

УДК 548.736.1:546.26-126:541.183:532.64

ВЛИЯНИЕ ЛИПОФИЛЬНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C_{60} НА ИХ СПОСОБНОСТЬ ИНГИБИРОВАТЬ ПЕРОКСИДНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Ю.Г. Богданова, А.А. Тепанов, В.А. Иоутси¹, В.С. Романова², Г.Н. Богданов³,
Р.А. Котельникова³, Д.В. Мищенко³, А.Ю. Рыбкин³, А. И. Котельников³

(кафедра коллоидной химии; e-mail: yulibogd@yandex.ru)

Методом динамического светорассеяния исследованы водные растворы производных фуллера C_{60} и методом хемилюминесценции изучено их влияние на процесс пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в водной среде. Показано, что коллоидная растворимость в воде, которая определяет антиоксидантную активность производных фуллера C_{60} в процессе ПОЛ, контролируется химическим строением адденда, присоединенного к C_{60} . Для изученных производных установлена прямая зависимость эффективности ингибирования ПОЛ от липофильности.

Ключевые слова: производные фуллера C_{60} , хемилюминесценция, антиоксидантная активность.

В настоящее время активно развиваются исследования в направлениях поиска путей синтеза водорастворимых производных фуллера C_{60} (ВПФ) и изучения их влияния на биообъекты в целях создания на основе ВПФ препаратов для медицины и фармакологии. Известно, что при разных патологиях интенсифицируются процессы пероксидного окисления липидов (ПОЛ), которые можно рассматривать как частный случай цепного окисления органических соединений молекулярным кислородом [1]. В то же время свободнорадикальный механизм ПОЛ и его торможение биоантиоксидантами играют важную роль в регуляции процессов пролиферации клеток, размножения бактерий и некоторых вирусов, а также в резистентности живых систем к окислительному стрессу [2]. Именно поэтому в современной фармакологии антиоксиданты составляют самостоятельный разряд, содержащий несколько классов и групп лекарственных препаратов [3]. Высокая антиоксидантная активность в сочетании со способностью водорастворимых производных фуллера C_{60} проявлять нейропротекторное действие при разных деменциях, а также предупреждать гибель нейронов, предотвращая нарушение долговременной памяти и оказывая выраженное стимулирующее действие на центральные дофаминовые рецепторы [4], делает их весьма перспективными объектами для разработки лекарственных средств целевого назначения.

В ряду известных синтетических подходов к созданию ВПФ можно выделить два стратегических направления: присоединение к C_{60} фрагментов, способных оказывать терапевтический эффект, и введение гидрофильных аддендов с целью повысить растворимость в воде производных C_{60} для эффективного включения их в клеточный метаболизм. При планировании направленного синтеза ВПФ необходима информация о коллоидно-химических свойствах новых и уже известных объектов, а ее в научной литературе очень мало. В частности, в большинстве работ не уточняется, являются растворы ВПФ молекулярными или коллоидными [5]. Открытым остается вопрос о том, до каких пределов целесообразно увеличивать растворимость производных C_{60} в воде для того, чтобы обеспечить оптимальное фармакокинетическое поведение, в частности, проницаемость через липидный бислой клеточных и цитоплазматических мембран и включаться в клеточный метаболизм.

Цель данной работы – выявить взаимосвязь растворимости ВПФ в воде и их антиоксидантной активности в процессе пероксидного окисления липидов в водной среде.

