

На правах рукописи

**Солдатова Юлия Валериевна**

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ  
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПЕНТААМИНОКИСЛОТНЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub> НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
МИШЕНИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА**

**1.5.2. Биофизика**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пушино - 2021

Работа выполнена в Лаборатории физико-химической биологии физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химической физики Российской академии наук (ИПХФ РАН), г. Черноголовка

**Научный  
руководитель:**

кандидат физико-математических наук  
**Котельникова Раиса Алексеевна**

**Официальные  
оппоненты:**

доктор биологических наук  
**Вихлянцев Иван Милентьевич**  
(гл. н. с. лаборатории структуры и функции мышечных белков ИТЭБ РАН)

доктор биологических наук, профессор  
**Ланкин Вадим Зиновьевич**  
(гл. н. с., и.о. руководителя отдела биохимии свободнорадикальных процессов ФГБУ Национального медицинского исследовательского центра кардиологии)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт физиологически активных веществ Российской академии наук**

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_\_\_\_ на заседании **диссертационного совета 24.1.127.01**, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <https://iteb.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат физ.-мат. наук

Н.Ф.Ланина

## Общая характеристика работы

**Актуальность работы.** Производные фуллерена обладают широким спектром биологической активности. Биологическая активность фуллерена обусловлена уникальной структурой углеродного каркаса и его физико-химическими свойствами (Moussa 2018). Показано, что водорастворимые производные фуллерена  $C_{60}$  проявляют антиоксидантные (Wang et al. 2013), мембранотропные (Kotelnikova et al., 2018), противоишемические (Vani et al. 2016), нейропротекторные (Vorobyov et al. 2015), противовирусные (Troshina et al. 2007), антибактериальные (Mashino et al. 2003) и противоопухолевые (Ikeda, 2013) свойства, выполняют роль эффективных малотоксичных средств (Monteiro-Riviere et al. 2012) для доставки лекарственных препаратов к мишеням различных заболеваний (Medrek et al. 2013). За последнее десятилетие выявлены разные аспекты антидиабетического действия фуллерена  $C_{60}$  и его производных. Показано, что  $C_{60}$  (Namadr et al. 2020) и гидратированный фуллерен  $C_{60}$  (Nedzvetsky et al. 2012) защищают от индуцированного окислительным стрессом повреждения мозг и печень крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом. Введение гидратированного фуллерена оказывает снижающее действие на концентрацию гликированного гемоглобина в сыворотке крови диабетических крыс (Nedzvetskii et al. 2016) и подавляет вызванное диабетом повреждение сетчатки за счет антиоксидантного, противовоспалительного и глиопротекторного действия (Nedzvetsky et al. 2019). Выявлена эффективность фуллерен-порфирилат- $^{25}Mg$  при стрептозотоцин-индуцированной нейропатии крыс (Hosseini et al. 2011). Сочетание перечисленных биологических свойств вызывает интерес исследователей к производным фуллерена  $C_{60}$  в качестве новых потенциальных лекарственных препаратов.

Сахарный диабет 2 типа (СД2) до сих пор остается одной из серьезных проблем современной медицины, что обуславливает актуальность изучения антидиабетической активности новых водорастворимых пентааминокислотных производных фуллерена  $C_{60}$ . Современные клинические препараты для лечения сахарного диабета оказывают симптоматическое действие, проявляют серьезные побочные эффекты, кроме того, при длительном применении наступает резистентность к ним, что приводит к необходимости использования комбинированной терапии и индивидуального подбора препаратов. Ключевыми мишенями СД2 и его осложнений, помимо прогрессирующей гипергликемии, являются: усиление окислительного стресса, повышение неферментативного гликирования белков, а также активация полиольного пути метаболизма глюкозы (Brownlee 2005; Shah et al. 2016). Эффективность лекарственных средств для терапии СД2 может определяться их селективностью к мишеням процессов, связанных с данным заболеванием. Исходя из анализа биологической активности производных фуллеренов, они являются перспективными соединениями, способными влиять на мишени СД2.

В диссертационной работе изучался новый класс водорастворимых пентааминокислотных производных  $C_{60}$  (ППФ), которые отличаются простотой получения, высокой растворимостью в водных и физиологических средах,

амфифильными свойствами (Котельникова и др., 2018) и низкой токсичностью (Hsieh et al. 2017; Wong et al. 2019).

**Целью** работы является комплексное исследование физико-химических механизмов действия водорастворимых пентааминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> на экспериментальные мишени сахарного диабета 2 типа.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить способность ППФ проникать в гидрофильные и гидрофобные участки фосфолипидных мембран *in vitro*.
2. Исследовать влияние ППФ на процесс перекисного окисления липидов *in vitro*.
3. Оценить действие ППФ на процесс неферментативного гликирования бычьего сывороточного альбумина *in vitro*.
4. Изучить влияние ППФ на каталитическую активность ферментов полиольного пути метаболизма глюкозы: альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы *in vitro*.
5. Выбрать соединение-лидер по всем показателям проведенных исследований *in vitro*. Исследовать *in vivo* влияние соединения-лидера на уровень гликемии крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа.

**Научная новизна работы.** В работе впервые было проведено исследование влияния нового класса водорастворимых ППФ на экспериментальные мишени СД2. Автором показано, что соединения из класса ППФ могут оказывать влияние одновременно на несколько мишеней СД2: процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и неферментативного гликирования белков, а также каталитическую активность ферментов полиольного пути метаболизма глюкозы. На основании данных, полученных в результате экспериментов *in vitro*, выбрано соединение-лидер из класса изучаемых ППФ, для которого показана *in vivo* антигипергликемическая активность на крысах линии Вистар с экспериментальным СД2 по методу высокожировая диета в комбинации с инъекцией стрептозотоцина (ВЖД/СТЗ).

**Научно-практическая значимость работы.** В результате проведенной работы получены данные по действию класса ППФ на экспериментальные мишени СД2. Результаты экспериментов *in vitro* позволили выявить наиболее эффективное соединение – калиевую соль фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина (ППФ-VI). Результаты исследований на крысах с экспериментальным СД2 по методу ВЖД/СТЗ показали способность ППФ-VI проявлять антигипергликемическую активность. Полученные в диссертационной работе данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования данного класса соединений как потенциальных препаратов для терапии СД2 и его осложнений.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. ППФ проникают в область полярных головок и жирнокислотных остатков фосфолипидов мембраны фосфатидилхолиновых липосом, вызывая при этом дезактивацию синглетного возбужденного состояния флуоресцентных зондов за счет образования комплексов зонд-ППФ.

2. ППФ действуют одновременно на несколько экспериментальных мишеней СД2 *in vitro*: эффективно ингибируют процессы ПОЛ и неферментативного гликирования белков, а также каталитическую активность ферментов полиольного пути метаболизма глюкозы - альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы.

3. ППФ-VI оказывает антигипергликемическую активность при введении крысам с экспериментальным СД2 по методу ВЖД/СТЗ.

**Достоверность полученных результатов** подтверждается использованием большого числа литературных и нормативных научных источников по исследуемой теме, значительным объемом проведенных экспериментов, адекватностью применённых методик, в том числе методов статистической обработки результатов исследований, качеством использованного оборудования и его сертификацией.

**Личный вклад автора.** Все результаты, представленные в диссертации, получены непосредственно автором или при его участии. Эксперименты на крысах проведены совместно с к.б.н. Д.А. Арешидзе и сотрудниками лаборатории НОЦ МГОУ. Постановка задач и обсуждение полученных результатов проводились совместно с научным руководителем Р.А. Котельниковой.

**Апробация работы.** Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях: III Всероссийской молодежной конференции «Успехи химической физики» (Черноголовка, 2016), III международной школе и конференции по Оптоэлектронике, Фотонике, Технике и Наноструктурам «Saint Petersburg OPEN 2016» (Санкт-Петербург, 2016), международной конференции «Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases» (Долгопрудный, 2016), 19-м конкурсе молодых ученых ИПХФ РАН им. С.М. Батурина (Черноголовка, 2017), 21-й и 22-й международной Пуцинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2017, 2018), международной конференции «Biomembranes 2018» (Долгопрудный, 2018), XIV международной Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2019), XIX Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2019), VII Троицкой конференции с международным участием «Медицинская физика» (Москва, 2020).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 3 статьи по теме диссертации в реферируемых научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus и входящих в перечень ВАК, 1 патент по теме диссертации, 10 тезисов докладов на Всероссийских и международных конференциях.

