

**Отчет о выполнении проекта
№ 14-23-00018
«Исследование механизма химических и биохимических реакций с участием
парамагнитных частиц»,
в 2014 году**

Аннотация выполненных работ и полученных научных результатов

В ходе выполнения проекта в 2014 году получены следующие результаты.

Спроектированы и смонтированы следующие установки:

А. Для изучения динамики гемореологических показателей крови (гемоглобина, гематокрита, индекса агрегации эритроцитов, показателя общего белка плазмы) под влиянием постоянного магнитного поля и оценка защитных свойств железосодержащего материала. На количественном уровне показано конкретное изменение данных показателей под влиянием магнитного поля.

Б. Для исследования влияния магнитного поля на кинетику окисления липидов, а также других непредельных и насыщенных субстратов. Разработан вариант, когда ячейка помещается в поле электромагнита с регулируемой напряженностью магнитного поля. Диапазон измерения скорости поглощения кислорода $1,0 \cdot 10^{-7}$ – $5,0 \cdot 10^{-5}$ л/(моль·с). Температурный диапазон: 20–85 °С.

Осуществлен синтез хитозан-полинитроксиллов (ХПН) путем ацилирования аминогрупп хитозана активированными производными карбоксилсодержащих нитроксильных радикалов. Получено два образца хитозанполинитроксиллов. Строение ХПН подтверждено данными ИК-, ЭПР- и УФ-спектроскопии. Степень модификации хитозана составила около 10%. Определены средние молекулярные массы синтезированных ХПН. Получены первые результаты по взаимодействию культуры клеток HeLa с исходным и модифицированным хитозаном ХПН1. Клетки HeLa прикрепляются и растут на поверхности ХПН1, что свидетельствует о хорошей аффинности модифицированного хитозана к биомолекулам/поверхности клеток.

Получен ряд наноструктурных катализаторов на основе частиц монтмориллонита и целлюлозы с нанесенными на их поверхность катионным ПАВ цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ), а также ПАВ в сочетании с ацетилацетонатом кобальта. Установлено, что гидрофобизованный катионным ПАВ монтмориллонит катализирует окисление и разлагает гидропероксид на свободные радикалы. Практически также действует монтмориллонит с нанесенным адсорбционным слоем СТАВ. Наноструктурный катализатор с нанесенным на поверхность СТАВ в сочетании с $\text{Co}(\text{acac})_2$ в аналогичных условиях обеспечивает на порядок более высокую скорость генерирования радикалов. Аналогичные результаты получены для наноструктурного катализатора на основе целлюлозы. Возможность получения нанокомпозитов путем радикальной полимеризации виниловых мономеров, инициированной системой гидропероксид – нанодисперсный носитель, гидрофобизованный катионным ПАВ, исследовали на примере полимеризации стирола. Методом термогравиметрии было показано, что температуры начала и максимальной скорости разложения для полученного образца превышают температуры для обычного полистирола, полученного радикальной полимеризацией, инициированной АИБН, на 30 и 60 °С соответственно. Изученные нанокомпозиты дают возможность получать композиционные материалы путем радикальной полимеризации виниловых мономеров. Поскольку инициирование происходит на поверхности носителя, это обеспечивает ее полное покрытие и не оставляет мономер в порах носителя.

Взаимодействие лабильных парамагнетиков (алкильных и пероксильных радикалов) с α -С–Н-связями метиллинолеата в растворах и мицеллах исследовано в режиме радикально-цепного окисления субстратов. Главной задачей при этом явилось доказательство образования в этом процессе гидропероксидного радикала HO_2^\bullet .

Показано, что неингибированное окисление ЛН в жидкой фазе подчиняется классической кинетической схеме с квадратичным обрывом цепей. При окислении в мицелле наряду с квадратичным обрывом обнаружен и линейный обрыв цепей. Рассчитанный из экспериментальных данных порядок по инициатору равен 0,72, что близко к известной величине 0,8.

Для кинетической идентификации радикала HO_2^\bullet использовались реакции ингибированного окисления метиллинолеата (ЛН) в присутствии стабильного нитроксильного радикала ($>\text{NO}^\bullet$), регенерация которого позволяет судить и том, что в реакциях продолжения цепей участвуют гидропероксидные радикалы. Обнаружено, что как в растворе, так и в мицеллах происходит нестехиометрическое расходование нитроксильного радикала, что свидетельствует о регенерации последнего. Этот факт служит доказательством того, что в процессе окисления метиллинолеата в мицелле происходит генерация гидропероксидного радикала. Нестехиометрическое расходование нитроксильного радикала в растворе может объясняться как генерацией гидропероксидного радикала, так и другими процессами образования радикалов по реакции алкильных и пероксильных радикалов с $\alpha\text{-C-H}$ связями субстрата. Кинетическое моделирование показывает, что в оценке этих процессов необходимо учитывать возможность обратимого присоединения кислорода к алкильному радикалу и его реакцию с последним с образованием HO_2^\bullet . Составлены кинетические схемы процессов; их правомерность подтверждена сопоставлением экспериментальных данных с результатами моделирования.

Установлены закономерности влияния фосфолипидов и холестерина на скорость генерирования радикалов при взаимодействии ацетилхолина с пероксидом водорода и гидропероксидами и размерные характеристики супрамолекулярных агрегатов. Данные по скорости расходования β -каротина в модельной системе (β -каротин-ГПТБ-АCh) в присутствии добавок индивидуальных липидов показывают, что с увеличением концентрации холестерина увеличивается и скорость расходования каротина. Сфингомиелин при этом демонстрирует обратный эффект. Добавки фосфатидилхолина, внесенные в данную модельную систему, полностью останавливают расходование β -каротина в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ М, а при концентрации фосфатидилхолина $1 \cdot 10^{-6}$ М наблюдается лишь незначительное его расходование. Такое же блокирующее выход радикалов влияние фосфатидилхолина наблюдается и в модельной системе {mACh...nH₂O₂}. Эти результаты показывают существенное влияние структуры микроагрегатов {mACh...nГПТБ} на выход радикалов. По-видимому, холестерин структурирует микроагрегаты ацетилхолина и способствует организации двойного электрического слоя и встраиванию в него гидропероксида, что приводит к увеличению скорости его радикального распада. Фосфатидилхолин (PC), напротив, консервирует и солюбилизирует микроагрегаты {mACh...nГПТБ}. При этом не только не увеличивается скорость радикального распада ГПТБ, но и затрудняется выход радикалов в объем. Такой механизм антиокислительного действия PC, состоящий в блокировании источника радикалов и приводящий к уменьшению скорости окисления в целом, наблюдается в процессах окисления липидов, катализируемых гидрофильными или амфифильными соединениями переходных металлов. Измерения размерных характеристик микроагрегатов {mACh...nГПТБ} с добавками PC методом ДСР показали, что индивидуальный PC образует обратные мицеллы размером 5 нм, {mACh...nГПТБ} – размером 350 нм, а смесь PC + {mACh...nГПТБ} демонстрирует крупные агрегаты 800–1500 нм, что согласуется с механизмом антиокислительного действия PC путем солюбилизации и изоляции иницирующей радикалы системы. Таким образом, установлено, что добавки холестерина в несколько раз увеличивают скорость инициирования радикалов в системе ацетилхолин – гидропероксид, а фосфатидилхолин, образуя смешанные агрегаты с {mACh...nГПТБ}, блокирует выход радикалов в объем.

Сведения о фактическом выполнении плана работы на год

1. Конструирование и монтаж специальных установок, позволяющих исследовать воздействие на изучаемые процессы постоянного магнитного поля различной напряженности:

- установка для изучения динамики гемореологических показателей крови крыс (гемоглобина, гематокрита, индекса агрегации эритроцитов, показателя общего белка плазмы) под влиянием постоянного магнитного поля и оценка защитных свойств железосодержащего материала;

- микровольнометрическая установка для мониторинга поглощения кислорода в процессе окисления непредельных соединений и их насыщенных аналогов под действием магнитного поля.

Произведен монтаж установки для изучения динамики гемореологических показателей крови (рис. 1), генерирующей постоянное магнитное поле в диапазоне от 10 до 200 мТл. Установка представляет собой четыре пластинчатых магнита, которые попарно фиксируются на штативе. С помощью тесламетра измерена магнитная индукция между полюсами магнитов на различных расстояниях (от 2,5 до 20 см). Построен график, отображающий зависимость магнитной индукции от расстояния (рис. 2).