При исследовании фармакокинетики лекарственных средств важную роль играет гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) – характеристика дифильных соединений, отражающая сродство вещества к полярным и неполярным фазам [6, 7]. Как правило,

¹РНИМУ им. Н.И.Пирогова, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; ²ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, ГСП-1, Москва, В-334, ул. Вавилова, д. 28; ³ИПХФ РАН, 142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр-т Академика Семенова, д. 1

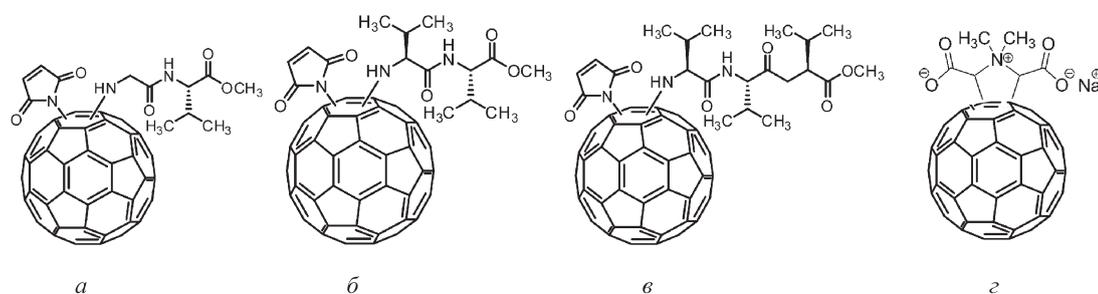


Рис. 1. Структурные формулы АПФ: *a* – метиловый эфир N-[(N-малеимидил)фуллеренил]-L-валил-L-валина; *b* – метиловый эфир N-[(N-малеимидил)фуллеренил]-глицил-L-валина; *c* – метиловый эфир N-[(N-малеимидил)фуллеренил]-L-валил-L-валил-L-валина; *z* – структурная формула натриевой соли N,N-диметил-3,4-фуллоропирролидиний-2,5-дикарбоновой кислоты (FPsh-29)

ГЛБ используют для выбора поверхностно-активных веществ (ПАВ) в качестве стабилизаторов прямых или обратных эмульсий, однако его роль для веществ, проявляющих различные виды биологической активности, трудно переоценить. Для расчета ГЛБ существует ряд методов [6], но в рамках данной работы его определение оказалось невозможным как из-за малых количеств синтетических образцов, так и по причине отсутствия данных о групповом числе фуллерена C_{60} . Поэтому в качестве альтернативного параметра, отражающего сродство ВПФ к воде, использовали условную величину растворимости – концентрацию, соответствующую размеру частиц ВПФ в растворе, близкому к характеристическому размеру молекулы. Объектами исследования служили аминокислотные производные C_{60} (АПФ):

метиловый эфир N-[(N-малеимидил)фуллеренил]-L-валил-L-валина (рис. 1, *a*),

метиловый эфир N-[(N-малеимидил)фуллеренил]-глицил-L-валина (рис. 1, *b*),

метиловый эфир N-[(N-малеимидил)фуллеренил]-L-валил-L-валил-L-валина (рис. 1, *c*).

Далее для этих веществ будут использованы сокращения *ValVal*, *GlyVal* и *ValValVal* соответственно. Также была исследована натриевая соль N,N-диметил-3,4-фуллоропирролидиний-2,5-дикарбоновой кислоты (FPsh-29, рис. 1, *z*)

Все синтетические образцы представляют собой концентрированные водные дисперсии с известной концентрацией ВПФ, определенной по массе не испаряемого остатка аликвот известного объема (табл. 1); точность определения массы и объема 1 мг и 10 мкл соответственно.

Для оценки молекулярной растворимости ВПФ методом динамического светорассеяния определяли размеры частиц ВПФ в водных растворах с разной

концентрацией (табл. 1), которые готовили разбавлением аликвот исходных синтетических образцов дистиллированной водой, обеспыленной фильтрованием через мембранные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,45 мкм. Измерения* проводили на приборе «Zeta Trac», США при 20°C.