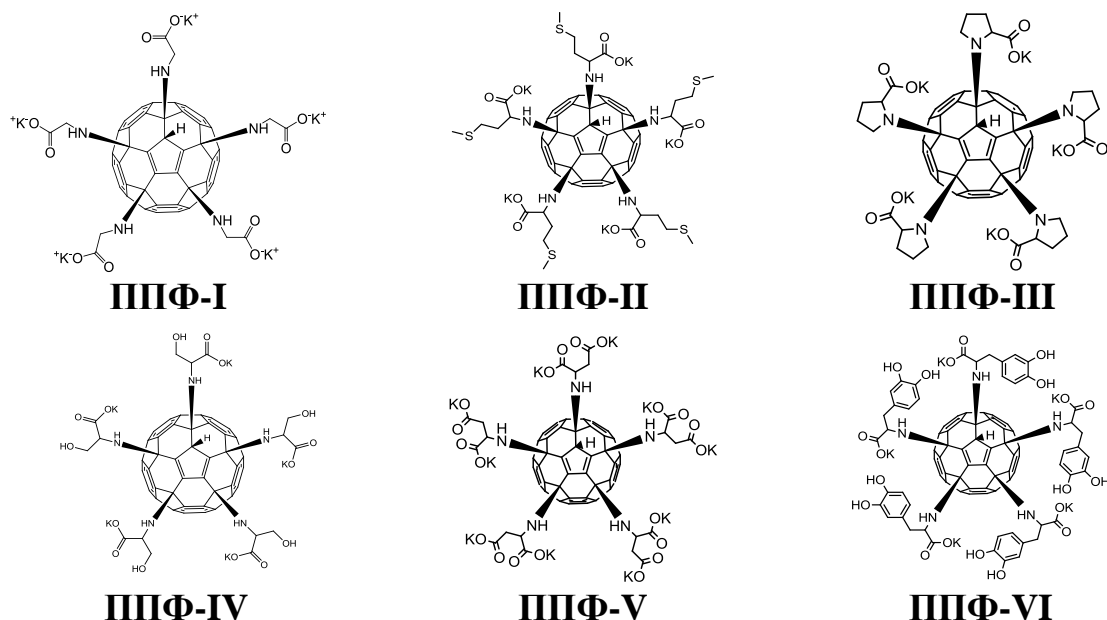
**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы (245 библиографических ссылок). Работа содержит 26 рисунков и 7 таблиц.

## Основное содержание работы

**Во введении** обоснована актуальность темы исследования и степень её новизны, определены цель и основные задачи исследования.

**В первой главе** проведён анализ литературы, посвященный производным фуллерена и их биологическим свойствам, благодаря которым их можно рассматривать в качестве перспективных соединений, действующих на мишени СД2. Рассмотрены роль перекисного окисления липидов (ПОЛ), неферментативного гликирования белков и полиольного пути метаболизма глюкозы в развитии СД2 и его осложнений.

**Вторая глава** посвящена описанию материалов и методов исследования. Объектом исследования выбран класс пентааминокислотных производных фуллерена  $C_{60}$ , синтезированных в ИПХФ РАН (рисунок 1). Данные производные отличаются высокой растворимостью в водных растворах, низкой токсичностью ( $LD_{50} \sim 334 \text{ мг/кг} - 725 \text{ мг/кг}$ ) (Hsieh et al. 2017; Wong et al. 2019), выраженными амфифильными свойствами благодаря гидрофобным и гидрофильным фрагментам в их структуре, относительной простотой получения и низкой стоимостью.



**Рисунок 1** - Исследуемые пентааминокислотные производные фуллерена  $C_{60}$ .

### Методы исследования:

Для исследования взаимодействия ППФ с модельными мембранами фосфатидилхолиновых липосом применяли метод флуоресцентных зондов (Kotelnikova et al. 1996; Полетаева и др. 2012). Использовали гидрофильный положительно заряженный 2,7-дибромпрофлавин и гидрофобный незаряженный пирен. Из угла наклона линейных анаморфоз в координатах Штерна–Фольмера определяли константы равновесия  $K_p$ , характеризующие прочность комплекса ППФ-зонд в водном растворе и в составе фосфатидилхолиновых липосом.

Влияние ППФ на процессы ПОЛ в гомогенате головного мозга мышей *in vitro* оценивали методом люминол-зависимой хемиллюминесценции (ХЛ) по изменению люминесценции люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона), опосредованной взаимодействием хромофора со свободными радикалами, образование которых инициируется *трет*-бутилгидропероксидом (Фархутдинов 1995). Интенсивность спонтанного ПОЛ в гомогенате головного мозга мышей определяли по содержанию в образцах малонового диальдегида (МДА) – одного из конечных продуктов окисления полиненасыщенных жирных кислот. Суть метода заключается в реакции между 2-тиобарбитуровой кислотой и продуктами ПОЛ, в результате которой образуется окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при 532 нм. По оптической плотности образца определяли концентрацию МДА в комплексе (Артюхов 2000). Концентрацию белка в гомогенатах головного мозга мышей определяли по методу Лоури (Lowry et al. 1951).

Антигликирующую активность соединений *in vitro* исследовали по изменению специфической флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина (БСА), характерной для флуоресценции конечных продуктов гликирования (КПГ), после инкубации БСА с глюкозой в присутствии ППФ (Chen et al. 2011). После проведения инкубирования ППФ удаляли из проб путем осаждения белка трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием. Супернатант, содержащий исследуемое водорастворимое производное фуллерена, отбирали, а оставшийся осадок (в котором содержался как гликированный, так и негликированный БСА) перерастворяли в фосфатном солевом буфере и проводили измерение флуоресценции КПГ, по интенсивности которой судили об эффективности протекания процесса гликирования, при  $\lambda_{\text{ex}}=370$  нм и  $\lambda_{\text{max/em}}=440$  нм с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (США).

Влияние ППФ на каталитическую активность альдозоредуктазы (АР) *in vitro* анализировали по методу (Motaal A. et al. 2015) с модификациями (Курмаз и др. 2021). С помощью спектрофотометра Agilent Cary 60 (США), измеряли уменьшение поглощения НАДФН при  $\lambda=340$  нм в супернатанте гомогената печени мышей.

Определение активности сорбитолдегидрогеназы (СДГ) *in vitro* в сыворотке крови при действии исследуемых соединений проводили по методу (Sevela and Tovarek 1961). Под действием фермента в присутствии НАД происходит конвертация D-сорбитола во фруктозу, которая при реакции с резорцином дает окрашивание, интенсивность которого определяли спектрофотометрически при  $\lambda=500$  нм. Ставили пробы сравнения на сыворотку, их оптическую плотность вычитали из экспериментальных проб.

Для изучения характера ингибирования ферментов АР и СДГ производными фуллерена использовали кинетический метод исследования ферментативных реакций (Березин, 1976). Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (D,L-глицеральдегида для АР и D-сорбитола для СДГ) в присутствии ППФ оценивали в обратных

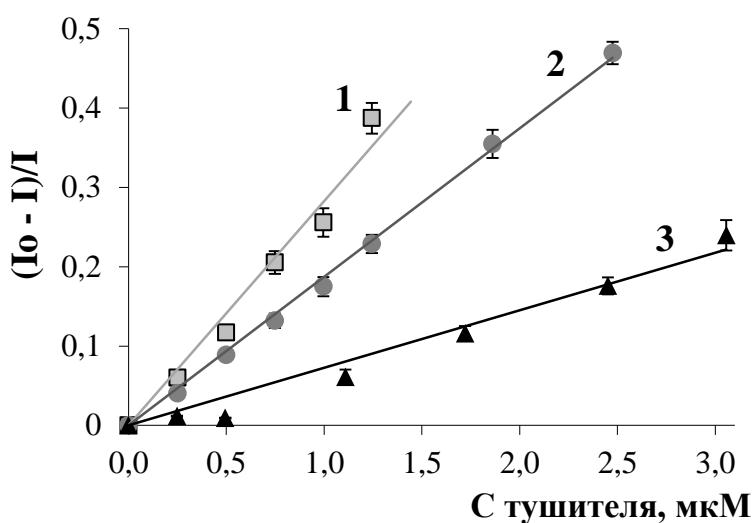
координатах Лайнуивера-Берка. Определяли константы ингибирования каталитической активности AP и СДГ исследуемыми ППФ.