Для изучения гемореологических показателей фракций крови отработан и усовершенствован ряд методик: определение объемного соотношения плазмы и форменных элементов с помощью центрифугирования; определение концентрации гемоглобина в крови гемиглобинцианидным методом; определение индекса агрегации эритроцитов при исследовании в счетной камере Горяева; определение общего белка методом Бредфорда; определение распределения белковых фракций в сыворотке крови методом электрофореза в полиакриламидном геле; определение показателей агрегации тромбоцитов методом оптической агрегатометрии.

Для оценки защитных свойств от воздействия постоянного магнитного поля изготовлены образцы футляров из железосодержащих материалов различного состава. Защитный материал представляет собой систему, состоящую из дисперсной фазы и дисперсионной среды. Дисперсной фазой является порошок, содержащий ~ 80% оксидов железа (различная степень окисления). Кроме того, для изготовления защитного материала использовались отходы гальванических производств, что решило проблему их утилизации. В качестве дисперсионной среды выступает эпоксидная смола.

Спроектирована лабораторная микровольнометрическая установка для исследования влияния магнитного поля на кинетику окисления липидов, а также других непредельных и насыщенных субстратов и произведен монтаж опытного образца (рис. 3). Устройство и принцип работы установки описаны в разделе 1.4.

2. Разработка методов синтеза полинитроксилхитозанов, получение их спектральных характеристик.

Осуществлен синтез и исследование свойств хитозан-полинитроксиллов (ХПН). Хитозан представляет собой природный полисахарид, получаемый гидролизом хитина, и состоящий из звеньев D-глюкозамина (70–90%) и N-ацетил-D-глюкозамина (30–10%), соединенных $\beta(1\rightarrow4)$ гликозидной связью. Достоинствами этого полимера являются нетоксичность, биосовместимость, способность к биологическому разложению, сравнительно невысокая стоимость.

Значительный интерес представляют производные хитозана, содержащие ковалентно присоединенные антиоксиданты различной природы. Например, производные, содержащие полифенольные группы, проявляют антиоксидантные и антимикробные свойства, противоопухолевую активность, ранозаживляющее действие, усиливают иммунитет (Lee S.J. et al. // Arch. Pharmacal Res., 2013, 36, 1437). Нитроксильные радикалы являются нестехиометрическими (каталитическими) антиоксидантами и способны дезактивировать активные формы кислорода аналогично ферменту супероксид-дисмутазе

(СОД–миметики). Они эффективны при окислительном стрессе, в радиационной защите организмов, проявляют сосудорасширяющее действие, улучшают химиотерапевтические свойства противоопухолевых соединений (Wilcox C.S. // *Pharmacol. Ther.* 2010, 126, 119). Благодаря их парамагнетизму нитроксильные радикалы могут выполнять двойную роль: антиоксидантов и контрастирующих агентов в магнитной томографии (Kleschyov A.L. et al. // *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 58, 265). Поэтому нитроксильные производные хитозана являются перспективными материалами с потенциально широким спектром полезных свойств. В литературе такие материалы не описаны.

Учитывая особенности химии нитроксильных радикалов, наиболее перспективным способом модификации хитозана представляется ацилирование его аминогрупп активированными производными карбоксил содержащих нитроксильных радикалов. Подходящим вариантом активации карбоксильных групп нитроксильных радикалов является генерация (без выделения) активированных N-гидроксисукцинимидных эфиров с помощью водорастворимого карбодиимида – гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (EDC) (Схема 1). В другом варианте, активированные эфиры могут быть выделены и использованы для модификации хитозана.

Синтетическая часть настоящей работы включает получение и очистку карбоксил содержащих нитроксильных радикалов (Sen' V.D. et al // *J. Phys. Org. Chem.*, DOI 10.1002/roc.3392), различающихся по редокс-свойствам, и модификацию ими хитозана по методике без выделения промежуточных эфиров. Получено два образца хитозанполинитроксидов (ХПН1, ХПН2), методики синтеза приведены в разделе 1.4 настоящего отчета. ИК-спектры регистрировали на спектрометре «Specord 75-1R», УФ-спектры – на приборе «Specord UV-VIS», спектры ЭПР – на радиоспектрометре ЭПА-2М. Температуры плавления определяли на нагревательном столике РНМК (ГДР). Для модификации использовали низкомолекулярный (50–190 кДа) хитозан, а также N-гидроксисукцинимид и гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (EDC) фирмы Aldrich.

Предложенное строение ХПН подтверждается данными ИК-, ЭПР- и УФ-спектров. В ИК-спектрах ХПН имеются ожидаемые полосы амидных групп (~ 1550 и 1650 см⁻¹). ЭПР-спектры свидетельствуют о присоединении радикалов к полимеру и характеризуются типичными значениями g-фактора и констант расщепления a_N , характерными для радикалов пиперидинового и пирролидинового ряда. Содержание присоединенного радикала рассчитывали по поглощению УФ-спектров растворов образцов в 1%-ной уксусной кислоте при длине волны 238 нм. С учетом слабого поглощения хитозана при этой длине волны и значительного поглощения нитроксильного радикала с хорошей точностью удастся определить степень модификации полимера, которая составила около 10%.

3. Изучение растворимости и реологических свойств, мицеллообразования полинитроксилхитозанов.

Исходный хитозан и ХПН в воде и органических растворителях нерастворимы, но растворяются в 1%-ной уксусной кислоте за счет частичного протонирования аминогрупп, растворимость ~ 10 мг/мл. Полученные растворы имеют pH 5. Средние молекулярные массы ХПН определяли по характеристической вязкости их растворов в ацетатном буфере (2% AcOH + 0,2 M NaOAc) согласно методике описанной в (Gamzazade A. et al. // *Acta Polym.*, 1985, 36, 420; Wang W., et al. // *Int. J. Biol. Macromol.*, 1991, 13, 281). Средние молекулярные массы ХПН1 и ХПН2 составили 110±10 и 105±17 кДа. Синтезированные образцы ХПН не образуют мицеллы.

Получены первые результаты по взаимодействию культуры клеток HeLa с исходным и модифицированным хитозаном ХПН1. Для этого использовали метод, ранее предложенный для немодифицированного хитозана (Wenling C. et al. // *J. Biomater. Appl.*, 2005, 20, 157). Клетки HeLa прикрепляются и растут на поверхности ХПН1, что

свидетельствует о хорошей афинности модифицированного хитозана к биомолекулам/поверхности клеток. Известно, что как хитозаны (Aranaz I. et al. // *Curr. Chem. Biol.*, 2009, 3, 203), так и нитроксильные радикалы (Araki Y. // *Int. J. Mol. Med.*, 2006, 17, 331) связываются с биомолекулами и/или проникают в клетки животных и оказывают ранозаживляющее действие при внешних ранах и воспалительных процессах в желудочно-кишечном тракте. Предполагается изучение таких свойств ХПН на подходящих моделях.

4. Разработка новых методов получения наноструктурных катализаторов распада пероксидов на основе наночастиц монтмориллонита и микрофибриллы целлюлозы с нанесенными на поверхность катионными ПАВ в сочетании с соединениями переходных металлов.

Для получения наноструктурных катализаторов путем нанесения на поверхность катионных ПАВ и соединений переходных металлов первоначально было изучено совместное действие ацетилацетонатов Co(II), Mn(II), Fe(III), Cu(II) и катионных ПАВ цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) и ацетилхолина (ACh) на окисление лимонена (LH), который использовали в качестве модельной реакции для определения скорости инициирования радикалов. Окисление LH молекулярным O₂ в органических растворителях протекает по цепному свободно-радикальному механизму и описывается известным уравнением жидкофазного радикально-цепного процесса окисления углеводов: $W_{O_2} = k_p / (2k_t)^{0.5} [LH] W_i^{0.5}$, где W_i – скорость инициирования радикалов, k_p и k_t – эффективные константы скорости продолжения и обрыва цепи окисления соответственно. Значение параметра окисляемости $a = k_p / (2k_t)^{0.5}$ зависит от типа растворителя: в 1 М растворе лимонена в хлорбензоле параметр $a = 1,1 \cdot 10^4 \cdot \exp(-38100/RT) (\text{М} \cdot \text{с})^{-0.5}$. Скорость инициирования радикалов рассчитывали по уравнению: $W_i = (W_{O_2} / (a[LH]))^2$; $a = 1,1 \cdot 10^{-2} (\text{М} \cdot \text{с})^{-0.5}$. Окисление проводили в термостатированном сосуде (60°C), соединенном с газометрической установкой при P_{O₂} = 1 атм, на которой измеряли скорость поглощения O₂ (W_{O₂}).

