

БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-6-492-503>



УДК 615.014.24:615.015.4

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Исследование биологической активности водорастворимого комплекса C_{60} /поли-*N*-винилпирролидон

Н.Ю. Логинова¹, Ю.С. Чесовских^{1,✉}, В.Б. Бородулин^{1,2}

¹Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, 410012 Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: Juliachesovskih@gmail.com

Аннотация

Цели. Исследовать биологическую активность водорастворимого производного фуллере́на – комплекса C_{60} /поли-*N*-винилпирролидона (C_{60} /ПВП) – в условиях *in vitro* и *in vivo*; изучить влияние комплекса C_{60} /ПВП на активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в условиях *in vitro* и *in vivo*; оценить изменения биохимических показателей сыворотки крови при введении мышам C_{60} /ПВП *per os*.

Методы. Для определения активности коммерческого препарата ЛДГ и исследования кинетики данного процесса был использован фотометрический метод Варбурга с применением стандартной методики. Для оценки влияния поливинилпирролидона (ПВП) и комплекса C_{60} /ПВП на некоторые биохимические показатели *in vivo* было проведено исследование на двухмесячных самцах белых беспородных мышей весом 20 ± 3 г. Определение биохимических показателей сыворотки крови проводилось с помощью полуавтоматического биохимического анализатора по стандартным методикам.

Результаты. Исследовано влияние комплекса C_{60} /ПВП на активность ЛДГ и проведена оценка изменений биохимических показателей сыворотки крови мышей, характеризующих углеводный обмен. Установлено, что комплекс C_{60} /ПВП увеличивает содержание глюкозы и пировиноградной кислоты, снижает содержание лактата и активность ЛДГ в сыворотке крови по сравнению с контролем, а также снижает активность ЛДГ в условиях *in vitro* по типу смешанного ингибирования.

Выводы. Комплексы C_{60} /ПВП и ПВП проявляют биологическую активность в условиях *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что комплекс C_{60} /ПВП является ингибитором ЛДГ смешанного типа в условиях *in vitro*, угнетает активность ЛДГ в условиях *in vivo*, а также способствует снижению концентрации лактата и увеличению концентрации пировиноградной кислоты и глюкозы в сыворотке крови при введении мышам C_{60} /ПВП *per os*. При этом также выявлено ингибирующее действие и ПВП на активность ЛДГ *in vitro* и *in vivo*, причем в условиях *in vivo* ПВП способствует снижению концентрации лактата в крови. Менее выраженное действие комплекса C_{60} /ПВП по сравнению с ПВП может быть связано с тем, что молекулы C_{60} «скрыты» в полостях, образованных в молекулах ПВП.

Ключевые слова: фуллерен, C_{60} , C_{60} /поли-*N*-винилпирролидон, комплекс C_{60} /ПВП, активность ЛДГ, биохимические показатели, биологическая активность

Для цитирования: Логинова Н.Ю., Чесовских Ю.С., Бородулин В.Б. Исследование биологической активности водорастворимого комплекса C_{60} /поли-*N*-винилпирролидон. *Тонкие химические технологии*. 2022;17(6):492–503. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-6-492-503>

RESEARCH ARTICLE

Investigation of the biological activity of the water-soluble C_{60} /poly-*N*-vinylpyrrolidone complex

Natalia Yu. Loginova¹, Yulia S. Chesovskikh^{1,✉}, Vladimir B. Borodulin^{1,2}

¹V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Saratov, 410012 Russia

²MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

✉ Corresponding author, e-mail: Juliachesovskih@gmail.com

Abstract

Objectives. The study aimed to investigate the biological activity of the C_{60} /poly-*N*-vinylpyrrolidone (C_{60} /PVP) complex representing a water-soluble fullerene derivative. *In vitro* and *in vivo* techniques were used to analyze the effect of the C_{60} /PVP complex on the activity of lactate dehydrogenase (LDH) and evaluate changes in the biochemical parameters of blood serum when *per os* administered to mice.

Methods. In order to determine the activity of a commercial LDH preparation and study the kinetics of this process, the standard Warburg photometric method was used. To assess the effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) and the C_{60} /PVP complex on some biochemical parameters *in vivo*, a study was conducted on two-month-old male white mongrel mice weighing 20 ± 3 g. Determination of biochemical parameters of blood serum was carried out using a semi-automatic biochemical analyzer according to standard methods.

Results. The effect of the C_{60} /PVP complex on LDH activity was studied along with changes in the biochemical parameters of mouse blood serum characterizing carbohydrate metabolism. As well as increasing the glucose and pyruvic acid content, the C_{60} /PVP complex was found to reduce lactate content and LDH activity in blood serum along with *in vitro* LDH activity according to the type of mixed inhibition.

Conclusions. The C₆₀/PVP complex and PVP were shown to exhibit biological activity *in vitro* and *in vivo*. The C₆₀/PVP complex, representing a mixed-type LDH inhibitor, was shown to inhibit LDH activity, as well as contributing to a decrease in lactate concentration and an increase in the concentration of pyruvic acid and glucose in blood serum when administered *per os* to mice. The inhibitory effect of PVP on LDH activity was revealed in both *in vivo* and *in vitro* investigations. *In vivo*, PVP contributes to a decrease in the concentration of lactate in the blood. The less pronounced effect of the C₆₀/PVP complex as compared to PVP alone may be due to the fact that C₆₀ molecules are “hidden” in cavities formed in PVP molecules.

Keywords: fullerene, C₆₀, C₆₀/poly-N-vinylpyrrolidone, C₆₀/PVP complex, LDH activity, biochemical parameters, biological activity

For citation: Loginova N.Yu., Chesovskikh Yu.S., Borodulin V.B. Investigation of the biological activity of the water-soluble C₆₀/poly-N-vinylpyrrolidone complex. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2022;17(6):492–503 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-6-492-503>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно идет изучение влияния производных фуллерена C₆₀ на биообъекты с целью создания на их основе препаратов для медицины и фармакологии. Сегодня широкое использование наноразмерных материалов в различных отраслях промышленности, а также активный поиск областей применения их в медицинской и фармацевтической сфере в качестве вспомогательных средств для диагностики и терапии заболеваний приводит к тому, что взаимодействие человека с такими материалами становится постоянной и неотъемлемой частью жизни. Подобные материалы являются чужеродными и оказывают влияние на организм непосредственно или после взаимодействия с биомолекулами, что может проявляться серьезными изменениями метаболизма. Поэтому одной из задач современных исследований является постоянная оценка потенциальных рисков при взаимодействии с наноматериалами, выявление и оценка их токсических свойств, а также поиск полезных качеств таких материалов.