СД2 индуцировали сочетанием высокожировой диеты и инъекции стрептозотоцина (40 мг/кг) у самцов крыс линии Вистар в возрасте 6 месяцев (Furman, 2015). Животные были разделены на три группы: 1) интактные крысы; 2) контрольные крысы (с экспериментальным СД2 по методу ВЖД/СТЗ); 3) экспериментальные крысы (крысы с экспериментальным СД2 по методу ВЖД/СТЗ, получавшие внутрибрюшинные инъекции ППФ-VI). После внутрибрюшинной инъекции СТЗ крысам контрольной и экспериментальной групп часть животных (около 30 %, что согласуется с литературными данными (Спасов и др., 2017)) погибла, что может быть вызвано резкой гипогликемией в результате действия СТЗ. Через 2 недели после инъекции СТЗ по результатам анализа уровня глюкозы в крови натощак в эксперимент отбирали крыс с глюкозой >7ммоль/л. В результате количество животных в контрольной группе n=6, в экспериментальной n=7. Затем крысам экспериментальной группы вводили ППФ-VI в дозе 6 мг/кг внутрибрюшинно с 36-го дня эксперимента (5 инъекций с интервалом через 2 дня). Животные контрольной группы получали соответствующие инъекции физиологического раствора.

Третья глава посвящена результатам исследований и их обсуждению.

### 3.1. Исследование взаимодействия ППФ с фосфолипидными мембранами методом флуоресцентных зондов

В работе оценивали локализацию исследуемых ППФ в модельных мембранах фосфатидилхолиновых липосом по характеру тушения флуоресценции зондов: положительно заряженного водорастворимого 2,7-дибромпрофлавина, который сорбируется в области глицериновых остатков фосфатидилхолина, и незаряженного гидрофобного зонда пирена, локализующегося в области жирнокислотных остатков фосфолипидов.



**Рисунок 2** - Тушение флуоресценции 2,7-дибромпрофлавина ( $\lambda_{ex}=453$  нм,  $\lambda_{max/em}=510$  нм) в буфере (1) трис-НСl (рН=7.2, 0,02 М), в суспензии фосфатидилхолиновых липосом (2) и мономеров пирена (3) в составе фосфатидилхолиновых липосом ( $\lambda_{ex}=335$  нм,  $\lambda_{max/em}=394$  нм) в присутствии ППФ-VI.

Известно, что при динамическом взаимодействии молекул тушение флуоресценции хромофоров зонда происходит при молярных концентрациях соединения-тушителя (Владимиров Ю.А., 1980). Поскольку тушение



флуоресценции 2,7-дибромпрофлавина происходит уже при концентрациях ППФ  $\sim 10^{-6}$ - $10^{-5}$  М как в водном растворе, так и в липосомах (рисунок 2), то можно утверждать, что дезактивация возбужденного состояния красителя происходит в результате образования комплекса возбужденного зонда-ППФ и описывается уравнением Штерна-Фольмера.

Для оценки локализации соединений в гидрофобных участках мембраны исследовалось изменение флуоресценции гидрофобного зонда пирена в мембране фосфатидилхолиновых липосом в присутствии ППФ. Показано, что при титровании суспензии липосом с возбужденным пиреном производными фуллерена наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции мономеров и эксимеров пирена при низких концентрациях ППФ  $\sim 10^{-6}$ - $10^{-5}$  М, что свидетельствует о том, что дезактивация возбужденного состояния зонда исследуемыми соединениями осуществляется за счет образования комплексов ППФ с пиреном в мономерной и эксимерной форме (рисунок 2).

Для исследуемых ППФ по величине угла наклона линейных анаморфоз в координатах Штерна-Фольмера были определены константы равновесия ( $K_p$ ) в комплексах 2,7-дибромпрофлавин-ППФ в водном растворе трис-НСl и эффективные константы равновесия в суспензии фосфатидилхолиновых липосом (таблица 1).

**Таблица 1** - Константы равновесия комплексов зонд-ППФ в буфере трис-НСl (рН =7.2, 0.02 М) и в фосфатидилхолиновых липосомах

ППФ	Константы равновесия комплексов «зонд:ППФ», $10^5 \text{ M}^{-1}$			
	2.7-Br-профлавин : ППФ		пирен : ППФ	
	$K_{\text{трис}}$	$K_{\text{лип}}$	$K_{\text{м}}$	$K_{\text{экс}}$
ППФ-I	1,15	0,66	0,74	0,30
ППФ-II	0,92	0,79	0,64	0,69
ППФ-III	0,76	0,64	0,82	0,58
ППФ-IV	0,99	0,36	1,10	0,75
ППФ-V	0,79	0,72	0,57	0,37
ППФ-VI	2,59	1,79	0,73	0,86

$K_{\text{трис}}$ ,  $K_{\text{лип}}$  - константы равновесия комплексов 2.7-Br-профлавин:ППФ в буфере трис-НСl и в фосфатидилхолиновых липосомах соответственно ( $\lambda_{em}=510$  нм,  $\lambda_{ex}=453$  нм);  $K_{\text{м}}$ ,  $K_{\text{экс}}$  - константы равновесия для мономеров и эксимеров пирена при  $\lambda_{ex} = 335$  нм,  $\lambda_{max}=394$  нм и  $\lambda_{max}=475$  нм соответственно.

Как видно из таблицы 1, в водном растворе значения констант равновесия выше, чем в составе липосом. Этот факт, возможно, объясняется тем, что, с одной стороны, в водном растворе ППФ могут образовывать различного вида ассоциаты, в которые включается зонд, что вызывает тушение его флуоресценции, и это приводит к увеличению значений констант в водных растворах, а с другой стороны, в составе липосом ППФ взаимодействуют не только с красителями, но и с полярными головками фосфолипидов, что частично препятствует их комплексообразованию с зондом.

Из сравнения констант равновесия (таблица 1) видно, что наиболее высокие значения в буферном растворе и в составе липосом соответствуют константам в комплексе 2,7-дибромпрофлавинов-ППФ-VI ( $2,59 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  и  $1,79 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , соответственно). Наблюдаемый эффект можно объяснить тем, что в структуру ППФ-VI в качестве адденда включена молекула *N*-3-гидрокси-L-тирозина, и на прочность комплекса (зонд-ППФ-VI) могут оказывать влияние выраженные гидрофобные взаимодействия флуоресцентного зонда не только с ядром фуллеренового сфероида, но и с ароматическими структурами аддендов.

Определены значения эффективных констант равновесия комплекса зонд-ППФ как для мономерной, так и для эксимерной форм возбужденного пирена (таблица 1). Так как молекула пирена не имеет заряда и является ароматической насыщенной структурой, то взаимодействие возбужденного пирена с ППФ осуществляется за счет прямого комплексообразования ароматической структуры пирена со сфероидом фуллерена или с его аддендами в гидрофобных участках мембраны.

Исходя из сказанного, следует, что ППФ образуют долгоживущие комплексы: возбужденный зонд-ППФ в липосомальной мембране с хромофорами 2,7-дибромпрофлавином и пиреном, что свидетельствует о локализации ППФ в области глицериновых и жирнокислотных остатков фосфолипидов мембраны липосом. Деактивация синглетного возбужденного состояния зондов происходит в результате образования комплексов возбужденный зонд-ППФ, а не в результате их динамического взаимодействия. Определены константы равновесия комплексов зонд-ППФ, характеризующие прочность комплексов. Показано, что все изучаемые ППФ обладают способностью активно проникать как в области полярных головок, так и в области жирнокислотных остатков фосфолипидов липосомальной мембраны фосфатидилхолиновых липосом. Таким образом, исследуемые ППФ обладают выраженными мембранотропными свойствами и способны проникать в липидный бислой мембран фосфатидилхолиновых липосом.

### 3.2 Влияние ППФ на процесс ПОЛ в гомогенате головного мозга мышей *in vitro*

В работе оценивали способность изучаемых ППФ ингибировать процесс ПОЛ по изменению содержания МДА в гомогенате головного мозга мышей *in vitro*. Как видно из таблицы 2, все исследуемые ППФ достоверно снижают накопление МДА в гомогенате головного мозга мышей *in vitro* по сравнению с контролем.

Наиболее эффективными ингибиторами являются соединения ППФ-V и ППФ-VI, которые в концентрации  $10^{-5} \text{ M}$  снижали содержание МДА на 74% и 73% соответственно. Этот эффект можно объяснить тем, что, с одной стороны, L-ДОПА (L-3,4-дигидроксифенилаланин) - адденд ППФ-VI, проявляет эффективное антиоксидантное и антирадикальное действие в различных тестах *in vitro* (Gülçin, 2007), а аддендом ППФ-V является производное янтарной кислоты, хорошо известного антиоксиданта (Zarubina et al. 2012). С другой стороны - углеродный сфероид фуллерена  $\text{C}_{60}$  является акцептором свободных радикалов (Krusic et al. 1991).