В табл. 1 приведены значения скоростей поглощения кислорода (W_{O₂,Me}) при окислении 1 М раствора лимонена с добавкой 1 мМ ацетилацетонатов Fe, Cu, Co и Mn по отдельности и вместе с 1 мМ ацетилхолина. Все ацетилацетонаты катализируют окисление лимонена и обеспечивают высокие скорости инициирования цепей (W_{i,Me}). Наиболее сильным катализатором является Co(асас)₂. При совместном присутствии 1 мМ ACh и соединений металлов скорости больше, чем в отсутствие ACh. Однако скорость поглощения O₂ и, следовательно, W_Σ при совместном присутствии соединения металла и ACh (W_Σ) меньше суммы скоростей процессов, катализированных этими добавками по отдельности (W_{Me} + W_{ПАВ}). При совместном введении Co(асас)₂ и ACh скорость окисления даже меньше, чем при в присутствии одного ACh или Co(асас)₂, т.е. Co(асас)₂ и ACh как бы взаимно дезактивируются. Только в случае Cu(асас)₂ в начале скорость генерирования радикалов в 4 раза превышает сумму скоростей инициирования при введении компонентов по отдельности. Однако на 10-й минуте W_Σ резко уменьшается, и окисление переходит в стационарный режим со скоростью инициирования, равной скорости в отсутствие Cu(асас)₂.

При совместном присутствии 1 мМ СТАВ и соединений металлов скорости значительно больше скоростей реакции, катализированной каждым из компонентов (табл. 2). Сравнение W_Σ и (W_{Me} + W_{ПАВ}) показывает, что для всех металлов наблюдается синергизм каталитического действия с СТАВ. В наибольшей степени он выражен для системы Fe(асас)₃ + СТАВ. В аналогичных условиях в этилбензоле наиболее активной системой является сочетание Co(асас)₂, тогда как соединения железа не проявляют заметной активности.

Поскольку сочетания ацетилхолина с переходными металлами не проявляют синергизм в инициировании радикалов, а в случае СТАВ устойчивый (применительно к

разным гидропероксидам) синергизм наблюдался для сочетания СТАВ + $\text{Co}(\text{acac})_2$, то был приготовлен наноструктурный катализатор с нанесенными на поверхность СТАВ в сочетании с $\text{Co}(\text{acac})_2$. Катализаторы получали путем адсорбции из хлороформенных растворов СТАВ (50 мМ): СТАВ (50 мМ) + $\text{Co}(\text{acac})_2$ (2 мМ) на монтмориллоните. Свойства полученных нанокатализаторов (табл. 3) и результаты первичных экспериментов по их использованию для получения полимерных нанокомпозитов (табл. 4) представлены в разделе 1.4 отчета.

5. Исследование реакции образования радикалов в процессах взаимодействия лабильных парамагнетиков с α -С–Н-связями метиллинолеата в растворах и мицеллах.

Реакция образования радикалов при взаимодействии лабильных парамагнетиков (алкильных и пероксильных радикалов) с α -С–Н-связями метиллинолеата в растворах и мицеллах исследована в режиме радикально-цепного окисления субстратов. Главной задачей при этом явилось доказательство образования в этом процессе гидропероксидного радикала HO_2^\bullet . На такую возможность указывают данные работ (Рогинский В.А. // Кинетика и катализ, 1996, 37, 521; Pratt D. // Acc. Chem. Res., 2011, 44, 458).

Для решения поставленной задачи была использована следующая методология:

А. В каждом случае использовалось определенное экспериментально значение скорости иницирования (W_i). При окислении в растворе (метод микроволнометрии, Loshadkin D. et al. // Int. J. Chem. Kinet, 2002, 34, 162) работе в качестве инициатора применялся 2,2'-азобис(2,4-диметилвалеронитрил) (AMVN); при окислении в мицеллах (биологический кислородный монитор) – водорастворимый инициатор 2,2'-азобис-(2-метилпропионамид)дигидрохлорид (AAPH). С использованием кинетических кривых окисления метиллинолеата рассчитывалась скорость окисления (W). Для каждого значения скорости иницирования проводилась серия экспериментов и на основании массива полученных результатов из известной кинетической схемы проводилось моделирование процесса (программа «Кинетика 2012») и рассчитывались соответствующие константы скорости.

Б. Для кинетической идентификации радикала HO_2^\bullet использовались реакции ингибированного окисления метиллинолеата (ЛН) в присутствии стабильного нитроксильного радикала ($>\text{NO}^\bullet$), регенерация которого позволяет судить и том, что в реакциях продолжения цепей участвуют гидропероксидные радикалы (Pliss E.M. et al. In: Nitroxides - Theory, Experiment and Applications. InTech, 2012, P. 263).

В. Для получения значений соответствующих констант скорости на основе полученных экспериментальных даны проводилось компьютерное моделирование в программе «Кинетика 2012».

Показано, что неингибированное окисление ЛН в жидкой фазе ($37,0 \pm 0,1$ °С) подчиняется классической кинетической схеме с квадратичным обрывом цепей в соответствии с (Yin H. et al. // Chem. Rev., 2011, 111, 5944). Кинетика цепного окисления метиллинолеата в водных мицеллах изучалась при следующих условиях: температура $37,0 \pm 0,1$ °С, рН водного фосфатного буфера $7,40 \pm 0,02$. В качестве ПАВ использовали Triton X-100. При окислении в мицеллах наряду с квадратичным обрывом обнаружен и линейный обрыв цепей.

Рассчитанный из экспериментальных данных порядок по инициатору равен 0,72, что близко к известной величине 0,8 (Рогинский В.А. // Кинетика и катализ, 1996, 37, 521).

При ингибированном $>\text{NO}^\bullet$ окислении ЛН как в растворе, так и в мицеллах обнаружено нестехиометрическое расходование нитроксильного радикала, что свидетельствует о регенерации последнего. Более подробно данный процесс будет исследован на следующем этапе выполнения проекта.

6. Исследование кинетики генерирования радикалов при взаимодействии ацетилхолина с пероксидом водорода и гидропероксидами в присутствии фосфолипидов и холестерина.

Нами обнаружено, что в органической среде ацетилхолин (ACh) хлорид подобно катионным поверхностно-активным веществам (ПАВ) образует смешанные наноагрегаты с гидропероксидами, ускоряет окисление липидов и распад гидропероксидов на свободные радикалы. Методом ингибиторов с использованием разных акцепторов радикалов проведена оценка скорости образования ингибиторов. Показано, что наиболее удобным акцептором для исследования выхода радикалов в микрогетерогенных мицеллярных системах является гидрофобный β -каротин. С использованием β -каротина как акцептора радикалов были сопоставлены степени вовлечения разных липидных компонентов в радикальные реакции с участием пероксильных радикалов (АФК). Сравнивали два источника радикалов: азоинициатор AMVN (модельная система 1) и смешанные обращенные микроагрегаты ацетилхолина с гидропероксидом третбутила (ГПТБ) {mACh ...nГПТБ} (модельная система 2). В качестве липидных компонентов были исследованы холестерин, сфингомиелин и фосфатидилхолин (схема 4) – липиды, входящие в состав рафтов, роль которых в физиологии клетки в настоящее время интенсивно изучается. Скорость расщепления β -каротина определяли спектрофотометрически при $\lambda = 490$ нм (рис. 5). Эксперимент проводили в кварцевых кюветках, на приборе Ultrospec 1100pro. В модельной системе 1 ($[\beta\text{-каротин}] = (0,5 - 1) \cdot 10^{-5}$ М, $[\text{AMVN}] = 1,5 \cdot 10^{-3}$ М, хлорбензол, 37°C) расщепление β -каротина регистрировали при разных соотношениях концентраций липида и β -каротина (табл. 5). Расчетная скорость инициирования радикалов при распаде 1,5 мМ AMVN равна $5,5 \cdot 10^{-9}$ М/с. Из данных табл. 5 видно, что при концентрации β -каротина $0,5 \cdot 10^{-5}$ М перехватывается только 34% радикалов. Поэтому в дальнейшем использовали $1 \cdot 10^{-5}$ М растворы β -каротина. Скорость расщепления β -каротина уменьшается при добавках липидов, что свидетельствует об их вовлечении в радикальный процесс и увеличении скорости квадратичной гибели образующихся радикалов. Результаты для модельной системы 2 ($[\beta\text{-каротин}] = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $[\text{ГПТБ}] = 1 \cdot 10^{-2}$ М, $[\text{ACh}] = 1 \cdot 10^{-3}$ М, n-декан, 37°C), представленные в табл. 6, и модельной системе 3 {кверцетин} = $6 \cdot 10^{-5}$ М, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \cdot 10^{-2}$ М, $[\text{ACh}] = 1,5 \cdot 10^{-3}$ М, хлорбензол, 37°C {mACh ...n H₂O₂} (табл. 7) позволили установить закономерности влияния фосфолипидов и холестерина на скорость генерирования радикалов при взаимодействии ацетилхолина с гидропероксидами.