Антиоксидантную активность ВПФ исследовали методом хемилюминесценции (ХЛ) при окислении гомогената головного мозга крыс (ГГМ), инициированного *trans*-бутил-гидропероксидом (ГПТБ). В качестве ХЛ-зонда использовали люминол [8]. Системы для жидкофазного окисления (табл. 2) получали следующим образом. Раствор люминола ($C = 5 \times 10^{-4}$ М) готовили разбавлением бидистиллированной водой исходного раствора люминола («Sigma Aldrich», «ч.д.а.») в этаноле («Sigma Aldrich», «ч.д.а.»). Концентрация приготовленного по весу исходного раствора люминола (C_0) составляла 10^{-2} М. Раствор ГПТБ получали 10-кратным разбавлением исходного раствора («Sigma Aldrich», «ч.д.а.») бидистиллятом. Исходный раствор буфера Трис-НСl (0,5 М) разбавляли бидистиллятом до концентрации 0,1 М. Гомогенат готовили в гомогенизаторе Поттера из ткани головного мозга крыс (на 1 г ткани мозга брали 8 мл буфера). Дисперсию ГГМ разбавляли бидистиллятом до концентрации белка

Таблица 1

Концентрация ВПФ в исходных дисперсиях

Соединение	C , М
<i>ValVal</i>	$4,2 \times 10^{-4}$
<i>GlyVal</i>	3×10^{-4}
<i>ValValVal</i>	$5,2 \times 10^{-5}$
FPsh-29	$2,2 \times 10^{-4}$

*Диапазон измеряемых размеров $r = (0,6-6500)$ нм, где r – радиус частицы.

Т а б л и ц а 2

Состав систем жидкофазного окисления

Вещество	Исходная концентрация, М	Добавляемый объем, мл	Конечная концентрация в пробе, М
Люминол	5×10^{-4}	0,2	5×10^{-5}
Гомогенат	белок 1 мг/мл	0,2	0,1 мг/мл
Исследуемое вещество	5×10^{-5}	0,2	$4,5 \times 10^{-6}$
Буфер Трис-НСl (рН 7,4)	0,1	1,4	0,06
ГПТБ	0,73 (7%)	0,2	0,073 (0,7%)

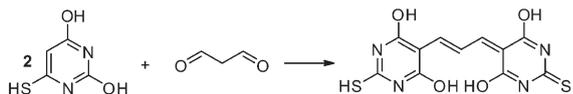
1 мг/мл. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [9]. Регистрацию интенсивности свечения люминола проводили при 33°C на хемилуцинометре «Luminometr-1250 LKB Wallak».

Экспериментальные кинетические кривые анализировали компьютерной программой прибора. Расчет интегральной интенсивности свечения люминола проводили по 512 точкам кинетической зависимости $I = f(t)$ интенсивности свечения люминола от времени реакции жидкофазного окисления ГГМ в присутствии ВПФ. Антиоксидантную активность ВПФ сопоставляли, сравнивая эффективность тушения свечения люминола E_e , которую рассчитывали по уравнению

$$E_e = (I_k - I)/I,$$

где I_k и I – интегральная интенсивность свечения (светосумма) люминола в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно.

Степень ПОЛ в субклеточном ГГМ определяли по содержанию в образцах малонового диальдегида (МДА) – продукта окисления полиненасыщенных жирных кислот [10], способного реагировать с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса с характерным пиком поглощения при 532 нм по схеме:



Содержание МДА определяли по следующей методике. В центрифужные пробирки помещали 2,5 мл дисперсии субклеточного ГГМ в К-На-фосфатном буферном растворе (рН 7,4) и 1 мл 17%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Смесь центрифугировали 10 мин при 3000g на центрифуге К-23 и декантацией отделяли жидкую фракцию (супернатант), 2 мл супернатанта переносили в аналитические пробирки. В

пробы добавляли по 1 мл 0,8%-го раствора тиобарбитуровой кислоты. Пробирки с образцами помещали на 30 мин на водяную баню при 100°C. После термостатирования пробы охлаждали до комнатной температуры и регистрировали оптическую плотность растворов при длине волны 532 нм. В качестве контроля использовали К-На-фосфатный буфер. Концентрацию МДА в пробе определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности D_{532} при молярном коэффициенте экстинкции комплекса $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [10] и пересчитывали количество МДА в единицах $[K] = \text{мкмоль/г}_{\text{ткани}}$. Точность определения (K) составляла ~5%.

