃₆ в концентрации 7,5 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

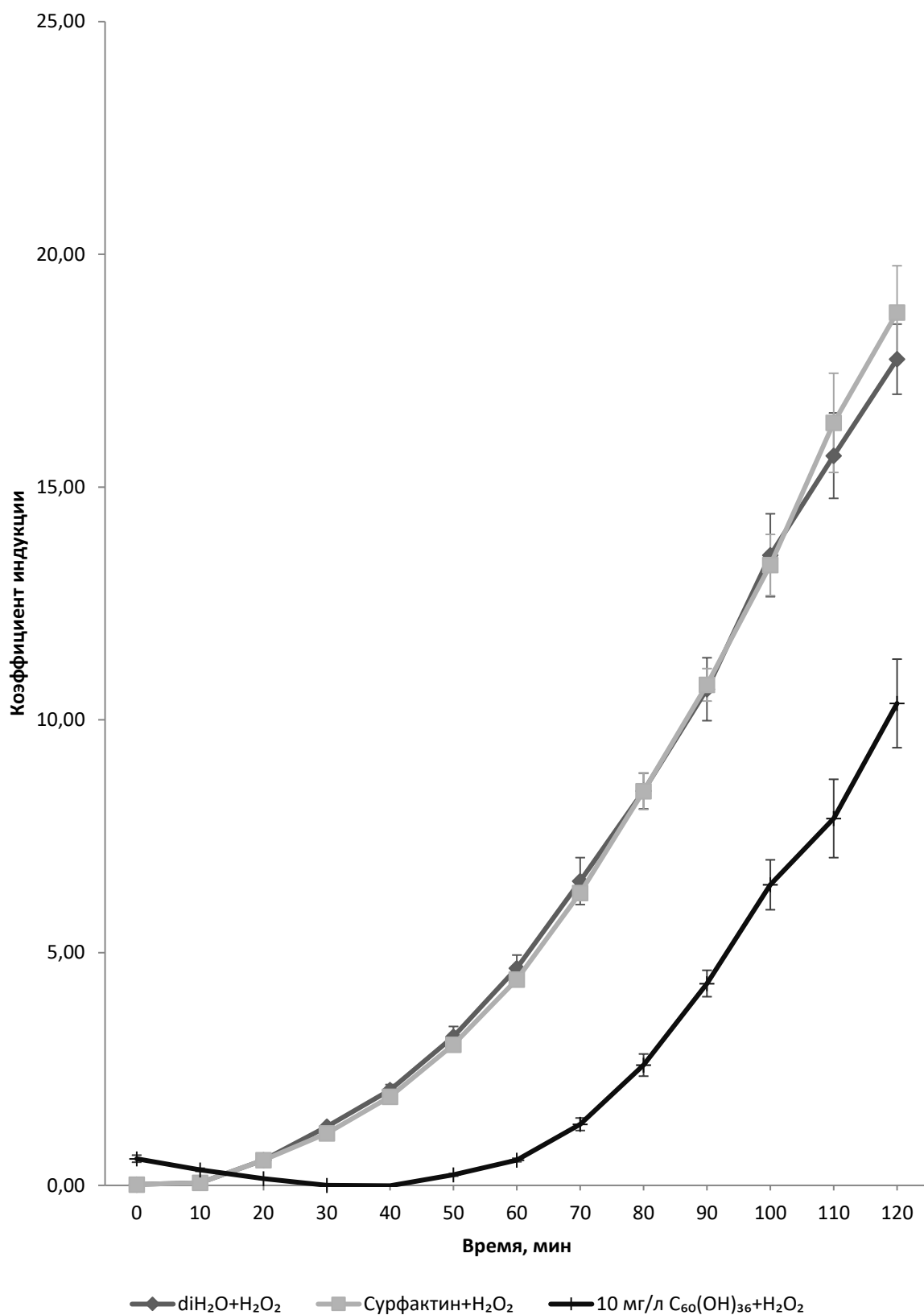


Рисунок 67 – Снижение индукции экспрессии гена *katG* штамма *E. coli* MG1655 (pKatG) относительно контроля растворителя фуллеренолом C₆₀(OH)₃₆ в концентрации 10 мг/л в растворе сурфактина в присутствии перекиси водорода (p<0,05).

Было установлено, что антиоксидантный эффект $C_{60}(OH)_{36}$ в диапазоне концентраций от 1 до 10 мг/л в сурфактине имеет дозозависимость, как можно видеть на рисунках 68 и 69.

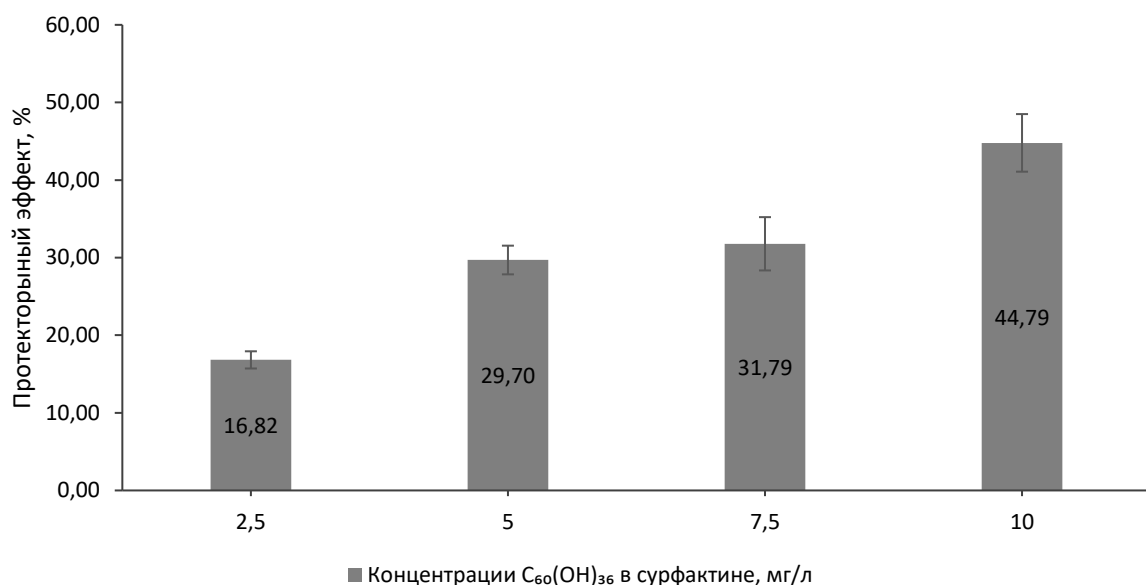


Рисунок 68 – Протекторный (антиоксидантный) эффект $C_{60}(OH)_{36}$ в сурфактине в отношении перекиси водорода во время максимальной индукции, $p < 0,05$. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655(pKatG).

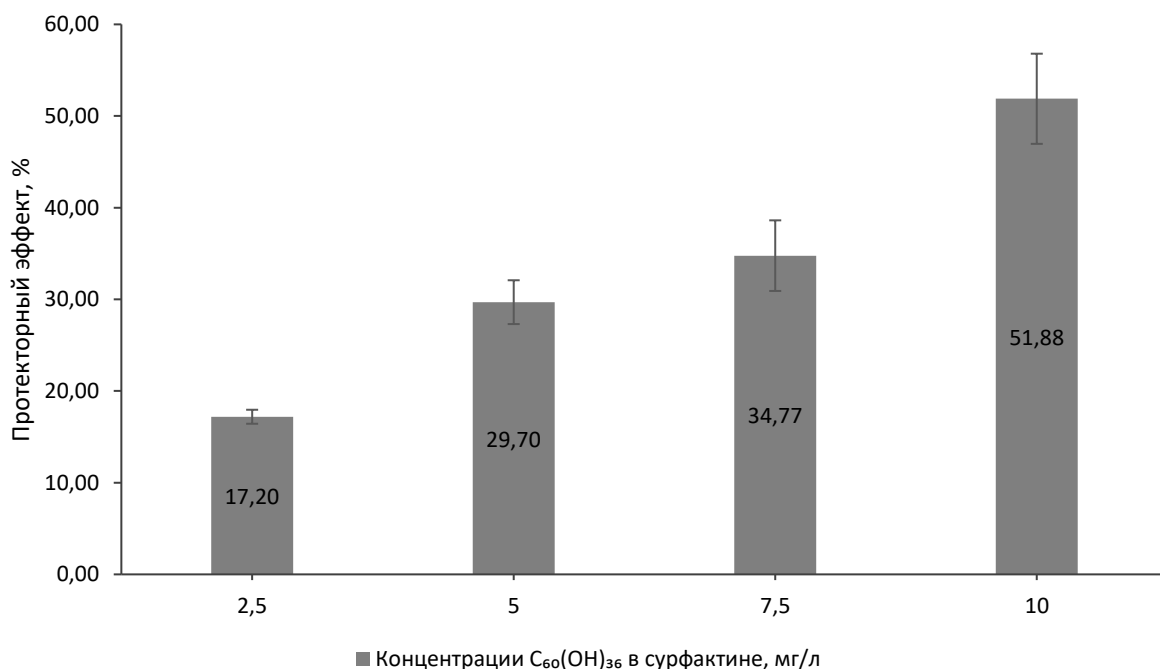


Рисунок 69 – Максимальный протекторный (антиоксидантный) эффект $C_{60}(OH)_{36}$ в сурфактине в отношении перекиси водорода, $p < 0,05$. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655(pKatG).

Коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллеренола в водном растворе сурфактина и оказываемым ими протекторным эффектом в отношении перекиси водорода во время максимальной индукции составил 0,970; коэффициент корреляции между значениями концентраций фуллерена и оказываемым ими максимальным протекторным эффектом в отношении перекиси водорода равен 0,980, 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 солубилизатора и мембранотропного вещества, и не увеличивает антиоксидантное действие фуллерена.

Коэффициент корреляции между значениями протекторного эффекта в отношении перекиси водорода во время максимальной индукции концентраций фуллеренола в воде и фуллерена в растворе сурфактина составил 0,949; что означает сильную прямую связь; коэффициент корреляции между значениями максимального протекторного эффекта фуллеренола в воде и фуллерена в растворе сурфактина в отношении перекиси водорода равен 0,946; что означает сильную прямую связь; т.е. зависимость антиоксидантного эффекта от концентрации наночастиц фуллерена является прямой независимо от способа повышения растворимости C_{60} .

Коэффициент корреляции между значениями протекторного эффекта в отношении перекиси водорода во время максимальной индукции концентраций фуллеренола в растворе сурфактина и фуллерена в растворе сурфактина составил 0,840; что означает сильную прямую связь; коэффициент корреляции между значениями максимального протекторного эффекта фуллеренола в растворе сурфактина и фуллерена в растворе сурфактина в отношении перекиси водорода равен 0,883; что означает сильную прямую связь; т.е. зависимость антиоксидантного эффекта от концентрации наночастиц фуллерена является прямой независимо от модификаций C_{60} .

3.6 Антимутагенный эффект C₆₀ *in vivo*.

Эксперименты показали, что концентрация C₆₀ 10 мг/л в растворе сурфактина статистически значимо снижает частоту как спонтанного, так и индуцированного диоксидином мутагенеза устойчивости *E. coli* к рифампицину. Сурфактин (контроль растворителя) не оказывает статистически значимого влияния на частоту мутаций (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние фуллерена C₆₀ в растворе сурфактина на выживаемость и частоту мутагенеза *E. coli* MG1655.