Исследования последних лет по изучению свойств производных фуллерена C₆₀ показали, что некоторые из них способны ингибировать ВИЧ-1 протеазу [1, 2] и проявляют антимикробную [3] и антиоксидантную [4] активности. Также имеются работы, посвященные применению фуллеренов в терапии воспалительных процессов [5]. Очень перспективными, особенно в радиомедицине, считаются производные металлофуллеренов,

содержащие атом металла внутри молекулы; при этом они более стабильны, чем использующиеся хелатные комплексы.

Анализ приведенных в литературе экспериментальных данных показывает, что в целом биологическая активность фуллерена определяется его липофильностью (которая определяет его адгезивность к белкам и липидам, а также мембранотропные свойства), электроноакцепторной активностью (что способствует взаимодействию со свободными радикалами и активными формами кислорода) и способностью к фотовозбуждению (способностью из возбужденного состояния передавать энергию молекуле обычного кислорода и превращать его в синглетный кислород). В ряде работ, проводимых *in vivo* и *in vitro*, была выявлена способность фуллерена предотвращать апоптоз нейронов [6, 7]. В литературе имеются данные о благоприятных эффектах при лечении нейродегенеративных заболеваний с применением фуллеренов и их производных [8].

Установлено, что производные фуллеренов обладают способностью ингибировать цепную реакцию перекисного окисления липидов [6, 7]. Антиоксидантные свойства фуллеренов в большей степени обусловлены системой сопряженных двойных связей, способных принимать дополнительные электроны, например, от свободных радикалов. Одна молекула фуллерена может принимать до 34 метильных радикалов, захватывать и инактивировать супероксиданион-радикалы и гидроксильные радикалы *in vivo* и *in vitro* [7]. Кроме того, использование фуллеренов в качестве

антиоксидантов обусловлено их способностью локализоваться внутри митохондрий и других компартментах, где происходит продукция свободных радикалов. По мнению авторов ряда работ фуллерены являются эффективными нейтропротекторами при некоторых формах склероза, улучшают когнитивные процессы в норме и патологии и представляют большой интерес для разработки терапии болезни Альцгеймера [9, 10].

Анализ имеющихся в литературе данных по изучению биологической активности C_{60} и его производных в экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявил, что серьезных токсических эффектов фуллерен C_{60} не проявляет. В отношении немодифицированной формы фуллерена большинством работ доказано отсутствие токсических эффектов. Первые исследования токсичности фуллерена показали [11–13], что ведение мышам фуллерена в дозе 2.5 г/кг не проявляется побочными эффектами у животных при наблюдении в течение длительного периода времени. Имеются данные исследования токсического влияния водной дисперсии C_{60} , стабилизированного крахмалом [14]. Результаты исследований показали, что водная дисперсия C_{60} не проявляет хронической токсичности при интрагастральном введении крысам, также не обнаружено и значимых различий в гематологических и биохимических показателях по сравнению с контролем.

Испытания гидроксидированного фуллерена $C_{60}(OH)_n$ показали, что при его внутрибрюшинном введении мышам и крысам полудетальная доза LD_{50} составляла 0.5–2.4 г/кг [15]. При этом авторы работы отметили, что в присутствии гидроксидированной формы фуллерена C_{60} (*in vivo*) происходит снижение активности микросомальных ферментов, в частности снижение активности P_{450} -зависимой монооксигеназы.

Своей сферической структурой фуллерен кардинально отличается от всех известных биогенных молекул, и в физиологической гидрофильной среде неизбежно будет идти его взаимодействие с молекулами, имеющими гидрофобные участки (например, белками, липидами) и, таким образом, его углеродная поверхность практически будет недоступна для распознавания иммунной системой [16–18].

В ходе проведенных исследований по определению токсического влияния было установлено, что сам фуллерен C_{60} не обладает острой токсичностью, а токсические эффекты, которые иногда наблюдаются, связаны с токсическими свойствами органических растворителей, которые используются для приготовления растворов фуллерена [19]. Более детальному изучению механизмов воздействия и механизмов ответа организма в целом

на применение как самого фуллерена, так и его производных мешает низкая растворимость в водной среде.

Одним из растворителей, применяемых в медицинской практике для гидрофобных препаратов, является поливинилпирролидон (ПВП). ПВП является нетоксичным и используется широко в медицинской практике (входит в состав таких лекарственных средств как, например, «гемодез», «энтеродез»). В медицинской практике применяют ПВП, получаемый полимеризацией *N*-винилпирролидона-2. Используется ПВП для пролонгации действия некоторых лекарственных средств, как связующее и стабилизатор при изготовлении таблетированной формы лекарственных препаратов и т.д.

Ранее в литературе уже упоминались биологические исследования данного комплекса. Фуллерены применялись для защиты клеток против действия ультрафиолета [20]. Ультрафиолетовое облучение (320–400 нм) провоцирует образование активных форм кислорода, что приводит к повреждению и гибели клеток кожного покрова у человека. В качестве защиты от подобного окислительного стресса был испытан водорастворимый комплекс C_{60} /поли-*N*-винилпирролидона (C_{60} /ПВП). В этом случае способность фуллерена проникать в глубокие слои эпидермиса кожи человека и устойчивость к окислительной деградаци, предотвращают стрессе кожи без фотосенсибилизации и цитотоксичности, что делает его более перспективным препаратом, чем аскорбиновая кислота.