Сопоставление средних радиусов частиц, определенных методом динамического светорассеяния, с характеристическими размерами молекул ВПФ, полученными путем квантово-химических расчетов молекул в газовой фазе методом AM1 (табл. 3) показывает, что все исследованные растворы АПФ являются коллоидными (рис. 2), что согласуется с полученными ранее данными [11].

Средний размер частиц дисперсной фазы увеличивается при увеличении концентрации АПФ и увеличении молекулярной массы дипептидного адденда. При разбавлении растворов наблюдается сужение пика распределения частиц по размерам, что свидетельствует об уменьшении полидисперсности растворов при снижении концентрации АПФ в водном растворе.

Т а б л и ц а 3

Характеристические размеры молекул ВПФ, рассчитанные методом AM 1; D – диаметр

ВПФ	ValValVal	ValVal	GlyVal	FPsh-29
D, нм	1,8	1,6	1,5	1,1

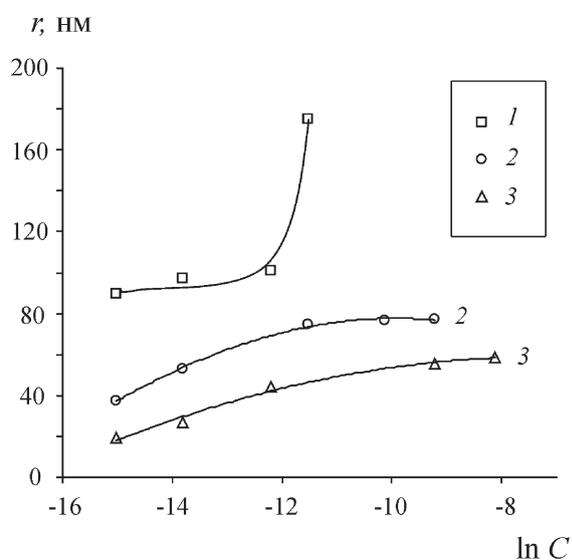


Рис. 2. Зависимость средних радиусов частиц в растворе от концентрации АПФ: 1 – ValValVal, 2 – ValVal, 3 – GlyVal

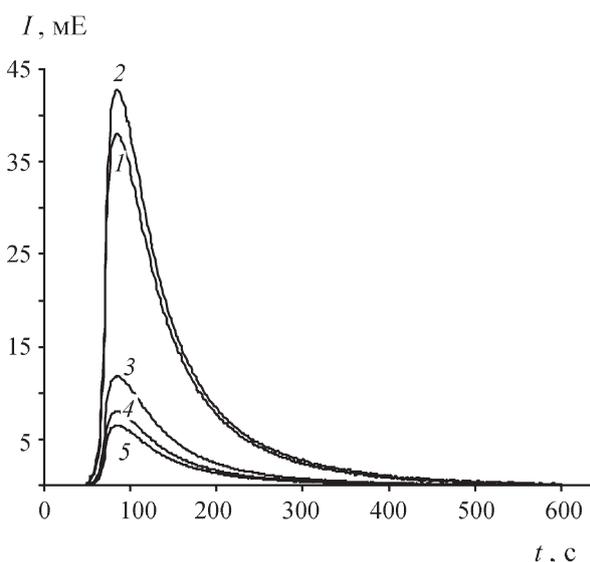


Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесценции люминола в ГДМ в контрольном образце (1) и в присутствии ВПФ: *FPsh-29* (2), *GlyVal* (3), *ValVal* (4), *ValValVal* (5)

С использованием уравнений кривых, аппроксимирующих зависимости $r = f(C)$ (рис. 3), и данных о характеристических размерах молекул (табл. 3) была определена условная величина C_m , отражающая растворимость АПФ в воде. Она составила $12,0 \times 10^{-8}$ М для *GlyVal* и $5,6 \times 10^{-8}$ М для *ValVal*. Определить таким способом величину C_m для *ValValVal* не удалось, однако ход зависимости $r = f(C)$ позволяет ожидать, что для *ValValVal* эта величина на несколько порядков ниже, чем для *GlyVal* и *ValVal*.