	Среда без рифампицина			Среда 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
Диоксидин	10 ⁻⁵	51,67±5,51	30,10	10 ⁻¹	60,00±3,61	(11,61±3,53)×10 ⁻⁵
Сурфактин + диоксидин	10 ⁻⁵	16,67±1,53	9,71	10 ⁻¹	26,67±2,08	(16,00±4,79)×10 ⁻⁵
C ₆₀ в сурфактине + диоксидин	10 ⁻⁵	18,33±0,58	10,68	10 ⁻¹	11,67±0,58	(6,36±0,93)×10 ⁻⁵

Таким образом, C₆₀ 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.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Биологические эффекты фуллерена C₆₀ и их механизмы

Из представленных данных можно видеть, что фуллерен C₆₀ обладает антимуtagenным 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). 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 трихлорметил-пероксильный 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).

Благодаря своей структуре фуллерен C₆₀ может связывать до шести электронов (Chistyakov et al., 2013; Emelyantsev et al., 2019), которые быстро перемещаются вокруг фуллереновой решётки из-за дипольных моментов. Когда C₆₀ подвергается воздействию света, электроны выталкиваются на более высокий энергетический уровень, в результате чего возбужденное синглетное состояние C₆₀ реагирует с молекулой кислорода (O₂) с образованием синглетного кислорода (¹O₂), т. е. кислорода со свободным электроном на внешней орбите. Фуллерены

являются очень эффективными генераторами синглетного кислорода с квантовым выходом $^1\text{O}_2$, близким к единице. Они эффективно поглощают свет в ультрафиолетовой и умеренно в видимой областях спектра (Yamakoshi et al., 2003), что открывает путь для их применения в фотодинамической терапии (Orlova et al., 2013).

Биологическая активность C_{60} сложна и может быть объяснена несколькими факторами, такими как: (1) липофильность, которая определяет мембранотропные свойства, (2) дефицит электронов, что делает возможным взаимодействие со свободными радикалами, (3) и способность фуллерена в возбужденном состоянии передавать энергию молекуле кислорода и преобразовывать ее в синглетный кислород (Piotrovsky et al., 2008; Galvan et al., 2017).

В 2013 году была выдвинута гипотеза о способности фуллерена быть переносчиком протонов (Chistyakov et al., 2013). Было высказано предположение, что фуллерен способен поглощать протоны, и приобретая таким образом положительный заряд, проникать в митохондрии клеток, действуя как мембранотропный протонофор. Такой механизм объясняет снижение образования супероксидного анион-радикала из-за мягкого разобщения дыхания и фосфорилирования (Korshunov, Skulachev, Starkov, 1997). Теоретическое моделирование с помощью теории функционала плотности (DFT) подтвердило способность C_{60} поглощать до 6 протонов (Chistyakov et al., 2013).

Однако данные расчеты производились для немодифицированного фуллерена, без учета процессов, происходящих в водных растворах.

4.2. Образование производных фуллерена в клетке

Фуллерен C_{60} способен взаимодействовать с различными радикалами, включая гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$), гидроксипероксильный радикал ($\text{ROO}\bullet$) и супероксид ($\text{O}_2\bullet^-$), с последующей химической модификацией молекулы до фуллеренолов, карбоксифуллеренов и карбоксифуллеренолов, что является основным типом его химических превращений со свободными радикалами кислорода (Галимов, Булгаков, Газеева, 2011; Grebowski et al., 2020; Krokosz et al.,

2014; Ali et al., 2004). Хотя прямые данные о реакции с гидроксипероксильным радикалом ($\text{ROO}\cdot$) и супероксидом в клеточных условиях отсутствуют, однако, можно предположить реакционную способность C_{60} и его окисленных производных со свободными радикалами внутри клетки и частичное ингибирование свободнорадикальной цепной реакции окисления.

Гидратированная форма немодифицированного фуллерена C_{60}FWS демонстрирует защитное действие против окислительной модификации ДНК (снижение количества окисленного гуанина – 8-оксогуанина на 35 – 50 %), вызванной радиационным облучением, что косвенно указывает на его взаимодействие со свободными реактивными радикалами, включая гидроксильные (Гудков и др., 2009)

Таким образом, присоединение радикалов кислорода к немодифицированному фуллерену C_{60} при индуцированном окислительном стрессе перекисью водорода с образованием гидроксильного радикала в результате реакции Фентона и генератором супероксида паракватом может вызвать образование производных C_{60} в этих растворах, следовательно, возможно, мы также описываем эффекты гидроксильного и пергидроксильного фуллерена. Возможным подтверждением этому может служить близкие значения антиоксидантного эффекта в отношении АФК немодифицированного фуллерена и химически синтезированного нами гидроксильного производного, фуллеренола $\text{C}_{60}\text{OH}_{36}$.

Поверхностно-активные вещества эффективно повышают растворимость C_{60} в воде. Несколько поверхностно-активных веществ, демонстрирующих эту способность, включают Tween 20, Tween 60, Tween 80, Triton X-100, поливинилпирролидон и полиоксиэтиленовый лауриловый эфир (Oh et al., 2024). Эти поверхностно-активные вещества создают мицеллярные структуры, которые инкапсулируют гидрофобный фуллерен, представляя гидрофильные поверхности водной среде.

Гидратация немодифицированных фуллеренов в воде включает сложные взаимодействия, которые были выявлены с помощью моделирования

молекулярной динамики и спектроскопических исследований. Вода образует слоистые структуры вблизи поверхности частиц фуллерена, причем плотность межфазной воды увеличивается с увеличением размера частиц (Keshri, Tembe, 2017; Makarucha et al., 2016). Вместо равномерного расположения молекулы принимают различные ориентации в первой гидратной оболочке, несмотря на сферическую симметрию фуллеренов (Weiss, Raschke, Levitt, 2008).

Отсутствие протекторного действия C_{60} в 2% водном растворе TWEEN 80 может быть объяснено тем, что при добавлении TWEEN 80 2 % в среду получается концентрация 0,2 %, что ниже первой критической концентрации мицеллообразования TWEEN 80 (0,012 mM, что равно 0,0168 % по объёму) (Shi, Luo, Li, 2011) и C_{60} менее биодоступен для клеток, чем в растворе сурфактина. Также антиоксидантное действие самого C_{60} незначительно по сравнению с TWEEN 80. Концентрации сурфактина в воде для использования в качестве растворителя (31,25 мг/л) и для наибольшей проницаемости мембран (312,5 мг/л) находятся ниже минимальной гемолитической концентрации (400 мг/л) (Morán, Martinez, Siñeriz, 2002), что обуславливает возможность их безопасного применения на эукариотах. Таким образом, суспензии фуллерена C_{60} в сурфактине могут найти биомедицинское применение.

4.3. Образование агрегатов фуллеренов в растворе

Одним из примечательных результатов сравнения растворов C_{60} с добавлением твина и сурфактина в данной работе является разница в размере агрегатов, образующихся в данных растворах. Исходя из результатов измерения распределения размеров агрегатов фуллерена C_{60} , средний размер агрегатов в сурфактине (302 нм) в 43 раза больше, чем в TWEEN 80 (7 нм).

Согласно (Arndt и др., 1999), размер агрегатов C_{60} 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.

Размер агрегатов фуллерена в растворе также существенно влияет на их биологические свойства посредством множества механизмов, как продемонстрировано экспериментальными и *in silico* исследованиями. При этом не обязательно меньшие агрегаты вызывают наиболее благоприятные эффекты. Напротив, меньшие агрегаты (4–10 нм) проявляют более высокую токсичность по сравнению с более крупными агрегатами. Так, при концентрациях 4–6 мг/л нано- C_{60} (nC_{60}) с меньшими размерами вызывали большую цитотоксичность и связанную с апоптозом транслокацию Вах в клетках человека (Song et al., 2012).

Согласно данным литературы, агрегаты фуллерена <200 нм более эффективно усваиваются посредством энергозависимого эндоцитоза, в то время как более крупные частицы полагаются на пассивную диффузию. Ингибиторы снижают поглощение более мелких агрегатов на 30–50%, подтверждая доминирование активного транспорта. При этом сывороточные белки (например, сыворотка плода крупного рогатого скота) стабилизируют более мелкие агрегаты (~90 нм) и подавляют клеточное поглощение на 40 % (Ha et al., 2022).

Моделирование методом молекулярной динамики показывает, что небольшие кластеры (≤ 6 нм) проникают в липидные мембраны, вызывая локальные структурные нарушения без глобального разрыва мембраны. Предварительно собранные кластеры проникают в мембраны более эффективно, чем отдельные частицы (Zhang et al., 2013).

В этой же работе показано, что более высокие концентрации C_{60} (например, 1 мг/л) благоприятствуют более крупным агрегатам, снижая биоактивность. Разбавление увеличивает долю небольших кластеров, усиливая взаимодействие с биологическими мишенями. Данный эффект может объяснить, в частности, отсутствие линейной дозовой зависимости для ДНК-протекторного эффекта в наших экспериментах.

Таким образом, для практического применения биологических свойств фуллеренов задача не только в том, чтобы получить раствор с максимально мелкими частицами, но и в том, чтобы подобрать оптимальное значение размера агрегатов.

4.4. Влияние сурфактина на вышеописанные процессы

Добавление сурфактина, безусловно, должно повлиять на эти процессы. Мы предполагаем, что добавление солубилизатора сурфактина значительно улучшает поведение фуллерена C_{60} в водных растворах посредством трех основных механизмов:

1) Формирование агрегатов оптимального размера: мицеллы сурфактина инкапсулируют молекулы C_{60} , предотвращая агрегацию и поддерживая кластеры размером <200 нм. Это увеличивает эффективную площадь поверхности для взаимодействия с водой.

2) Стабилизация гидратной оболочки: сурфактин может способствовать упорядоченным водным структурам вокруг C_{60} .

Эти эффекты возникают из-за уникальной амфифильной структуры сурфактина (циклический гептапептид с жирнокислотной цепью) и вытекающих из нее физико-химических свойств.

Сурфактин усиливает биологические свойства фуллерена в первую очередь за счет его уникального поведения при мицеллизации.

Гомологи сурфактина демонстрируют исключительно низкие значения ККМ (например, 0,08 мМ для сурфактина C15), что позволяет образовывать мицеллы при минимальных концентрациях (Bochynek et al., 2023). Это позволяет эффективно инкапсулировать гидрофобные фуллерены, такие как C_{60} , в мицеллярные ядра даже в разбавленных системах.

Вероятно, β -гидроксигирная кислотная цепь в сурфактине может взаимодействовать с гидрофобной углеродной клеткой фуллерена посредством:

- π - π -укладки с сопряженными двойными связями фуллерена;
- сил Ван-дер-Ваальса между алкильными цепями и C_{60} .

Эта инкапсуляция защищает фуллерены от водной среды, сохраняя при этом коллоидную стабильность.

Кроме того, сурфактин снижает поверхностное натяжение до 27,5 мН/м (C15), улучшая смачиваемость и межфазные взаимодействия (Bochynek et al.,

2023).

Циклическое гептапептидное кольцо обеспечивает гидрофильную внешнюю поверхность, что обеспечивает повышенную растворимость в воде комплексов фуллерен-мицелла.

Жесткая циклическая структура и асимметричная амфифильность сурфактина (большая гидрофильная площадь поверхности против компактного гидрофобного ядра) обеспечивают стабильные мицеллы, которые предотвращают агрегацию фуллерена, одновременно способствуя контролируемому высвобождению.

Поддерживая фуллерен в нанодисперсном состоянии, мицеллы сурфактина увеличивают проницаемость клеточной мембраны, уменьшают непреднамеренную токсичность, связанную с агрегацией, и повышают эффективность удаления АФК при более низких дозах.

Сочетание низкой ККМ, точного контроля размера и внутренней биоактивности делает сурфактин подходящим солюбилизатором для оптимизации терапевтических и экологических применений фуллерена.

Таким образом, хотя сурфактин напрямую не вызывает гидроксилирование, его стабилизация гидратированных наноагрегатов C_{60} создает условия, благоприятствующие контролируемым поверхностным реакциям в биологических средах. Это делает солюбилизированный сурфактином C_{60} особенно подходящим для применений, требующих устойчивой антиоксидантной активности без химической модификации.