В ряде работ было исследовано противовирусное действие и было выявлено, что комплекс C_{60} /ПВП ингибирует репродукцию вирусов гриппа А и В, способен ингибировать репродукцию ДНК-содержащих вирусов, в частности вируса простого герпеса (HSV-1) [21, 22]. В ходе исследований было установлено, что обработка комплексом C_{60} /ПВП вируса гриппа типа А приводит к морфологическим изменениям. Было выявлено присутствие большого количества дефектных вирионов и вирионов с поврежденной «кистой», а также нарушения липидной оболочки. Полученные данные позволяют предположить, что комплекс мешает процессу сборки в цикле репликации вируса и блокирует самонастраивание зрелых вирусных частиц.

В связи с вышеупомянутым, целью данной работы было исследование биологической активности водорастворимого производного фуллерена – комплекса C_{60} /ПВП – в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Для получения водорастворимого производного фуллерена C_{60} /ПВП был использован ранее описанный метод комплексообразования фуллерена C_{60} /ПВП [23] (рис. 1).

Данный комплекс растворим в воде и поглощает при 255 и 330 нм. ИК спектр, ν , см⁻¹: 578, 844, 894, 933, 1077, 1227, 1266, 1375, 1490, 1630–1687, 1703, 2127, 2395, 2575, 2922, 3329, 3493, 3800, 3943.

ПВП обладает хорошей растворимостью в воде и содержит в своей структуре полости, близкие по размерам молекулам C₆₀. Полости легко заполняются молекулами фуллерена, образуя водорастворимый комплекс. Исследования проводили для комплекса C₆₀/ПВП (содержание C₆₀ в комплексе составляет ~ 1.6%). Было изучено влияние комплекса C₆₀/ПВП на активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в условиях *in vitro*, а также оценены изменения биохимических показателей сыворотки крови при введении мышам C₆₀/ПВП *per os*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение активности ЛДГ в модельных опытах *in vitro*

Для определения активности коммерческого препарата ЛДГ и исследования кинетики данного процесса был использован фотометрический метод Варбурга с применением стандартной методики. В работе были использованы растворы фосфатного буфера, пирувата натрия, кофермент-связанного водорода никотинамид-адениндинуклеотида (НАДН + Н⁺), ЛДГ (*Sigma-Aldrich*, США). Изменение активности ЛДГ определялось в присутствии раствора ПВП и водного раствора комплекса C₆₀/ПВП, которые являлись опытными образцами и сравнивались с контрольной пробой, не содержащей ПВП и C₆₀/ПВП. Спектры регистрировались на спектрофотометре Specord UV VIS (*Analytik Jena*, Германия) в диапазоне длин волн от 220 нм до 400 нм. Спектрофотометрически определяли максимум поглощения ЛДГ, который соответствовал длине волны 340 нм. Затем в кювету определения последовательно добавлялся пируват

натрия (не поглощает при $\lambda = 340$ нм), раствор ПВП или C₆₀/ПВП и ЛДГ. В ходе реакции измерялось оптическое поглощение через определенные промежутки времени. Активность ЛДГ определялась по уменьшению содержания НАДН + Н⁺ (максимум поглощения при длине волны 340 нм) в реакционной смеси в результате энзиматического восстановления пирувата в лактат.

Активность фермента выражалась в наномолях субстрата, превращенного в продукт реакции за 1 мин на 1 мг фермента при температуре 25 °С, оптимуме pH и вычислялась по формуле (1):

$$a = (\Delta A \cdot V) / (\epsilon_{340} \cdot d \cdot V_p) \cdot 10^{-9} \quad (1)$$

где ΔA – изменение оптического поглощения НАД·Н + Н⁺ за 1 мин, отн.ед.; V – конечный объем в кювете после прибавления последнего компонента, мл; ϵ_{340} – коэффициент молярного поглощения НАД·Н + Н⁺ равный 6220 М⁻¹·см⁻¹; d – толщина слоя исследуемой жидкости, см; V_p – объем раствора фермента, взятого для исследования, мл.

Скорость ферментативной реакции определяли по формуле (2):

$$v = (C_0 - C_{1/2}) / (\tau - \tau_0) \quad (2)$$

где v – скорость ферментативной реакции, моль·л⁻¹·с⁻¹; C_0 – концентрация НАД·Н+Н⁺ до начала реакции, моль/л; $C_{1/2}$ – половина от общей концентрации НАД·Н + Н⁺, моль/л; τ – время, за которое произошло ферментативное окисление 1/2 концентрации НАД·Н + Н⁺ (с); τ_0 – время начала реакции, с.

Анализ влияния ПВП и C₆₀/ПВП оценивался также по изменению константы Михаэлиса–Ментен (K_M). Для определения K_M вычисляли скорость реакции при различных концентрациях субстрата – пирувата натрия.

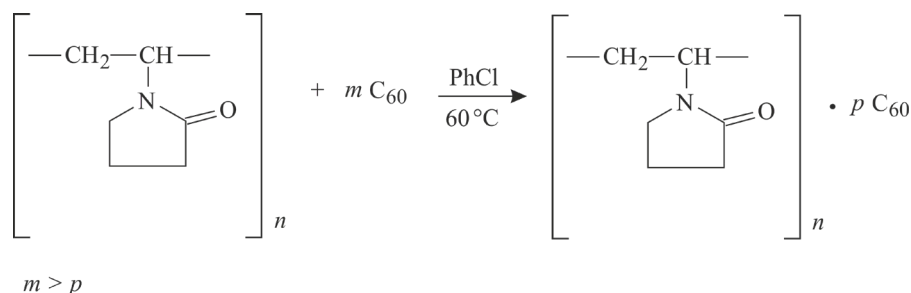


Рис. 1. Схема реакции комплексообразования фуллерена C₆₀ с ПВП.

Fig. 1. Scheme of the complexation reaction of fullerene C₆₀ polyvinylpyrrolidone (PVP).

Определение биохимических показателей сыворотки крови

Для оценки влияния ПВП и комплекса C_{60} /ПВП на некоторые биохимические показатели *in vivo*, концентрация которых зависит от активности ЛДГ, было проведено исследование на белых беспородных мышах. Экспериментальная часть работы выполнена в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009)¹ [24].