**Таблица 2** - Изменение интенсивности ПОЛ по изменению содержания МДА и ХЛ люминола в гомогенате головного мозга мышей в присутствии ППФ *in vitro*.

Соединение [10 <sup>-5</sup> М]	Содержание МДА, мкмоль/мг белка	$\frac{[МДА]_o}{[МДА]_к}$ ·100, %	S, отн.ед	S, %
контроль	0,116±0,004	100±3,6	4464±184	100±4,1
ППФ-I	0,046±0,003	40±2,6 <sup>***</sup>	1670±116	37±2,6 <sup>**</sup>
ППФ-II	0,078±0,005	67±4,7 <sup>**</sup>	3216±144	72±3,2 <sup>**</sup>
ППФ-III	0,096±0,001	83±0,7 <sup>*</sup>	2415±215	54±4,8 <sup>**</sup>
ППФ-IV	0,092±0,001	79±0,8 <sup>*</sup>	2128±211	48±4,7 <sup>**</sup>
ППФ-V	0,030±0,0003	26±0,2 <sup>***</sup>	576±58	13±1,3 <sup>***</sup>
ППФ-VI	0,032±0,001	27±1,3 <sup>***</sup>	951±7	21±0,2 <sup>***</sup>

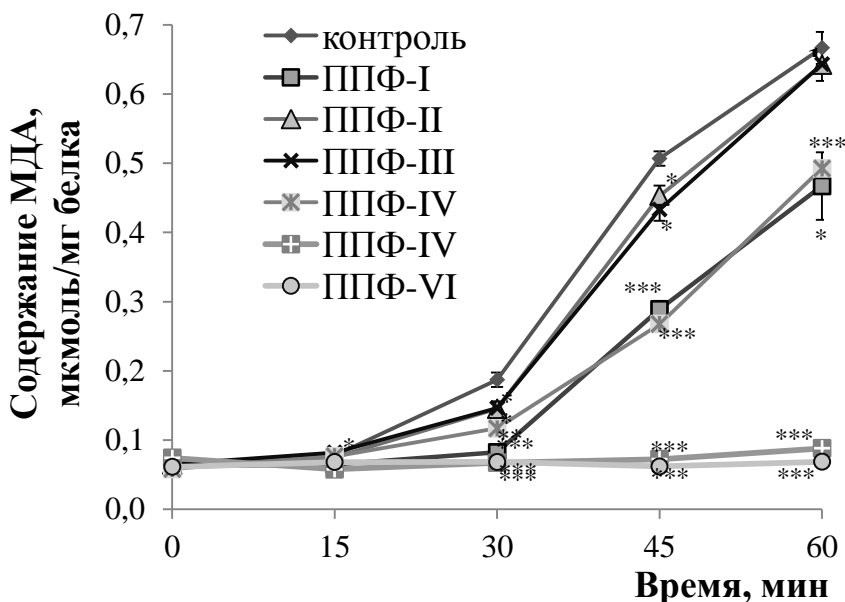
$[МДА]_к$  – концентрация МДА в контрольном образце;  $[МДА]_o$  – концентрация МДА в опытном образце. Данные представлены в виде значение  $\pm SEM$ . \* - $p < 0.05$ , \*\* - $p < 0.01$ , \*\*\* - $p < 0.001$  относительно контроля (*t*-критерий Стьюдента). МДА – малоновый диальдегид. S – светосумма ХЛ люминола в отн. ед. и процентах по отношению к контрольному образцу.

Влияние ППФ на процесс ПОЛ также оценивали по изменению сигнала ХЛ люминола. Как видно из таблицы 2, в присутствии ППФ снижается значение светосуммы (площади под кинетической кривой интенсивности ХЛ люминола), что свидетельствует об уменьшении содержания свободных радикалов в модельной системе. Таким образом, все исследуемые ППФ обладают способностью перехватывать свободные радикалы, т.е. ингибируют процесс ПОЛ. Поскольку значение светосуммы в образцах в присутствии исследуемых ППФ варьируется от 72 до 13% относительно контроля в зависимости от аддендов ППФ, то можно предположить, что ингибирование процесса ПОЛ производными фуллерена определяется не только сфероидом фуллерена, но и в существенной степени зависит от структуры аддендов (Kotel'nikova et al. 2011).

Наибольшую активность проявили ППФ-V и ППФ-VI (таблица 2), в концентрации 10<sup>-5</sup> М снижающие светосумму, а, следовательно, и содержание свободных радикалов в образцах на 87% и 79% соответственно. Как было показано выше, эти же соединения наиболее эффективно ингибируют процесс накопления МДА в образцах гомогената головного мозга мышей *in vitro*.

Проведено исследование кинетики накопления МДА при действии изучаемых ППФ в концентрации 10<sup>-5</sup> М. На рисунке 3 представлены кинетические кривые накопления МДА в гомогенате головного мозга мышей при действии ППФ (0–60 минут инкубации, 37 °С). Под влиянием ППФ снижалась скорость накопления МДА, что свидетельствует об их способности ингибировать процесс ПОЛ. Наиболее эффективными ингибиторами выступают ППФ-V и ППФ-VI.

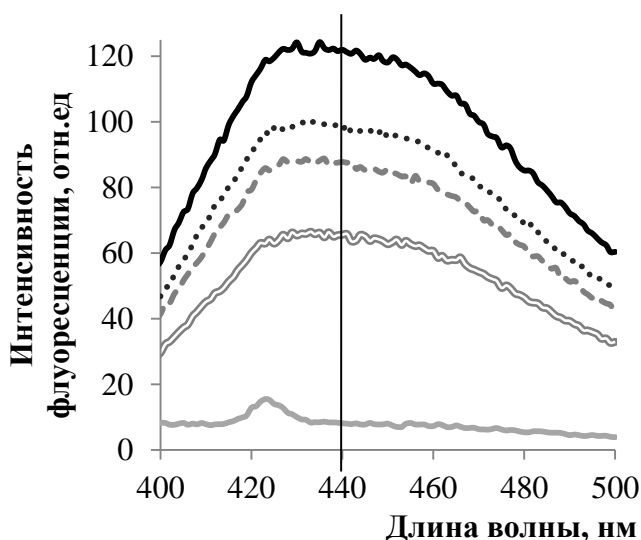
Таким образом, показано, что исследуемые ППФ проявляют ингибирующее действие на процесс ПОЛ, при этом максимальную активность проявляют ППФ-V и ППФ-VI.



**Рисунок 3** - Влияние ППФ [ $10^{-5}$  М] на кинетику накопления МДА в гомогенате головного мозга мышей *in vitro* (0,1М К-На-фосфатный буфер, pH= 7,2).  
 \*-p<0.05,  
 \*\*- p<0.01,  
 \*\*\*- p<0.001  
 относительно контроля (t-критерий Стьюдента).

### 3.3 Исследование влияния ППФ на процесс неферментативного гликирования альбумина *in vitro*

В работе изучали влияние ППФ на процесс неферментативного гликирования БСА по изменению его специфической флуоресценции. Образование гликированного БСА (глБСА) *in vitro* определяется наличием характерного пика флуоресценции конечных продуктов гликирования (КПГ) при  $\lambda_{ex} = 370$  нм,  $\lambda_{max/em.} = 440$  нм, в отличие от негликированного БСА (неглБСА) (рисунок 4). Специфическая флуоресценция гликированного в присутствии ППФ бычьего сывороточного альбумина ([глБСА + ППФ]) снижается (рисунки 4 и 5 (прямая 1) – данные для ППФ-III; такая же картина наблюдается для всех изучаемых ППФ).

