

УДК 546.26-17-046.64: 542.943-092.78

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФОРМ ФУЛЛЕРЕНОВ

Ермоленко Е. М., Ринейская О. Н., Улосевич Д. С.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Работа посвящена сравнительной оценке антиокислительной способности ряда водорастворимых фуллеренов – $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Декстрин и C_{60} -Поливинилпирролидон — по отношению к аскорбиновой кислоте. Установлено, что исследуемые нами формы фуллеренов обладают антиоксидантной активностью, которая определялась при помощи спектрофотометрического метода ингибирования автоокисления адреналина в щелочной среде. $C_{60}(OH)_{24}$ проявлял более высокую антиоксидантную активность по сравнению с C_{60} -Декстрин и C_{60} -Поливинилпирролидон, а также аскорбиновой кислотой.

Ключевые слова: фуллерен, автоокисление адреналина в щелочной среде, аскорбиновая кислота, спектрофотометрия.

Введение. Фуллерены, открытые в 1985 году, представляют собой уникальный класс углеродных соединений, вызывающих значительный интерес в различных научных областях. Эти полые углеродные структуры могут принимать форму закрытых каркасов, известных как «бакиболы», или цилиндрических нанотрубок. Первый фуллерен, C_{60} , был открыт Гарольдом В. Крото, Ричардом Е. Смолли и Робертом Ф. Кёрлом и назван бакминстерфуллереном, или бакиболом, из-за сходства с геодезическими куполами архитектора Р. Бакминстера Фуллера. Наиболее распространенной формой наноструктур с углеродным каркасом, которые считаются трехмерными аналогами бензола и представляют собой аллотроп углерода, является бакминстерфуллерен с 60 атомами углерода (C_{60}), сложенный в сферическую структуру. Молекулы имеют вид усеченного икосаэдра, содержащего 12 пятиугольников и 20 шестиугольников, в которых каждый атом углерода, находясь в sp^2 -гибридизации, образует связь с тремя другими соседними атомами. Фуллерены обладают способностью отдавать и принимать электроны и легко присоединяют атомы водорода и галогенов, что дает возможность получения разнообразных производных с уникальными свойствами [1]. К специфическим параметрам фуллеренов можно также отнести мощную электронно-акцепторную активность, высокую поляризуемость молекулы, наличие большого числа эквивалентных

реакционных центров и гидрофобность, которая имеет отношение к способности фуллеренов проникать через биологические мембраны. Также было установлено, что сорбционная способность производных C_{60} намного превосходит активированный уголь [2]. Фуллерены обладают широким потенциалом в отношении медицинского применения. Уникальная углеродная структура и возможность модификации делают их привлекательными для исследований в области медицинской химии. Фуллерены обладают особыми фото-, электрохимическими и физическими свойствами, которые могут быть использованы в различных областях медицины. Большой интерес представляют водорастворимые формы модифицированных фуллеренов. Водорастворимые фуллерены могут быть получены путем введения (присоединения) различных гидрофильных групп и фрагментов карбоновых или аминокислот, что повышает их способность растворяться в воде. Большая площадь поверхности водорастворимых форм фуллеренов позволяет присоединить к сферической молекуле различные гидрофильные адденды, создавать поливалентные структуры, что представляет интерес для синтеза новых биофармацевтических препаратов и лекарственных средств [3]. Можно получить растворимые формы производных фуллеренов, вводя полярные заместители в молекулу, однако любой заместитель в фуллереновом ядре приводит к значительным изменениям в строении молекулы. Введение в него всего лишь одного