В модельной системе 3, представляющей смешанные обращенные микроагрегаты ацетилхолина с пероксидом водорода (H₂O₂) {mACh...nH₂O₂} в растворе хлорбензола, при 37°C β -каротин плохо растворялся, поэтому в качестве акцептора использовали кверцетин, кинетику расщепления которого регистрировали спектрофотометрически (рис. 6).

Сведения о достигнутых конкретных научных результатах в отчетном году

1. Произведен монтаж лабораторной установки для изучения динамики гемореологических показателей крови под влиянием постоянного магнитного поля и изучения защитных свойств железосодержащего материала (п. 1 календарного плана). Установка (рис. 1) представляет собой четыре пластинчатых магнита, которые попарно фиксируются на штативе. Однородное магнитное поле (МП) заданной индукции (10 до 200 мТл) создается за счет изменения расстояния между полюсами магнитов. В МП помещаются пробирки с различными фракциями крови (цельная кровь, плазма, фракция тромбоцитов, фракция осажденных эритроцитов). С помощью автоматических пробоотборников (дозаторов) производится отбор проб и изучаются различные физико-химические характеристики фракций крови.

Изучено влияние постоянного магнитного поля на кровь крыс (*in vitro*). Установлено, что под влиянием МП происходят изменения гемореологических показателей крови:

- 1) показатели гематокрита и индекс агрегации эритроцитов изменились на 8,1-8,3%;
- 2) значения общего белка и гемоглобина в образце по отношению к контролю изменялись на 26-28%;
- 3) в присутствии магнитного поля наблюдалось увеличение индекса электрофоретической подвижности белковых фракций сыворотки крови.

Можно предположить, что магнитное поле влияет на протекание ферментативных реакций. Мишенью МП может выступать антиоксидантная система, при нарушении работы которой не происходит (или замедляется) трансформация активных форм кислорода в пероксид водорода и далее в воду. Высокое содержание активных форм кислорода приводит к необратимым биологическим эффектам, которые подтверждаются изменением гемореологических показателей крови и электрофоретической подвижности белковых фракций.

В присутствии железосодержащего защитного материала гематокрит и индекс агрегации эритроцитов изменяются на 2-2,7% по отношению к контрольному образцу, а общий белок и гемоглобин – на 11-16%. При использовании защитного материала индекс электрофоретической подвижности остается на уровне контроля. Отмечены магнитозащитные свойства железосодержащего материала.

Для изучения механизма биологического действия МП на объекты и оценки эффективности защитных материалов запланировано проведение дальнейших исследований.

2. Произведен монтаж лабораторной микровольнометрической установки для исследования влияния магнитного поля на кинетику окисления липидов, а также других непредельных и насыщенных субстратов и произведен монтаж опытного образца (рис 2). Установка представляет собой стеклянное газометрическое устройство с постоянной регулировкой давления, термостатированная ячейка которого (с исследуемым субстратом) помещена в источник постоянного магнитного поля. Конструкция позволяет проводить измерения и вне источника магнитного поля. Разработан вариант, когда ячейка помещается в поле электромагнита с регулируемой напряженностью магнитного поля. Диапазон измерения скорости поглощения кислорода: $1,0 \cdot 10^{-7}$ – $5,0 \cdot 10^{-5}$ л/(моль·с). Температурный диапазон: 20–85 °С.

3. Осуществлен синтез нитроксильных радикалов с различными редокс-свойствами, содержащими карбоксильные группы, пригодных для ковалентного связывания с хитозанами. Оригинальные методики синтеза карбоксилзамещенных нитроксильных радикалов приведены ниже.

4-Карбоксиметил-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил ($R^{\bullet}1-COOH$).

Раствор 59,6 г метилового эфира 2,2,6,6-тетраметилпиперидил-4-уксусной кислоты (Шапиро А.Б. // Журн. орган. Химии, 1972, 8, 2263) и 12 г NaOH в 200 мл 50%-ного EtOH кипятили ~1 ч с обратным холодильником до завершения гидролиза. Контроль за ходом реакции осуществляли потенциометрическим титрованием. Избыток щелочи нейтрализовали 2 н HCl до pH 11–11,5 и к раствору добавляли 0,6 г $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ и 0,1 г трилона Б. Затем при ~20° и перемешивании порциями по 5 мл добавляли 60 мл 30%-ной H_2O_2 через постепенно возрастающие интервалы времени – от 1 ч вначале до 3 ч к концу реакции. Степень окисления амина контролировали по накоплению $>NO^{\bullet}$ методом ЭПР, а также по расходованию субстрата и промежуточного гидроксилamina $>NOH$ методом потенциометрического титрования. После завершения реакции (~36 ч) реакционный раствор промывали эфиром (3 × 50 мл) и при охлаждении льдом и интенсивном

перемешивании подкисляли 2 н HCl до pH 3. Образовавшееся красное масло экстрагировали эфиром (4 × 50 мл), экстракт высушивали Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Получено 49,9 г (84%) R¹-COOH, красные призмы с т. пл. 98–99° (из смеси гексан – хлороформ, 4 : 1). М 214,3.

3-Карбокси-2,2,5,5-тетраметилпирролидин-1-оксил (R²-COOH).

Смесь 1,85 г 3-карбамидо-2,2,5,5-тетраметилпирролидин-1-оксила (Розанцев Э.Г. Свободные иминоксильные радикалы, Москва, Химия, 1970, 216 с.), 3,15 г гидроокиси бария и 6 мл воды кипятили с обратным холодильником в течении 20 ч до прекращения выделения аммиака. Реакционную смесь разбавляли 50 мл воды и при ~ 60°C насыщали углекислым газом. Осадок карбоната бария фильтровали, фильтрат подкисляли 5%-ной HCl до pH 2 и экстрагировали эфиром. Экстракт сушили безводным Na₂SO₄ и упаривали. Получили 1,62 г (87%) R²-COOH с т.пл. 192–194°C (из хлороформ–гексан).

Синтезированы образцы хитозан-полинитроксилов (ХПН1, ХПН2) на основе представленных выше нитроксильных радикалов по представленным ниже методикам.

Синтез ХПН1.

Хитозан (0,54 г, ~ 3,3 мМоль в расчете на моносахарид) растворяли при перемешивании в течении 1 ч в 25 мл 1%-ного раствора уксусной кислоты. Далее к раствору прибавляли 0,34 г (1,6 мМоль) кислоты R¹-COOH и после ее растворения 0,18 г (1,6 мМ) N-гидроксисукцинимид и 0,35 г (1,8 мМ) EDC. Далее реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и добавляли свежие порции EDC (0,2 г) через 8 и 24 ч, поддерживая pH ~ 5,5 путем прибавления 1 М NaOH. После достижения суммарного времени реакции 48 ч полимер осаждали медленным прибавлением 1 М NaOH до достижения pH ~ 8. Осажденный полимер отфильтровали на плотном стеклянном фильтре и тщательно промыли дистиллированной водой (10 мл × 4) и этиловым спиртом (10 мл × 2). Измельченный влажный полимер сушили в вакууме и получили 0,48 г ХПН1 в виде частиц бледно-желтого цвета. ИК-спектр: 1550, 1655 см⁻¹ (O=CNH). ЭПР (1%-ная AcOH, 1 мг/мл): три линии с соотношением интенсивностей 100:115:60, g-фактор 2,0056, a_N = 1,70 мТ. Содержание присоединенного радикала рассчитывали по поглощению в УФ-спектре при длине волны 238 нм. С учетом слабого поглощения хитозана при этой длине волны и коэффициентом экстинкции нитроксильного радикала 4-аминокарбонилметил-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила равным 2200 л/моль·см, найдено, что степень модификации составила 11±2%.

Синтез ХПН2.