4.5. Биодоступность и проникновение через мембраны

Еще одним механизмом, обеспечивающим активизацию биологических свойств C_{60} в растворе с сурфактином, может быть повышение биодоступности за счет повышения проницаемости мембран. Эта гипотеза позволяет объяснить, почему в эксперименте Ваати и соавт. (Ваати et al., 2012), в котором фуллерен C_{60} 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-продуцирующими, помимо потенциально пробиотических штаммов наиболее известного продуцента *B. subtilis* (Lee et al., 2012; Mohammadipour et al., 2009), являются пробиотические бактерии *Bacillus clausii* (Liu et al., 2020), а также представители рода *Lactobacillus* (Nelson и др., 2020) – компоненты нормальной микрофлоры кишечника млекопитающих (Urdaci, Bressollier, Pinchuk, 2004) и крыс в частности (Klimina et al., 2019).

Отсутствие влияния C_{60} 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 (Baati et al., 2012).

Следовательно, по нашему мнению, все дальнейшие исследования биологической активности фуллеренов на животных должны сопровождаться контролем точного состава микробиоты, например, методами метагеномики и метатранскриптомики. При этом оценка индивидуальных различий должна проводиться еще до начала эксперимента, если, конечно, животные не являются безмикробными (стерильными).

Известно, что наноматериалы способны изменять состав кишечной микробиоты (Li et al., 2024), как, впрочем, и значительная часть вводимых перорально субстанций.

В работе (Ђурашевић et al., 2021) изучили гепатопротекторные эффекты двух доз C_{60} , растворенных в оливковом масле. Наблюдалось улучшение антиоксидантного статуса печени, вызванное C_{60} , сопровождалось снижением экспрессии HMGB1 в печени и увеличением ядерного соотношения Nrf2/NF- κ B p65, что предполагает снижение воспаления, некроза и фиброза. Были отмечены различия структуры микробиома во всех экспериментальных группах, хотя это скорее следствие эксперимента.

В работе (Ђурашевић et al., 2020) были изучены эффекты двенадцатинедельного приема раствора фуллерена C_{60} в оливкового/кокосового

масла на широкий спектр параметров у крыс. Было показано, что фуллерен изменил структуру микробиоты кишечника в сторону бактерий, которые улучшают липидный гомеостаз, вызывая снижение концентрации триглицеридов в сыворотке крови. Однако, в экспериментальных группах наблюдались и негативные эффекты.

Таким образом, необходимо рассматривать взаимное влияние фуллеренов и микробиоты, в том числе спектра выделяемых метаболитов, чтобы увеличить воспроизводимость экспериментов на животных с пероральным введением фуллеренов. Стоит отметить, что подобранная для использования в качестве солюбилизатора для фуллерена C_{60} и для наибольшего увеличения проницаемости мембран для протекторов концентрация сурфактина ниже минимальной концентрации, при которой сурфактин проявляет гемолитическую активность (50 мг/л) (Santos, Silveira, Pereira, 2018), что открывает перспективу исследований суспензий фуллерена в сурфактине на животных моделях.

4.6. Влияние фуллерена на стабильность ДНК, экспрессию генов SOS-ответа и мутагенез

Полученные данные позволяют предположить, что фуллерены демонстрируют антимуtagenные свойства, прежде всего, благодаря своей антиоксидантной активности или прямому взаимодействию с агентами, повреждающими ДНК. Прямое взаимодействие с ДНК в эукариотической клетке для фуллерена затруднено ее компартиментализацией и множеством защитных механизмов, охраняющий генетический материал. ДНК-тропные эффекты, поэтому, если таковые имеются, могут быть более ярко выражены в бактериальных моделях.

Ароматические соединения, в частности фенолы, способны проявлять антимуtagenную активность как через внутриклеточные, так и через внеклеточные механизмы (Słoczyńska et al., 2014). Внутриклеточные механизм включает вмешательство в метаболизм этих мутагенов цитохромом P450, и взаимодействие с активными метаболитами мутагенов (Marnewick, Gelderblom, Joubert, 2000). Кроме того, антимуtagenная активность этих соединений может быть связана с

восстановлением мутагенов, обладающих электрофильными свойствами (Marnewick et al. 2000).

Сообщалось о гетероассоциации чистый фуллерен C_{60} с ароматическими противоопухолевыми препаратами (доксорубин, профлавин) *in vitro*, не зависящей от типа используемой клеточной культуры. Таким образом, фуллерен C_{60} может снижать биологические эффекты, вызываемые ароматическими препаратами, тем самым указывая на потенциальную возможность использования фуллерена C_{60} в качестве молекулы-перехватчика для модуляции эффекта и при передозировке ароматических препаратов (Skamrova et al., 2014). Сообщалось о комплексообразовании фуллерена с другим противоопухолевым препаратом, берберин, за счёт гидрофобных взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и π -стэкинга, в результате которого увеличивалась эффективность противоопухолевой терапии (Grebinyk et al., 2019).

Возможные механизмы антиоксидантных эффектов фуллеренов уже обсуждались выше. Тем не менее, стоит рассмотреть другие возможные механизмы.

4.6.1. Прямое связывание с ДНК

В работе (Zhao, Liu, 2021) при разработке антиоксидантного комплекса для защиты ДНК обнаружено, что введение фуллеренового фрагмента в дипептид позволяет усилить антиоксидантный эффект на 20-30%, поскольку фуллереновый фрагмент облегчает интеркалирование соответствующего дипептида с цепями ДНК и, таким образом, увеличивает антиоксидантную эффективность.

Авторами (Paravasileiou et al., 2017) методами компьютерного моделирования рассчитано множество вариантов взаимодействия фуллеренов и их производных с ДНК. Молекулярно-динамическое моделирование комплексов показало, что немодифицированные фуллерены не оказывают эффектов, а связывание гидроксильированного фуллерена с ДНК опосредовано водородными связями. Что интересно, авторы показали, что фуллерены небольшого размера, такие как C_{20} , не способны связываться с ДНК, в то время как связывание C_{60} в

малой бороздке не вызывало никаких парных разрывов в dsDNA, но он слегка деформирует ДНК, и ее спиральный изгиб увеличивается. Связывание чистых фуллеренов с ДНК в основном обусловлено Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, при этом пуриновые основания гуанин и аденин действуют наиболее благоприятно для комплексообразования. Расчеты авторов (Papavasileiou et al., 2017) также показали, что фуллеренолы $C_{60}(OH)_{24}$, независимо от распределения гидроксильных групп, не вызывают деформации ДНК при образовании комплекса. Кроме того, эти результаты подтверждают связывание с большой бороздкой через плотную сеть водородных связей, включающую гидроксильные группы фуллеренола и свободные или мостиковые группы пар оснований $-NH_2$ ДНК, а также кислороды фосфатного остова.

Также расчеты авторов (Papavasileiou et al., 2017) подтверждают связывание фуллеренолов $C_{60}(OH)_{24}$ с большой бороздкой через плотную сеть водородных связей, включающую гидроксильные группы фуллеренола и свободные или мостиковые группы пар оснований $-NH_2$ ДНК, а также кислороды фосфатного остова. Что касается свободной энергии связывания, явное включение воды как части рецептора ДНК дает сопоставимые энергии связывания среди производных в большой бороздке, демонстрируя важность дисперсии гидроксильных групп на поверхности фуллерена.

Авторы (Mrđanović et al., 2009) изучили антигенотоксический потенциал фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$. Фуллеренол опосредовал снижение частоты микроядер (МЯ) и хромосомных aberrаций по сравнению с контрольными группами во всех исследованных конечных точках. Дозозависимое снижение частоты МЯ было обнаружено через 24 часа после обработки фуллеренолом. Большинство aberrаций были хромосомного типа. Результаты показывают, что фуллеренол не вызывает генотоксических эффектов и что он защищает как неповрежденные, так и поврежденные ММК клетки CHO-K1.

Обсуждавшееся выше образование в водных растворах производных фуллеренов может, таким образом, объяснить появление в наших опытах антигенотоксических свойств в растворе с подходящим солюбилизатором

(сурфактином), в то время как в других растворителях данный эффект не проявлялся.

4.6.2. Влияние антиоксидантов на подавление экспрессии стресс-индуцируемых генов *Escherichia coli*

Рассмотрим механизмы, с помощью которых в использованной нами модели *E. coli* и биосенсорном тесте фуллерен C₆₀ снижает индукцию экспрессии ключевых генов, использованных в данной работе.

RecA является ключевым белком SOS-ответа – системы, активируемой при повреждении ДНК. Этот ген играет решающую роль в восстановлении ДНК и инициации мутагенеза при стрессовых условиях.

Прямое подавление SOS-ответа. Антиоксиданты, такие как N-ацетилцистеин (NAC), существенно снижают индукцию SOS-ответа (до 75%) за счет уменьшения внутриклеточного уровня АФК примерно на 40%. Эти данные показывают, что АФК являются ключевым фактором в диоксидин-индуцированном мутагенезе SOS-системы, а снижение их концентрации препятствует активации гена RecA (Rodríguez-Rosado и др., 2019).

Ингибирование активации RecA. Фторхинолоны и другие антибиотики индуцируют мутагенный SOS-ответ и повышают уровень внутриклеточных АФК. RecA активируется при обнаружении одноцепочечной ДНК (ssDNA) после повреждения ДНК (Yang et al., 2018). Антиоксиданты (например, эпикатехин из зеленого чая) подавляют экспрессию recA в *E. coli*, что предотвращает инициацию SOS-ответа. Инактивация SOS-ответа путем подавления recA повышает чувствительность к антибиотикам, особенно к хинолонам, таким как ципрофлоксацин (Yang et al., 2018).

Колицины (продукт гена ColD) – это плазмидно-кодируемые белки, продуцируемые *E. coli* в стрессовых условиях и токсичные для родственных штаммов.

Экспрессия генов колицинов регулируется репрессором LexA – ключевым регулятором системы SOS. Антиоксиданты, снижая уровень АФК, препятствуют

активации RecA, который в активированном состоянии стимулирует автопротеолиз LexA (Ebina et al., 1983). При сохранении функционального LexA продолжается репрессия гена ColD.

Колицины продуцируются *E. coli* под влиянием стрессовых условий, которые повреждают ДНК или ингибируют репликацию ДНК (Ebina et al., 1983). Антиоксиданты, нейтрализуя АФК, уменьшают повреждение ДНК, что предотвращает активацию SOS-ответа и, следовательно, продукцию колицинов, включая ColD (Cascales et al., 2007).

SoxS является частью регулона SoxRS, который защищает от окислительного стресса, вызванного супероксидными радикал-анионами. Регулон SoxRS индуцируется в двухэтапном процессе. Сенсорный белок SoxR активируется при окислении его железо-серного центра супероксид-анионом, после чего активированный SoxR усиливает транскрипцию SoxS (Dong et al., 2015; Touati, 2000). SoxS, в свою очередь, активирует гены регулона, обеспечивающие защиту от окислительного стресса.

Антиоксиданты, нейтрализуя супероксидные радикал-анионы, предотвращают окисление железо-серного центра SoxR, что препятствует его активации и последующей индукции экспрессии SoxS (Dong et al., 2015; Touati, 2000). Экспериментальные исследования показали, что воздействие антиоксидантов снижает уровень АФК и, соответственно, индукцию SoxS (Dong et al., 2015).

Индукция SoxS наблюдается при различных формах химических атак конкурирующих микробов, включая выделение в среду антибиотиков и АФК. Антиоксиданты снижают уровень АФК, образующихся в ответ на эти атаки, снижая индукцию *soxS* (Dong et al., 2015).