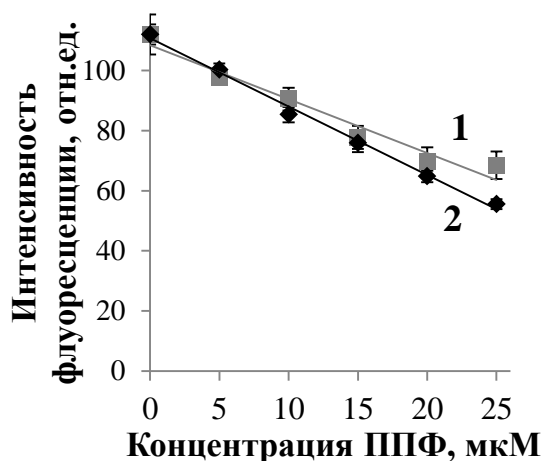


**Рисунок 4** - Снижение интенсивности флуоресценции гликированного в присутствии ППФ-III БСА. Концентрация БСА -  $6 \cdot 10^{-5}$  М.  $\lambda_{ex}=370$  нм,  $\lambda_{max/em.}=440$  нм.  
 — - негликированный БСА;  
 — - гликированный БСА [глБСА без ППФ];  
 — - [глБСА + ППФ-III [ $5 \cdot 10^{-6}$  М]]  
 - - - [глБСА + ППФ-III [ $10^{-5}$  М]]  
 — — - [глБСА + ППФ-III [ $2,5 \cdot 10^{-5}$  М]]

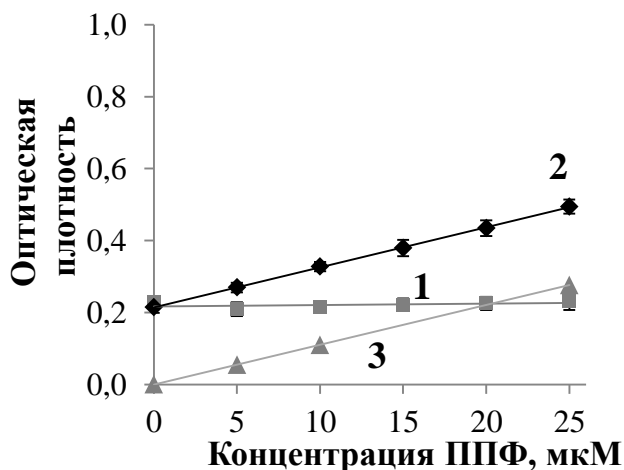
ППФ выступают эффективными тушителями триплетных и синглетных возбужденных состояний хромофоров (Kotelnikova et al. 1996, 2003), реализуемых как за счет механизма переноса электрона, так и за счет синглет-синглетного переноса энергии по механизму Ферстера. Из этого следует, что

при изучении действия соединений-тушителей флуоресценции на процесс гликирования белков данным методом необходимо подтвердить, что снижение интенсивности флуоресценции КПП происходит именно в результате уменьшения содержания КПП в пробе, а не за счет эффекта тушения сигнала флуоресценции КПП.

В работе был проведен ряд дополнительных экспериментов с целью доказательства полноты удаления исследуемых ППФ из проб (*см. методы*) и, как следствие, отсутствие эффекта тушения флуоресценции КПП производными фуллерена. Для этого образцы с альбумином, гликированным без добавления ППФ (*[глБСА без ППФ]*), титровали производными фуллерена  $C_{60}$  в тех же концентрациях, которые применяли при гликировании БСА в присутствии ППФ (*[глБСА + ППФ]*) и измеряли не только интенсивность флуоресценции (рисунок 5, прямая 2), но и поглощение данных проб (рисунок 6, прямая 2). Также измеряли поглощение проб *[глБСА + ППФ]* (рисунок 6, прямая 1).



**Рисунок 5** – Зависимости интенсивности флуоресценции глБСА от концентрации ППФ-III при  $\lambda_{\text{возб.}}=370$  нм,  $\lambda_{\text{макс/фл.}}=440$  нм:  
 1 (■) – зависимость интенсивности флуоресценции *[глБСА+ ППФ-III]*.  
 2 (◆) – зависимость интенсивности флуоресценции *[глБСА без ППФ]* при титровании ППФ-III;



**Рисунок 6** – Зависимости оптической плотности от концентрации ППФ-III при  $\lambda_{\text{погл.}}=370$  нм:  
 1(■) – зависимость поглощения *[глБСА+ППФ-III]*;  
 2 (◆) – зависимость поглощения *[глБСА без ППФ]* при титровании ППФ-III;  
 3(▲) – зависимость поглощения ППФ-III в водном растворе.

*Схожие данные были получены для всех остальных ППФ.*

Было обнаружено, что в обоих случаях (при *[глБСА + ППФ]* и при титровании *[глБСА без ППФ]* производными фуллерена) происходит сопоставимое по величине падение сигнала интенсивности флуоресценции (рисунок 5). Однако при сравнении изменения величин оптической плотности при 370 нм для данных проб было обнаружено существенное различие (рисунок 6) – оптическая плотность проб *[глБСА + ППФ]* (прямая 1) практически не изменялась при увеличении концентрации ППФ, в то время как

поглощение проб [глБСА без ППФ] при титровании ППФ повышалось при увеличении концентрации ППФ, аналогично простому водному раствору ППФ – как мы можем видеть из рисунка 6, угол наклона прямых 2 и 3 практически идентичен – т.е. можно заключить, что для проб [глБСА без ППФ] при титровании ППФ наблюдается суперпозиция спектров поглощения пробы [глБСА без ППФ] и добавляемого ППФ.

Следует подчеркнуть, что для получения сопоставимой величины падения сигнала наблюдаемой флуоресценции при  $\lambda_{ex} = 370$  нм,  $\lambda_{max/em.} = 440$  нм в данных типах проб (рисунок 5) лишь за счет механизма тушения флуоресценции, требовалось бы, чтобы в данных пробах присутствовала сопоставимая концентрация ППФ, что напрямую противоречит экспериментальным данным – концентрация ППФ в пробах [глБСА + ППФ] значительно ниже, чем в пробах [глБСА без ППФ] при титровании ППФ (рисунок 6).

Таким образом, отсутствие исследуемых ППФ в пробе было дополнительно проконтролировано измерением оптической плотности на 370 нм, которое показало практически полное их удаление из пробы после перерастворения осадка БСА (рисунок 5). Это позволяет утверждать, что высказанное выше предположение о том, что наблюдаемое снижение сигнала флуоресценции может быть вызвано только эффектом тушения флуоресценции КПП, в то время как в присутствии ППФ происходит эффективное образование КПП на уровне контрольной пробы, является неверным. Мы полагаем, что в условиях проведения гликирования БСА с ППФ (при совместном инкубировании), при повышении действующей концентрации ППФ происходит интенсивное ингибирование процесса гликирования белка, что приводит к тому, что в образцах образуется меньшее количество КПП, а значит и к снижению интенсивности сигнала наблюдаемой флуоресценции.

В результате проведенных исследований показано, что все изучаемые ППФ проявляют антигликирующую активность *in vitro*, определены  $IC_{50}$  (таблица 3).

**Таблица 3** - Концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) процесса гликирования БСА исследуемыми соединениями.

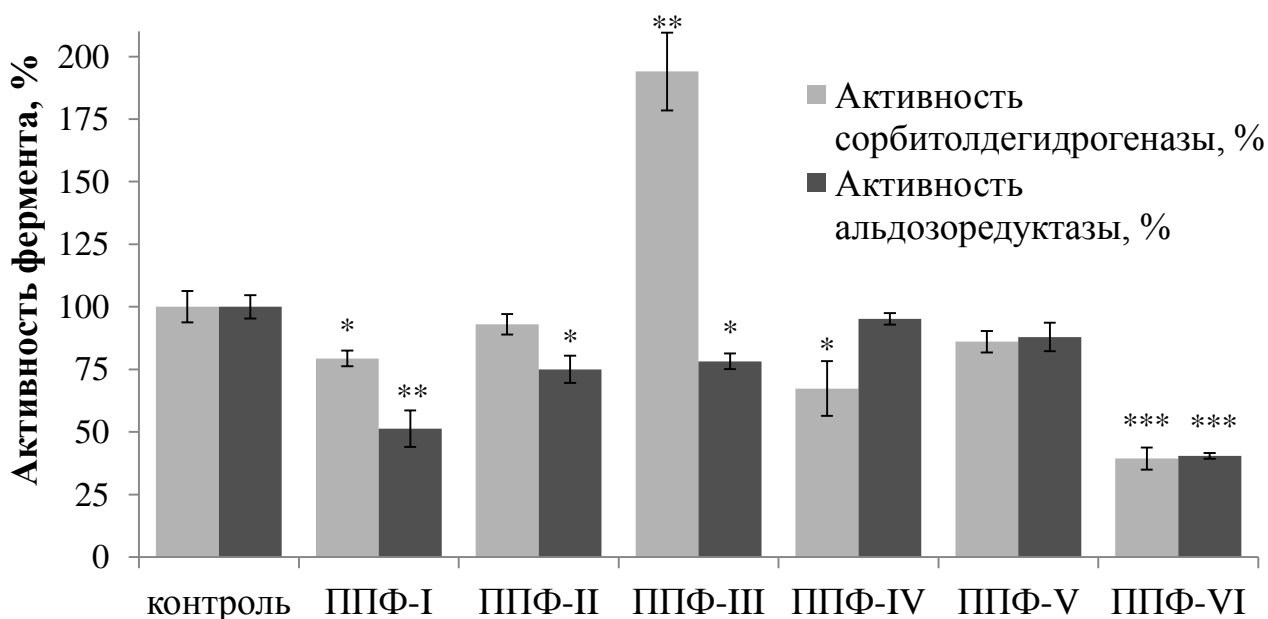
Соединение	ППФ-I	ППФ-II	ППФ-III	ППФ-IV	ППФ-V	ППФ-VI	Амино-гуанидин
$IC_{50}$ , мкМ	30	52,4	63,5	419,9	40,2	15,1	1294,4

