

6. Новиков Н. В., Бочечка А. А., Назарчук С. Н., Особенности взаимодействия между компонентами при реакционном спекании композитов алмаз – карбид вольфрама и алмаз – карбид кремния в условиях высокого давления // Породоразрушающий и металлообрабатывающий инструмент – техника и технологии его изготовления и применения, 2012. – № 15. – С. 227–232.

Надійшла 17.06.13

УДК 577.152.321

**И. В. Шугалей<sup>1</sup>, А. П. Возняковский<sup>2</sup>, М. А. Илюшин<sup>1</sup>,  
А. В. Гарабаджиу<sup>1</sup>**, доктора химических наук

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Россия

<sup>2</sup>Федеральное унитарное государственное предприятие «НИИ синтетического каучука им. акад. С. В. Лебедева», г. Санкт-Петербург, Россия

### **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕТОНАЦИОННЫХ НАНОАЛМАЗОВ НА ПРОЦЕСС ПЕРОКСИДНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ**

*На примере использования фермента ацетилхолинэстеразы в качестве тест-объекта показано, что детонационные наноалмазы способны эффективно защищать белки от окислительного повреждения в условиях, близких к физиологическим. Определены оптимальные условия проявления защитного эффекта.*

**Ключевые слова:** ацетилхолинэстераза, детонационные наноалмазы, активные формы кислорода, пероксидное повреждение.

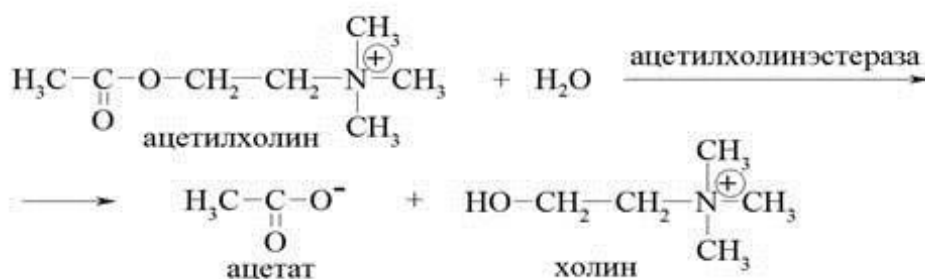
В настоящее время факт различной биологической активности наноуглеродных материалов очевиден, а темпы выявления различных форм биологической активности и сфер медико-биологического применения наоуглеродов постоянно ускоряются [1; 2]. Многочисленными исследованиями установлено, что наноуглеродные материалы активно влияют на процессы, протекающие с участием активных форм кислорода (АФК) [1; 3]. На подобных взаимодействиях основано их противовирусное, антибактериальное и, возможно, противораковое действие. Несмотря на обилие публикаций по биологической активности наноуглеродных материалов, систематических исследований механизмов их взаимодействия с биологическими объектами довольно мало. Традиционными объектами, которые используют для оценки взаимодействия любых, в том числе углеродных, наноматериалов с активными формами кислорода, являются липиды. Способность тормозить либо промотировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) традиционно трактуется как характеристика анти- либо прооксидантной активности материала [4]. Однако при взаимодействии с такими биологическими объектами, как клетка, а тем более многоклеточный организм, гидрофильный наноматериал, к которому относятся детонационные наноалмазы (ДНА), будет проявлять высокое сродство к гидрофильным биологическим объектам, прежде всего к белкам. Взаимодействие ДНА с белками широко известно, его применяют в биологии и медицине [1; 5]. Наноматериалы вызывают изменение конформации белковых молекул, поверхностной энергии молекул биополимеров. Таким образом, изучать анти- и прооксидантную активность ДНА предпочтительнее с использованием более адекватной модели – растворов белков. При введении суспензий углеродных наноматериалов лабораторным животным у них изменяются биохимические

параметры крови, активность ряда ферментов [6], что приводит к существенной перестройке внутриклеточного метаболизма.