Белок OxyR является ключевым транскрипционным фактором, управляющим многими антиоксидантными генами, в т.ч. каталазы *katG*, в ответ на окислительный стресс (Zhang, Hartline, Zhang, 2024). OxyR активируется перекисью водорода и индуцирует экспрессию подконтрольных ему генов, включая *katG* (Åslund et al., 1999).

Антиоксиданты помогают поддерживать OxyR в восстановленной (неактивной) форме, предотвращая его окисление перекисью водорода (Storz, Tartaglia, 1992). В восстановленном состоянии OxyR не может активировать транскрипцию *katG*, что приводит к снижению экспрессии этого гена (Storz, Tartaglia, 1992).

OxyR регулирует более 30 генов, включая антиоксидантные ферменты, такие как *katG*, *ahpCF* и *sodA* (Zhang, Hartline, Zhang, 2024). Антиоксиданты, снижая уровень перекиси водорода до нормальных внутриклеточных концентраций (менее 5 мкМ *in vivo*), предотвращают активацию OxyR и, следовательно, экспрессию *katG* (Åslund et al., 1999).

Таким образом, фуллерен C₆₀, эффективно снижает экспрессию генов *recA*, *colD*, *soxS* и *katG* в *E. coli* через различные, но взаимосвязанные механизмы, центральным из которых является способность нейтрализовать АФК. Нейтрализация АФК предотвращает активацию транскрипционных регуляторов (OxyR, SoxR) и защитных систем (SOS-ответ), что приводит к подавлению экспрессии соответствующих генов.

4.6.3. Снижение частоты спонтанного и индуцированного мутагенеза *E. coli*

Снижение экспрессии генов SOS-ответа в *Escherichia coli* оказывает комплексное воздействие на частоту возникновения мутаций, включая устойчивость к рифампицину. Этот процесс затрагивает ключевые механизмы репарации ДНК, регуляции мутагенеза и адаптации к стрессовым условиям.

Подавление SOS-ответа влияет на устойчивость к рифампицину через множественные механизмы:

1. Снижение активности склонных к ошибкам (error-prone) ДНК-полимераз;
2. Ингибирование RecA-зависимой рекомбинации;
3. Ингибирование стресс-индуцированного мутагенеза.

Эти процессы уменьшают как спонтанные (в 5-10 раз), так и индуцированные (в 50-100 раз) мутации в *proB*.

В данной работе в биосенсорных тестах наблюдалось снижение экспрессии генов SOS-ответа на 22-26 %.

При этом в тестах *in vivo* наблюдалось снижение уровня индуцированного диоксином мутагенеза на 60,23 % относительно контроля растворителя, на 45,2 % относительно индуктора; уровень спонтанного мутагенеза на 59,77 % снижался относительно контроля растворителя, на 44,19 % относительно контроля.

Механизмы индуцированного мутагенеза тесно связаны с механизмами SOS-ответа бактерий. Спонтанный мутагенез тоже не обходится без участия систем репарации. Рассмотрим подробнее эту связь.

Механизмы связи SOS-ответа с мутагенезом. Роль RecA-LexA регуляторной системы.

Влияние подавления SOS-ответа на Rif^r мутации выражается несколькими путями.

Во-первых, это возможно через ингибирование склонной к ошибкам (error-prone) репарации SOS-зависимыми полимеразми.

SOS-ответ активируется через RecA-опосредованный автопротеолиз репрессора LexA. При повреждении ДНК RecA образует филаменты на одноцепочечных участках, что стимулирует расщепление LexA и дерепрессию >40 генов SOS-регулона (Baharoglu, Mazel, 2014; Niccum et al., 2020). Эти гены включают:

- umuDC (кодирует error-prone ДНК-полимеразу V);
- dinB (кодирует ДНК-полимеразу IV);
- recN (вовлечён в рекомбинационную репарацию);

Увеличение экспрессии данных генов приводит к увеличению частоты мутагенеза у *E. coli*. Это связано с тем, что полимеразы SOS-системы (Pol IV и Pol V) осуществляют репликацию через поврежденные участки ДНК с низкой точностью: Pol V (UmuD'2C) вносит 1 ошибку на 10^3 - 10^4 нуклеотидов (Niccum et al., 2020), а Pol IV (DinB) увеличивает частоту делеций в GC-богатых регионах.

Данная взаимосвязь подтверждается множеством экспериментов. Так, эксперименты с мутантом *E. coli* recA730 (несёт конститутивно активный *recA* ,

содержащий мутацию E38K, которая делает его конститутивным для всех функций SOS, включая расщепление LexA и UmuD) показывают 60-кратное увеличение частоты спонтанных трансверсий (Niccum et al., 2020), что подтверждает прямую связь между активностью SOS и мутагенезом.

При сверхэкспрессии гена *dinB* мутагенез резко усиливается (до 800-кратного увеличения частоты мутаций) (Kim et al., 1997)

Исследования с Δ umuDC и Δ dinB делеционными мутантами также демонстрируют снижение частоты Rif^r мутаций на 85 – 90% (Kim et al., 1997; Niccum et al., 2020), подтверждая ключевую роль TLS в возникновении устойчивости.

Подавление *recA* снижает активацию Pol V на 70% (Chakravarti, Hamilton, Sussman, 1986), Полимераза IV ответственна за 78% спонтанных мутаций в условиях SOS (Baharoglu, Mazel, 2014). Делеция umuDC уменьшает частоту Rif^r мутаций с $2.3 \cdot 10^{-8}$ до $4.7 \cdot 10^{-9}$ (Niccum et al., 2020).

Рекомбинационный мутагенез также связан с индуцированным мутагенезом. Так, *recA*-дефицитные мутанты показывают 5-кратное снижение частоты Rif^r после УФ-облучения по сравнению с исходными штаммами (Chakravarti, Hamilton, Sussman, 1986); RecF-зависимая активация SOS ответственна за 40 % индуцированных мутаций (McKenzie et al., 2000).

В нашей работе также наблюдалось подавление индуцированного мутагенеза, которое может быть связано с дополнительными механизмами, такими, как снижение антибиотик-индуцированного стресса. Известно, что суб-ингибирующая концентрация ципрофлоксацина увеличивает Rif^r мутации в 8 раз через SOS-активацию (Crane, Alvarado, Sutton, 2021); при этом ингибирование RecA антиоксидантами снижает этот эффект на 90% (Crane, Alvarado, Sutton, 2021).

Роль SOS-системы в спонтанном мутагенезе.

Даже в клетке, не подвергающейся действию мутагенов, наблюдается некоторый уровень разрывов ДНК, на которые может среагировать SOS-система (Pennington, Rosenberg, 2007).

Кроме того, некоторые данные свидетельствуют, что SOS-ответ поддерживает базальную активность в нормальных условиях роста и играет значительную роль в спонтанном мутагенезе. Недавние исследования с использованием анализа отдельных клеток и секвенирования всего генома показали, что система SOS функционирует как динамическая регуляторная сеть, которая непрерывно контролирует целостность клеточной ДНК.

В нормальных условиях роста система SOS поддерживает базовый уровень активности, необходимый для клеточного гомеостаза. Гены SOS экспрессируются даже при отсутствии явных повреждений ДНК (Janion, 2008), что позволяет предположить, что эта система служит непрерывным механизмом надзора за целостностью генома. Эта базальная экспрессия регулируется динамическим взаимодействием между репрессором LexA и белком RecA, как описано выше.

Конститутивная низкоуровневая экспрессия выполняет множество клеточных функций, выходящих за рамки реагирования на чрезвычайные ситуации. Исследования показали, что даже во время нормальной репликации ДНК неповрежденных шаблонов одноцепочечные участки ДНК образуются из-за стохастического расщепления ведущей нити ДНК-полимеразы от репликативной вилки ДНК-хеликазы (Мука, Marians, 2020). Эти естественно возникающие одноцепочечные участки ДНК могут активировать RecA, что приводит к расщеплению LexA и последующей экспрессии гена SOS, что указывает на то, что система реагирует на нормальный репликационный стресс, а также на стресс, вызванный повреждением. Анализ отдельных клеток показал, что спонтанная активация SOS происходит в небольшой, но постоянной фракции бактериальных клеток во время нормального роста. Она, по-видимому, особенно заметна во время ранней экспоненциальной фазы, когда происходит быстрая репликация ДНК. Временные рамки предполагают, что SOS-система реагирует на стресс, связанный с репликацией, и потенциальное повреждение ДНК, которое естественным образом происходит во время высокоскоростного клеточного деления.

Изменения в гене groB.

Рассмотрим молекулярные основы Rif^r мутагенеза. Можно выделить т.н. «горячие точки» в гене *groB*, где чаще всего возникают мутации и кластеры мутаций. Чаще всего возникают кластеры мутаций в позициях (Yang et al., 2023):

- S531F/L (50% случаев Rif^r);
- H526Y (25%);
- D516V (15%).

Кристаллографические исследования показывают, что эти замены нарушают связывание рифампицина с β -субъединицей РНК-полимеразы (Yang et al., 2023). Pol V преимущественно вносит транзиции в этих позициях (Niccum et al., 2020).

Отмечено, что существует влияние SOS-ответа не только на частоту, но и на спектр мутаций. Исследования показывают, что активация SOS-ответа увеличивает частоту трансверсий G:C→C:G в 160 раз и сдвигает соотношение транзиций/трансверсий с 3:1 до 1:2 (Niccum et al., 2020). Это особенно значимо для гена *groB*, где 80% Rif^r мутаций представляют собой трансверсии (Yang et al., 2023).

In vitro анализ с использованием системы MA/WGS (Mutation Accumulation/Whole Genome Sequencing) показал, что в условиях постоянной активации SOS-ответа (мутант *lexA3*) частота мутаций возрастает до $4,7 \times 10^{-3}$ на геном за поколение, что в 6.5 раз выше базового уровня дикого типа ($7,2 \times 10^{-4}$) (Niccum et al., 2020). Интересно, что даже сублетальные концентрации рифампицина (32 мкг/мл) провоцируют SOS-зависимые осцилляции роста бактерий (Elitas, et al, 2023)

В условиях *in vivo* исследования: лечение ципрофлоксацином во время кишечных инфекций увеличивает частоту Rif^r-мутантов в 1000 раз, однако совместное введение антиоксидантов снижает этот эффект на 99% (Crane, Alvarado, Sutton, 2021). Эволюционные эксперименты подтвердили ключевую роль SOS-системы: через 20 поколений 50% бактерий в популяции с активным SOS-ответом приобретали устойчивость, тогда как в Δ recA-штаммах 98% клеток сохраняли чувствительность (Baharoglu, Mazel, 2014)

Современные стратегии подавления резистентности, такие как комбинация рифампицина с пептидными аналогами-ингибиторами RecA, демонстрируют

снижение частоты устойчивости на 70%, а добавление N-ацетилцистеина усиливает этот эффект (Yang et al., 2023) (Crane, Alvarado, Sutton, 2021).

Таким образом, ингибирование экспрессии генов SOS-системы снижает частоту мутаций устойчивости к рифампицину. Поскольку SOS-система это сложный регуляторный каскад, на нее влияет даже незначительный эффект в начальной точке. Кроме того, стоит отметить, что в нашей системе ингибируются как гены раннего, так и позднего SOS-ответа.

Это объясняет, почему, небольшое снижение фуллереном C₆₀ (на 22 – 26 %) экспрессии генов *recA* и *colD* у *E. coli* приводит к значительному снижению (на 45 – 60 %) частоты мутагенеза.

ВЫВОДЫ

1. Установлена биосовместимая концентрация сурфактина для использования в качестве солубилизатора для фуллерена C_{60} . 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. C_{60} в растворе биосовместимой концентрации сурфактина снижает индуцированную окислительным стрессом экспрессию генов SOS-ответа у *E. coli*, таким образом, демонстрируя протекторные свойства. Растворы с другим солубилизатором такого эффекта не оказали.