Как следует из таблицы 3, среди ППФ самым эффективным ингибитором гликирования является ППФ-VI с  $IC_{50}=15,1$  мкМ. ППФ-I, -II, -III и -VI проявили значительную антигликирующую активность с  $IC_{50}$  от 30 до 63,5 мкМ и наиболее слабую показало ППФ-IV ( $IC_{50} = 419,9$  мкМ). Все изучаемые ППФ превышают по эффективности аминокгуанидин ( $IC_{50} = 1294,4$  мкМ) – известный стандартный ингибитор гликирования (Matsuura et al., 2002). ППФ-VI в 86 раз эффективней ингибирует гликирование БСА, чем аминокгуанидин.

### 3.4 Исследование влияния ППФ на ферменты полиольного пути метаболизма глюкозы *in vitro*

В работе исследовалось влияние ППФ на каталитическую активность ферментов полиольного пути метаболизма глюкозы – альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы. Влияние исследуемых ППФ на активность данных ферментов представлено на рисунке 7. Было показано, что ППФ-I, -II, -III и -VI в концентрации  $10^{-4}$  М проявляют ингибирующее действие на альдозоредуктазу, ППФ-IV и ППФ-VI в этой же концентрации не влияют на каталитическую активность АР. Наибольшую ингибирующую способность проявило ППФ-VI, ингибирующее АР на 60% а также ППФ-I, которое снижает каталитическую активность АР на 49%.

В ходе изучения действия ППФ на каталитическую активность СДГ было установлено, что три из шести соединений: ППФ-I, ППФ-IV и ППФ-VI [ $10^{-4}$  М] ингибируют каталитическую активность фермента на 21, 32 и 61 %, соответственно (рисунок 7). Наибольшую ингибирующую способность проявило ППФ-VI. ППФ-III выступило активатором каталитической активности СДГ, а ППФ-II и ППФ-V не изменяли активность фермента.

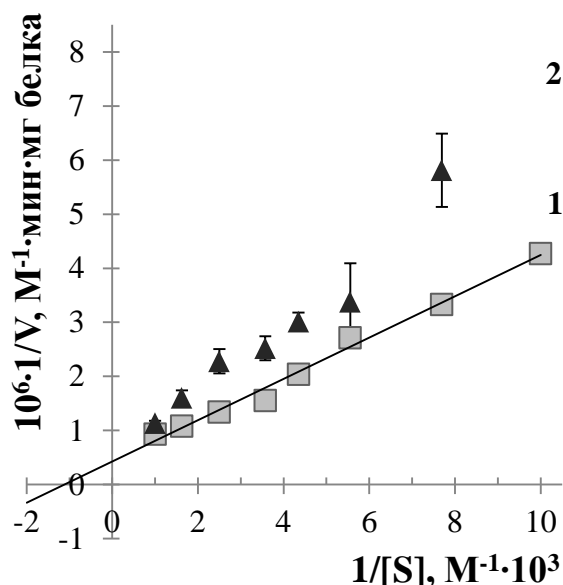


**Рисунок 7** - Влияние ППФ [ $10^{-4}$  М] на каталитическую активность ферментов АР в супернатанте гомогената печени и СДГ в сыворотке крови мышей *in vitro*. Контроль - образцы, не содержащие ППФ. Результаты в процентах от контроля  $\pm$ SEM. \*- $p<0.05$ , \*\*- $p<0.01$ , \*\*\*-  $p<0.001$  от контроля (t-критерий Стьюдента).

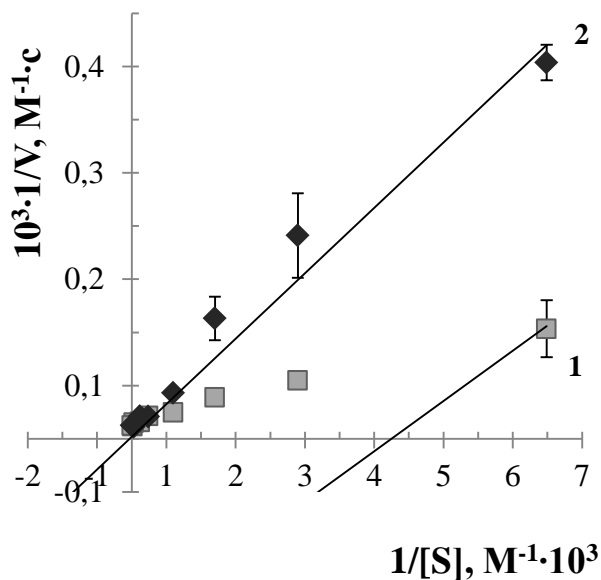
Для ППФ-VI, которое является соединением-лидером по эффективности влияния на ферменты полиольного пути, оценивали характер его взаимодействия с АР и СДГ в обратных координатах Лайнуивера-Берка и определяли константы ингибирования (рисунки 8–9).

На рисунке 8 видно, что при действии ППФ-VI на АР зависимость в координатах Лайнуивера-Берка имеет вид прямых, пересекающихся на оси ординат, что свидетельствует о конкурентном характере ингибирования АР

производным ППФ-VI, следовательно, ППФ-VI взаимодействует с активным центром фермента (Березин, 1976). Определена константа ингибирования АР соединением ППФ-VI, равная 15,3 мкМ. Из рисунка 9 видно, что ППФ-VI конкурентно ингибирует СДГ ( $K_i = 29,2$  мкМ). Таким образом, ППФ-VI является конкурентным ингибитором обоих ферментов полиольного пути метаболизма глюкозы АР и СДГ, что свидетельствует о его взаимодействии с их активными центрами.



**Рисунок 8** - Конкурентное ингибирование АР при действии ППФ-VI в супернатанте гомогената печени мышей *in vitro*. 1(□) – контроль (в отсутствии ингибитора); 2(▲) – в присутствии ППФ-VI [ $10^{-5}$  М]. [S] – концентрация D,L-глицеральдегида; V – скорость ферментативной реакции.  $K_i = 15,3$  мкМ.



**Рисунок 9** - Конкурентное ингибирование СДГ при действии ППФ-VI в сыворотке крови мышей *in vitro*. 1(□) – контроль (в отсутствии ингибитора); 2(◆) – в присутствии ППФ-VI [ $8,33 \cdot 10^{-5}$  М]. [S] – концентрация D-сорбитола; V – скорость ферментативной реакции.  $K_i = 29,2$  мкМ.

В ходе исследований *in vitro* показано, что все ППФ (рисунок 1) обладают способностью активно проникать как в область полярных головок, так и в область жирнокислотных остатков фосфолипидов мембраны фосфатидилхолиновых липосом (таблица 1), ингибировать процесс ПОЛ в гомогенате головного мозга мышей и процесс неферментативного гликирования БСА, ряд ППФ выступают эффективными ингибиторами ферментов АР и СДГ.

ППФ оказывают ингибирующее действие на ПОЛ *in vitro*, что показано как методом люминол-зависимой хемилюминесценции, так и по изменению содержания МДА в гомогенате головного мозга мышей. ППФ-V и ППФ-VI оказались наиболее эффективными ингибиторами ПОЛ (таблица 4).

Изучаемые ППФ в качестве ингибиторов процесса гликирования альбумина имеют значения  $IC_{50}$ , во много раз превышающие действие



аминогуанидина ( $IC_{50} = 1294,4$ ) – известного ингибитора гликирования (таблица 4). Более эффективной антигликирующей способностью обладают те же соединения, которые проявляют сильное ингибирующее действие на процесс перекисного окисления липидов: ППФ-V и ППФ-VI, а также ППФ-I.

Ингибирующее действие на оба исследованных фермента полиольного пути метаболизма глюкозы (сорбитолдегидрогеназу и альдозоредуктазу) проявили только два соединения: ППФ-I и ППФ-VI (таблица 4). Эти же соединения оказывают сильное ингибирующее действие на процесс ПОЛ и процесс неферментативного гликирования белков.

