

Улосевич Д.С.<sup>1</sup>

## **ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 2,2-ДИФЕНИЛ-1-ПИКРИЛГИДРАЗИЛА ВОДОРАСТВОРИМЫХ МОДИФИКАЦИЙ ФУЛЛЕРЕНА IN VITRO**

Научный руководитель: к.м.н., доцент Ринейская О.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Аннотация.** Исследование посвящено анализу антиоксидантной способности водорастворимых модификаций фуллерена –  $C_{60}$ Поливинилпирролидон и  $C_{60}(OH)_{24}$ , который проводился при помощи спектрофотометрического метода с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом.  $C_{60}$ Поливинилпирролидон проявлял более высокую антиокислительную активность по сравнению с  $C_{60}(OH)_{24}$  и глутатионом, незначительно уступая в ингибировании кверцетину.

**Ключевые слова:** модификации фуллерена, глутатион, кверцетин, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH), спектрофотометрический метод.

**Введение.** Свободные радикалы вызывают разрушение тканей, вступая во взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами, белками и ДНК, способствуя и сопровождая многие патологические процессы. Во всех жизнеспособных клетках существуют антиоксидантные механизмы, снижающие риск возникновения атеросклероза, рака, сахарного диабета, аутоиммунных заболеваний и др.

Интерес представляют водорастворимые формы модифицированных фуллеренов, которые 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 сфероидной молекуле различные гидрофильные лиганды, создавать поливалентные структуры, что представляет интерес для синтеза новых лекарственных средств. Можно получить растворимые формы производных фуллеренов, вводя полярные заместители в молекулу, однако любой заместитель в фуллереновом ядре приводит к значительным изменениям в строении [1].

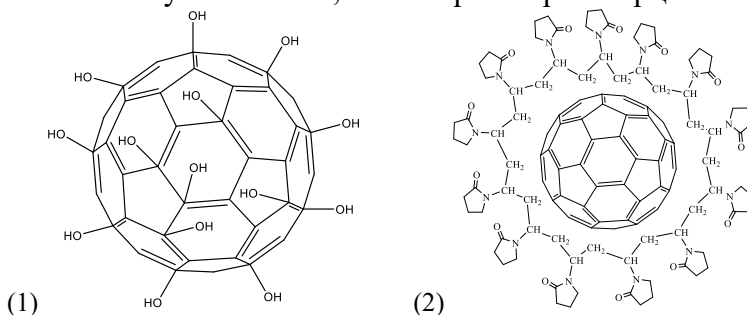
Модифицированные формы фуллерена исследуются в настоящее время также в качестве радикальных ловушек, антиоксидантов и носителей генов и лекарств [2].

Фуллерены обладают высокой степенью стабильности и низкой токсичностью для организма человека. Так как в них можно инкапсулировать различные молекулы с лечебным назначением (антибиотики, гормоны, витамины, а также металлы), а снаружи к углеродному каркасу легко присоединить органические молекулы, то уникальные транспортировочные свойства позволяют использовать фуллерены для противоопухолевого лечения [3].

В последнее время исследования сосредоточены на разработке производных фуллеренов для применения в различных областях биологии и медицины, включая профилактику и лечение различных заболеваний. Исследования указывают на возможность подавления фуллеренами окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, т.е. они оказывают цитопротекторное действие на клетки [4]. 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.

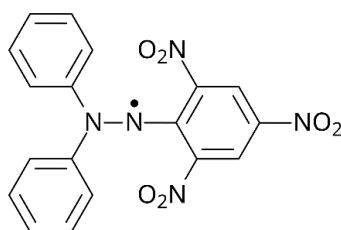
**Цель исследования.** Изучить антиоксидантную активность (АОА) водорастворимых модификаций фуллерена:  $C_{60}(OH)_{24}$  и  $C_{60}$ Поливинилпирролидона в сравнении с глутатионом с помощью DPPH

**Материал и методы.** Материалами исследования служили водные растворы фуллеренов  $C_{60}(OH)_{24}$ ,  $C_{60}$ Поливинилпирролидон (Рис. 1) в концентрации 1 мМ, полученные в НИЦ "Курчатовский институт" – ПИЯФ, и 1 мМ растворы кверцетина и глутатиона.



**Рисунок 1.** Формулы водорастворимых фуллеренов: 1 –  $C_{60}(OH)_{24}$ , 2 –  $C_{60}$ Поливинилпирролидон

Антиоксидантная активность тестируемых модификаций водорастворимых фуллеренов изучалась методом DPPH с использованием спектрофотометра PV 1251C Solar (Республика Беларусь). Метод основан на измерении восстанавливающей способности исследуемых образцов по отношению к хромогенному радикалу 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу (Рис. 2), которая пропорциональна скорости снижения оптической плотности (мД/с). Реакция протекает по схеме:  $DPPH\cdot + AH \rightarrow DPPH-H + A^*$ .