3. Концентрации C_{60} оказавшие ДНК-протекторное действие, и фуллеренол $C_{60}(OH)_{36}$ 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 C_{60} является антиоксидантный.

4. C_{60} 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 солубилизатора 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, то есть, определено влияние ПАВ, используемого для растворения наночастиц, на биологические эффекты фуллерена.

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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абилов С., Глазер В. Мутагенез с основами генотоксикологии. – Litres, 2021, 304 с.
2. Безмельницын В. Н. и др. Термодиффузия фуллеренов в растворах // Журнал технической физики. – 1996. –Т. 66. – № 10. – С. 26–30.
3. Безмельницын В. Н., Елецкий А. В., Окунь М. В. Фуллерены в растворах // Успехи физических наук. – 1998. –Т. 168. – № 11. – С. 1195–1220.
4. Бочвар Д. А., Гальперн Е. Г. О гипотетических системах: карбододекаэдре, s-икосаэдре и карбо-s-икосаэдре // Доклады Академии наук СССР. – 1973. – С. 610–612.
5. Галимов Д. И., Булгаков Р. Г., Газеева Д. Р. Реакционная способность фуллерена C₆₀ по отношению к пероксильным радикалам, генерируемым при жидкофазном окислении кислородом кумола и этилбензола // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2011. – №. 10. – С. 2070.
6. Гергерт В. Я., Попова О. А. Цитотоксичность и антимикобактериальное действие препарата «хиксозид» // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2025. – №. 4. – С. 18-31.
7. Горносталев А. А., Рыбальченко А. Г. Практическое руководство к лабораторным работам по курсу "Основы ксенобиологии". – 2001.
8. Гудков С. В., Штаркман И. Н., Асадуллина Н. Р., Гармаш С. А., Карп О. Э., Андриевский Г. В. ДНК-защитные и радиопротекторные эффекты гидратированного фуллерена C₆₀ // Физика живого. – 2009. – Т. 17. – №. 1. – С. 82-88.
9. Завильгельский Г. Б., Котова В. Ю., Манухов И. В. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов для детекции токсичных веществ // Химическая физика. – 2012. – Т. 31. – №. 10. – С. 15.
10. Захаров Е. Е., Гапоненко И. Н. Оценка генотоксичности водорастворимого производного фуллерена C₆₀-(L-аргинина)₈ методом ДНК-комет // Актуальные проблемы биомедицины – 2020. – С. 307–308.
11. Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. Природные фенольные антиоксиданты в биоаналитической химии: состояние проблемы и перспективы развития // Успехи химии. – 2015. – Т. 84. – №. 2. – С. 194-224.
12. Карбышев М. С., Абдуллаев Ш. П. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие / Шестопапов А.В. – Москва: ФГБОУ ВО РНИМУ имени НИ Пирогова Минздрава России, 2018. – 60 с.

13. Королькова Н., Минина И. Статистика. Часть 1. Теория статистики. // Litres. – 2017.
14. Котова В. Ю., Манухов И. В., Завильгельский Г. Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. – 2009. – № 6. – С. 16–25.
15. Кулинский В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский Образовательный Журнал. — 1999. – №1. – С. 2–7.
16. Мазанко М. С., Чистяков В. А., Празднова Е. В., Покудина И. О., Чурилов М. Н., Чмыхало В. К., Батюшин М. М. Диоксидин индуцирует антибиотикорезистентность бактерий // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – Т. 34. – № 4.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – 1984.
18. Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К. Современные подходы при анализе окислительного стресса, или как измерить неизмеримое // Acta Biomedica Scientifica. – 2016. – Т. 1. – №. 3. – С. 174-180.
19. Пиотровский Л. Б. и др. Механизмы биологического действия фуллеренов зависимость от агрегатного состояния // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7. – № 2. – С. 1548–1554.
20. Пискарев И. М., Иванова И. П. Оценка окислительной и антиоксидантной способности биологических субстратов по хемиллюминесценции, индуцированной реакцией Фентона // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8. – №. 3. – С. 16-26.
21. Попов Д. А. и др. Диоксидин: антимикробная активность и перспективы клинического применения на современном этапе // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – Т. 58. – № 3–4.
22. Празднова Е. В., Андриянов А. И., Васильченко Н. Г. Нерибосомально синтезируемые метаболиты и генетические механизмы их синтеза в реализации фунгицидного эффекта бактерий р. Bacillus и Paenibacillus (обзор) // Живые и биокосные системы. – 2018. – №. 25. – С. 6.
23. Пугачевский М. А., Мамонтов В. А., Кузьменко А. П., Неручев Ю. А. Исследование антиоксидантных свойств аблированных наночастиц диоксида церия в окислительной реакции Фентона // Известия Юго-Западного государственного университета. Серия: Техника и технологии. – 2023. – Т. 11. – №. 1. – С. 63-76.

24. Свиридова А. А., Ищенко А. А. Солнцезащитные средства. I. классификация и механизм действия органических УФ фильтров // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. – 2006. – Т. 49. – №. 11. – С. 3–14.
25. Симонова О. И. Муколитики в педиатрической практике: рациональный выбор, лечебные эффекты и особенности терапии // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – Т. 12. – №. 4. – С. 138.
26. Скулачѳв В. П. Эволюция, митохондрии и кислород // Соросовский образовательный журнал. — 1999. – №9. – С. 4–10.
27. Ушаков В. Ю. SOS-система репарации ДНК у бактерий (обзор) // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2010. – № 2.
28. Хасанов, В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3 – С. 63–75.
29. Чистяков В. А. и др. Синтез и биологические свойства производных нитробензоксадиазолов-потенциальных доноров оксида азота (II): SOX-индукция, токсичность, генотоксичность и ДНК-протекторная активность в опытах на lux-биосенсорах *Escherichia coli* // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2015. – №. 6. – С. 1369-1377.
30. Шахмарданова С. А., Гулевская О. Н., Селецкая В. В., Зеленская А. В., Хананашвили Я. А., Нефедов Д. А., Галенко-Ярошевский, П. А. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2016. – №. 3. – С. 4-15.
31. Ямалова Н. Р., Агеев С. В. Биологические свойства водорастворимого полигидроксилированного фуллерена $C_{60}(OH)_{22-24}$ // Актуальные проблемы биомедицины-2021. – 2021. – С. 324–325.
32. Ярыгин В. Н., Васильева В. И., Волков И. Н., Синельщикова В. В. Биология. В 2 кн. Кн. 1: Учеб. для медиц. спец. Вузов / Ярыгин В. Н.– 2003. – С. 26.
33. Abdelli F. et al. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin (s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4 // Biodegradation. – 2019. – V. 30. – P. 287-300.
34. Abdollahi S., Tofighi Z., Babae T., Shamsi M., Rahimzadeh G., Rezvanifar H., Samadi N. Evaluation of anti-oxidant and anti-biofilm activities of biogenic surfactants derived from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* // Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. – 2020. – V. 19. – №. 2. – P. 115.
35. Afreen S., Kokubo K., Muthoosamy K., Manickam S. Hydration or hydroxylation: direct synthesis of fulleranol from pristine fullerene [C60] via acoustic

cavitation in the presence of hydrogen peroxide // RSC Advances. – 2017. – V. 7. – № 51. – P. 31930–31939.

36. Ali S. S., Hardt J. I., Quick K. L., Kim-Han J. S., Erlanger B. F., Huang T. T., Dugan L. L. A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase mimetic properties // Free Radical Biology and Medicine. – 2004. – V. 37. – №. 8. – P. 1191-1202.

37. Aly F. M., Othman A., Haridy M. A. M. Protective effects of fullerene C60 nanoparticles and virgin olive oil against genotoxicity induced by cyclophosphamide in rats // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2018.

38. Amabile-Cuevas C. F., Demple B. Molecular characterization of the soxRS genes of Escherichia coli: two genes control a superoxide stress regulon // Nucleic acids research. – 1991. – V. 19. – №. 16. – P. 4479-4484.

39. Arndt M. et al. Wave–particle duality of C60 molecules // Nature. – 1999. – V. 401. – № 6754. – P. 680–682.

40. Åslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol—disulfide status // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – V. 96. – №. 11. – P. 6161-6165.

41. Baati T. et al. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene // Biomaterials. – 2012. – V. 33. – № 19. – P. 4936–4946.

42. Babynin E. V et al. Study of mutagenic activity of fullerene and some of its derivatives using His⁺ reversions of Salmonella typhimurium as an example // Russian Journal of Genetics. – 2002. V. 38. – № 4. – P. 359–363.

43. Baharoglu Z., Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions // FEMS microbiology reviews. – 2014. – V. 38. – №. 6. – P. 1126-1145.

44. Baun A. et al. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60 // Aquatic Toxicology. – 2008. V. 86. – № 3. P. 379–387.

45. Bazhenov S. V et al. Bacterial lux-biosensors: Constructing, applications, and prospects // Biosensors and Bioelectronics: X. – 2023. – V. 13. – P. 100323.

46. Bedard L., Young M. J., Hall D., Paul T., Ingold, K. U. Quantitative Studies on the Peroxidation of Human Low-Density Lipoprotein Initiated by Superoxide and by Charged and Neutral Alkylperoxyl Radicals1 // Journal of the American chemical society. – 2001. – V. 123. – №. 50. – P. 12439-12448.

47. Blattner F. R., Burland V., Plunkett III G., Sofia H. J., Daniels D. L. Analysis of the Escherichia coli genome. IV. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes //Nucleic acids research. – 1993. – V. 21. – №. 23. – P. 5408-5417.

48. Billington O. J., McHugh T. D., Gillespie S. H. Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1999. – V. 43. – № 8. – P. 1866–1869.
49. Bochynek M., Lewińska A., Witwicki M., Dębczak A., Łukaszewicz M. Formation and structural features of micelles formed by surfactin homologues // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – V. 11. – P. 1211319.
50. Boguszewska K., Szewczuk M., Kaźmierczak-Barańska J., Karwowski B. T. The similarities between human mitochondria and bacteria in the context of structure, genome, and base excision repair system // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – №. 12. – P. 2857.
51. Boulebd H. Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study // *Journal of Molecular Structure*. – 2020. – V. 1201. – P. 127210.
52. Brant J. A., Labille J., Robichaud C. O., Wiesner M. Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2007. – V. 314. – №. 1. – P. 281-288.
53. Bromilow R. H. Paraquat and sustainable agriculture // *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*. – 2004. – V. 60. – № 4. – P. 340–349.
54. Buettner G. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2011. – V. 11. – №. 4. – P. 341-346.
55. Bull H. J., Lombardo M.-J., Rosenberg S. M. Stationary-phase mutation in the bacterial chromosome: recombination protein and DNA polymerase IV dependence // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – V. 98. – № 15. – P. 8334–8341.
56. Bus J. S., Gibson J. E. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. // *Environmental health perspectives*. – 1984. – V. 55. – P. 37–46.
57. Butala M., Sonjak S., Kamenšek S., Hodošček M., Browning D. F., Žgur-Bertok D., Busby S. J. Double locking of an *Escherichia coli* promoter by two repressors prevents premature colicin expression and cell lysis // *Molecular microbiology*. – 2012. – V. 86. – №. 1. – P. 129-139.
58. Chakravarti S., Hamilton B., Sussman R. Relationship between cellular RecA protein concentration and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli* // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1986. – V. 160. – №. 3. – P. 179-193.