**Таблица 4** - Влияние ППФ на экспериментальные мишени СД2 *in vitro*.

	Светосумма ХЛ люминола, %	Содержание МДА, %	Активность СДГ, %	Активность АР, %	Антигликирующая активность, ( $IC_{50}$ , мкМ)
контроль	100±4,1	100±3,6	100±6,3	100±4,7	-
ППФ-I	37±2,6**	40±2,6***	79±3,1*	51±7,3**	30,0
ППФ-II	72±3,2**	67±4,7**	93±4,1	75±5,4*	52,4
ППФ-III	54±4,8**	83±0,7*	194±15,6**	78±3,1*	63,5
ППФ-IV	48±4,7**	79±0,8*	68±10,9*	95±2,3	419,9
ППФ-V	13±1,3***	26±0,2***	86±4,3	88±5,7	40,2
ППФ-VI	<b>21±0,2***</b>	<b>27±1,3***</b>	<b>39±4,5***</b>	<b>40±1,1***</b>	<b>15,1</b>

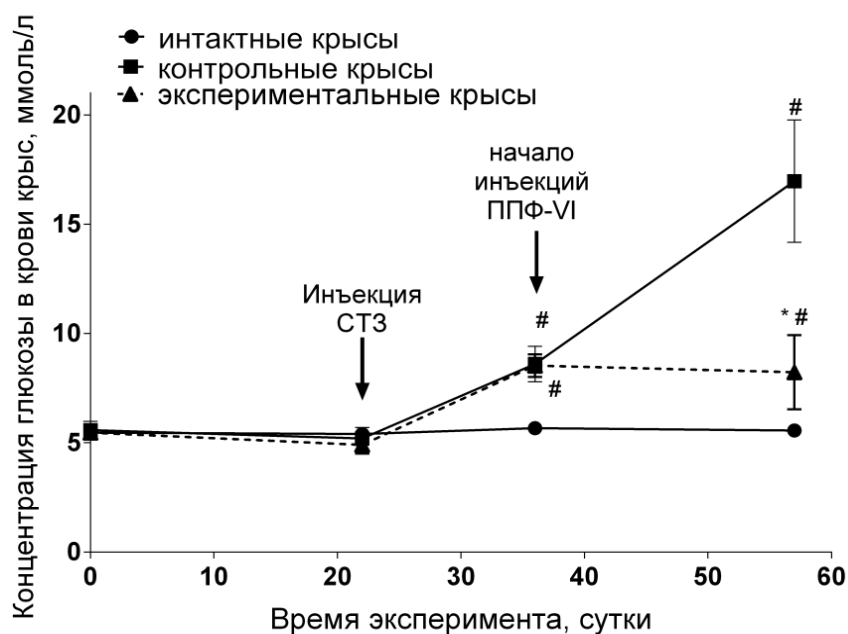
Результаты представлены в процентах относительно контроля  $\pm$  SEM. Контроль - образцы, не содержащие производных фуллерена. СДГ-сорбитолдегидрогеназа; АР – альдозоредуктаза; Светосумма ХЛ люминола – параметр, отражающий количество свободных радикалов в образце по данным ХЛ; МДА – содержание малонового диальдегида. \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$  относительно контроля (*t*-критерий Стьюдента).

По результатам *in vitro* исследований выбрано соединение-лидер ППФ-VI, которое наиболее эффективно действует на мишени СД2: обладает выраженными мембранотропными свойствами, ингибирует процесс ПОЛ и процесс неферментативного гликирования белка, конкурентно ингибирует ферменты полиольного пути метаболизма глюкозы, что свидетельствует о перспективности исследования данного соединения на животных с экспериментальным СД2.

### 3.5 Действие пентааминокислотного производного фуллерена C<sub>60</sub> на крыс с экспериментальной моделью СД2 по методу ВЖД/СТЗ

В представленной работе мы изучали влияние соединения лидера (ППФ-VI) на экспериментальной модели СД2 крыс, вызываемого сочетанием ВЖД и инъекции СТЗ. В начале эксперимента у крыс каждой группы определяли интактный уровень глюкозы в крови. Во всех группах животных уровень глюкозы в крови был в пределах физиологической нормы (рисунок 10).

После 3 недель высокожировой диеты не наблюдалось изменений уровня глюкозы (рисунок 10) в крови крыс контрольной и экспериментальной групп по отношению к интактным животным. Показатели глюкозы контрольной ( $8,6 \pm 0,8$  ммоль/л) и экспериментальной ( $8,5 \pm 0,5$  ммоль/л) групп к пятой неделе эксперимента (после инъекции СТЗ) достоверно превышали уровень глюкозы в крови у интактных крыс. У животных контрольной группы уровень глюкозы в крови продолжает расти и увеличивается в два раза к 8-й неделе эксперимента. У крыс экспериментальной группы, получавших внутрибрюшинные инъекции ППФ-VI, рост уровня глюкозы приостанавливается и достоверно отличается от показателей контрольной группы через 21 сутки после первого введения ППФ-VI ( $8,2 \pm 1,7$  против  $17,0 \pm 2,8$  ммоль/л).



**Рисунок 10** - Динамика содержания глюкозы в крови крыс в течение эксперимента. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM.

\* -  $P \leq 0,05$  – достоверность отличий между показателями крыс экспериментальной ( $n=7$ ) и контрольной группы ( $n=6$ );  
# -  $P \leq 0,05$  – достоверность отличий от показателей интактных крыс ( $n=10$ ) по t-критерию Стьюдента.

Несмотря на то, что в экспериментальной группе после проведенных инъекций ППФ-VI содержание глюкозы в крови превышает данный показатель для интактных животных, эти изменения имеют меньшую выраженность и достоверно отличаются от контрольных животных с экспериментальным СД2 по методу ВЖД/СТЗ. Таким образом, в работе показано, что внутрибрюшинное введение производного фуллерена ППФ-VI оказывает антигипергликемическое действие при индуцированном ВЖД/СТЗ диабете у крыс.

## Заключение

В данной работе проведено комплексное исследование физико-химических механизмов действия водорастворимых пентааминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> на экспериментальные мишени сахарного диабета 2 типа.

Методом флуоресцентных зондов *in vitro* показано, что исследуемые ППФ обладают способностью активно проникать как в область полярных головок, так и в область жирнокислотных остатков фосфолипидов мембран фосфатидилхолиновых липосом, что связано с их амфифильными свойствами. Методом люминол-зависимой хемилюминесценции, а также по изменению содержания МДА в гомогенате головного мозга мышей *in vitro* показано, что исследуемые ППФ являются эффективными ингибиторами процесса ПОЛ.

Изучено влияние ППФ на процесс неферментативного гликирования альбумина *in vitro*. Показано, что исследуемые ППФ демонстрируют выраженное антигликирующее действие, значительно превышающее (для ППФ-VI - в 86 раз) эффективность аминогуанидина - стандартного ингибитора гликирования.

Исследована каталитическая активность ферментов полиольного пути метаболизма глюкозы *in vitro* при действии ППФ. Четыре из шести ППФ оказали ингибирующее влияние на каталитическую активность альдозоредуктазы, и три соединения ингибировали каталитическую активность сорбитолдегидрогеназы. При этом только соединения ППФ-I и ППФ-VI ингибировали каталитическую активность АР и СДГ одновременно. Эти же соединения эффективно снижали интенсивность процессов ПОЛ и гликирования альбумина. Для ППФ-VI был определен характер ингибирования альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы и оценены константы ингибирования. Показано, что данное соединение ингибирует каталитическую активность ферментов полиольного пути по конкурентному механизму.

В результате анализа полученных результатов экспериментов *in vitro*, нами было выбрано соединение-лидер ППФ-VI, которое обладает выраженными мембранотропными свойствами и наиболее эффективно действует на мишени СД2, изучаемые в работе: ингибирует процесс ПОЛ, проявляет выраженное антигликирующее действие, конкурентно ингибирует ферменты полиольного пути метаболизма глюкозы, что свидетельствует о перспективности исследования данного соединения на животных с экспериментальным СД2.

В эксперименте *in vivo* показано, что соединение ППФ-VI способно оказывать антигипергликемическое действие при введении его крысам с экспериментальным СД2.

Полученные в диссертационной работе результаты показывают перспективность дальнейшего углубленного изучения нового класса пентааминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> как основы для создания высокоэффективных потенциальных препаратов для терапии патологических процессов, связанных с развитием СД2.