ХПН2 получен аналогичным способом с использованием кислоты R²-COOH. ИК спектр: 1546, 1650 (O=CNH). ЭПР (1%-ная AcOH, 1 мг/мл): три линии с соотношением интенсивностей 100:110:65, g фактор 2,0053, a_N = 1,58 мТ. Содержание присоединенного радикала рассчитывали по поглощению в УФ-спектре при длине волны 238 нм. С учетом слабого поглощения хитозана при этой длине волны и коэффициентом экстинкции нитроксильного радикала 3-аминокарбонил-2,2,5,5-тетраметилпирролидин-1-оксила равным 2300 л/моль·см, найдено, что степень модификации составила 9±3%.

4. Изучение реологических свойств растворов ХПН (определение средней молекулярной массы).

Определение вязкости растворов ХПН проводили в растворе 2%-ной уксусной кислоты и 0,2 М ацетата натрия по методике описанной в (Gamzazade A. et al. // Acta Polym., 1985, 36, 420; Wang W., et al. // Int. J. Biol. Macromol., 1991, 13, 281) при концентрации ХПН равной 0,01–0,07 г/мл. Характеристические вязкости растворов ХПН1 и ХПН2 составили $[\eta] = 270 \pm 23$ и 255 ± 37 мл/г. Для хитозана со степенью деацелирования 85% связь характеристической вязкости и молекулярной массы определяется формулой $[\eta] = 1,38 \times 10^{-2} \times M^{0,85}$ (Gamzazade A. et al. // Acta Polym., 1985, 36, 420). Отсюда найдены средние молекулярные массы ХПН1 и ХПН2 равные 110±10 и

105±17 кДа. Эти значения молекулярной массы близки к среднему значению, заявленному для низкомолекулярного хитозана фирмы Aldrich.

Рост клеток HeLa на поверхности пленки ХПН1 (определение аффинности). Пленки исходного хитозана и ХПН1 в ячейках культурального планшета готовили как описано в (Wenling C. et al. // J. Biomater. Appl., 2005, 20, 157). Эксперимент проводился на клеточной культуре HeLa. Клетки рассеивались в количестве 2×10^4 на одну ячейку и инкубировались при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM, содержащей 10%-ную телячью эмбриональную сыворотку (PAA Laboratories). Ячейки без пленок хитозана и ХПН1 использовались для контроля. Предварительный анализ полученных результатов показывает, что клетки HeLa хорошо прикрепляются и распространяются на поверхности как исходного хитозана, так и ХПН1. Это свидетельствует о хорошей аффинности ХПН1 к биомолекулам/поверхности клеток.

5. Получен ряд наноструктурных катализаторов на основе частиц монтмориллонита и целлюлозы с нанесенными на их поверхность катионным ПАВ, а также ПАВ в сочетании с ионами кобальта. В табл. 3 представлены значения скоростей поглощения O₂ и инициирования радикалов при окислении лимонена при 37°C с добавкой 4% (вес) полученных наноструктурных катализаторов в сравнении с американским Cloisite 20A, Cl-N(CH₃)₂ (C₁₈-C₁₆)₂ – монтмориллонитом, обработанным катионным ПАВ путем ионного обмена, гидрофобизованным для получения нанокомпозитов путем смешения с расплавленным неполярным полимером. Из таблицы видно, что гидрофобизованный катионным ПАВ монтмориллонит катализирует окисление, разлагая гидропероксид на свободные радикалы. Практически так же действует монтмориллонит с нанесенным адсорбционным слоем СТАВ. Наноструктурный катализатор с нанесенным на поверхность СТАВ в сочетании с Co(acac)₂ в аналогичных условиях обеспечивает на порядок более высокую скорость генерирования радикалов. Аналогичные результаты получены для наноструктурного катализатора на основе целлюлозы. Установлено, что постоянное внешнее магнитное поле с магнитной индукцией 100–200 мТл слабо влияет на выход радикалов в объем при каталитическом распаде пероксидов. Предполагается, что данный эффект связан с конкуренцией гомолитического и гетеролитического распада. Для установления причин обнаруженного эффекта необходимо дальнейшее исследование данной системы при различных соотношениях концентраций катализатора, кислорода и гидропероксида.

Возможность получения нанокомпозитов путем радикальной полимеризации виниловых мономеров, инициированной системой гидропероксид – нанодисперсный носитель, гидрофобизованный катионным ПАВ, исследовали на примере полимеризации стирола. Для сравнения в таких же условиях (при 60°C и в атмосфере азота) провели радикальную полимеризацию стирола в гомогенной системе, инициированную азоизобутиронитрилом (АИБН).

При инициировании системой (2)/гидропероксид реакционная смесь на всем протяжении реакции была прозрачной; извлеченный из сосуда полимерный материал имел форму сосуда, был твердым, хрупким, полупрозрачным, без запаха. Методом термогравиметрии (TG 209 F1 Iris “NETZSCH”) показано, что температуры начала и максимальной скорости разложения для полученного образца превышают эти температуры для обычного полистирола, полученного радикальной полимеризацией, инициированной АИБН, на 30 и 60°C соответственно (табл. 4). Полученные нами образцы также дают возможность получать композиционные материалы путем радикальной полимеризации виниловых мономеров. Поскольку инициирование происходит на поверхности носителя, это обеспечивает ее полное покрытие и не оставляет мономер в порах носителя.

6. Получены кинетические закономерности взаимодействия алкильных и пероксидных радикалов с α -С–Н-связями метиллинолеата в растворах и мицеллах. Данные закономерности описываются следующими кинетическими схемами (схема 2). Все реакции охарактеризованы соответствующими константами скорости. Сравнение результатов моделирования с экспериментом представлено на рис. 4. Как видно из рисунка, экспериментальные результаты вполне удовлетворительно совпадают с результатами моделирования. Полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что образование радикалов HO_2^\bullet протекает путем внутримолекулярного отрыва: $\text{LO}_2^\bullet \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{продукты}$. Роль алкильных радикалов в вероятном образовании HO_2^\bullet определяется возможностью диспропорционирования алкильного радикала с кислородом по реакции: $\text{L}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{olefin}$. При этом одним из продуктов окисления ЛН должен быть пероксид водорода, который, судя по литературным данным (Yin H. et al. // Chem. Rev. 2011, 111, 5944), не обнаружен. Поэтому можно полагать, что роль алкильных радикалов в образовании HO_2^\bullet пренебрежимо мала. Предполагаемый механизм регенерации >NO^\bullet в растворах и мицеллах представлен на схеме 3. Более подробно данный механизм будет исследован на втором этапе выполнения проекта.

7. Установлены закономерности влияния фосфолипидов и холестерина на скорость генерирования радикалов при взаимодействии ацетилхолина с пероксидом водорода и гидропероксидами и размерные характеристики супрамолекулярных агрегатов. Данные по скорости расходования β -каротина в модельной системе 2 (β -каротин-ГПТБ-АСh) в присутствии добавок индивидуальных липидов (табл. б) показывают, что с увеличением концентрации холестерина увеличивается и скорость расходования каротина. Это свидетельствует о возрастании скорости образования радикалов и увеличении выхода радикалов в объем. Установлено, что аналогичные результаты, полученные методами микроволнометрии и ЭПР, имеют более низкую точность и в дальнейшем не использовались. Сфингомиелин при этом демонстрирует обратный эффект. Добавки фосфатидилхолина, внесенные в данную модельную систему, полностью останавливают расходование β -каротина в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ М, а при концентрации фосфатидилхолина $1 \cdot 10^{-6}$ М наблюдается лишь незначительное его расходование. Такое же блокирующее выход радикалов влияние фосфатидилхолина наблюдается и в модельной системе 3 - {mАCh ...nH₂O₂} (табл. 7). Эти результаты указывают на существенное влияние структуры микроагрегатов {mАCh ...nГПТБ} на выход радикалов. По-видимому, холестерин структурирует микроагрегаты ацетилхолина и способствует организации двойного электрического слоя и встраиванию в него гидропероксида, что приводит к увеличению скорости его радикального распада. Фосфатидилхолин (РС), напротив, консервирует и сольбилизирует микроагрегаты {mАCh ...nГПТБ}. При этом не только не увеличивается скорость радикального распада ГПТБ, но и затрудняется выход радикалов в объем. Такой механизм антиокислительного действия РС, состоящий в блокировании источника радикалов и приводящий к уменьшению скорости окисления в целом, наблюдается в процессах окисления липидов, катализируемых гидрофильными или амфифильными соединениями переходных металлов. Измерения размерных характеристик микроагрегатов {mАCh...nГПТБ} с добавками РС методом ДСР показали, что индивидуальный РС образует обратные мицеллы размером 5 нм, {mАCh ...nГПТБ} – размером 350 нм, а смесь РС + {mАCh...nГПТБ} демонстрирует крупные агрегаты 800–1500 нм, что согласуется с механизмом антиокислительного действия РС путем сольбилизации и изоляции иницирующей радикалы системы. Таким образом, установлено, что добавки холестерина в несколько раз увеличивают скорость иницирования радикалов в системе ацетилхолин – гидропероксид, а фосфатидилхолин, образуя смешанные агрегаты с {mАCh ...nГПТБ}, блокирует выход радикалов в объем.