Контрольные и экспериментальные группы формировали из двухмесячных самцов весом 20 ± 3 г. Мыши находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения с соблюдением общевиварийного рациона. У всех животных был свободный доступ к пище и воде. Мыши контрольной группы действию ПВП и C_{60} /ПВП не подвергались. Первая экспериментальная группа получала раствор ПВП, вторая группа – комплекс C_{60} /ПВП. Каждая исследуемая группа мышей состояла из 15 особей. Суточная доза вводимых веществ составляла 0.5 мг/кг. Соединения вводились мышам в виде раствора (100 мкл) в течение 5 дней с использованием зонда. По окончании эксперимента животных декапитировали и проводили анализ биохимических показателей сыворотки крови.

Определение биохимических показателей сыворотки крови проводилось с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Screenmaster (*Hospitex Diagnostics*, Швейцария), оборудованного термостатом, фотометром и микропроцессором.

Методы являются унифицированными [25].

В работе определялись биохимические показатели: концентрация глюкозы, лактата и пировиноградной кислоты (ПВК), активность ЛДГ.

Определение концентрации глюкозы проводилось глюкозооксидазным методом и измерялось фотометрически при длине волны 500 нм (480–520 нм).

Определение концентрации лактата в сыворотке крови основывалось на превращении лактата

в ПВК и перекись водорода лактатоксидазой; измерение проводилось фотометрически при 546 нм (500–550 нм).

Определение концентрации ПВК в сыворотке крови основывалось на методе Умбрайта и определялось фотометрически при длине волны 430 нм.

Определение активности ЛДГ в сыворотке крови проводилось по методу Варбурга и измерялось фотометрически при длине волны 340 нм.

Для определения всех исследуемых показателей использовались наборы реактивов фирмы *Диакон ДС*, Россия.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica v7.0.61.0 (*StatSoft*, США). О достоверности отличий учитываемых показателей контрольной и опытной групп судили по величине *t* – критерия Стьюдента и *p* – уровню значимости. При $p \leq 0.05$ различия считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния комплекса C_{60} /ПВП на протекание углеводного обмена у мышей была проведена на основе данных, полученных в ходе биохимического анализа сыворотки крови.

Основным показателем углеводного обмена является глюкоза, которая присутствует в большинстве органов и тканей. Ее концентрация в крови является результатом протекания процессов гликолиза, глюконеогенеза и гликолиза. Поддержание постоянной концентрации глюкозы в крови – необходимое условие для нормальной жизнедеятельности организма, поскольку глюкоза является главным, а для некоторых тканей и единственным источником энергии в клетке. В организме глюкоза подвергается окислению с образованием ПВК, которая в зависимости от условий окисляется до ацетил-КоА, который вступает в реакции цикла Кребса (аэробные условия), либо восстанавливается до лактата (анаэробные условия). Лактат как продукт анаэробного метаболизма глюкозы поступает в кровь из скелетных мышц, мозга и эритроцитов.

Взаимопревращение ПВК в лактат происходит при участии фермента ЛДГ. ЛДГ обнаруживается во всех тканях животного и человека, особенно сердечной и скелетных мышцах, эритроцитах, печени и почках. В физиологических условиях равновесие реакции, катализируемой ЛДГ, смещено в сторону образования

¹ ГОСТ Р 53434-2009. Национальный стандарт Российской Федерации. *Принципы надлежащей лабораторной практики*. М.: Стандартинформ; 2010. 12 с. [GOST R 53434-2009. National Standard of the Russian Federation. *Principles of good laboratory practice*. Moscow: Standartinform; 2010. 12 p.]

² *Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях*. Женева: ВОЗ; 2007. 188 с. [*Prakticheskoe rukovodstvo po biologicheskoi bezopasnosti v laboratornykh usloviyakh (Practical Guide to Biological Safety in the Laboratory)*. Geneva: VOZ; 2007. 188 p. (in Russ.).]

лактата. Активность этого фермента в сыворотке крови и относительное содержание его изоферментов могут являться важным биохимическим диагностическим тестом при ряде заболеваний. В сыворотке крови активность ЛДГ – чувствительный индикатор гепатоцеллюлярного поражения, изменение активности обычно наблюдается при гепатите, лекарственной интоксикации, циррозе, опухолях травме.

В ходе исследований было выявлено, что комплекс C₆₀/ПВП в два раза увеличивает содержание глюкозы в крови по сравнению с контролем (табл. 1). В свою очередь ПВП не оказывает существенного влияния на изменение уровня глюкозы в крови. Снижение содержания лактата в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой достоверно в случае с комплексом C₆₀/ПВП на 55% и в случае с ПВП на 30%.

Концентрация ПВК в крови мышей под действием ПВП находится в пределах нормы, а при введении комплекса C₆₀/ПВП – увеличена на 27%.

Снижение содержания лактата связано со снижением активности ЛДГ под действием комплекса C₆₀/ПВП на 7% и ПВП на 27% по сравнению с контролем.

Возможной причиной увеличения уровня глюкозы в крови под действием комплекса C₆₀/ПВП может являться нарушение поступления глюкозы внутрь клетки. Это приводит к активации компенсаторных механизмов, в частности, к активации процесса глюконеогенеза, в котором источником для синтеза глюкозы в клетке может служить лактат (в связи с чем его концентрация снижается в крови), при этом лактат под действием фермента

ЛДГ превращается в ПВК – основной источник для синтеза глюкозы, содержание которой увеличилось в крови экспериментальных животных.

Высокий уровень достоверности различий между C₆₀/ПВП и ПВП ($p < 0.01$) позволяет предположить, что влияние, оказываемое на обменные процессы у мышей в присутствии C₆₀/ПВП обусловлено именно фуллереном C₆₀.

Влияние ПВП на углеводный обмен у мышей сводится к снижению уровня лактата и активности ЛДГ. Снижение уровня лактата, вероятно, обусловлено снижением активности ЛДГ, что согласуется с данными, полученными в исследованиях по изучению влияния ПВП и комплекса C₆₀/ПВП на активность ЛДГ в эксперименте *in vitro*.

В ходе работы было выявлено, что исследуемые соединения являются ингибиторами активности ЛДГ, скорость реакции в их присутствии снижается, а константа Михаэлиса–Ментен, напротив, увеличивается (табл. 2 и рис. 2).