## Выводы

1. Изучаемые пентааминокислотные производные фуллерена C<sub>60</sub> образуют комплексы с флуоресцентными зондами, локализованными в области полярных головок и жирнокислотных остатков фосфолипидов модельных мембран, что свидетельствует об их способности включаться в липосомальные мембраны. Определены эффективные константы равновесия комплексов зонд-ППФ.
2. Исследуемые ППФ эффективно ингибируют процесс перекисного окисления липидов *in vitro*. Наиболее высокую активность проявляют ППФ-V и ППФ-VI.
3. Изучаемые ППФ проявляют ингибирующее действие на процесс неферментативного гликирования БСА *in vitro*. Определены IC<sub>50</sub> для всех ППФ. Наиболее эффективным ингибитором выступает ППФ-VI – его ингибирующая активность в 86 раз превышает активность стандартного ингибитора аминогуанидина.
4. Ряд ППФ являются ингибиторами каталитической активности ферментов полиольного пути метаболизма глюкозы - альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы *in vitro*. Наибольшую ингибирующую активность проявило - ППФ-VI, для которого показано, что ингибирование активности данных ферментов происходит по конкурентному механизму и оценены константы ингибирования.
5. Выбрано соединение-лидер по показателям проведенных исследований *in vitro* - ППФ-VI (калиевая соль фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина). В эксперименте *in vivo* показано, что ППФ-VI проявляет антигипергликемическую активность при введении крысам с экспериментальным СД2.

## Список публикаций по теме диссертации

1. Kotelnikova, R.A. Interaction of water soluble pentaamino acid fullerene derivatives with membranes of phosphatidylcholine liposomes. / R.A. Kotelnikova, A.V. Smolina, A.V. Zhilenkov, **Yu.V. Soldatova**, I.I. Faingold, P.A. Troshin, A.I. Kotelnikov // Russian chemical bulletin. – 2018. – V.67, № 2. – P. 366-370.
2. **Солдатова, Ю.В.** Влияние калиевой соли фуллеренилпента-N-дигидрокситирозина на терапевтические мишени сахарного диабета 2 типа / **Ю.В. Солдатова**, Р.А. Котельникова, А.В. Жиленков, И.И. Файнгольд, П.А. Трошин, М.А. Козлова, Д.А. Арешидзе, С.М. Алдошин // Доклады Академии наук. Биохимия, биофизика, молекулярная биология. – 2019. – Т. 488, № 3. – С. 338–341.
3. Курмаз, С.В. Гибридные материалы диметилбигуанида (метформина) на основе сополимера N-винилпирролидона с высоким содержанием диметакрилата триэтиленгликоля / С.В.Курмаз, Н.В. Фадеева, А.А. Грищук, Н.С. Емельянова, В.М. Игнатъев, Г.В. Шилов, **Ю.В. Солдатова**, И.И. Файнгольд, Р.А. Котельникова // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2021. – Т.63, №2. – С. 99-109.
4. Патент РФ № 2669341. Применение пентааминокислотных производных фуллеренов в качестве антиоксидантов и антидиабетических средств / Р.А. Котельникова, Д.А. Арешидзе, **Ю.В. Солдатова**, А.В. Смолина, М.А. Козлова,

- И.А. Семин, А.В. Жиленков, П.А. Трошин, А.И. Котельников, С.М. Алдошин // № 2016112993; заявл. 6.04.2016. опубл. 10.10.2018. Бюл. изобрет. №. 28; 2 с.
5. **Soldatova, Yu.V.** Antidiabetic action of water-soluble pentamino acid derivatives of fullerene C<sub>60</sub>. / **Yu.V. Soldatova**, D.A. Areshidze, I.I. Faingold, D.A. Poletaeva, A.V. Zhilenkov, P.A. Troshin, R.A. Kotelnikova // Journal of bioenergetics and biomembranes. – 233 Spring st, New York, USA: Springer, 2018. – V. 50, №. 6. – P. 586.
6. **Солдатова, Ю.В.** Влияние водорастворимых производных фуллеренов на терапевтические мишени сахарного диабета 2 типа и болезни Альцгеймера. / **Солдатова Ю.В.**, Котельникова Р.А., Смолина А.В., Жиленков А.В., Трошин П.А. // Успехи химической физики: сб. тезисов докладов на III Всероссийской молодежной конференции, 3-7 июля 2016 г. – М.: «Граница», 2016. – С.158.
7. **Soldatova, Yu.V.** Influence of water-soluble fullerene derivatives possessing anti-diabetic activity in Alzheimer's disease targets. / **Yu.V. Soldatova**, A.V. Smolina, A.V. Zhilenkov, V.V. Grigoriev, P.A. Troshin, R.A. Kotelnikova // Book of abstracts 3rd International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures “Saint Petersburg Open 2016”, March 28–30, 2016. – St Petersburg, 2016. – P. 202.
8. **Soldatova, Yu.V.** Influence of water-soluble fullerene derivatives on a therapeutic target for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. / **Yu.V. Soldatova**, A.V. Smolina, R.A. Kotelnikova, D.A. Areshidze, A.V. Zhilenkov, P.A. Troshin, A.I. Kotelnikov // Book of Abstracts of International Conference “Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases” 26-30 September 2016. – Dolgoprudny: MIPT, 2016. – P.156.
9. **Солдатова, Ю.В.** Антидиабетическое действие пентааминокислотных водорастворимых производных фуллерена C<sub>60</sub>. / **Ю.В. Солдатова**, А.В. Жиленков, И.И. Файнгольд, Д.А. Арешидзе, П.А. Трошин, И.А. Семин, Котельникова Р.А. // Биология – наука XXI века: 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, 17-21 апреля 2017 г. – Пущино, 2017. – С. 239.
10. **Солдатова, Ю.В.** Влияние пентааминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> на активность альдозоредуктазы и процесс гликозилирования / **Ю.В. Солдатова**, А.В. Жиленков, И.И. Файнгольд, Д.А. Полетаева, П.А. Трошин, Р.А. Котельникова // Биология - наука XXI века: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, 23-27 апреля 2018 г. – Пущино, 2018. – С. 238.
11. **Солдатова, Ю.В.** Исследование нейропротекторных свойств пентааминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> / **Ю.В. Солдатова**, Я.А. Кузнецова, А.В. Жиленков, П.А. Трошин, Д.А. Арешидзе, Р.А. Котельникова // Материалы международной конференции "Психофизиология и психонейроэндокринология" 23-26 мая 2018 г. – Ставрополь // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018 – Т.16. – Спецвып.1 – С. 122
12. **Солдатова, Ю.В.** Антидиабетическое действие водорастворимых пентааминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> / **Ю.В. Солдатова**, А.В.

Жиленков, П.А. Трошин, Д.А. Арешидзе, Р.А. Котельникова // Сборник тезисов XIV Международной (XXIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, 21 марта 2019. – М.: ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 2019. – С. 87-88.

13. **Солдатова, Ю.В.** Влияние водорастворимых пентааминокислотных производных фуллерена  $C_{60}$  на мишени сахарного диабета 2-го типа. / **Ю.В. Солдатова**, А.В. Жиленков, Д.А. Арешидзе, П.А. Трошин, Р.А. Котельникова // Труды XIX Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы “Биохимическая физика”. Москва, 28-30 октября 2019 г. – М.: ООО Альтиграфика, 2019. – С. 205-206.

14. **Солдатова, Ю.В.** Антидиабетическое действие пентааминокислотных производных фуллерена  $C_{60}$ . / **Ю.В. Солдатова**, А.В. Жиленков, Д.А. Арешидзе, П.А. Трошин, Р.А. Котельникова // VII Троицкая конференция «Медицинская физика», 19- 21 октября 2020 г. — М.: Издательство ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России. – 2020. - С. 93-94

### Список используемых сокращений

**АР** – альдозоредуктаза

**БСА** – бычий сывороточный альбумин

**ВЖД/СТЗ** – высокожировая диета в комбинации с инъекцией стрептозотоцина

**глБСА** – гликированный БСА

**[глБСА без ППФ]** – БСА, гликированный без добавления ППФ

**[глБСА + ППФ]** – БСА, гликированный в присутствии ППФ

**КПГ** – конечные продукты гликирования

**МДА** – малоновый диальдегид

**неглБСА** – негликированный БСА

**ПОЛ** – перекисное окисление липидов

**ППФ** – пентааминокислотные производные фуллерена  $C_{60}$

**СД2** – сахарный диабет 2 типа

**СДГ** – сорбитолдегидрогеназа

**СТЗ** – стрептозотоцин

**ХЛ** – хемиллюминесценция