В связи с изложенным было предпринято исследование анти- и прооксидантной активности ДНА с использованием в качестве субстрата фермента ацетилхолинэстеразы (холинэстеразы, АХЭ).

Ацетилхолинэстераза – это фермент, который содержится в синапсах и катализирует гидролиз нейромедиатора – ацетилхолина до холина и уксусной кислоты.

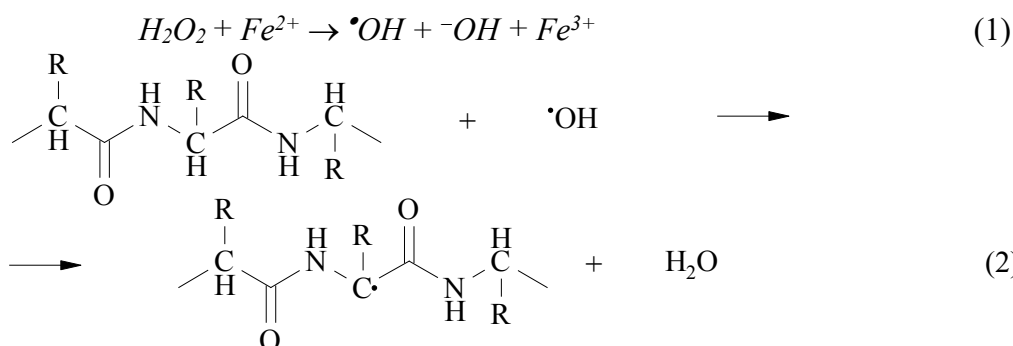
Реакция, катализируемая АХЭ, необходима для дезактивации ацетилхолина в синаптической щели и перехода клетки-мишени в состояние покоя (например, для расслабления мышечной клетки). Ацетилхолинэстераза обнаружена в мембранах эритроцитов и является Yt-антигеном крови [7].