59. Choi Sue Hyung, Gu Man Bock. A whole cell bioluminescent biosensor for the detection of membrane-damaging toxicity // *Biotechnology and bioprocess engineering*. – 1999. – V. 4. – P. 59-62.
60. Chistyakov V. A., Smirnova Y. O., Prazdnova E. V., Soldatov A. V. Possible mechanisms of fullerene C60 antioxidant action // *BioMed Research International*. – 2013. – V. 2013.
61. Chistyakov V. A., Prazdnova E. V., Soldatov A. V., Smirnova Y. O., Alperovich, I.G. Can C60 fullerene demonstrate properties of mitochondria-targeted antioxidant from the computational point of view // *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*. – 2014. – V. 8. – P. 59–62.
62. Cirz R. T. et al. Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance // *PLoS biology*. – 2005. – V. 3. – № 6. – P. 176.
63. Słoczyńska K., Powroźnik B., Pękala E., Waszkielewicz A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action // *Journal of applied genetics*. – 2014. – V. 55. – P. 273-285.
64. Cascales E., Buchanan S. K., Duché D., Kleanthous C., Llobes R., Postle K., Cavard D. Colicin biology // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2007. – V. 71. – №. 1. – P. 158-229.
65. Condee C. W., Summers A. O. A mer-lux transcriptional fusion for real-time examination of in vivo gene expression kinetics and promoter response to altered superhelicity // *Journal of bacteriology*. – 1992. – V. 174. – № 24. – P. 8094–8101.
66. Cong W. et al. Evaluation of the influence of fullerenol on aging and stress resistance using *Caenorhabditis elegans* // *Biomaterials*. – 2015. – V. 42. – P. 78–86.
67. Crane J. K., Alvarado C. L., Sutton M. D. Role of the SOS response in the generation of antibiotic resistance in vivo // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2021. – V. 65. – №. 7.
68. Davison C. L., Papirmeister B. Bacteriostasis of *Escherichia coli* by the herbicide paraquat // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1971. – V. 136. – № 2. – P. 359–364.
69. De Grey A. D. HO₂•: the forgotten radical // *DNA and cell biology*. – 2002. – V. 21. – №. 4. – P. 251-257.
70. Dong T. G., Dong S., Catalano C., Moore R., Liang X., Mekalanos J. J. Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112. – №. 7. – P. 2181-2186.
71. Đurašević S. et al. Effects of fullerene C60 supplementation on gut microbiota and glucose and lipid homeostasis in rats // *Food and Chemical Toxicology*. – 2020. – V. 140. – P. 111302.

72. Đurašević S. et al. Effects of C60 fullerene on thioacetamide-induced rat liver toxicity and gut microbiome changes // *Antioxidants*. – 2021. – V. 10. – №. 6. – P. 911.
73. Dussert E., Turret M., Dupuis C., Noblecourt A., Behra-Miellet J. Evaluation of antiradical and antioxidant activities of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains // *Frontiers in microbiology*. – 2022. – V. 13. – P. 914713.
74. Eastmond D. A., Hartwig A., Anderson D., Anwar W. A., Cimino M. C., Dobrev I., Vickers C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme // *Mutagenesis*. – 2009. – V. 24. – №. 4. – P. 341-349.
75. Ebina Y., Takahara Y., Kishi F., Nakazawa A., Brent R. LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene // *Journal of Biological Chemistry*. – 1983. – V. 258. – №. 21. – P. 13258-13261.
76. Elitas M., Kalayci Demir G., Vural Kaymaz S. Mathematical model for growth and rifampicin-dependent killing kinetics of *Escherichia coli* cells // *ACS omega*. – 2023. – V. 8. – №. 41. – P. 38452-38458.
77. Emelyantsev, S., Prazdnova E., Chistyakov V., Alperovich, I. Biological effects of C60 fullerene revealed with bacterial biosensor—toxic or rather antioxidant? // *Biosensors*. – 2019. – V. 9. – №. 2.
78. Erental A., Sharon I., Engelberg-Kulka H. Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: an apoptotic-like death is inhibited by the mazEF-mediated death pathway // *PLoS biology*. – 2012. – V. 10. – №. 3. – P. e1001281.
79. Fiege H., Voges H. W., Hamamoto T., Umemura S., Iwata T., Miki H., Paulus W. Phenol Derivatives // *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. – 2000.
80. Fisher H. K., Williams G. Paraquat is not bacteriostatic under anaerobic conditions // *Life Sciences*. – 1976. – V. 19. – №. 3. – P. 421–425.
81. Flieger J., Flieger W., Baj J., Maciejewski R. Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles // *Materials*. – 2021. – V. 14. – №. 15. – P. 4135.
82. Foroutan M., Boudaghi A., Alibalazadeh M. Fullerenes containing water molecules: a study of reactive molecular dynamics simulations // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2023. – V. 25. – №. 47. – P. 32493-32502.
83. Fortner J. D. et al. C60 in water: nanocrystal formation and microbial response // *Environmental Science & Technology*. – 2005. – V. 39. – №. 11. – P. 4307-4316.
84. Francis K. P., Gallagher M. P. Light emission from a Mudlux transcriptional fusion in *Salmonella typhimurium* is stimulated by hydrogen peroxide and by interaction

with the mouse macrophage cell line J774. 2 // *Infection and immunity*. – 1993. – V. 61. – № 2. – P. 640–649.

85. Franskevych D., Palyvoda K., Petukhov D., Prylutska S., Grynyuk I., Schuetze C., Ritter U. Fullerene C60 penetration into leukemic cells and its photoinduced cytotoxic effects // *Nanoscale Research Letters*. – 2017. – V. 12. – №. 1. – P. 1-9.

86. Galán J.-C. et al. Mutation rate is reduced by increased dosage of mutL gene in *Escherichia coli* K-12 // *FEMS microbiology letters*. – 2007. – V. 275. – № 2. – P. 263–269.

87. Gharbi N. et al. [60] Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity // *Nano Letters*. – 2005. – V. 5. – № 12. – P. 2578–2585.

88. Ghersa P., Lurz R., Dobrinski B., Deshusses J., Belet M., Frey J. Genetic evidence for the existence of a repressor that modulates colicin D expression on plasmid ColD-CA23 // *Molecular and General Genetics MGG*. – 1988. – V. 213. – № 1. – P. 36–41.

89. Grebinyk A., Prylutska S., Buchelnikov A., Tverdokhle N., Grebinyk S., Evstigneev M. C60 fullerene as an effective nanoplatform of alkaloid berberine delivery into leukemic cells // *Pharmaceutics*. – 2019. – V. 11. – №. 11. – P. 586.

90. Goldstein S., Czapski G. Comparison between different assays for superoxide dismutase-like activity // *Free Radical Research Communications*. – 1991. – V. 12. – №. 1. – P. 5-10.

91. Govindan J. A., Jayamani E., Zhang X., Mylonakis E., Ruvkun G. Dialogue between *E. coli* free radical pathways and the mitochondria of *C. elegans* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112. – №. 40. – P. 12456-12461.

92. Gou N., Onnis-Hayden A., Gu A. Z. Mechanistic toxicity assessment of nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis // *Environmental science & technology*. – 2010. – V. 44. – № 15. – P. 5964–5970.

93. Grebowski J., Kazmierska P., Krokosz A. Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine // *BioMed Research International*. – 2013. – V. 2013. – №. 1. – P. 751913.

94. Grebowski J., Kazmierska-Grebowska P., Cichon N., Konarska A., Wolszczak M., Litwinienko G. Fullereneol C60(OH)36 protects the antioxidant enzymes in human erythrocytes against oxidative damage induced by high-energy electrons // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – №. 18. – P. 10939.

95. Grebowski J., Konopko A., Krokosz A., DiLabio G. A., Litwinienko G. Antioxidant activity of highly hydroxylated fullerene C60 and its interactions with the analogue of α -tocopherol // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2020. – V. 160. – P. 734-744.

96. Grohn K. J. et al. C60 in olive oil causes light-dependent toxicity and does not extend lifespan in mice // *GeroScience*. – 2021. – V. 43. – № 2. – P. 579–591.
97. Gudiña E. J., Teixeira J. A. *Bacillus licheniformis*: The unexplored alternative for the anaerobic production of lipopeptide biosurfactants? // *Biotechnology Advances*. – 2022. – V. 60. – P. 108013.
98. Ha Y., Wang X., Liljestrand H. M., Maynard J. A., Katz L. E. Elucidating the mechanism of cellular uptake of fullerene nanoparticles // *Environmental Engineering Research*. – 2022. – T. 27. – № 2.
99. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. – Oxford university press, 2015.
100. Han Y. et al. Micellization of Surfactin and Its Effect on the Aggregate Conformation of Amyloid $\beta(1-40)$ // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – V. 112. – № 47. – P. 15195–15201.
101. Hao N., Yang H., Li L., Li L., Tang F. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on intracellular reactive oxygen species in A375 cells // *New Journal of Chemistry*. – 2014. – V. 38. – № 9. – P. 4258-4266.
102. Hassan H. M., Fridovich I. Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical // *Journal of Biological Chemistry*. – 1979. – V. 254. – № 21. P. 10846–10852.
103. Heath R. J., Rock C. O. Roles of the FabA and FabZ β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – V. 271. – № 44. – P. 27795-27801.
104. Heerklotz H., Seelig J. Detergent-Like Action of the Antibiotic Peptide Surfactin on Lipid Membranes // *Biophysical journal*. – 2001. – V. 81. – № 3. – P. 1547–1554.
105. Hoke S. H., Molstad J., Payne G. L., Cotter R. J., Kahr B., Ben-Amotz D., Cooks R. G. Aromatic hydrocarbon derivatives of fullerenes // *Rapid communications in mass spectrometry*. – 1991. – V. 5. – № 10. – P. 472-474.
106. Horng Y.-B. et al. Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens* // *AMB Express*. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 188.
107. Hou W. C., Moghadam B. Y., Westerhoff P., Posner J. D. Distribution of fullerene nanomaterials between water and model biological membranes // *Langmuir*. – 2011. – V. 27. – № 19. – P. 11899-11905.
108. Hu Z., Guan W., Wang W., Huang L., Xing H., Zhu Z. Protective effect of a novel cystine C60 derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat

pheochromocytoma PC12 cells // *Chemico-biological interactions*. – 2007. – V. 167. – №. 2. – P. 135-144.

109. Hui M., Jia X., Li X., Lazcano-Silveira R., Shi M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of liposoluble C60 at the cellular, molecular, and whole-animal levels // *Journal of Inflammation Research*. – 2023. – P. 83-93.

110. Ishigami Y. et al. Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 1995. – V. 4. – № 6. P. 341–348.

111. Kazmierska-Grebowska P., Kobrzycka A., Bocian R., Kowalczyk T., Krokosz A., Grebowski J. (2018). Fullerenol C60(OH)36 at relatively high concentrations impairs hippocampal theta oscillations (in vivo and in vitro) and triggers epilepsy (in vitro)—A dose response study // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2018. – V. 105. – №. 1. – P. 98-109.

112. Kearns D. B., Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis* // *Molecular microbiology*. – 2003. – V. 49. – №. 3. – P. 581-590.

113. Keshri S., Tembe B. L. Thermodynamics of hydration of fullerenols [C60(OH)_n] and hydrogen bond dynamics in their hydration shells // *The Journal of chemical physics*. – 2017. – V. 146. – №. 7.

114. Khmelevtsova L., Klimova M., Karchava S., Azhogina T., Polienko E., Litsevich A., Chernyshenko E., Khammami M., Sazykin I., Sazykina M. Biosensor-Based Assessment of Pesticides and Mineral Fertilizers' Influence on Ecotoxicological Parameters of Soils under Soya, Sunflower and Wheat // *Chemosensors*. – 2024. – V. 12. – №. 5. – P. 73.

115. Kim S. R., Maenhaut-Michel G., Yamada M., Yamamoto Y., Matsui. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – V. 94. – №. 25. – P. 13792-13797.

116. Kokubo K., Shirakawa S., Kobayashi N., Aoshima H., Oshima T. Facile and scalable synthesis of a highly hydroxylated water-soluble fullerenol as a single nanoparticle // *Nano Research*. – 2011. – V. 4. – P. 204-215.