заместителя модифицирует свойства сразу двух атомов углерода: их гибридизация меняется из sp^2 -гибридного состояния в sp^3 . При этом исчезает равноценность атомов углерода. Более того, введение нескольких заместителей приводит к образованию региоизомеров [4]. Также было показано, что присоединение к фуллеренам различных химических групп сопровождается разрывом их двойных связей, понижением электронно-акцепторных и антиоксидантных свойств фуллеренового каркаса в отношении перекисного окисления липидов [5]. Модифицированные формы фуллеренов исследуются также в качестве радикальных ловушек, антиоксидантов и носителей для доставки генов и лекарств. Фуллерены обладают высокой степенью стабильности и низкой токсичностью для организма человека. В них можно инкапсулировать различные молекулы с лечебным назначением (антибиотики, гормоны, витамины, а также металлы), а снаружи к углеродному каркасу легко присоединить органические молекулы. Все эти уникальные транспортные свойства позволяют использовать фуллерены для противоопухолевого лечения [6]. В последнее время исследования сосредоточены на разработке производных фуллеренов для применения в различных областях биологии и медицины, включая профилактику и лечение различных заболеваний. Ряд исследований фуллеренов указывает на тот факт, что водорастворимые фуллерены проявляют антиоксидантную активность, – способность нейтрализовать в организме свободные радикалы, которые образуются в процессе заболевания. Фуллерены подавляют окислительный стресс, вызванный перекисью водорода, и оказывают цитопротекторное действие на клетки [7]. Это позволяет фуллеренам оказывать положительное влияние на различные патологические состояния, связанные с окислительным стрессом, такие как нейродегенеративные расстройства, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. Кроме того, фуллерены могут найти применение в косметологии для защиты кожи от воздействия свободных радикалов и замедления процессов старения. Хотя в водных растворах производные фуллеренов показывают АОА, их свойства и поведение *in vivo* в этом отношении дискуссионно. Зависимость антиоксидантного действия производных фуллеренов от их химической структуры до сих пор остается неясной. Считается, что производные с более высокой степенью функционализации обладают меньшей АОА из-за нарушения π -системы. Однако это обобщение не всегда верно: например, трисаддукты малоновой кислоты обладают более высокой АОА,

чем бисаддукты, содержащие цепи этиленгликоля. Известно так же, что производные фуллеренов способны агрегировать в зависимости от их химической структуры, тем самым снижая их концентрацию и доступность, а также взаимодействовать с ферментами и другими биологическими молекулами в зависимости от структуры и заряда соединения.

Цель работы – исследование антиоксидантной активности ряда растворимых фуллеренов: $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Декстрина, C_{60} -Поливинилпирролидона – в сравнении с аскорбиновой кислотой (стандарт).

Материалы и методы. Оценка антиоксидантной активности проводилась при помощи спектрофотометрии, основанной на ингибировании автоокисления адреналина в щелочной среде при длинах волн 347 нм, 480 нм. Определялась скорость реакции окисления по изменению оптической плотности (ОП) накапливающегося промежуточного продукта автоокисления адреналина – адренохрома – при длине волны 480 нм и конечного продукта автоокисления адреналина – адренолютина – при длине волны 347 нм. АОА определяли по формуле $AOA = (D_{\lambda(контроль)} - D_{\lambda(опыт)}) / D_{\lambda(контроль)} \times 100 \%$. При проведении измерений были использованы следующие материалы: раствор эпинефрина гидротартрата, содержащий в 1 мл 1,82 мг вещества; 0,2 М бикарбонатного буферного раствора (рН 10,68); растворы фуллеренов $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Декстрин, C_{60} -Поливинилпирролидон в концентрации 1 мкМ (рисунок 1), полученные в НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ; 5%-ный раствор аскорбиновой кислоты. Измерения проводились с использованием спектрофотометра PV 1251C Solar.

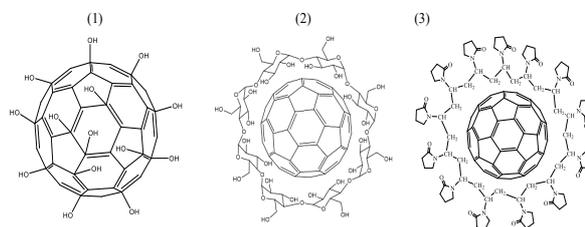


Рисунок 1 – Формулы водорастворимых фуллеренов

1 – $C_{60}(OH)_{24}$, 2 – C_{60} -Декстрин,
3 – C_{60} -Поливинилпирролидон

Результаты и их обсуждение. Хиноидное окисление адреналина в щелочной среде протекает по радикальному механизму через

одноэлектронное восстановление кислорода (рисунки 2) с образованием адреналин-семихинона (2) и адреналин-хинона (3) и последующей циклизацией через нуклеофильное присоединение атома азота к ароматическому кольцу, сопровождающееся восстановлением о-хиноидной группы [8]. Далее лейкоадренохром (4) подвергается дальнейшему окислению с образованием адренохром-семихинона (5) и адренохрома (6), которые могут быть изомеризованы до адренолютина (7, 8).