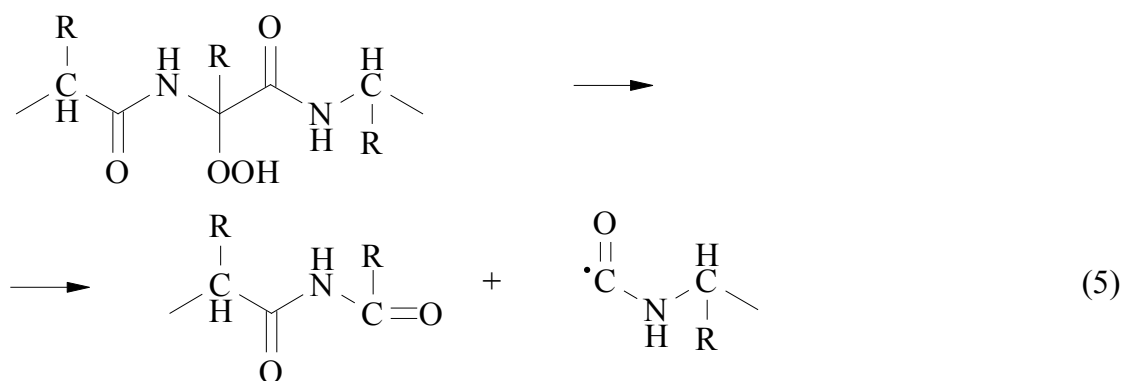
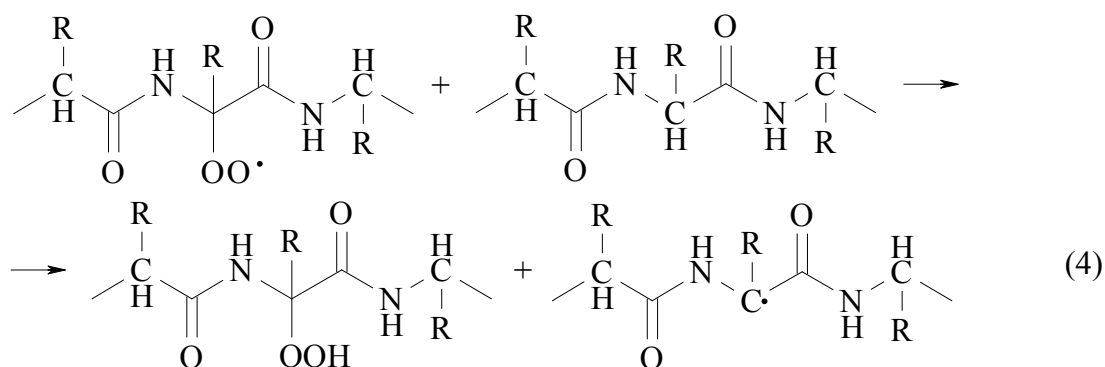
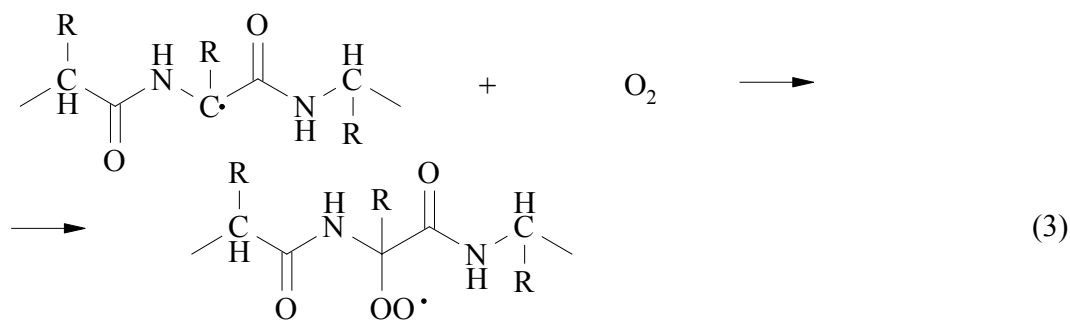


Известно, что ДНА в случае с фосфолипидами, подвергшимися воздействию реактива Фентона, проявляют антиоксидантные свойства, снижая повреждающее действие АФК, генерируемых в системе реактив Фентона – фосфолипид [3; 8].

Система Фентона – смесь солей двухвалентного железа с пероксидом водорода – рассматривается как классическая модель генерации одних из наиболее активных кислородсодержащих свободных радикалов – гидроксильных, которые, как известно, стимулируют перекисное повреждение биоструктур, в том числе белков. В качестве объекта изучения окислительного радикального повреждения выбрали фермент АХЭ, так как известно, что этот фермент интенсивно повреждается активными формами кислорода, в том числе гидроксильным радикалом [9]. При этом предположили, что инактивация данной системой АХЭ является следствием ее перекисного повреждения, а глубина перекисного повреждения белковой молекулы и степень инактивации фермента, вызванные единой причиной, должны коррелировать между собой.

Общую характеристику процессов, протекающих в растворе белка в присутствии реактива Фентона, можно представить в виде схемы:





Ключевой стадией приведенного каскада цепных радикальных реакций является атака гидроксильным радикалом СН-фрагмента пептидной связи.

Такой механизм можно рассматривать как общий для белков всех типов [10]. С учетом того, что ДНА активно ингибируют ПОЛ и ингибирующее действие приписывается именно улавливанию кластерами ДНА гидроксильного радикала, с высокой степенью вероятности следовало ожидать ингибирующего действия ДНА для перекисного повреждения белков.

Поскольку пероксид водорода и катион двухвалентного железа – основные компоненты, при взаимодействии которых генерируется гидроксильный радикал, изменение активности АХЭ должно зависеть от изменения концентрации этих реагентов. Наблюдаемую зависимость снижения активности АХЭ (А) от концентрации пероксида водорода и катиона двухвалентного железа (рН = 8,0, фосфатный буфер) при концентрации фермента 0,40 мкмоль/л, можно представить в виде уравнений.

