

М. А. Думпис¹, В. М. Прокопенко², Е. В. Литасова², А. В. Арутюнян²,
Л. Б. Пиотровский¹

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИЦИИ ФУЛЛЕРЕН C₆₀/ДГКЦ

¹ ФБГНУ ИЭМ, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12.

² БГУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, Россия, 199034, Санкт-Петербург, В. О. Менделеевская линия, д. 3.

Получен комплекс фуллерена C₆₀ с дигидрокверцетином (ДГКЦ) и методом хемиллюминесценции изучено его биологическое действие на модельной системе. Показано, что комплекс C₆₀/ДГКЦ обладает антиоксидантной активностью, что предполагает дальнейшее изучение его биологических эффектов. Для установления строения полученного комплекса эта работа будет продолжена с применением методов ВЭЖХ анализа и спектроскопии ЯМР.

Ключевые слова: фуллерен C₆₀; дигидроквертицин; антиоксидантная активность.

Несмотря на прогресс фундаментальной и прикладной науки в создании новых лекарственных препаратов, остаются актуальными проблемы их доставки в патологический очаг организма и достижения их устойчивости в физиологических условиях. При поиске новых лекарственных веществ в настоящее время внимание исследователей привлекают наноматериалы и создание комплексов различных препаратов на основе наноматериалов, среди которых, безусловно, перспективным с точки зрения применения в биологии и медицине является фуллерен C₆₀ (C₆₀), обладающий уникальными физико-химическими, химическими и биологическими свойствами [1 – 3].

Известно, что в различных условиях C₆₀ может проявлять 3 типа биологической активности: антиоксидантную (“radical sponge”), оксидантную и мембранотропную [1 – 4]. Препятствием для полного проявления биологических эффектов C₆₀ является его чрезвычайно низкая нерастворимость в воде. Поэтому представляет интерес создание композиции, содержащей 2 антиоксиданта: C₆₀ и растворимого в воде дигидрокверцетина (таксифолин, ДГКЦ), и изучение биологических эффектов такого комплекса.

ДГКЦ, представитель довольно ограниченной группы флавононов, создан на основе природного сырья. Действие ДГКЦ направлено против свободных радикалов, отвечающих за возникновение целого ряда заболеваний, в числе которых рак, атеросклероз, инфаркт, инсульт и др. Препарат обладает выраженной антиоксидантной активностью, блокирует, нейтрализует и выводит из организма избыток свободных радикалов, проявляет антиоксидантное действие, защищая печень от гепатотропных ядов [5 – 9].

В композициях лекарственных веществ возможно их взаимодействие, приводящее к синергизму или антагонизму терапевтического эффекта и, наконец, к антидотизму — химическому взаимодействию веществ между собой с образованием неактивных продуктов. Поэтому при создании комплекса C₆₀/ДГКЦ необходимо учитывать совместимость и взаимодействие 2 компонентов [10].

В связи с этим первоочередной задачей нашей работы стало выяснение взаимного влияния C₆₀ и ДГКЦ на биологическую активность и, в частности, на величину антиоксидантного эффекта ДГКЦ в композиции C₆₀/ДГКЦ. Для этой цели использована хемиллюминесцентная реакция рибофлавина в присутствии ионов двухвалентного железа и перекиси водорода [11].

Экспериментальная химическая часть

В работе использовали C₆₀ (99,5 %) производства компании NeoTechProduct (Санкт-Петербург, Россия), и ДГКЦ производства компании “МедЭкоПроект”, (Москва, Россия). УФ-спектры снимали на спектрофотометре Beckman Coulter DU 800 (USA) в воде, ИК-спектры — на спектрофотометре SHIMADZU FTIR 8400S.

Синтез C₆₀/ДГКЦ осуществлен в НИИЭМ.