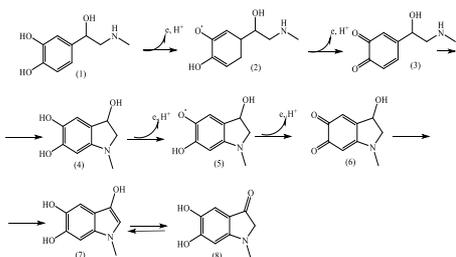


Рисунок 2 – Схема автоокисления адреналина
 1 – адреналин, 2 – адреналин-семихинон, 3 – адреналинхинон, 4 – лейкоадренохром, 5 – адренохромсемихинон, 6 – адренохром, 7 – адренолютин (енольная форма), 8 – адренолютин (кетонная форма)

Об антиоксидантной активности судили по способности растворов фуллеренов и аскорбиновой кислоты ингибировать представленный выше процесс автоокисления адреналина, который протекает под действием образующихся активных форм кислорода. Данные исследования скорости образования промежуточного продукта – адренохрома – при самопроизвольном окислении адреналина без действия ингибиторов процесса при длине волны 480 нм указывают на то, что максимум (увеличение ОП на 22,6 %) развивается ко 2-й минуте; далее наблюдается плавное снижение в течение 10 минут уровня адренохрома, связанное, по-видимому, с дальнейшим превращением его в адренолютин (рисунок 3).

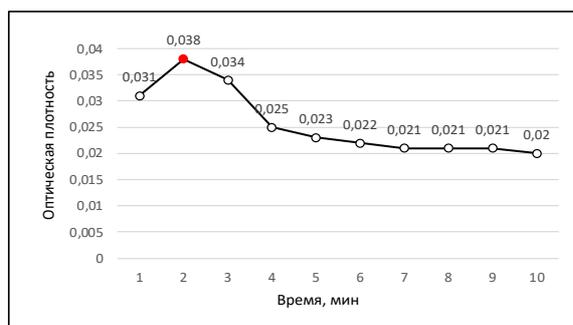


Рисунок 3 – Динамика изменения уровня адренохрома при автоокислении адреналина без ингибиторов (длина волны 480 нм)

Рисунок 4 демонстрирует изменение уровня адренохрома при окислении адреналина в присутствии гидроксилированного фуллерена. На протяжении периода наблюдения уровень адренохрома постепенно увеличивается и к 10й минуте составляет 111 % от начального.

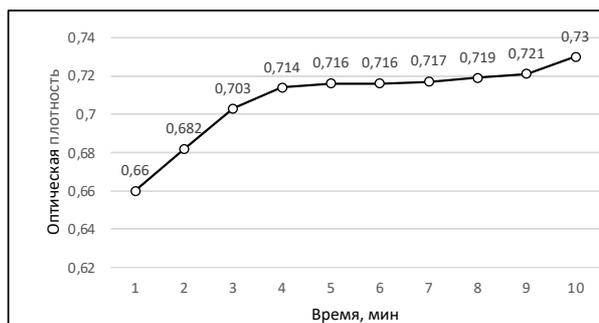


Рисунок 4 – Динамика изменения уровня адренохрома при автоокислении адреналина в присутствии C₆₀(OH)₂₄ (длина волны 480 нм)

Процесс автоокисления адреналина замедляется и при добавлении в реакционную среду фуллерена, стабилизированного декстрином (рисунок 5).

Уровень адренохрома достигает максимального значения к 3-й минуте (составляет 116 %) и затем плавно снижается.

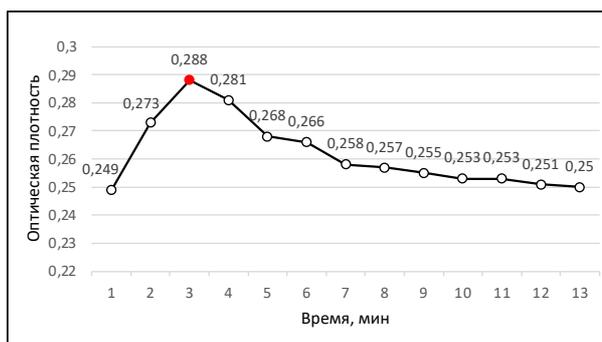


Рисунок 5 – Динамика изменения уровня адренохрома при автоокислении адреналина в присутствии C₆₀-Декстрин (длина волны 480 нм)

Присутствие в реакционной среде C₆₀-Поливинилпирролидона приводит к резкому увеличению уровня адренохрома в течение 2 минут на 27,5 % (рисунок 6).