**Рисунок 2.** Формула DPPH•

Навеску 0,0025 г. DPPH растворяли в 50 мл 96% этанола для получения исходного раствора. К 2,1 мл исходного раствора DPPH добавляли по 0,3 мл 1 мМ водорастворимых модификаций фуллерена, перемешивали и регистрировали оптическую плотность системы каждые 15 минут на протяжении часа при длине волны 514 нм (максимум поглощения DPPH в этаноле). В качестве растворов сравнения использовали 1 мМ растворы кверцетина и глутатиона. Антиоксидантную активность определяли по формуле:

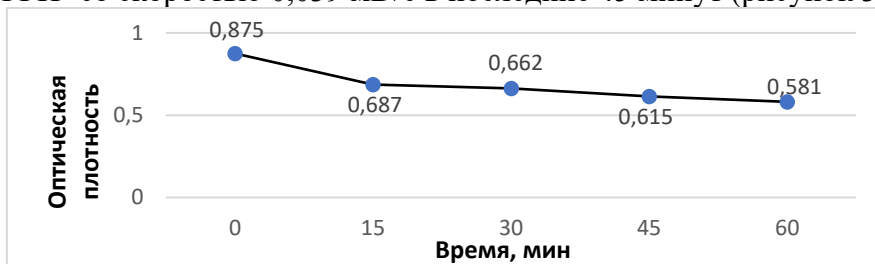
$$AOA = (D_{\lambda(\text{контроль})} - D_{\lambda(\text{опыт})}) / D_{\lambda(\text{контроль})} \times 100\%$$

В результате восстановления DPPH• антиоксидантом уменьшается интенсивность окраски. Степень ее снижения свидетельствует о восстановительных (антиоксидантных) свойствах исследуемых веществ. Была рассчитана скорость остаточного восстановления DPPH• в интервале 15-60 минут.

#### **Результаты исследования.**

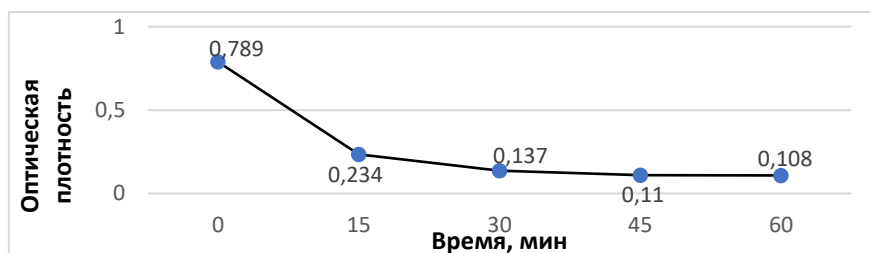
На рисунках 3-6 представлены данные об изменении оптической плотности реакционных систем в присутствии  $C_{60}(OH)_{24}$ ,  $C_{60}$ Поливинилпирролидона, глутатиона и кверцетина с интервалом 15 минут на протяжении 60 минут. Следует отметить значительные изменения в первые 15 минут при использовании в качестве ингибитора всех исследуемых веществ, в связи с чем был рассчитан показатель антиоксидантной активности по формуле, приведенной в Материалах и методах исследования. Для оценки интервала 15-60 минут была рассчитана скорость остаточного антирадикального действия  $C_{60}(OH)_{24}$ ,  $C_{60}$ Поливинилпирролидона, глутатиона и кверцетина, которая подтверждала продолжительность ингибирующих свойств.

При добавлении в реакционную среду  $C_{60}(OH)_{24}$  происходит постепенное восстановление DPPH• со скоростью 0,039 мД/с в последние 45 минут (рисунок 3).



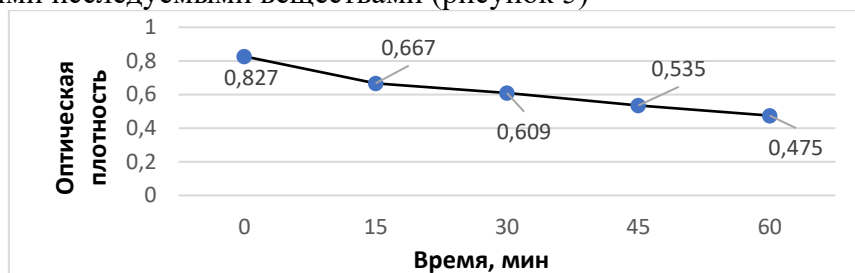
**Рисунок 3.** Динамика изменения оптической плотности в системе DPPH• с  $C_{60}(OH)_{24}$  на протяжении 60 минут.

Рисунок 4 демонстрирует процесс нейтрализации DPPH• путем восстановления  $C_{60}$ Поливинилпирролидоном, который протекает со скоростью 0,047 мД/с в последние 45 минут.