Пример 1. C₆₀ 5 мг (~0,007 моль) растворяют в 130 мл безводного бензола и прибавляют раствор 18,5 мг ДГКЦ (0,014 моль) в 35 мл абсолютного этанола. Нагревают реакционную смесь до 40 °С при перемешивании на магнитной мешалке, затем поднимают температуру до 60 °С и перемешивают в течение 24 ч. При охлаждении реакционной смеси на стенках реакционного сосуда из реакционной смеси выделяется фуллерен C₆₀. Отделяют непрореагировавший фуллерен, отгоняют растворители в вакууме на ротационном испарителе и сухой остаток растворяют в дистиллированной воде. Фильтруют, фильтрат упаривают досуха, получают осадок коричневого цвета. Сушат остаток в вакуумном шкафу над P₂O₅ до постоянной массы. Получают 10 мг.

Пример 2. C₆₀ 25 мг (~0,035 моль) растворяют в 150 мл безводного бензола и прибавляют раствор 92,5 мг ДГКЦ (0,07 моль) в 100 мл метанола. Нагревают реакционную смесь до 40 °С при перемешивании на магнитной мешалке, затем поднимают температуру до 60 °С и перемешивают 24 ч. При охлаждении реакционной смеси на стенках реакционного сосуда из реакционной смеси выделяется фуллерен C₆₀. Отделяют непрореагировавший фуллерен, отгоняют растворители

ли в вакууме на ротационном испарителе и сухой остаток растворяют в дистиллированной воде. Фильтруют и фильтрат упаривают досуха, получают светло-желтый, почти неокрашенный осадок, что свидетельствует о том, что реакция не прошла. Соединяют непрореагировавшие компоненты, к полученной смеси прибавляют 50 мл безводного толуола и 10 мл абсолютного этанола и 5–7 мл безводного хлороформа. Перемешивают 24 ч при 60 °С. Отгоняют растворители в вакууме на ротационном испарителе и сухой остаток растворяют в дистиллированной воде. Фильтруют и фильтрат упаривают в вакууме досуха, получают осадок коричневого цвета. Сушат остаток в вакуумном шкафу над P₂O₅ до постоянной массы. Получают 67 мг.

В ИК-спектре композиции C₆₀/ДГКЦ наблюдаются полосы поглощения обоих компонентов. Отношение УФ-спектров C₆₀ и C₆₀/ДГКЦ позволяет говорить о наличии фуллерена в исследуемой композиции.

Определенное по данным УФ-спектров содержание C₆₀ в полученной композиции составляет 0,06 %.

Экспериментальная фармакологическая часть

Антиоксидантную активность (АОА) исследуемых веществ определяли методом хемилюминесценции. Измерение свечения — величину светосуммы (СС) — осуществляли при комнатной температуре в течение 60 с на биохемилюминесцентном приборе БХЛ-06М (Нижний Новгород, Россия).

Модельная система содержала: 710 мкл фосфатного буфера (рН 9,0), 100 мкл H₂O, 40 мкл рибофлавина (10 мМ), 50 мкл FeSO₄ × 7H₂O (25 мМ). Инициировали процесс введением 100 мкл 0,1 % H₂O₂. В опытный вариант вместо H₂O вносили исследуемые соединения в разной концентрации. АОА выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$\text{АОА (\%)} = (1 - \text{СС}_{\text{опыт}}/\text{СС}_{\text{мод}}) \cdot 100.$$

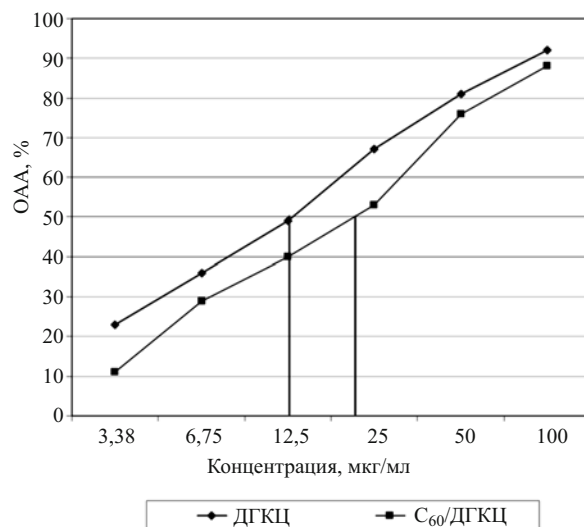
Величину СС (таблица) выражали в относительных единицах (1 отн.ед. соответствовала 1 мВ). Об эффективности исследуемых соединений судили, сравнивая величину их концентраций, уменьшающих СС модельной системы на 50 % (I₅₀).