Графики, таблицы и схемы

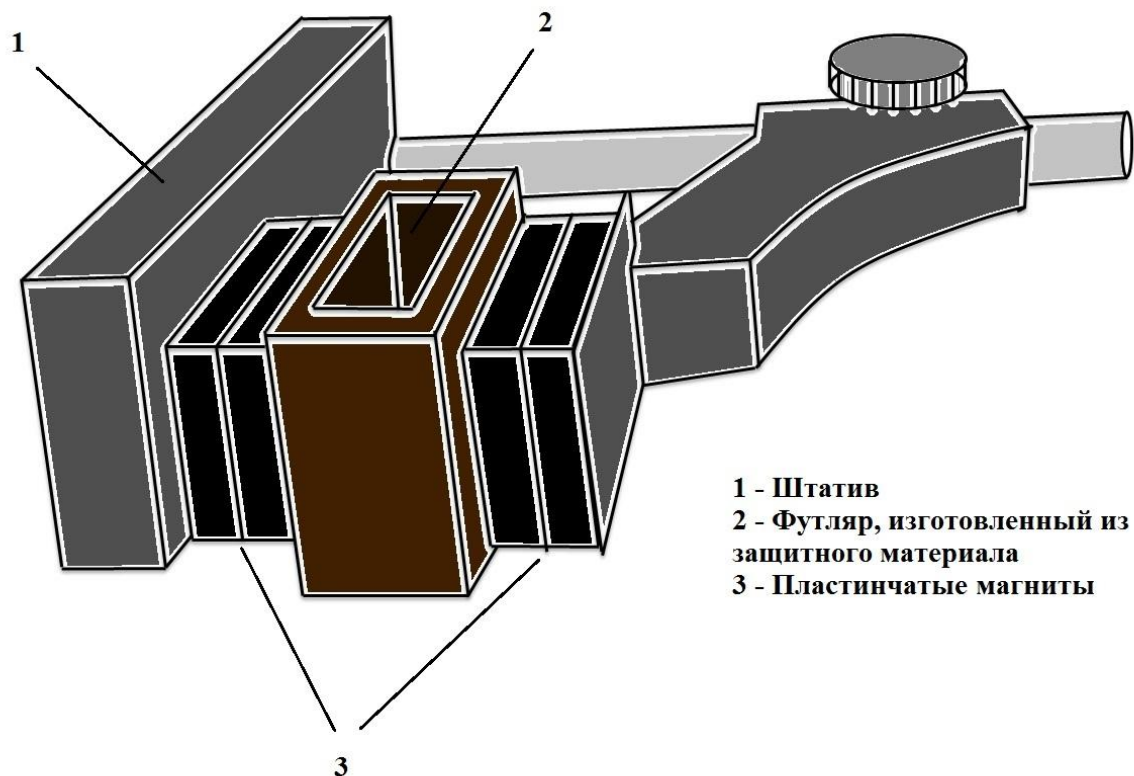


Рис. 1. Лабораторная установка для изучения гемореологических показателей крови под влиянием постоянного магнитного поля.

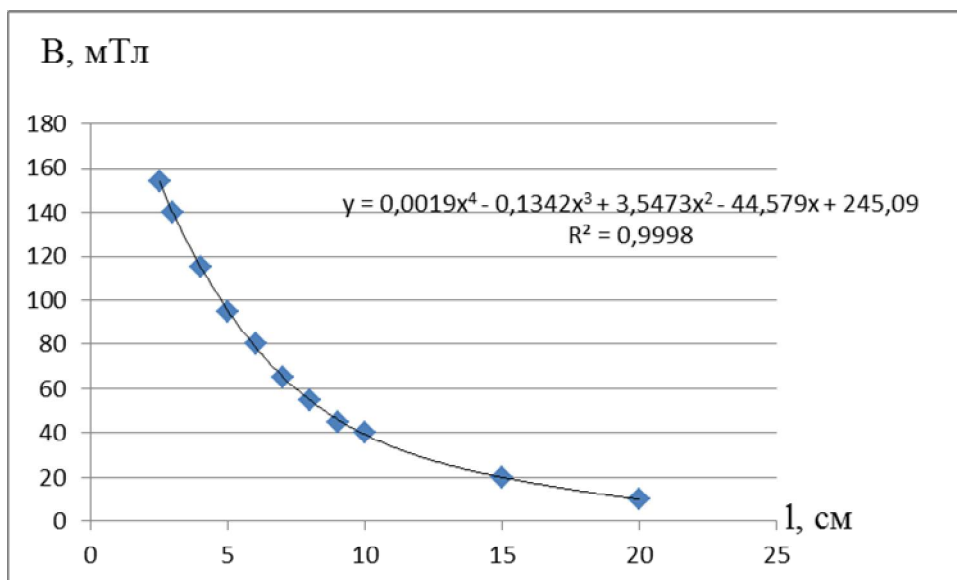


Рис. 2. Зависимость магнитной индукции от расстояния между магнитами в лабораторной установке (см. рис. 1)

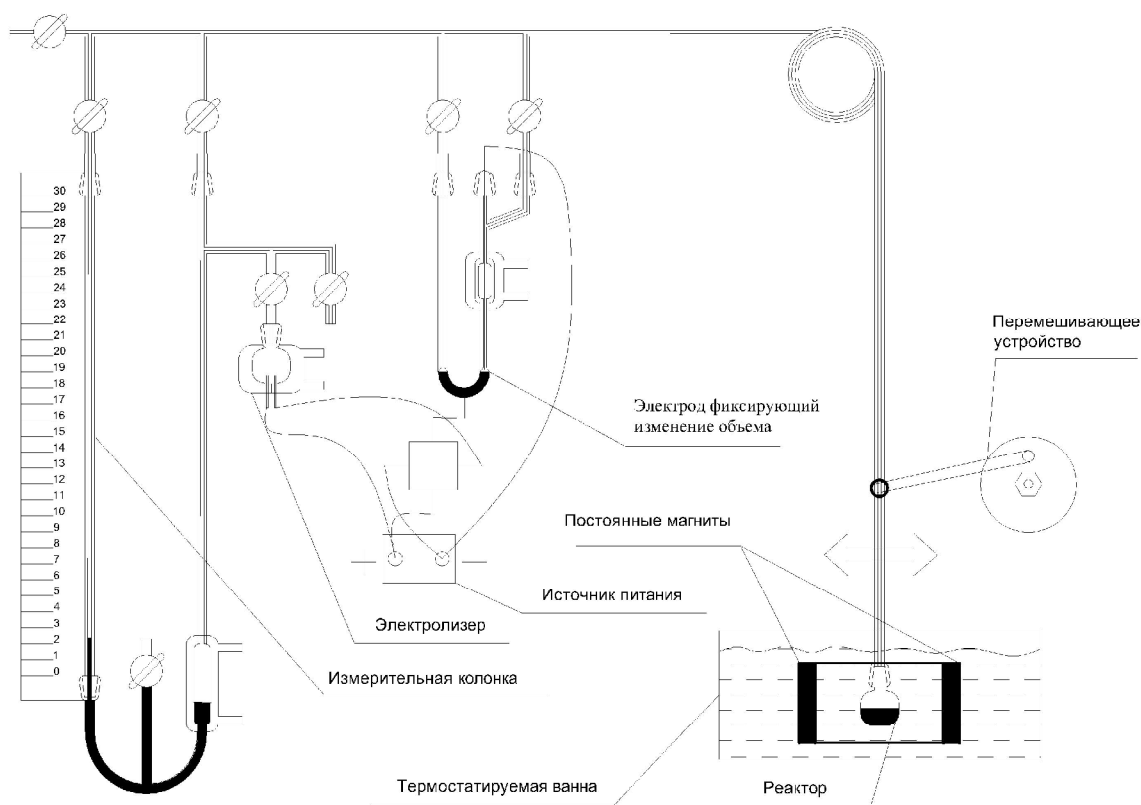


Рис. 3. Лабораторная микроволнометрическая установка для мониторинга поглощения кислорода в процессе окисления непредельных соединений и их насыщенных аналогов под действием магнитного поля.