Так, при концентрации ионов железа 0,6 ммоль/л и диапазоне изменения концентраций пероксида водорода 0,01–0,83 ммоль/л активность фермента снижается на 5,6–51%, что соответствует уравнению

$$A = 54,3 [\text{H}_2\text{O}_2]^{1/2} + 0,66 \quad (r = 0/95, n = 8)$$

При изменении концентрации ионов двухвалентного железа в пределах 0,08–0,82 ммоль/л и постоянной концентрации пероксида водорода 0,83 ммоль/л снижение активности АХЭ описывается уравнением

$$A = 107,2 [\text{Fe}^{+2}] + 2,0 \quad (r = 0,99, n = 8)$$

При этом диапазон падения активности составляет 11–90%

Установлено также, что степень инактивации АХЭ под действием реактива Фентона не зависит от кислотности среды (табл. 1).

**Таблица 1. Степень инактивации АХЭ под действием реактива Фентона при различной кислотности среды. Водный фосфатный буфер,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,83$  ммоль/л,  $[\text{Fe}^{+2}] = 0,6$  ммоль/л,  $[\text{АХЭ}] = 0,40$  мкмоль/л**

рН среды	6,0	6,4	6,7	7,2	7,6	8,0
Падение активности, %	29	33	29	30	30	33

Далее исследовали влияние детонационных наноалмазов на инактивирующее действие реактива Фентона относительно АХЭ.

Полученные данные представлены в таблицах 2–6.

**Таблица 2. Влияние добавок ДНА на инактивирующее действие реактива Фентона относительно холинэстеразы при различных концентрациях пероксида водорода, рН = 7,2 (водный фосфатный буфер),  $[\text{АХЭ}] = 0,40$  мкмоль/л,  $[\text{Fe}^{+2}] = 0,5$  ммоль/л,  $[\text{ДНА}] = 0,015\%$  масс. (Контроль – образец без добавок)**

Концентрация $\text{H}_2\text{O}_2$ , ммоль/л	Снижение активности АХЭ по сравнению с контролем, %	
	без ДНА	с ДНА
0,02	2	3
0,05	9	7
0,10	16	13
0,20	22	14
0,40	39	22
0,60	43	35
0,80	56	44

**Таблица 3. Влияние различных концентраций ДНА на инактивирующее действие реактива Фентона относительно холинэстеразы при рН = 7,2 (водный фосфатный буфер),  $[\text{АХЭ}] = 0,40$  мкмоль/л,  $[\text{Fe}^{+2}] = 0,6$  ммоль/л,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,75$  ммоль/л. (Контроль – образец без добавок)**

Концентрация ДНА, % масс.	Падение активности АХЭ по сравнению с контролем, %	
	без ДНА	с ДНА
0,005	30	34
0,010	34	27
0,015	34	13
0,020	33	15
0,025	30	22
0,040	29	29
0,050	34	38

Таблица 4. Влияние добавок ДНА на инактивирующее действие реактива Фентона относительно холинэстеразы при различных концентрациях катиона двухвалентного железа, рН =7,2 (водный фосфатный буфер), [АХЭ] = 0,40 мкмоль/л, [Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>] = 0,55 ммоль/л, [ДНА] = 0,020% масс. (Контроль – образец без добавок)

[Fe <sup>+2</sup> ], ммоль/л	Снижение активности АХЭ по сравнению с контролем, %	
	без ДНА	с ДНА
0,10	12	14
0,20	24	19
0,40	40	25
0,60	64	34
0,80	94	56

Таблица 5. Влияние добавок ДНА на инактивирующее действие реактива Фентона относительно холинэстеразы при различных концентрациях фермента, рН =7,2 (водный фосфатный буфер), [Fe<sup>+2</sup>] = 0,50 ммоль/л, [Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>] = 0,75 ммоль/л, [ДНА] = 0,020% масс. (Контроль – образец без добавок)