Проведенные исследования влияния комплекса C₆₀/ПВП на активность ЛДГ в модельных опытах *in vitro* позволили сделать вывод, что комплекс C₆₀/ПВП оказывает ингибирующее действие на активность ЛДГ. В присутствии комплекса C₆₀/ПВП наблюдается снижение активности ЛДГ на 57.3% по сравнению с контролем, что приводит к снижению катализируемой реакции. В присутствии ПВП в исследуемой системе активность ЛДГ по сравнению с контролем снижена на 70.9%.

Для выявления типа ингибирования в присутствии исследуемых соединений были построены графики Лайнуивера–Бэрка (рис. 4) и Эди–Хофсти (рис. 5).

Таблица 1. Влияние ПВП и C₆₀/ПВП на биохимические показатели сыворотки крови
Table 1. Effect of PVP and C₆₀/PVP on the biochemical parameters of blood serum

Биохимический показатель Biochemical indicator	Контроль Control	ПВП PVP		C ₆₀ /ПВП C ₆₀ /PVP		
	<i>M ± m</i>	<i>M ± m</i>	<i>p</i>	<i>M ± m</i>	<i>p</i>	<i>p'</i>
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	7.04 ± 1.08	6.82 ± 0.51	>0.05	14.00 ± 0.94	<0.01	<0.001
Лактат, ммоль/л Lactate, mmol/L	25.30 ± 0.39	17.64 ± 0.46	<0.001	11.32 ± 0.85	<0.001	<0.001
ПВК, ммоль/л Puvvic acid, mmol/L	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	>0.05	0.15 ± 0.01	<0.01	<0.01
ЛДГ, МЕ Lactate dehydrogenase (LDH), IU	2025.25 ± 23.28	1470.00 ± 20.94	<0.001	1892.00 ± 15.60	<0.05	<0.001

Примечание: *p* – уровень вероятности различий в сравнении с контролем; *p'* – уровень вероятности различий в сравнении с ПВП. *M* – среднее значение молярной концентрации; *m* – доверительный интервал молярной концентрации.

Note: *p* is the level of probability of differences in comparison with control; *p'* is level of probability of differences in comparison with PVP. *M* is the average value of molar concentration; *m* is the confidence interval of molar concentration.

Таблица 2. Влияние исследуемых соединений на активность ЛДГ
Table 2. Influence of the studied compounds on the LDH activity

Соединение Compound	Концентрация $\times 10^{-2}$, мг/мл Concentration $\times 10^{-2}$, mg/mL	$K_M \times 10^{-2}$, M[S]	$r_{\max} \times 10^{-7}$, моль/л·с $r_{\max} \times 10^{-7}$, mol/L·s	Активность $\times 10^{-11}$, моль/мин Activity $\times 10^{-11}$, mol/min	Активность Activity, %
Контроль Control	–	0.15 ± 0.01	1.34 ± 0.11	0.96 ± 0.10	100
ПВП PVP	2	0.32 ± 0.05	0.90 ± 0.04	0.28 ± 0.04	29.1
C_{60} /ПВП C_{60} /PVP	2	0.25 ± 0.04	1.14 ± 0.10	0.41 ± 0.01	42.7

Примечание: K_M – константа Михаэлиса–Ментен; v_{\max} – максимальная скорость реакции; $M[S]$ – молярная масса субстрата.
 Note: K_M is the Michaelis–Menten constant; v_{\max} is the maximum reaction rate; $M[S]$ is the substrate molar mass.

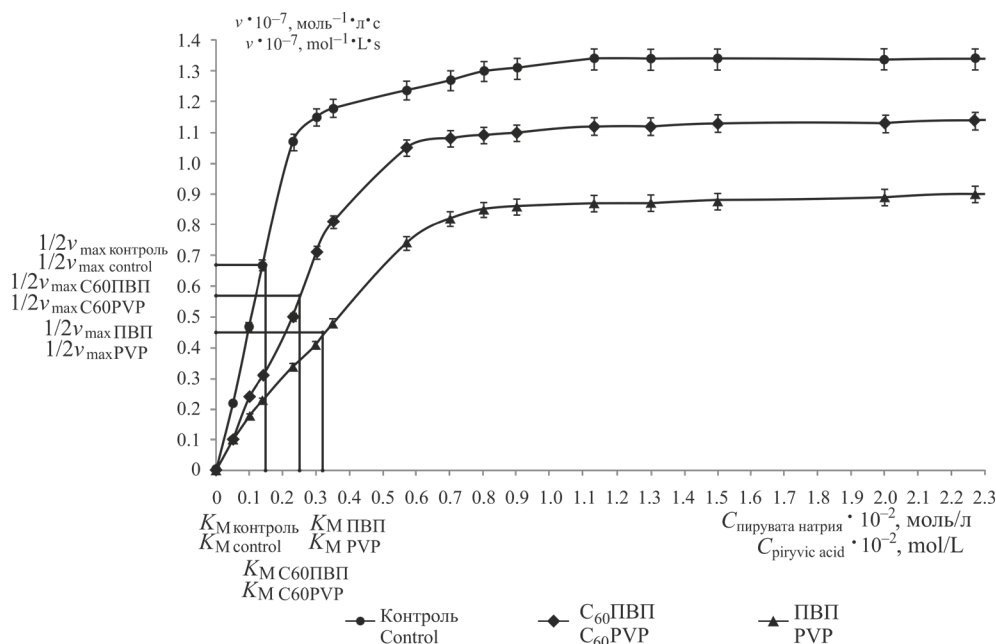


Рис. 2. График зависимости скорости реакции (v) от концентрации субстрата (C) в присутствии исследуемых соединений.
Fig. 2. Graph of the reaction rate (v) versus the substrate concentration (C) in the presence of the compounds under study.

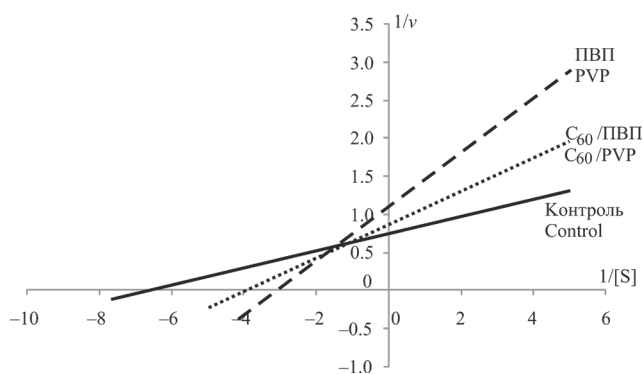


Рис. 3. График Лайнуивера–Бэрка. S – субстрат.
Fig. 3. Lineweaver–Burk graph. S is substrate.