В растворах *FPsh-29* с концентрацией в интервале C от 1×10^{-6} до $2,2 \times 10^{-5}$ М не фиксируется образование ассоциатов. Сопоставление нижнего предела из-

мерений прибора ($r = 0,6$ нм) с характеристическими размерами молекулы *FPsh-29* (табл. 2) позволяет полагать, что в указанном концентрационном диапазоне соединение находится в растворе в виде юнимеров. С течением времени средний размер частиц *FPsh-29* увеличивается (до 70 нм для раствора $C = 1 \times 10^{-6}$). Таким образом, водные растворы производных C_{60} с плохо экранированной фуллереновой сферой являются агрегативно неустойчивыми лиофобными системами.

Результаты динамического светорассеяния показывают, что в ряду *ValValVal* \ll *ValVal* \ll *GlyVal* \ll *FPsh-29* растворимость в воде увеличивается. В этом же ряду для АПФ уменьшается эффективность тушения хемилюминесценции люминола при окислении ГДМ: величина максимума свечения зависимостей $I = f(t)$ (рис. 3) уменьшается при увеличении молекулярной массы дипептидного адденда в ряду *GlyVal* \rightarrow *ValVal* \rightarrow *ValValVal*.

Сопоставление зависимостей $I = f(t)$ для контрольного образца и образца, содержащего *FPsh-29*, указывают на незначительное проокислительное действие *FPsh-29*. Полученный результат является нетривиальным, и для его объяснения требуются дополнительные исследования.

Известно, что при облучении светом C_{60} и некоторые его производные способны генерировать активные формы кислорода (АФК) [12], что обуславливает их проокислительную активность. Возможно, проокислительный эффект *FPsh-29* объясняется фотодинамическими свойствами соединения. Не исключено, что смешение компонентов системы жидкофазного окисления, содержащей *FPsh-29*, в темноте может привести к другому экспериментальному результату.

Значения эффективности тушения хемилюминесценции люминола (E_e) хорошо коррелируют с концентрацией МДА в исследуемых системах, содержащих АПФ, по окончании окисления (табл. 4). Этот резуль-

Таблица 4

Влияние АПФ на интенсивность свечения люминола при окислении ГДМ и на содержание малонового диальдегида (конечного продукта окисления) в образце

Контроль	E_e , %	K , мкг/г (ткани)
	0	$7,65 \pm 0,31$
<i>Gly-Val</i>	18 ± 2	$6,12 \pm 0,25$
<i>Val-Val</i>	22 ± 2	$5,53 \pm 0,22$
<i>Val-Val-Val</i>	32 ± 2	$4,28 \pm 0,12$

тат свидетельствует о корректности метода хемиллюминесценции для изучения скорости генерирования радикалов в исследованных системах.

Полученные результаты показывают, что эффективность ингибирования ПОЛ производными C_{60} определяется растворимостью этих соединений в воде, причем максимальное ингибирующее действие проявляет ВПФ, наименее растворимое в водной фазе. Этот экспериментальный факт показывает, что наиболее гидрофобные соединения взаи-