[АХЭ], мкмоль/л	Снижение активности АХЭ по сравнению с контролем, %	
	без ДНА	с ДНА
0,10	83	80
0,20	67	59
0,30	60	40
0,40	55	40
0,50	50	35

Таблица 6. Влияние добавок ДНА на инактивирующее действие реактива Фентона относительно холинэстеразы при различной кислотности среды (водный фосфатный буфер), [Fe<sup>+2</sup>] = 0,50 ммоль/л, [Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>] = 0,75 ммоль/л, [АХЭ] = 0,40 мкмоль/л, [ДНА] = 0,015% масс. (Контроль – образец без добавок)

рН среды	Снижение активности АХЭ по сравнению с контролем, %	
	без ДНА	с ДНА
6,0	20	21
6,2	30	29
6,4	33	27
6,7	29	17
7,2	30	10
7,5	33	16
7,8	29	20
8,0	33	31

Как следует из данных табл. 2–6, при введении ДНА в реакционную среду, содержащую фермент АХЭ и компоненты реактива Фентона, характер повреждения

фермента генерируемыми в системе АФК сохраняется, однако степень повреждения существенно снижается, что свидетельствует о выраженной антиоксидантной способности суспензии ДНА в условиях эксперимента относительно белка-фермента.

Наиболее вероятным механизмом защиты белка от окислительного повреждения следует считать способность кластера ДНА снижать продукцию АФК в реакционной среде. Наиболее эффективно защитное действие ДНА проявляется при физиологических значениях рН. Выявлена зависимость защитного эффекта от концентрации ДНА в реакционной среде. Оптимальная концентрация ДНА для защиты от окислительного повреждения составляет 0,015–0,020% масс. Учитывая выявленный антиоксидантный эффект ДНА относительно липидов, можно заключить, что ДНА является универсальным антиоксидантом. Однако с учетом сложности структуры поверхности ДНА, зависимости свойств от типа образца, существенного влияния среды на свойства кластеров ДНА можно изменить характер влияния кластеров ДНА на пероксидное повреждение биоструктур в других условиях. Тем не менее, на основании накопленного экспериментального материала можно однозначно утверждать, что ДНА способны активно вмешиваться в процессы с участием активных форм кислорода, что во многом объясняет их разнообразную биологическую активность.

#### **Выводы**

1. Показано, что ДНА способны снижать интенсивность перекисного повреждения белков в водной среде
2. Установлено, что максимальный антиоксидантный эффект достигается при значениях кислотности среды, близких к физиологическим значениям.

*На прикладі використання ферменту ацетилхолінестерази в якості тест-об'єкта показано, що детонаційні наноалмази здатні ефективно захищати білки від окислювального пошкодження в умовах, близьких до фізіологічних. Визначено оптимальні умови прояву захисного ефекту.*

**Ключові слова:** ацетилхолінестераза, детонаційні наноалмази, активні форми кисню, пероксидне пошкодження.

*Detonation nanodiamonds have shown the protecting effect against active oxygen species while acetylcholine esterase enzyme was used as a testing substrate. The best effect was reached at the conditions being close to physiological ones.*

**Key words:** acetylcholinesterase, detonation nanodiamonds, active oxygen species, peroxy damage.

#### **Литература**

1. Биологическая активность детонационных наноалмазов и перспективы их медико-биологического использования / И. В. Шугалей, А. П. Возняковский, А. В. Гарабаджи и др. // ЖОХ. – 2013. – **83**. – Вып. 5. – С. 709–744.
2. Карпухин А. В. Наноалмаз детонационного синтеза – химическое модифицирование, свойства и возможные применения: автореф... канд. хим. наук. – М.: МГУ, 2012. – 25 с.
3. Химия поверхности детонационных наноалмазов как основа создания продукции биомедицинского назначения / И. В. Шугалей, А. М. Судариков, А. П. Возняковский и др. – СПб: ЛГУ им. Пушкина, 2012. – 152 с.
4. Владимирова Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
5. Шугалей И. В., Возняковский А. П., Гарабаджи А. В. Перспективы использования детонационных наноалмазов как биоадсорбента в биологии и медицине // Пятая Всерос. конф. (с международным участием) «Химия поверхности и