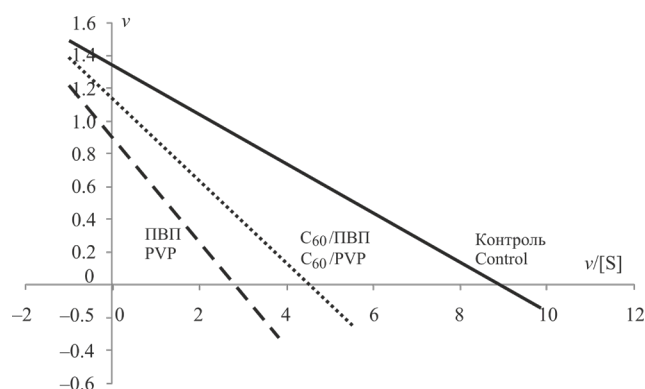


Рис. 4. График Эди–Хофсти.
Fig. 4. Eadie–Hofstee graph.

Снижение максимальной скорости протекания реакции, катализируемой ЛДГ, в присутствии ПВП и C₆₀/ПВП в сочетании с увеличением константы Михаэлиса–Ментен может свидетельствовать об обратимом неконкурентном ингибировании ЛДГ.

Исходя из графиков Лайнуивера–Бэрка и Эди–Хофсти тип ингибирования в присутствии ПВП и комплекса C₆₀/ПВП был определен как смешанный тип ингибирования, при котором снижение v_{\max} сочетается с одновременным увеличением значений K_M . Это означает, что комплекс «фермент-ингибитор» сохраняет частичную активность, т.е. способность к образованию промежуточного тройного комплекса «фермент-ингибитор-субстрат», в котором субстрат подвергается замедленному каталитическому превращению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплекс C₆₀/ПВП и ПВП проявляют биологическую активность в условиях *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что комплекс C₆₀/ПВП является ингибитором ЛДГ смешанного типа в условиях *in vitro*, угнетает активность ЛДГ в условиях *in vivo*, а также способствует снижению концентрации лактата и увеличению концентрации ПВК и глюкозы в сыворотки крови при введении мышам C₆₀/ПВП *per os*. При этом также выявлено ингибирующее действие и ПВП на активность ЛДГ *in vitro*,

а в условиях *in vivo* ПВП способствует снижению концентрации лактата в крови. Менее выраженное действие комплекса C₆₀/ПВП по сравнению с ПВП может быть связано с тем, что молекулы C₆₀ «скрыты» в полостях, образованных в молекулах ПВП.

Вклад авторов

Н.Ю. Логинова – сбор и обработка материала по производным фуллерена, получение водорастворимого комплекса C₆₀/ПВП, исследование активности ЛДГ в условиях *in vitro*;

Ю.С. Чесовских – сбор и обработка материала по производным фуллерена, проведение исследования биологической активности комплекса C₆₀/ПВП в условиях *in vivo*;

В.В. Бородулин – научное консультирование на всех этапах работы.

Authors' contributions

N.Yu. Loginova – collecting and processing materials on fullerene derivatives, a water-soluble C₆₀/PVP complex synthesis, and the study of LDH activity under *in vitro* conditions;

Yu.S. Chesovskikh – collecting and processing materials on fullerene derivatives, the biological activity of the C₆₀/PVP complex *in vivo* study;

V.V. Borodulin – scientific consulting at all stages of the work.

Авторы статьи гарантируют отсутствие конфликта интересов.

The authors of the article guarantee the absence of a conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nielsen G., Roursgaard M., Jensen K., *et al.* *In vivo* Biology and Toxicology of Fullerenes and Their Derivatives. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008;103(3):197–208. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00266.x>
- Shuster D.I., Wilson S.R., Shinazi R.F. Anti-human immunodeficiency virus activity and cytotoxicity of derivatized buckminsterfullerenes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996;6(11):1253–1256. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(96\)00210-7](https://doi.org/10.1016/0960-894X(96)00210-7)
- Shinazi R.F., Sijbesma R., Sradanov G., *et al.* Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C60 fullerene *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(8):1707–17110. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1707>
- Bakry R., Vallant R., Najam-ul-Haq M., *et al.* Medicinal applications of fullerenes. *Int. J. Nanomedicine.* 2007;2(4):639–649.

REFERENCES

- Nielsen G., Roursgaard M., Jensen K., *et al.* *In vivo* Biology and Toxicology of Fullerenes and Their Derivatives. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008;103(3):197–208. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00266.x>
- Shuster D.I., Wilson S.R., Shinazi R.F. Anti-human immunodeficiency virus activity and cytotoxicity of derivatized buckminsterfullerenes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996;6(11):1253–1256. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(96\)00210-7](https://doi.org/10.1016/0960-894X(96)00210-7)
- Shinazi R.F., Sijbesma R., Sradanov G., *et al.* Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C60 fullerene *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(8):1707–17110. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1707>
- Bakry R., Vallant R., Najam-ul-Haq M., *et al.* Medicinal applications of fullerenes. *Int. J. Nanomedicine.* 2007;2(4):639–649.