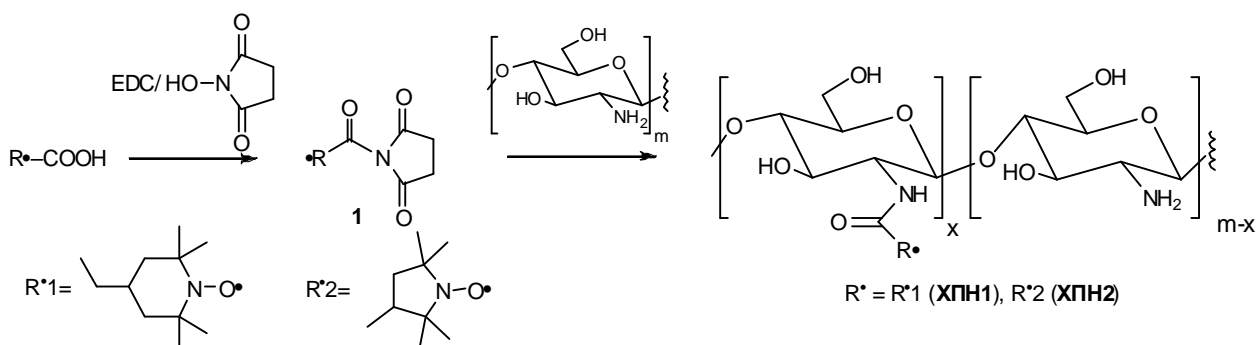


Схема 1. Схема синтеза хитозан–полинитроксидов (XPN)

Схема 2. Сравнение кинетических схем окисления метиллинолеата в растворе и мицеллах

Схема окисления LH в растворе

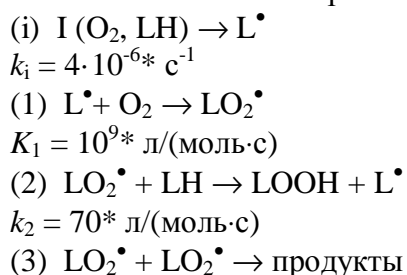
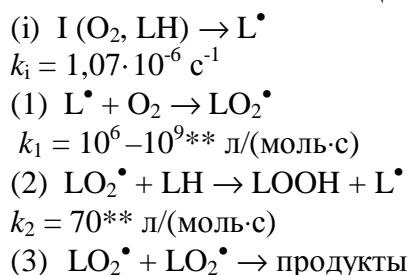
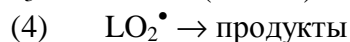


Схема окисления LH в мицелле



$$k_3 = 2,7 \cdot 10^6 \text{ л/(моль} \cdot \text{с)}$$

$$k_3 = 3 \cdot 10^3 \text{ л/(моль} \cdot \text{с)}$$



$$k_4 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ л/(моль} \cdot \text{с)}$$

* NIST Standard Referent Database 17. NIST Chemical Kinetics Database. – Version 6.0. Gaithersburg. 1994.

** результаты моделирования

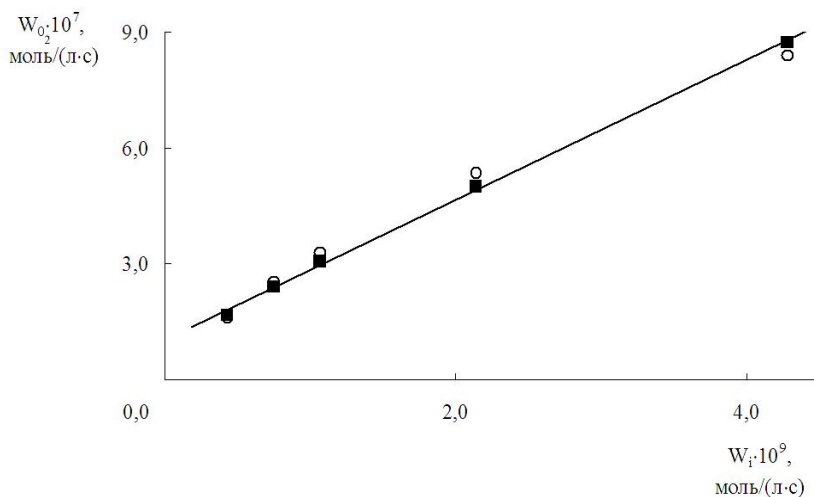


Рис. 4. Зависимость скорости окисления LH от скорости иницирования. ■ – экспериментальные данные; ○ – результаты моделирования. Условия эксперимента: [LH] = 0,02 моль/л, [Triton X-100] = 0,05 моль/л, [O₂] = 2·10⁻⁴ моль/л.

Схема 3. Сравнение формально-кинетических механизмов ингибированного >NO[•] окисления метиллинолеата в растворах и мицеллах

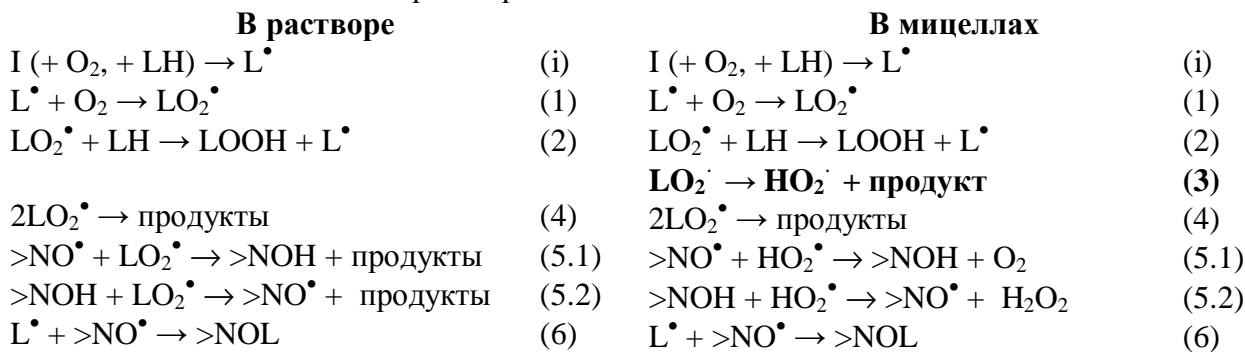


Таблица 1. Скорости поглощения O₂ и иницирования радикалов при окислении раствора лимонена (1 М) с добавками ACh и переходных металлов, вместе и по отдельности, 60°C, [LOOH] = 40мМ, [ACh] = 1 мМ, [Me] = 0,1 мМ

Металл	Без ACh		С ACh		$(W_{i,Me} + W_{i,ПАВ}) \cdot 10^7$, М/с	$\frac{W_{i\Sigma}}{W_{iMe} + W_{iПАВ}}$
	$W_{O_2,Me} \cdot 10^6$, М/с	$W_{i,Me} \cdot 10^7$, М/с	$W_{O_2,\Sigma} \cdot 10^6$, М/с	$W_{i,\Sigma} \cdot 10^7$, М/с		
Без металла	–	–	5,1	2,1	–	–
Co(асас) ₂	6,5	3,5	4,7	1,8	5,6	0,32
Fe(асас) ₃	3,6	1,1	7,4	4,5	3,2	1,4
Cu(асас) ₂	5,5	2,5	15,0	18,6	4,6	4,0
Mn(асас) ₃	4,9	2,0	5,9	2,9	4,1	0,7

Таблица 2. Скорости поглощения O₂ и инициирования радикалов при окислении раствора лимонена (1М) с добавками СТАВ и переходных металлов, вместе и по отдельности (60°C, [LOOH] = 40мМ, [ACh] = 1 мМ, [Me] = 0,1 мМ)

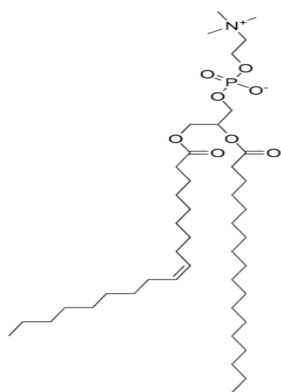
Металл	Без СТАВ		С СТАВ		$(W_{i,Me} + W_{i,ПАВ}) \cdot 10^7$, М/с	$\frac{W_{i\Sigma}}{W_{iMe} + W_{iПАВ}}$
	$W_{O_2,Me} \cdot 10^6$, М/с	$W_{i,Me} \cdot 10^7$, М/с	$W_{O_2,\Sigma} \cdot 10^6$, М/с	$W_{i,\Sigma} \cdot 10^7$, М/с		
Без металла	–	–	4,2	1,45	–	–
Co(асас) ₂	6,5	3,5	25	51,6	4,95	10,4
Fe(асас) ₃	3,6	1,1	23	43,7	2,55	17,06
Cu(асас) ₂	5,5	2,5	27	60,2	6,95	8,7
Mn(асас) ₃	4,9	2,0	13,4	14,8	3,46	4,2