При этом динамика процесса отражает дальнейший медленный рост уровня

промежуточного продукта окисления адреналина на протяжении 5 минут (составляет 182 % от начального).

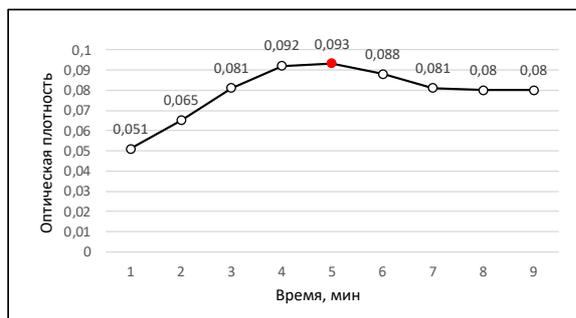


Рисунок 6 – Динамика изменения уровня адrenoхрома при автоокислении адреналина в присутствии С₆₀-Поливинилпирролидон (длина волны 480 нм)

В настоящем исследовании аскорбиновая кислота использовалась в качестве стандарта при оценке антиокислительной активности фуллеренов как потенциальных антиоксидантов. На рисунке 7 представлена динамика изменения уровня адrenoхрома при использовании аскорбиновой кислоты. Результаты исследования указывают на то, что аскорбиновая кислота тормозит процесс окисления в течение 3 минут, после чего обнаруживается увеличение уровня адrenoхрома на 25 %. Затем на протяжении следующих 3 минут изменений не наблюдалось, а к 8-й минуте, а также к 10-й — снова обнаруживался рост ОП.

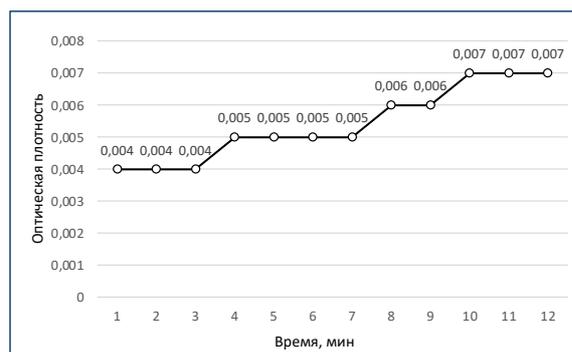


Рисунок 7 – Динамика изменения уровня адrenoхрома при автоокислении адреналина в присутствии аскорбиновой кислоты (длина волны 480 нм)

По результатам исследования уровня адrenoхрома как промежуточного продукта автоокисления адреналина следует отметить наличие антиоксидантных свойств у фуллеренов С₆₀(ОН)₂₄ и С₆₀-Декстрин. Лимитирующей стадией процесса автоокисления адреналина является

одноэлектронное восстановление кислорода анионными формами фенольных гидроксидов адреналина. Появление максимума поглощения на длине волны 347 нм при автоокислении адреналина связано с образованием адренолютина. Нами была также изучена ингибирующая активность фуллеренов по уровню конечного продукта автоокисления адреналина — адренолютина. Оценка проводилась в течение 5 минут. Полученные результаты указывают на резкое нарастание — в 13,9 раз — раствора адреналина, измеренное при длине волны 347 нм, когда в отсутствие ингибиторов происходит его самопроизвольное окисление (таблица 1). Все исследованные вещества – С₆₀(ОН)₂₄, С₆₀-Декстрин, С₆₀-Поливинилпирролидон и аскорбиновая кислота — оказывали ингибирующее действие на процесс автоокисления адреналина по уровню накопления адренолютина.

Таблица 1 – Результаты определения уровня конечного продукта автоокисления адреналина (адренолютина) при длине волны 347 нм

№	Вещество	ОП, 1 мин	ОП, 5 мин	Нараст ОП, %
1	С ₆₀ (ОН) ₂₄	1,85	2,373	128
2	С ₆₀ -Декстрин	0,795	1,411	177
3	С ₆₀ -Поливинил пирролидон	0,346	0,92	266
4	Аскорбиновая к-та	0,178	0,447	251
5	Холостая проба	0,024	0,334	1392