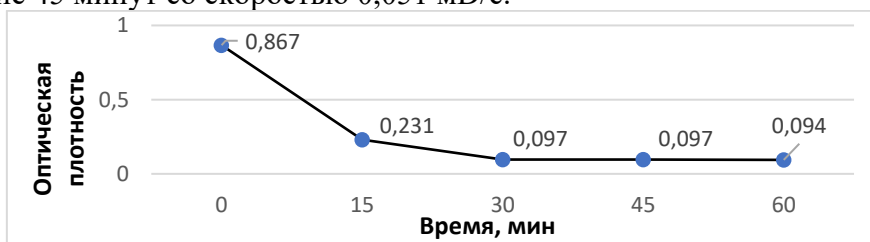
**Рисунок 4.** Динамика изменения оптической плотности в системе DPPH• с  $C_{60}$ Поливинилпирролидоном на протяжении 60 минут.

Динамика противорадикальной активности глутатиона протекает со скоростью 0,071 мД/с в последние 45 минут, что подтверждает его длительную эффективность по сравнению с другими исследуемыми веществами (рисунок 5)



**Рисунок 5.** Динамика изменения оптической плотности в системе DPPH• с глутатионом на протяжении 60 минут.

В настоящем исследовании кверцетин и глутатион (рисунок 5) использовались в качестве стандартов при оценке антиоксидантной активности водорастворимых модификаций фуллера как потенциальных антиоксидантов. На рисунке 6 представлена динамика изменения противорадикальной способности кверцетина. Результаты исследования указывают на то, что процесс нейтрализации свободных радикалов происходит относительно быстро в последние 45 минут со скоростью 0,051 мД/с.



**Рисунок 6.** Динамика изменения оптической плотности в системе DPPH• с кверцетином на протяжении 60 минут.

Полученные данные позволили судить об антиокислительной активности исследуемых веществ и скорости остаточного восстановления DPPH• в интервале 15-60 минут, которая указывала на длительность действия ингибитора (Таблица 1).

**Таблица 1.** Антиоксидантная активность и скорость остаточного восстановления DPPH• в интервале 15-60 минут исследуемых веществ: C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>, C<sub>60</sub>Поливинилпирролидон, глутатион и кверцетин

Вещество	АОА, %	Скорость остаточного восстановления DPPH• в интервале 15- 60 минут, мD/c
Кверцетин	73	0,051
C <sub>60</sub> Поливинилпирролидон	70	0,047
C <sub>60</sub> (OH) <sub>24</sub>	22	0,039
Глутатион	19	0,071

**Заключение.** Было установлено, что водорастворимые модификации фуллерена – C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>, C<sub>60</sub>Поливинилпирролидон – обладают хорошей антиоксидантной активностью, являясь эффективными радикальными ловушками (величина АОА более 10% свидетельствует о наличии АОА). При этом C<sub>60</sub>Поливинилпирролидон проявляет более высокую антиокислительную активность, определяемую методом DPPH, по сравнению с C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> и глутатионом. Значение антиоксидантной активности кверцетина как стандарта (АОА=89%) показало значение схожее с C<sub>60</sub>Поливинилпирролидоном (АОА=82%), что свидетельствует о хороших ингибирующих свойствах последнего. Исследование скорости остаточного восстановления DPPH• в интервале 15-60 минут показало, что глутатион, кверцетин и C<sub>60</sub>Поливинилпирролидон эффективно проявляют свои ингибирующие свойства на протяжении времени по сравнению с C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>.

Исследование антиокислительных свойств фуллеренов является современным и перспективным направлением медицины, так как имеет потенциал в отношении разработки инновационных терапевтических средств. Дальнейшее изучение механизмов действия фуллеренов и проведение клинических испытаний необходимы для реализации их лечебного потенциала.

#### **Список литературы:**

1. Biswas, R. Water-Soluble Fullerene Monoderivatives for Biomedical Applications. / R. Biswas, Da Rocha C. Batista, R.A. Bennick, J.Zhang // ChemMedChem. – 2023. – Vol. 18, P. 20.
2. Injac R. Fullerenol nanoparticles: toxicity and antioxidant activity. / R. Injac, M. Prijatelj, B. Strukelj // Methods Mol Biol. – 2013. – Vol. 1028, P. 75-100.
3. Piao-Yang Xu. Progress in Antiviral Fullerene Research/ Piao-Yang Xu [et all] // Nanomaterials (Basel). – 2022. – №12 – P. 2547.
4. Helinor J Johnston The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity / Helinor J Johnston [et all] // Toxicol Sci. – 2010. – №114 – P. 162–182.
5. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical/ / M. S. Blois // Nature, 1958. V. 26. P. 1198– 1200