Таблица 3. Кинетические параметры окисления лимонена с добавками 4% разных образцов монтмориллонитов и целлюлозы ([LH] = 1 М, [ROOH]₀ = 20 мМ, хлорбензол, 37°C)

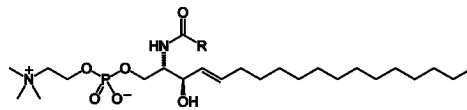
№	Катализатор	W_{O_2} , М·с ⁻¹	W_i , М·с ⁻¹
1	Cloisite Na	$3 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-9}$
2	Cloisite 20A, Cl-N(CH ₃) ₂ (C ₁₈ -C ₁₆) ₂	$7,3 \cdot 10^{-7}$	$2,9 \cdot 10^{-8}$
3	Cloisite 20A, СТАВ, заполнение $4,9 \cdot 10^{-4}$ моль/г	$7 \cdot 10^{-7}$	$2,7 \cdot 10^{-8}$
4	Cloisite Na, СТАВ с Co(асас) ₂	$21 \cdot 10^{-7}$	$25 \cdot 10^{-8}$
5	Целлюлоза, СТАВ заполнение $2,1 \cdot 10^{-4}$ моль/г	$8,5 \cdot 10^{-7}$	$4,5 \cdot 10^{-8}$
6	Целлюлоза, СТАВ с Co(асас) ₂	$9,5 \cdot 10^{-7}$	$5,6 \cdot 10^{-8}$

Таблица 4. Характеристики термостойкости полимерных материалов, полученных радикальной полимеризацией стирола с добавкой 4% алюмосиликатов

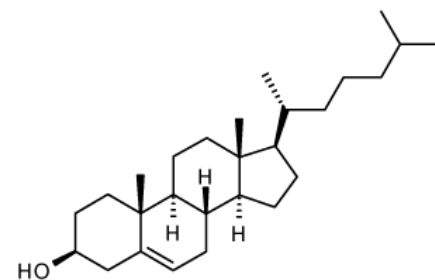
Иницирующая добавка	Температура начала деструкции (°C)	Температура максимальной скорости деструкции (°C)	Твердый остаток, %
10 мМ АИБН	328,5	365,9	–
Cloisite Na + ROOH	–	–	–
Cloisite 20A, Cl-N(CH ₃) ₂ (C ₁₈ -C ₁₆) ₂	359,6	436,8	3,2
Cloisite 20A, СТАВ + Co(асас) ₂ + ROOH	349,7	426,9	4,2
Cloisite 20A, СТАВ + ROOH	332,9	403,7	3,23



Фосфатидилхолин



Сфингомиелин



Холестерин

Схема 4. Формулы изученных липидных компонентов

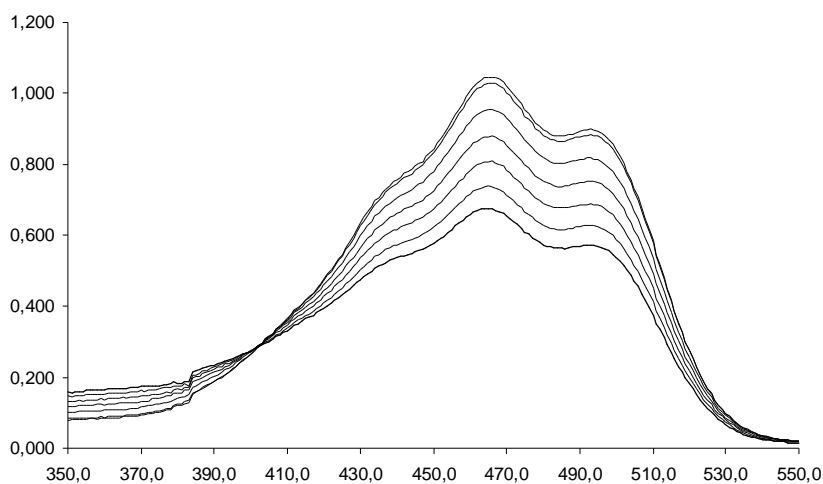


Рис. 5. Спектрофотометрическое определение расхождения β -каротина ($1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в присутствии липидов рафта ($[\text{AMVN}] = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $W_i = 5,5 \cdot 10^{-9} \text{ M/c}$)

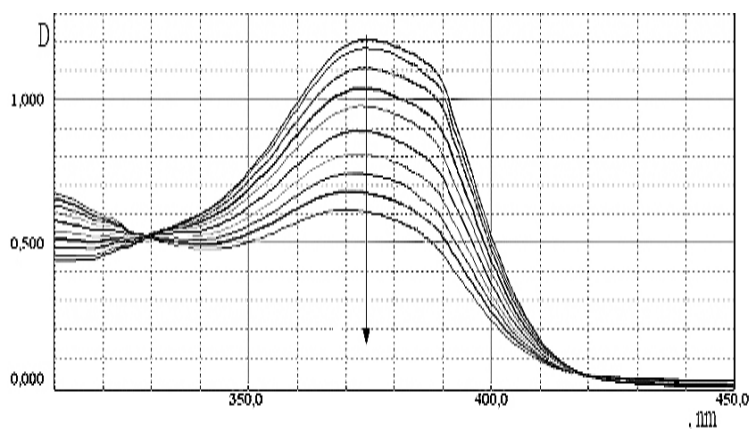


Рис. 6. Спектрофотометрическое определение расхождения кверцетина (0,06 мМ) в реакционной смеси H_2O_2 (20мМ) и АСh (1,5мМ) в растворе хлорбензола при 37°C.

Таблица 5. Скорости расходования β -каротина (М/с) с добавками липидов в модельной системе 1.

Состав смеси, М	$1 \cdot 10^{-4}$ липида и $0,5 \cdot 10^{-5}$ β -каротина	$1 \cdot 10^{-5}$ липида и $1 \cdot 10^{-5}$ β -каротина
1. Без добавок	$1,9 \cdot 10^{-9}$	$4,3 \cdot 10^{-9}$
2. Холестерин	$1,2 \cdot 10^{-9}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$
3. Фосфатидилхолин	$1,5 \cdot 10^{-9}$	$3,9 \cdot 10^{-9}$
4. Сфингомиелин	$1,2 \cdot 10^{-9}$	$3,8 \cdot 10^{-9}$

Таблица 6. Скорости расходования β -каротина (М/с) с добавками липидов в модельной системе 2. Скорость расходования β -каротина без добавок равна $1,15 \cdot 10^{-9}$ М/с.

[Липид], М	Холестерин	$*\omega \cdot 10^4, (\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$	Сфингомиелин	Фосфатидилхолин
–	–	1,15	–	–
$1 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-9}$	5,0	$0,57 \cdot 10^{-9}$	0
$5 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-9}$	4,8	$0,61 \cdot 10^{-9}$	$0,001 \cdot 10^{-9}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^{-9}$	4,2	$0,75 \cdot 10^{-9}$	$0,002 \cdot 10^{-9}$
$5 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-9}$	4,8	$0,82 \cdot 10^{-9}$	$0,005 \cdot 10^{-9}$
$1 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-9}$	3,5	$1,0 \cdot 10^{-9}$	$0,02 \cdot 10^{-9}$

$*\omega = W_i / ([\text{ROOH}][\text{ACh}])$ – удельная скорость генерирования радикалов, кинетическая характеристика активности мицеллярной системы в генерировании радикалов.

Таблица 7. Скорости образования радикалов в модельной системе 3 ($20 \text{ мМ H}_2\text{O}_2 + 1,5 \text{ мМ ACh}$) в хлорбензоле и водном растворе, 37°C (акцептор – кверцетин)

ПАВ	$W_i \cdot 10^8, \text{ М/с}$ орг. р-ль	$\omega_i \cdot 10^3, (\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$ орг. р-ль	$W_i \cdot 10^8, \text{ М/с}$ вода	$\omega_i \cdot 10^3, (\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$ вода
Без добавок	≈ 0		≈ 0	
ACh	1,3	0,43	≈ 0	≈ 0
ACh + 0,1мМ РС	≈ 0	–	–	–