Результаты исследования АОА C₆₀/ДГКЦ в сравнении с ДГКЦ приведены на рисунке.

Определение АОА C₆₀/ДГКЦ методом хемилюминесцентного анализа на модели с рибофлавином показало, что присоединение фуллерена C₆₀ к ДГКЦ с образованием композиции компонентов не ухудшает антиоксидантных свойств ДГКЦ.

Результаты и их обсуждение

Создание композиции C₆₀/ДГКЦ осложнялось различием растворимости компонентов в гидрофильных и липофильных растворителях, что требовало подбора системы растворителей, позволяющей создать гомогенный раствор без выпадения в осадок исходных ве-



АОА комплекса C₆₀/ДГКЦ.

ществ. C₆₀ хорошо растворяется в дихлорбензоле, хуже — в толуоле и бензоле. Применение дихлорбензола при получении биологически активных веществ резко ограничено из-за его высокой токсичности, а высокая температура кипения — 180–183 °С — препятствует его полному удалению из реакции при выделении полученных продуктов реакции. В работе использовали бензол, растворитель с наиболее низкой температурой кипения, равной 80,1 °С и толуол — 110 °С. Для растворения ДГКЦ можно использовать этанол или метанол.

Растворимость различных соединений в смесях растворителей резко отличается от растворимости в индивидуальных растворителях. Для достижения гомогенности реакционной массы были исследованы смеси бензол — этанол и бензол — метанол. При проведении реакции в смеси бензол — метанол в условиях, аналогичных её проведению в смеси бензол — этанол, выделялись исходные компоненты, поэтому для полнейшего прохождения реакции в реакционную массу прибавляли безводный хлороформ (соотношение растворителей см. в экспериментальной части). При этом C₆₀ вступал в реакцию практически полностью.

Зависимость величины СС от концентрации ДГКЦ и его композиции с фуллереном C₆₀

Концентрация, мкг/мл	Средняя величина СС, отн. ед., n = 3		Ингибирование модели, %	
	ДГКЦ	C ₆₀ /ДГКЦ	ДГКЦ	C ₆₀ /ДГКЦ
3,38	111,4	128,8	22,7	10,7
6,75	92,9	102,6	35,6	28,8
12,5	73,2	87,1	49,0	39,6
25	47,8	68,1	66,8	52,8
50	27,4	35,1	81,0	75,6
100	11,0	16,6	92,0	88
Модель (n = 6)	144,2 ± 4,4			

Элементный анализ комплексов и композиций различных соединений не может служить подтверждением вхождения в комплекс отдельных компонентов. Для подтверждения образования комплекса C_{60} /ДГКЦ были сняты УФ- и ИК-спектры.

В ИК-спектре C_{60} /ДГКЦ наблюдаются полосы поглощения обоих компонентов. В спектре C_{60} ярко выражены 4 полосы поглощения — при 1429, 1183, 577 и 528 см^{-1} . ИК-спектр ДГКЦ содержит 2 полосы поглощения, близкие по значению с полосами поглощения C_{60} , — 1421 и 1185 см^{-1} , поэтому оценивались полосы поглощения, находящиеся в других областях спектра. При сравнении положения в спектре полос поглощения, относящихся к C_{60} , наблюдается некоторый сдвиг в коротковолновую часть спектра — 538,1 и 593,07 с одновременным расширением пиков. В области 778, 825 и 1019 см^{-1} присутствуют полосы поглощения, относящиеся к ДГКЦ — 777, 825 и 1022 см^{-1} .