5. Ворошилов Е.А., Дегтярников В.П., Шуклина А.А. Перспективы применения мягких лекарственных форм с добавлением фуллерена C₆₀ в терапии воспалительных процессов. В сб.: *Медицинская помощь при травмах. Новое в организации и технологиях. Перспективы импортозамещения в России: Сборник тезисов Пятого юбилейного конгресса с международным участием*. СПб.; 2020. С. 63–64.
6. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 1992;59(5):1609–1623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>
7. Krustic P.J., Wasserman E., Keizer P.N., et al. Radical reactions of C₆₀. *Science.* 1991;254(5035):1183–1185. <https://doi.org/10.1126/science.254.5035.1183>
8. Аверьянова М.О., Куракин Г.Ф., Лопина Н.П., Бордина Г.Е. Перспективы применения фуллеренов и их производных как антиоксидантов. *Modern Science.* 2019;(6–3):11–14.
9. Dugan L.L., et al. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2001;7(3):243–246. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(00\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(00)00064-X)
10. Podolski I.Y., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A., Mugantseva E.A., Makarova E.G. Effects of hydrated forms of C₆₀ fullerene on amyloid β-peptide fibrillization *in vitro* and performance of the cognitive task. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007;7(4–5):1479–1485. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.330>
11. Moussa F., Chretien P., Dubois P., Chuniaud L., Dessante M., Trivin F., Sizaret P.Y., Agafonov V., Ceolin R., Szwarc H., Greugny V., Fabre C., Rassat A. The Influence of C₆₀ Powders on Cultured Human Leukocytes. *Full. Sci. Technol.* 2008;3(3):333–342. <https://doi.org/10.1080/153638X9508543788>
12. Moussa F., Trivin F., Ceolin R., Hadchouel M., Sizaret P.Y., Greugny V., Fabre C., Rassat A., Szwarc H. Early effects of C₆₀ administration in Swiss mice: A preliminary account for *in vivo* C₆₀ toxicity. *Full. Sci. Technol.* 1996;4(1):21–29. <https://doi.org/10.1080/10641229608001534>
13. Baati T., Bourasset F., Gharbi N., Njim L., Abderrabba M., Kerkeni A., Szwarc H., Moussa F. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene. *Biomaterials.* 2012;33(19):4936–4946 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.036>
14. Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P. Dzantiev B. Production of monoclonal antibodies against fullerene C₆₀ and development of a fullerene enzyme immunoassay. *Analyst.* 2012;137(1):98–105. <https://doi.org/10.1039/C1AN15745K>
15. Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Biological Applications of Fullerene Derivatives: A Brief Overview. *Croatica Chemica Acta.* 2001;74(4):743–755.
16. Belgorodsky B., Fadeev L., Ittah V., Benyamini H., Zelner S., Huppert D., Kotlyar A.B., Gozin M. Formation and characterization of stable human serum albumin-tris-malonic acid [C₆₀]fullerene complex. *Bioconjug. Chem.* 2005;16(5):1058–1062. <https://doi.org/10.1021/bc050103c>
17. Думпис М.А., Николаев Д.Н., Литасова Е.В., Ильин В.В., Брусина М.А., Пиотровский П.Б. Биологическая активность фуллеренов – реалии и перспективы. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2018;16(7):4–20. <https://doi.org/10.17816/RCF1614-20>
18. Benyamini H., Shulman-Peleg A., Wolfson H.J., Belgorodsky B., Fadeev L., Gozin M. Interaction of C₆₀-fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment. *Bioconjug. Chem.* 2006;17(2):378–386. <https://doi.org/10.1021/bc050299g>
5. Voroshilov E.A., Degtyarnikov V.P., Shuklina A.A. Prospects for the use of soft dosage forms with the addition of fullerene C₆₀ in the treatment of inflammatory processes. In: *Meditsinskaya pomoshch' pri travmakh. Novoe v organizatsii i tekhnologiyakh. Perspektivy importozameshcheniya v Rossii (Medical care for injuries. New in organization and technology. Prospects for import substitution in Russia): Collection of abstracts of the Fifth Anniversary Congress with International Participation*. St. Petersburg; 2020. P. 63–64 (in Russ.).
6. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 1992;59(5):1609–1623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>
7. Krustic P.J., Wasserman E., Keizer P.N., et al. Radical reactions of C₆₀. *Science.* 1991;254(5035):1183–1185. <https://doi.org/10.1126/science.254.5035.1183>
8. Aver'yanova M.O., Kurakin G.F., Lopina N.P., Bordina G.E. Prospects for the use of fullerenes and their derivatives as antioxidants. *Modern Science.* 2019;(6–3):11–14 (in Russ.).
9. Dugan L.L., et al. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2001;7(3):243–246. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(00\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(00)00064-X)
10. Podolski I.Y., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A., Mugantseva E.A., Makarova E.G. Effects of hydrated forms of C₆₀ fullerene on amyloid β-peptide fibrillization *in vitro* and performance of the cognitive task. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007;7(4–5):1479–1485. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.330>
11. Moussa F., Chretien P., Dubois P., Chuniaud L., Dessante M., Trivin F., Sizaret P.Y., Agafonov V., Ceolin R., Szwarc H., Greugny V., Fabre C., Rassat A. The Influence of C₆₀ Powders on Cultured Human Leukocytes. *Full. Sci. Technol.* 2008;3(3):333–342. <https://doi.org/10.1080/153638X9508543788>
12. Moussa F., Trivin F., Ceolin R., Hadchouel M., Sizaret P.Y., Greugny V., Fabre C., Rassat A., Szwarc H. Early effects of C₆₀ administration in Swiss mice: A preliminary account for *in vivo* C₆₀ toxicity. *Full. Sci. Technol.* 1996;4(1):21–29. <https://doi.org/10.1080/10641229608001534>
13. Baati T., Bourasset F., Gharbi N., Njim L., Abderrabba M., Kerkeni A., Szwarc H., Moussa F. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene. *Biomaterials.* 2012;33(19):4936–4946. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.036>
14. Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P. Dzantiev B. Production of monoclonal antibodies against fullerene C₆₀ and development of a fullerene enzyme immunoassay. *Analyst.* 2012;137(1):98–105. <https://doi.org/10.1039/C1AN15745K>
15. Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Biological Applications of Fullerene Derivatives: A Brief Overview. *Croatica Chemica Acta.* 2001;74(4):743–755.
16. Belgorodsky B., Fadeev L., Ittah V., Benyamini H., Zelner S., Huppert D., Kotlyar A. B., Gozin M. Formation and characterization of stable human serum albumin-tris-malonic acid [C₆₀]fullerene complex. *Bioconjug. Chem.* 2005;16(5):1058–1062. <https://doi.org/10.1021/bc050103c>
17. Dumpis M.A., Nikolaev D.N., Litasova E.V., Il'in V.V., Brusina M.A., Piotrovskii P.B. Biological activity of fullerenes – realities and prospects. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii (Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy).* 2018;16(7):4–20 (in Russ.). <https://doi.org/10.17816/RCF1614-20>

19. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. [60] Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.* 2005;5(12):2578–2585. <https://doi.org/10.1021/nl051866b>
20. Xiao L., Takada H., Gan X.H., *et al.* The water-soluble fullerene derivative ‘Radical Sponge[®]’ exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006;16(6):1590–1595. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.12.011>
21. Barzegar A., Naghizadeh E., Zakariazaden M., Azamat J. Molecular dynamics simulation study of the HIV-1 protease inhibit ion using fullerene and new fullerene derivatives of carbon nanostructures. *Mini Rev. Med. Chem.* 2017;17(7):633–647.
22. Martinez Z.S., Castro E., Seong C.-S., Ceron M.R., Echegoyen L., Llano M. Fullerene derivatives strongly inhibit HIV-1 replication by affecting virus maturation without impairing protease activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016;60(10):5731–5741. <https://doi.org/10.1128/AAC.00341-16>
23. Гунькин И.Ф., Целуйкин В.Н., Логинова Н.Ю. Синтез и изучение свойств водорастворимых производных фуллерена C₆₀. *Журн. прикладной химии.* 2006;79(6):1011–1013.
24. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. (ред.). *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях.* М.: Профиль-2С; 2010. 358 с.
25. Карпищенко А.И. *Медицинские лабораторные технологии.* СПб.: Интермедика; 1999. 656 с.
18. Benyamini H., Shulman-Peleg A., Wolfson H.J., Belgorodsky B., Fadeev L., Gozin M. Interaction of C₆₀-fullerene and carboxyfullerene with proteins: docking and binding site alignment. *Bioconjug. Chem.* 2006;17(2):378–386. <https://doi.org/10.1021/bc050299g>
19. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. [60] Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.* 2005;5(12):2578–2585. <https://doi.org/10.1021/nl051866b>
20. Xiao L., Takada H., Gan X.H., *et al.* The water-soluble fullerene derivative ‘Radical Sponge[®]’ exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006;16(6):1590–1595. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.12.011>
21. Barzegar A., Naghizadeh E., Zakariazaden M., Azamat J. Molecular dynamics simulation study of the HIV-1 protease inhibit ion using fullerene and new fullerene derivatives of carbon nanostructures. *Mini Rev. Med. Chem.* 2017;17(7):633–647.
22. Martinez Z.S., Castro E., Seong C.-S., Ceron M.R., Echegoyen L., Llano M. Fullerene derivatives strongly inhibit HIV-1 replication by affecting virus maturation without impairing protease activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016;60(10):5731–5741. <https://doi.org/10.1128/AAC.00341-16>
23. Gun'kin I.F., Tseluikin V.N., Loginova N.Yu. Synthesis and properties of water-soluble derivatives of fullerene C₆₀. *Russ. J. Appl. Chem.* 2006;79(6):1001–1004. <https://doi.org/10.1134/S1070427206060243>
[Original Russian Text: Gun'kin I.F., Tseluikin V.N., Loginova N.Yu. Synthesis and properties of water-soluble derivatives of fullerene C₆₀. *Zhurnal Prikladnoi Khimii.* 2006;79(6):1011–1013 (in Russ.).]
24. Karkishchenko N.N., Grachev S.V. (Eds.). *Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh (The Guide to Laboratory Animals and Alternative Models in Biomedical Research).* Moscow: Profil'-2S; 2010. 358 p. (in Russ.).
25. Karpishchenko A.I. *Meditsinskie laboratornye tekhnologii (Medical Laboratory Technologies).* St. Petersburg: Intermedika; 1999. 656 p. (in Russ.).

Об авторах:

Логинова Наталия Юрьевна, к.х.н., старший преподаватель кафедры биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (410012, Россия, Приволжский федеральный округ, Саратовская область, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112). E-mail: loginova_nu@mail.ru. SPIN-код РИНЦ 3048-0544, <https://orcid.org/0000-0003-1618-6690>

Чесовских Юлия Сергеевна, к.б.н., старший преподаватель кафедры биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (410012, Россия, Приволжский федеральный округ, Саратовская область, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112). E-mail: Juliachesovskih@gmail.com. ResearcherID AAD-8570-2021, Scopus Author ID 56613371400, <https://orcid.org/0000-0002-7732-0796>

Бородулин Владимир Борисович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (410012, Россия, Приволжский федеральный округ, Саратовская область, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112); профессор кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: borodulinvb@mail.ru. ResearcherID AAE-4632-2021, Scopus Author ID 57206159558, SPIN-код РИНЦ 7481-1557, <https://orcid.org/0000-0003-1550-313X>

About the authors:

Natalia Yu. Loginova, Cand. Sci. (Chem.), Senior Lecturer, Department of Biochemistry, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (112, Bolshaya Kazachya ul., Saratov, 410012, Volga Federal District, Saratov oblast, Russia). E-mail: loginova_nu@mail.ru. RSCI SPIN-code 3048-0544, <https://orcid.org/0000-0003-1618-6690>

Yulia S. Chesovskikh, Cand. Sci. (Biol.), Senior Lecturer, Department of Biochemistry, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (112, Bolshaya Kazachya ul., Saratov, 410012, Volga Federal District, Saratov oblast, Russia). E-mail: Juliachesovskih@gmail.com. ResearcherID AAD-8570-2021, Scopus Author ID 56613371400, <https://orcid.org/0000-0002-7732-0796>

Vladimir B. Borodulin, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Biochemistry, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (112, Bolshaya Kazachya ul., Saratov, 410012, Volga Federal District, Saratov oblast, Russia); Professor, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: borodulinvb@mail.ru. ResearcherID AAE-4632-2021, Scopus Author ID 57206159558, RSCI SPIN-code 7481-1557, <https://orcid.org/0000-0003-1550-313X>

*Поступила: 04.04.2022; получена после доработки: 04.05.2022; принята к опубликованию: 30.11.2022.
The article was submitted: April 04, 2022; approved after reviewing: May 04, 2022; accepted for publication: November 30, 2022.*