- нанотехнология» (Санкт-Петербург – Хилово, 24–30 сентября 2012 г.): тез. докл. – СПб: СПбГТИ (ТУ), 2012. – С.294–295.
6. The Influence of Detonation Nanodiamond Powder on Blood Cells. / A. P. Puzyr, D. A. Neshumayev, V. S. Bondar et all. // In Innovative Superhard Materials and Sustainable Coatings for Advanced Manufacturing / Ed. J. Lee, N. Novikov. NATO Sci. ser. II Materials, Physics and Chemistry. – 2005 – **100**. – Chapter 10. – P. 155–167
  7. Ковалев Н. Н. Холинэстеразы – биохимические механизмы адаптации гидробионтов: дисс... д-ра биол. наук. – Владивосток, 2003. – 280 с.
  8. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза как средство коррекции процессов пероксидации белков и липидов при злокачественном росте / И. В. Шугалей, Н. П. Дубяго, С. Н. Львов и др. // Породоразрушающий и металлообрабатывающий инструмент – техника и технология его изготовления и применения: сб. науч. тр. – К.: ИСМ им. В. Н. Бакуля НАН Украины, 2006 – Вып. 9. – С. 243–246.
  9. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (Жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинко-биохимические процессы. – СПб: Мед. Пресса, 2006. – 397 с.
  10. Лукогорская С. А. Некоторые закономерности процессов пероксидного повреждения полипептидной цепи белков различного типа: автореф... канд. хим. наук. – СПб, 2003. – 25 с.

Поступила 16.06.13

УДК 621.762.5–022.532

**А. А. Шульженко**, член-кор. НАН Украины<sup>1</sup>; **А. С. Попов**<sup>2</sup>;  
**В. Я. Гайворонский**<sup>2</sup>, канд. физ.-мат. наук; **В. Г. Гаргин**, **А. Н. Соколов**, кандидаты  
технических наук<sup>1</sup>; **Т. А. Прихна**, член-кор. НАН Украины<sup>1</sup>, **Т. В. Басюк**, канд. техн. наук;  
**Т. Е. Константинова**<sup>3</sup>, д-р физ.-мат. наук; **А. Д. Шевченко**<sup>4</sup>, д-р техн. наук

<sup>1</sup>Институт сверхтвердых материалов им. В. Н. Бакуля НАН Украины, г. Киев

<sup>2</sup>Институт физики НАН Украины, г. Киев

<sup>3</sup>Донецкий физико-технический институт им. А. А. Галкина НАН Украины

<sup>4</sup>Институт металлофизики им. Г. В. Курдюмова НАН Украины, г. Киев

## ОКСИДНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ НАНОКЕРАМИКА, ПОЛУЧЕННАЯ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ

*Изучено влияние температуры спекания при высоком давлении на оптические свойства нанокерамики из  $Y_3Al_5O_{12}$  (YAG). Все эксперименты показали существенное изменение оптического отклика при изменении температуры спекания. Установлено, что большинство полученных образцов YAG -керамики обладают эффектом самофокусировки лазерного пучка. Это говорит о том, что исследуемые образцы являются перспективными материалами для применения в нелинейной оптике.*

**Ключевые слова:** керамика, иттрий-алюминиевый гранат, высокое давление, спекание, оптические свойства.

### Введение

В настоящее время во многих областях науки и техники используются различные виды керамики, которые представляют собой поликристаллические материалы. Одним из