Полосы поглощения в УФ-спектрах C_{60} и ДГКЦ в области 330 нм перекрываются, но отношение спектров C_{60} и C_{60} /ДГКЦ позволяет говорить о наличии фуллерена в исследуемой композиции. Полосы поглощения ДГКЦ и C_{60} /ДГКЦ в смеси этанол — вода (1:1) при 285 нм свидетельствуют о наличии в композиции ДГКЦ. Однако эти данные не могут быть абсолютно доказательны из-за перекрывания полос поглощения фуллерена C_{60} и ДГКЦ в УФ-спектре.

При определении соотношения плотностей УФ-спектров различных концентраций комплекса мы не получили теоретически идеальных прямых линий. Это свидетельствует о присутствии в растворе супрамолекулярного комплекса, тонкие детали строения ко-

торого зависят от степени разведения. Такие супрамолекулы, помимо собственного модулирующего влияния на клетки, могут служить транспортерами при адресной доставке фуллерен-конъюгатов и самих фуллеренов к биологическим мишеням в организме, что представляет собой особый интерес при изучении биологических свойств фуллеренов и их комплексов с лекарственными веществами.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. B. Piotrovsky, *Biological activity of pristine fullerene C_{60}* , Carbon nanotechnology, L. Dai (ed.), Elsevier, Dayton, USA (2006).
2. T. Da Ros and M. Prato, *Chem. Commun.*, 663 – 669 (1999).
3. J. Kolosnjaj, H. Szwarc and F. Moussa, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **620**, 168 – 180 (2007).
4. L. B. Piotrovsky, M. A. Dumpis, E. V. Litasova, et al., *FULLER NANOTUB CAR N.*, **19**(1), 147 – 153 (2011).
5. Патент России № 2014841, *Бюл. изобрет.*, № 12 (1994).
6. В. К. Колхир, Н. А. Тюкавкина, В. А. Быков и др., *Хим.-фарм. журн.*, **29**(9), 61 (1995); *Pharm. Chem. J.*, **29**(9), 657 – 660 (1995).
7. C. Kandaswani, E. Perkins, G. Dizewiecki, et al., *Anticancer Drugs*, **3**(5), 525 – 530 (1992).
8. Т. Ю. Ильюченко, А. И. Хоменко, Л. Б. Фригидова и др., *Фармакол. и токсикол.*, **38**(5), 607 (1975).
9. В. А. Бабкин, Л. А. Остроухова, Н. Н. Трофимова, *Биомасса лиственницы: от химического состава до инновационных продуктов*, Сибирское отд. РАН, Иркутск (2011).
10. Н. Б. Мельникова, И. Д. Иоффе, *Химия растит. сырья*, № 4, 25 – 33 (2001).
11. Ф. Е. Путилина, О. В. Галкина, *Практикум по свободнорадикальному окислению*, СПб. Гос. Ун-т., Санкт-Петербург (2006), с. 82.

Поступила 02.04.16

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF FULLERENE C_{60} /DIHYDROQUERCETIN COMPOSITION

M. A. Dumpis¹, V. M. Prokopenko², E. V. Litasova², A. V. Arutyunyan², and L. B. Piotrovskii¹

¹ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

² D. O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia

A complex of fullerene C_{60} complex with dihydroquercetin (DHQC) was synthesized and its biological activity on a model system was studied by the chemiluminometric method. It is established that the obtained C_{60} /DHQC complex has antioxidant activity, which implies the need for further investigation of its structure and biological effects. In continuation of this work, the structure of C_{60} /DHQC complexes will be studied using HPLC analysis and NMR spectroscopy techniques.

Keywords: fullerene C_{60} ; dihydroquercetin; complex; antioxidant activity.