При этом наименее выраженным был антиоксидантный эффект фуллерена С₆₀-Поливинилпирролидон, что, возможно, связано с экранированием фрагментами пирролидона и, следовательно, уменьшением доступности фуллеренового каркаса для супероксидных радикалов. Гидроксильрованный фуллерен показал наиболее выраженные антиоксидантные свойства, так как в присутствии С₆₀(ОН)₂₄ в течение периода наблюдения было обнаружено увеличение уровня адренолютина только на 28 %, что в 11 раз меньше, чем в холостой пробе (в отсутствие ингибиторов). Полученные данные позволили рассчитать АОА исследованных веществ: АОА_{С₆₀(ОН)₂₄} = 77 %, АОА_{С₆₀Декстрин} = 56,7 %, АОА_{аскорбиновая кислота} = 40 %. С₆₀-Поливинилпирролидон также обладает антиоксидантной активностью, но более низкой, равной 37,5 %.

Заключение. При исследовании уровней промежуточного и конечного продуктов автоокисления адреналина было установлено, что все изученные водорастворимые фуллерены — $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Декстрин, C_{60} -Поливинилпирролидон — обладают хорошей АОА (величина АОА более 10 % свидетельствует о наличии АОА). При этом $C_{60}(OH)_{24}$ проявляет более высокую АОА по сравнению с C_{60} -Декстрин и C_{60} -Поливинилпирролидон, а также аскорбиновой кислотой. Это может быть следствием способности супероксидных радикалов, образующихся при автоокислении адреналина, хорошо адсорбироваться и

концентрироваться в слое гидратной оболочки фуллерена, где высока вероятность взаимной рекомбинации свободных радикалов с последующим образованием нейтральных молекул. Исследование антиокислительных свойств фуллеренов является перспективным направлением нанобиологии и медицины, так как имеет потенциал в отношении разработки инновационных терапевтических и косметических средств.

Дальнейшее изучение механизмов действия фуллеренов и проведение клинических испытаний необходимы для реализации их терапевтического потенциала.

Список цитированных источников

1. Walton, D. R. M. Fullerenes / D. R. M. Walton, H. W. Kroto // Encyclopaedia Britannica. – 2024.
2. Перспективы применения фуллеренов в медицине / О. Н. Кукалия [и др.] // Трансляционная медицина. – 2023. – Т. 10, № 6.
3. Скворцевич, Е. Г. Биологические эффекты наноструктур углерода / Е. Г. Скворцевич, Р. В. Романов, О. В. Стурлис // Вестник Санкт-Петербургского Университета. – 2009. – № 1. – С. 114–120.
4. Water-Soluble Fullerene Monoderivatives for Biomedical Applications. / R. Biswas [et al.] // ChemMedChem. – 2023. – Vol. 18. – P. 20.
5. Антиоксидантная активность высокогидроксилированного фуллерена C_{60} и его взаимодействия с аналогом α -токоферола. Биология и медицина свободных радикалов. / Я. Гребовски [и др.] // Free Radic Biol Med. – 2020. – Vol. 160. – P. 734–744.
6. Wang, I. C. C_{60} and Water-Soluble Derivatives as Antioxidants Against Radical-Initiated Lipid Peroxidation / I. C. Wang, L. A. Tai, D. D. Lee // J. Med. Chem. – 1999. – Vol. 42. – P. 4614–4620.
7. Rania, B. Medicinal applications of fullerenes / B. Rania // Nanomedicine. – 2007. – Vol. 2(4). – P. 639–649.
8. Kinetics and Mechanism of Epinephrine Autoxidation in the Presence of Plant Superoxide Inhibitors: A New Look at the Methodology of Using a Model System in Biological and Chemical Research / V. Volkov [et al.] // Antioxidants. – 2023. – N 12. – P. 1530.

Study of antioxidating properties of water-soluble forms of fullerenes

*Ermolenko E. M., Ryneiskaya O. N., Ulosevich D. S.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

A comparative assessment of the antioxidant capacity of a number of water-soluble fullerenes – $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Dextrin and C_{60} -Polyvinylpyrrolidone - in relation to ascorbic acid was carried out. It was established that the forms of fullerenes we studied have antioxidant activity, which was determined using the spectrophotometric method of inhibiting the autoxidation of adrenaline in an alkaline medium at pH 10.68. $C_{60}(OH)_{24}$ exhibited higher antioxidant activity compared to C_{60} -Dextrin and C_{60} -Polyvinylpyrrolidone, as well as ascorbic acid.

Keywords: fullerene, adrenaline autoxidation in an alkaline medium, ascorbic acid, spectrophotometry.

Поступила 05.06.2024