модействуют с мембраной в области жирнокислотных остатков фосфолипидов, где преимущественно и протекают процессы ПОЛ, т.е. образуются АФК, ловушками которых являются ВПФ. Таким образом, при рассмотрении целесообразности повышения растворимости в воде производных фуллерена C_{60} для дальнейшего терапевтического использования крайне важно принимать во внимание коллоидно-химические аспекты окисления ПОЛ в присутствии дифильных соединений [13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dianzani M.U. // *Boll. Soc. It Biol. Sper.* 1992. **68**. P. 491.
2. Тодоров И. Н., Тодоров Г. И. Стресс, старение и их биохимическая коррекция. М., 2000.
3. Кудрин А. Н. Фармакология. М., 1993. С. 328.
4. Podolski I.Ya., Podlubnaya Z.A., Kostenko E.A., Mugantseva E.A., Makarova E.G., Marsagishvili L.G., Shpagina M.D., Kaminsky Yu.G., Andrievsky G.A., Klochkov V.K. // *J. Nanosci, Nanotechnol.* 2007. **7**. P. 4.
5. Трошин П.А., Трошина О.А., Любовская Р.Н., Разумов В.Ф. Функциональные производные фуллеренов: методы синтеза и перспективы использования в органической электронике и биомедицине / Под ред. В.Ф. Разумова и М.В. Ключева. Иваново, 2008.
6. Щукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. М., 2004.
7. Kotelnikova R.A., Kotelnikov A.I., Bogdanov G.N., Romanova V.S., Kuleshova E.F., Parnes Z.N., Vol'pin M.E. // *FEBS Lett.* 1996. **389**. P. 111.
8. Фархутдинов Р.Р., Лиховских Л. В. Хемиллюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине. Уфа, 1995.
9. Lowry O. H, Rosebrough N. J., Farr A. L, Randall R. J. // *J. Biol Chem.* 1951. **193**. P. 265.
10. Slater T. F. // *Methods in Enzymology.* 1984. **105**. P. 273.
11. Тимофеева Г.И., Кулешова Е.Ф., Романова В.С. // *Изв. АН. Сер. хим.* 1997. № 3. С. 493.
12. Овчинникова Н. С. Дис. ... канд. хим. наук. М., 2010.
13. Касаикина О.Т., Голявин А.А., Круговов Д.А., Карташева З.С., Писаренко Л.М. // *Вестн. моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2010. **51**. № 3. С. 246.

Поступила в редакцию 12.01.12

THE INFLUENCE OF DERIVATIVES OF FULLERENE C_{60} LIPOPHILICITY IN ITS ABILITY TO INHIBIT OF THE LIPID PEROXIDE OXYDATION IN AQUEOUS MEDIA

Yu.G. Bogdanova¹, A.A. Tepanov, V.A. Ioutsi, V.S. Romanova, G.N. Bogdanov, R.A. Kotel'nikova, D.V. Mischenko, A.Yu. Rybkin, A.I. Kotel'nikov

(Division of Colloid Chemistry)

Using dynamic light scattering method the aqueous solutions of fullerene C_{60} derivatives (FD) were investigated and ones influence in process of the lipid peroxide oxidation (LPO) in aqueous media was studied by chemiluminescence method. It was shown that colloidal water solubility which determines the FDs antioxidant activity is controlled by chemical structure of addend connected with C_{60} . The most lipophilic FD is the best inhibitor.

Key words: fullerene C_{60} derivatives, antioxidant activity.

Сведения об авторах: Богданова Юлия Геннадиевна – ст. науч. сотр. кафедры коллоидной химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (yulibogd@yandex.ru); Тепанов Александр Александрович – аспирант кафедры химии нефти и орг. катализа химического факультета МГУ; Иоутси В.А. – аспирант кафедры общей и биоорганической химии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова, мл. науч. сотр. кафедры физической химии химического факультета МГУ; Романова Валентина Семеновна – ст. науч. сотр. ИНЭОС РАН, канд. хим. наук (roman@ineos.ac.ru); Богданов Геннадий Николаевич – вед. науч. сотр. ИПХФ РАН, канд. хим. наук; Котельникова Раиса Алексеевна – зав. лаб. физико-химической биологии физиологически активных соединений ИПХФ РАН, канд. физ.-матем. наук (kotel@icp.ac.ru); Мищенко Денис Валерьевич – ст. науч. сотр. ИПХФ РАН, канд. биол. наук; Рыбкин Александр Юрьевич – аспирант ИПХФ РАН; Котельников Александр Иванович – зав. отделом ИПХФ РАН, докт. физ.-матем. наук (kotel@icp.ac.ru).