117. Krusic P. J. et al. Radical reactions of C60 // *Science*. – 1991. – V. 254. – №. 5035. – P. 1183-1185.

118. Jacobsen N. R. et al. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C60 fullerenes in the FE1-MutaTM Mouse lung epithelial cells // *Environmental and molecular mutagenesis*. – 2008. – V. 49. – № 6. – P. 476–487.

119. Janion C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli* // *International journal of biological sciences*. – 2008. – V. 4. – №. 6. – P. 338.
120. Joshi H. et al. Isothermal Titration Calorimetry Studies on the Binding of Amino Acids to Gold Nanoparticles // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2004. – V. 108. – № 31. – P. 11535–11540.
121. Kalacheva N. V., Gubskaya V. P., Fazleeva G. M., Igtisamova G. R., Nuretdinov I. A., Rizvanov A. A., Cherepnev G. V. Novel water-soluble methanofullerenes $C_{60}[C_{13}H_{18}O_4(OH)_4]_6$ and $C_{60}[C_9H_{10}O_4(OH)_4]_6$: Promising uncouplers of respiration and phosphorylation // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2015. – V. 25. – №. 22. – P. 5250-5253.
122. Kalishwaralal K. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis* // *Materials letters*. – 2008. – V. 62. – № 29. – P. 4411–4413.
123. Klimina K. M. et al. The effects of desynchronosis on the gut microbiota composition and physiological parameters of rats // *BMC Microbiology*. – 2019. – V. 19. – № 1. – P. 160.
124. Korshunov S. S., Skulachev V. P., Starkov A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Letters*. – 1997. – V. 416. – № 1. – P. 15–18.
125. Krokosz A., Grebowski J., Rodacka A., Pasternak B., Puchala M. The effect of fullereneol $C_{60}(OH)_{\sim 30}$ on the alcohol dehydrogenase activity irradiated with X-rays // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2014. – V. 97. – P. 102–106.
126. Kroto H. W. et al. C_{60} : Buckminsterfullerene // *Nature*. – 1985. – V. 318. – № 6042. – P. 162–163.
127. Krusic P. J. et al. Radical reactions of C_{60} // *Science*. – 1991. – V. 254. – №. 5035. – P. 1183-1185.
128. Kuo W. S., Wang J. Y., Chang C. Y., Liu J. C., Shao Y. T., Lin Y. S., Wu P. C. Water-soluble fullereneol with hydroxyl group dependence for efficient two-photon excited photodynamic inactivation of infectious microbes // *Nanoscale Research Letters*. – 2020. – T. 15. – C. 1-15.
129. Lan J. et al. Comparative and mechanistic genotoxicity assessment of nanomaterials via a quantitative toxicogenomics approach across multiple species // *Environmental science & technology*. – 2014. – V. 48. – № 21. – P. 12937–12945.
130. Lee C. W., Chi M. C., Peng K. T., Chiang Y. C., Hsu L. F., Yan Y. L., Lai C. H. Water-soluble fullereneol $C_{60}(OH)_{36}$ toward effective anti-air pollution induced by

urban particulate matter in HaCaT cell // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – №. 17. – P. 4259.

131. Lee J. H., Nam S. H., Seo W. T., Yun H. D., Hong S. Y., Kim M. K., Cho K. M. The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells // *Food Chemistry*. – 2012. – V. 131. – № 4. – P. 1347–1354.

132. Lichota A., Szabelski M., Krokosz A. Quenching of protein fluorescence by Fullerene C₆₀(OH)₃₆ nanoparticles // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – №. 20. – P. 12382.

133. Liao S., Liu G., Tan B., Qi M., Li J., Li X., Tang Y. Fullerene C₆₀ protects against intestinal injury from deoxynivalenol toxicity by improving antioxidant capacity // *Life*. – 2021. – V. 11. – №. 6. – P. 491.

134. Li W., Zhan M., Wen Y., Chen Y., Zhang Z., Wang S., Tian S. Recent Progress of Oral Functional Nanomaterials for Intestinal Microbiota Regulation // *Pharmaceutics*. – 2024. – V. 16. – №. 7. – P. 921.

135. Li X., Deng, R., Li, J., Li, H., Xu, Z., Zhang, L., Feng L., Shu C., Zhen M., Wang, C. Oral [60] fullerene reduces neuroinflammation to alleviate Parkinson's disease via regulating gut microbiome // *Theranostics*. – 2023. – V. 13. – №. 14. – P. 4936.

136. Li Y., Zhu Y., Chu B., Liu N., Chen S., Wang J., Zou Y. Map of enteropathogenic *Escherichia coli* targets mitochondria and triggers DRP-1-mediated mitochondrial fission and cell apoptosis in bovine mastitis // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – №. 9. – P. 4907.

137. Liu C. X. et al. Bio-removal of tetracycline antibiotics under the consortium with probiotics *Bacillus clausii* T and *Bacillus amyloliquefaciens* producing biosurfactants // *Science of the Total Environment*. – 2020. – V. 710.

138. Loewe L., Textor V., Scherer S. High deleterious genomic mutation rate in stationary phase of *Escherichia coli* // *Science*. – 2003. – V. 302. – №. 5650. – P. 1558-1560.

139. Luo C., Zhou H., Zou J., Wang X., Zhang R., Xiang Y., Chen, Z. Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani* // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2015. – V. 99. – P. 1897-1910.

140. Lyon D. Y. et al. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size // *Environmental science & technology*. – 2006. – V. 40. – № 14. – P. 4360–4366.

141. Ma X., Bouchard D. Formation of aqueous suspensions of fullerenes // *Environmental Science & Technology*. – 2009. – V. 43. – №. 2. – P. 330-336.

142. Ma Y., Fu S., Tan Y., Zhan, A. Design and synthesis of highly fluorescent and stable fullerene nanoparticles as probes for folic acid detection and targeted cancer cell imaging // *Nanotechnology*. – 2021. – V. 32. – №. 19. – P. 195501.
143. Makarucha A. J., Baldauf J. S., Downton M. T., Yiapanis G. Size-dependent fullerene–fullerene interactions in water: A molecular dynamics study // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – T. 120. – №. 42. – C. 11018-11025.
144. Markovic Z., Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60) // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29. – № 26. – P. 3561–3573.
145. Marnewick J. L., Gelderblom W. C. A., Joubert E. An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2000. – V. 471. – №. 1-2. – P. 157-166.
146. Martinez J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria // *Drug Discovery Today: Technologies*. – 2014. – V. 11. – P. 33–39.
147. McKenzie G. J., Harris R. S., Lee P. L., Rosenberg S. M. The SOS response regulates adaptive mutation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – V. 97. – №. 12. – P. 6646-6651.
148. Michaelis L., Hill E. S. The viologen indicators // *The Journal of general physiology*. – 1933. – V. 16. – № 6. – P. 859.
149. Michel B. After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us // *PLoS biology*. – 2005. – V. 3. – № 7. – P. e255.
150. Mohammadipour M. et al. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides* // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2009. – V. 55. – № 4. – P. 395–404.
151. Morán A. C., Martínez M. A., Siñeriz F. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity // *Biotechnology letters*. – 2002. – V. 24. – P. 177-180.
152. Mori T. et al. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis // *Toxicology*. – 2006. – V. 225. – № 1. – P. 48–54.
153. Morry J., Ngamcherdtrakul W., Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles // *Redox biology*. – 2017. – V. 11. – P. 240-253.
154. Mrđanović J., Šolajić S., Bogdanović V., Stankov K., Bogdanović G., Djordjevic A. Effects of fulleranol C60(OH)₂₄ on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2009. – V. 680. – №. 1-2. – P. 25-30.

155. Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species // *Biochemical journal*. – 2009. – V. 417. – №. 1. – P. 1-13.
156. Musser J. M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights // *Clinical microbiology reviews*. – 1995. – V. 8. – № 4. – P. 496–514.
157. Myka K. K., Marians K. J. Two components of DNA replication-dependent LexA cleavage // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – V. 295. – №. 30. – P. 10368-10379.
158. Nelson J. et al. The biosurfactants iturin, lichenysin and surfactin, from vaginally isolated lactobacilli, prevent biofilm formation by pathogenic *Candida* // *FEMS Microbiology Letters*. – 2020. – V. 367. – № 15.
159. Niccum B. A. et al. New complexities of SOS-induced “untargeted” mutagenesis in *Escherichia coli* as revealed by mutation accumulation and whole-genome sequencing // *DNA Repair*. – 2020. – V. 90. – P. 102852
160. Nozdrenko D. et al. Protective effect of water-soluble C₆₀ fullerene nanoparticles on the ischemia-reperfusion injury of the muscle soleus in rats // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – V. 22. – № 13. – P. 6812.
161. Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. // *Environmental health perspectives*. – 2004. – V. 112. – № 10. – P. 1058–62.
162. Oberdörster E. et al. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms // *Carbon*. – 2006. – V. 44. – № 6. – P. 1112–1120.
163. Oh H., Lee J. S., Son P., Sim J., Park M. H., Bang Y. E., Choi W. I. Highly Water-Dispersed Natural Fullerenes Coated with Pluronic Polymers as Novel Nanoantioxidants for Enhanced Antioxidant Activity // *Antioxidants*. – 2024. – V. 13. – №. 10. – P. 1240.
164. Olah G. A., Bucsi I., Lambert C., Aniszfeld R., Trivedi N. J., Sensharma D. K., Prakash G. S. Polyarenefullerenes, C₆₀(H-Ar)_n, obtained by acid-catalyzed fullerenation of aromatics // *Journal of the American Chemical Society*. – 1991. – V. 113. – №. 24. – P. 9387-9388.
165. Onnis-Hayden A., Weng H., He M., Hansen S., Ilyin V., Lewis K., Gu A.Z. Prokaryotic real-time gene expression profiling for toxicity assessment // *Environmental science & technology*. – 2009. – V. 43 – № 12 – P. 4574–4581.
166. Orlova M. A., Trofimova T. P., Orlov A. P., Shatalov O. A. Perspectives of fullerene derivatives in PDT and radiotherapy of cancers // *British Journal of Medicine and Medical Research*. – 2013. – V. 3. – №. 4. – P. 1731-1756.
167. Osawa E. Superaromaticity // *Kagaku*. – 1970. – V. 25. – P. 854–863.

168. Papavasileiou K. D., Avramopoulos A., Leonis G., Papadopoulos M. G. Computational investigation of fullerene-DNA interactions: Implications of fullerene's size and functionalization on DNA structure and binding energetics // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2017. – V. 74. – P. 177-192.
169. Pennington J. M., Rosenberg S. M. Spontaneous DNA breakage in single living *Escherichia coli* cells // *Nature genetics*. – 2007. – V. 39. – №. 6. – P. 797-802.
170. Piotrovsky L.B., Eroпкиn M.Y., Eroпкиna E.M., Dumpis M.A., Kiselev O.I. Mechanisms of Biologic Action of Fullerenes—Dependence on Aggregate State // *Psychopharmacology and Biological Narcology*. – 2008. – V. 7. – №. 2. – P. 1548–1554.
171. Pham P. et al. Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – V. 98. – № 15. – P. 8350–8354.
172. Płaza G. A. et al. Synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus subtilis* T-1 growing on agro-industrial wastes and producing biosurfactant // *IET Nanobiotechnology*. – 2016. – V. 10. – № 2. – P. 62–68.
173. Pope C. F. et al. A practical guide to measuring mutation rates in antibiotic resistance // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2008. – V. 52. – № 4. – P. 1209–1214.
174. Proskurnina E. V., Mikheev I. V., Savinova E. A., Ershova E. S., Veiko N. N., Kameneva L. V., Kostyuk S. V. Effects of Aqueous Dispersions of C60, C70 and Gd@ C82 Fullerenes on Genes Involved in Oxidative Stress and Anti-Inflammatory Pathways // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – №. 11. – P. 6130
175. Quick K. L. et al. A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice // *Neurobiology of aging*. – 2008. – V. 29. – № 1. – P. 117–128.
176. Rabilloud T. et al. The mitochondrial antioxidant defence system and its response to oxidative stress // *PROTEOMICS: International Edition*. – 2001. – V. 1. – №. 9. – P. 1105-1110.
177. Reddy A. S. et al. Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent // *Materials letters*. – 2009. – V. 63. – № 15. – P. 1227–1230.
178. Rodríguez-Rosado A. I., Valencia E. Y., Rodríguez-Rojas A., Costas C., Galhardo R. S., Rodríguez-Beltrán J., Blázquez, J. N-acetylcysteine blocks SOS induction and mutagenesis produced by fluoroquinolones in *Escherichia coli* // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2019. – V. 74. – №. 8. – P. 2188-2196.

179. Rokitskaya T. I., Antonenko Y. N. Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ increases ion permeability of lipid membranes in a pH-dependent manner // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2016. – V. 1858. – №. 6. – P. 1165-1174.
180. Rosche W. A., Foster P. L. Determining mutation rates in bacterial populations // *Methods*. – 2000. – V. 20. – №. 1. – P. 4-17.
181. Roxas J. L., Ramamurthy S., Cocchi K., Rutins I., Harishankar A., Agellon A., Viswanathan V. K. Enteropathogenic *Escherichia coli* regulates host-cell mitochondrial morphology // *Gut Microbes*. – 2022. – V. 14. – №. 1. – P. 2143224.
182. Ruoff, R., Malhotra, R., Huestis, D. et al. Anomalous solubility behaviour of C₆₀ // *Nature*. – 1993. – V. 361. – P. 140.
183. Santos V. S. V., Silveira E., Pereira B. B. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology // *Journal of toxicology and environmental health, part B*. – 2018. – V. 21. – № 6–8. – P. 382–399.
184. Sayes C. M. и др. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes // *Nano letters*. – 2004. – V. 4. – № 10. – P. 1881–1887.
185. Sayes C. M. et al. Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – № 36. – P. 7587–7595.
186. Sazykin, I. S., Sazykina, M. A., Khmelevtsova, L. E., Mirina, E. A., Kudееvskaya, E. M., Rogulin, E. A., Rakin, A. V. Biosensor-based comparison of the ecotoxicological contamination of the wastewaters of Southern Russia and Southern Germany // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2016. – V. 13. – P. 945-954.
187. Schultz D. W., Yarus M. A simple and sensitive in vivo luciferase assay for tRNA-mediated nonsense suppression // *Journal of bacteriology*. – 1990. – V. 172. – № 2. – P. 595–602.
188. Schur D. V., Zaginaichenko S. Y., Veziroglu T. N. The hydrogenation process as a method of investigation of fullerene C₆₀ molecule // *International journal of hydrogen energy*. – 2015. – V. 40. – №. 6. – P. 2742-2762.
189. Semenov K. N., Letenko D. G., Charykov N. A., Nikitin V. A., Matuzenko M. Y., Keskinov V. A., Kopyrin, A. A. Electrochemical properties of aqueous solutions of fullerenol-d // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2011. – V. 84. – P. 79-83.
190. Semenov K. N., Charykov N. A., Postnov V. N., Sharoyko V. V., Vorotyntsev I. V., Galagudza M. M., Murin I. V. Fullerenols: Physicochemical properties and applications // *Progress in Solid State Chemistry*. – 2016. – V. 44. – №. 2. – P. 59-74.

191. Sen R., Swaminathan T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin // *Process Biochemistry*. – 2005. – V. 40. – № 9. – P. 2953–2958.
192. Shi Y., Luo H. Q., Li N. B. Determination of the critical premicelle concentration, first critical micelle concentration and second critical micelle concentration of surfactants by resonance Rayleigh scattering method without any probe // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2011. – V. 78. – № 5. – P. 1403-1407.
193. Shi Z., Li Y., Wang S., Fang H., Zhu D. Synthesis and antioxidative properties of polyphenol-fullerenes // *Chinese Science Bulletin*. – 2001. – V. 46. – P. 1790-1792.
194. Singh R., Wiseman B., Deemagarn T., Jha V., Switala J., Loewen P. C. Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs) // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2008. – V. 471. – № 2. – P. 207-214.
195. Sirotkin A. K. et al. Pristine fullerene C60: different water soluble forms—different mechanisms of biological action // *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. – 2006. – V. 14. – № 2-3. – P. 327–333.
196. Sivaraman N. et al. Solubility of C60 in organic solvents // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1992. – V. 57. – № 22. – P. 6077-6079.
197. Skamrova G. B. et al. Interceptor effect of C60 fullerene on the in vitro action of aromatic drug molecules // *European Biophysics Journal*. – 2014. – V. 43. – № 6. – P. 265–276.
198. Skulachev M. V. et al. Mitochondrial-Targeted Plastoquinone Derivatives. Effect on Senescence and Acute Age-Related Pathologies // *Current drug targets*. – 2011. – V. 12. – № 6. – P. 800–826.
199. Somoskovi A., Parsons L. M., Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* // *Respiratory research*. – 2001. – V. 2. – № 3. – P. 1–5.
200. Song M., Yuan S., Yin J., Wang X., Meng Z., Wang H., Jiang, G. Size-dependent toxicity of nano-C60 aggregates: more sensitive indication by apoptosis-related Bax translocation in cultured human cells // *Environmental science & technology*. – 2012. – V. 46. – № 6. – P. 3457-3464.
201. Stankov K., Borisev I., Kojic V., Rutonjski L., Bogdanovic G., Djordjevic A. Modification of antioxidative and antiapoptotic genes expression in irradiated K562 cells upon fulleranol C60(OH)24 nanoparticle treatment // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2013. – V. 13. – № 1. – P. 105-113.

202. Storz G., Tartaglia L. A. OxyR: A Regulator of Antioxidant Genes // *The Journal of nutrition*. – 1992. – V. 122. – P. 627-630.
203. Sutton S. Measurement of cell concentration in suspension by optical density // *Microbiology*. – 2006. – V. 585.
204. Takenaka S. et al. Study of the DNA interaction with water-soluble cationic fullerene derivatives // *Chemistry Letters*. – 1999. – V. 28. – № 4. – P. 319–320.
205. Tsai M. C., Chen Y. H., Chiang L. Y. Polyhydroxylated C60, fulleranol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide-and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro // *Journal of pharmacy and pharmacology*. – 1997. – V. 49. – №. 4. – P. 438-445.
206. Tompkins J. D. et al. Error-prone polymerase, DNA polymerase IV, is responsible for transient hypermutation during adaptive mutation in *Escherichia coli* // *Journal of bacteriology*. – 2003. – V. 185. – № 11. – P. 3469–3472.
207. Touati D. Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli*—how many ways are there to trigger soxRS response? // *Redox Report*. – 2000. – V. 5. – №. 5. – P. 287-293.
208. Tsuchiya T. et al. Novel harmful effects of [60]fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo // *FEBS letters*. – 1996. – V. 393. – № 1. – P. 139–145.
209. Urdaci M. C., Bressollier P., Pinchuk I. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities // *Journal of clinical gastroenterology*. – 2004. – V. 38. – № 6 Suppl.
210. Valgimigli L., Baschieri A., Amorati R. Antioxidant activity of nanomaterials // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2018. – V. 6. – №. 14. – P. 2036-2051.
211. Vauthier C., Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles // *Pharmaceutical research*. – 2009. – V. 26. – № 5. – P. 1025–1058.
212. Vilenó B., Marcoux P. R., Lekka M., Sienkiewicz A., Fehér T., Forró L. Spectroscopic and photophysical properties of a highly derivatized C60 fullerol // *Advanced Functional Materials*. – 2006. – V. 16. – №. 1. – P. 120-128.
213. Wang I. C., Tai L. A., Lee D. D., Kanakamma P. P., Shen C. K. F., Luh T. Y., Hwang K. C. C60 and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation // *Journal of medicinal chemistry*. – 1999. – V. 42. – №. 22. – P. 4614-4620.

214. Wang S., He P., Zhang J. M., Jiang H., Zhu S. Z. Novel and efficient synthesis of water-soluble [60] fulleranol by solvent-free reaction // *Synthetic Communications*. – 2005. – V. 35. – №. 13. – P. 1803-1808.
215. Wang Z., Wang S., Lu Z., Gao X. Syntheses, structures and antioxidant activities of fullerenols: knowledge learned at the atomistic level // *Journal of Cluster Science*. – 2015. – V. 26. – P. 375-388.
216. Weiss D. R., Raschke T. M., Levitt M. How hydrophobic buckminsterfullerene affects surrounding water structure // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – V. 112. – №. 10. – P. 2981-2990.
217. Wet J. R. De et al. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells // *Molecular and cellular biology*. – 1987. – V. 7. – № 2. – P. 725–737.
218. Widdel F. Theory and measurement of bacterial growth // *Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie*. – 2007. – V. 4. – №. 11. – P. 1-11.
219. Winterbourn C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction // *Toxicology letters*. – 1995. – V. 82. – P. 969–974.
220. Xiao M. et al. A novel point mutation in RpoB improves osmotolerance and succinic acid production in *Escherichia coli* // *BMC biotechnology*. – 2017. – V. 17. – № 1. – P. 1–11.
221. Yang J., Tang C. B., Xiao J., Du W. F., Li R. Influences of epigallocatechin gallate and citric acid on *Escherichia coli* O157: H7 toxin gene expression and virulence-associated stress response // *Letters in Applied Microbiology*. – 2018. – V. 67. – №. 5. – P. 435-441.
222. Yang K. B., Cameranesi M., Gowder M., Martinez C., Shamovsky Y., Epshtein V., Nudler, E. High-resolution landscape of an antibiotic binding site // *Nature*. – 2023. – V. 622. – №. 7981. – P. 180-187.
223. Ye S., Chen M., Jiang Y., Chen M., Zhou T., Wang Y., Ren L. Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system // *International journal of nanomedicine*. – 2014. – P. 2073-2087.
224. Yeh M.-S., Wei Y.-H., Chang J.-S. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers // *Biotechnology progress*. – 2005. – V. 21. – № 4. – P. 1329–1334.
225. Zha Y. Y., Yang B., Tang M. L., Guo Q. C., Chen J. T., Wen L. P., Wang M. Concentration-dependent effects of fulleranol on cultured hippocampal neuron viability // *International Journal of Nanomedicine*. – 2012. – C. 3099-3109.
226. Zhang L. et al. Surfactin variants for intra-intestinal delivery of insulin // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2017. – V. 115. – P. 218–228.

227. Zhang R., Hartline C., Zhang F. The ability in managing reactive oxygen species affects *Escherichia coli* persistence to ampicillin after nutrient shifts // *mSystems*. – 2024. – T. 9. – №. 11. – C. e01295-24.
228. Zhang S., Mu Y., Zhang J. Z., Xu W. Effect of self-assembly of fullerene nano-particles on lipid membrane // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 10. – P. e77436.
229. Zhao B. et al. Pristine (C60) and hydroxylated [C60 (OH) 24] fullerene phototoxicity towards HaCaT keratinocytes: type I vs type II mechanisms // *Chemical research in toxicology*. – 2008. – V. 21. – №. 5. – P. 1056-1063.
230. Zhao P. F., Liu Z. Q. Attaching a dipeptide to fullerene as an antioxidant hybrid against DNA oxidation // *Chemical Research in Toxicology*. – 2021. – V. 34. – №. 11. – P. 2366-2374.
231. Zhou X. et al. Solubility of fullerene C60 and C70 in toluene, o-xylene and carbon disulfide at various temperatures // *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures*. – 1997. – V. 5. – № 1. – P. 285–290.