

*Коробко Валентина Михайловна*

ассистент

ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная

медицинская академия» Минздрава России

г. Нижний Новгород, Нижегородская область

**БИОМИМЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ  
АКТИВНОСТИ НИТРОКСИДОВ НА ПРИМЕРЕ БИС-  
НИТРОКСИДНОГО МЕТАНОФУЛЛЕРЕНА**

*Аннотация:* в статье изучена антиоксидантная активность нитроксидов на модели бис-нитроксидного метанофуллерена ((NO·)2-МФ) по отношению к окисленным формам флавоноидов на примере дигидрокверцетина (ДКВ). Биомиметическое исследование проведено с использованием адслоев (NO·)2-МФ на SiO<sub>2</sub> при контакте с раствором ДКВ. УФ-спектральными исследованиями была доказана способность (NO·)2-МФ восстанавливать окисленную форму ДКВ. Антиоксидантная активность (NO·)2-МФ по отношению к дигидрокверцетину была доказана на крови крыс. Показано, что интенсивность липопероксидации (хемилюминесцентный анализ), концентрация диеновых, триеновых конъюгатов и оснований Шиффа (флуоресцентный анализ) ДКВ уменьшались в присутствии (NO·)2-МФ.

*Ключевые слова:* бис-нитроксидный метанофуллерен, дигидрокверцетин, антиоксидантная активность.

Монооксид азота является биологическим регулятором физиологических процессов *in vivo*, таких как эндотелиальная релаксация, передача нервных сигналов, улучшения микроциркуляции крови, агрегации тромбоцитов. В связи с этим чрезвычайно важным является изучение взаимодействия биологически активных веществ (БАВ) с NO-содержащими соединениями. С другой стороны, эти исследования важны не только для установления механизма взаимодействия нитроксидных фрагментов с БАВ, но и для разработки новых ЛС, генерирующих NO или улучшающих антиоксидантную функцию БАВ.

Сложностью изучения нитроксидных частиц *in situ* является их нестабильность, в связи с чем, весьма перспективно использование стабильных нитроксидных радикалов, таких как, ТЕМПО или ТЕМПО-содержащих соединений.

*Целью работы* является биомиметическое изучение антиоксидантной функции нитроксидных соединений на модели бис-нитроксидного метанофуллерена по отношению к природному антиоксиданту – дигидрокверцетину [3].

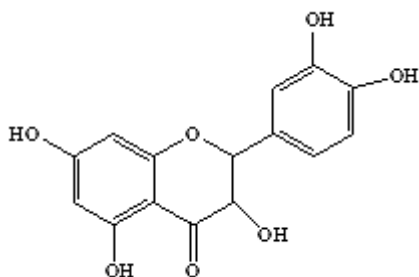


Рис. 1. Дигидрокверцетин

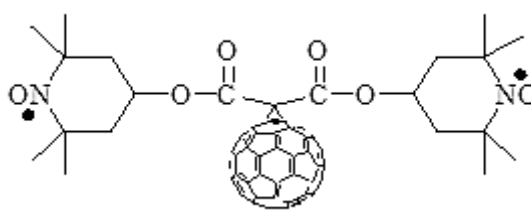


Рис. 2. Бис-нитроксидный метанофуллерен

### *Экспериментальная часть*

*Бис-нитроксидный малонатный метанофуллерен* (бис-(О-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипиперидинил-оксил)-бис-метано[60]-фуллерен) синтезирован и охарактеризован методами УФ, ИК,  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопией, MALDI TOF масс-спектрометрией в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН [4]; *Дигидрокверцетин* (> 99,6%, «Merck»).

*Приборы:* Электронные спектры поглощения были получены на приборе «Bio line Specord S-100» (Analytik Jena, Germany) в области 190–600 нм, толщина кварцевой кюветы 10 мм.

*Исследования антиоксидантных свойств* проводились на цельной крови, полученной путём декапитации головы крысы с предварительной перерезкой сонной артерии, в соответствии с нормативными документами (А.Н. Миронов, 2012).

*Хемилюминесцентный анализ* (индуцированной железом и пероксидом водорода) на общую антиоксидантную активность проводили на биохемилуминометре марки БХЛ-06 (Н. Новгород). *Методика.* В кювету вносили 0,1 мл пробы,

разводили её 0,4 мл фосфатного буфера, приливали 0,4 мл 0,5 mM раствора сульфата железа и 0,2% раствора перекиси водорода. Кювету помещали в кюветодержатель БХЛ-06 и измеряли интенсивность свечения за 30 сек.

Уровень первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК) проводили в метанол-гексановой фазе экстракта липидов при длинах волн 232 нм и 275 нм, а также по содержанию конечных продуктов – оснований Шиффа (ОШ) методом флуоресценции при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны эмиссии 420 нм.

#### Результаты работы и их обсуждение.

Методом электронной спектроскопии изучено влияние  $(NO^{\cdot})_2$ -МФ, сорбированного на силикагеле с образованием адслоев, на спектральные изменения окисленного ДКВ. Окисленную форму ДКВ получали растворением в  $4 \cdot 10^{-5}$  М NaOH и характеризовали полосой при  $\lambda_{max} = 325$  нм [1] (рис. 1а).

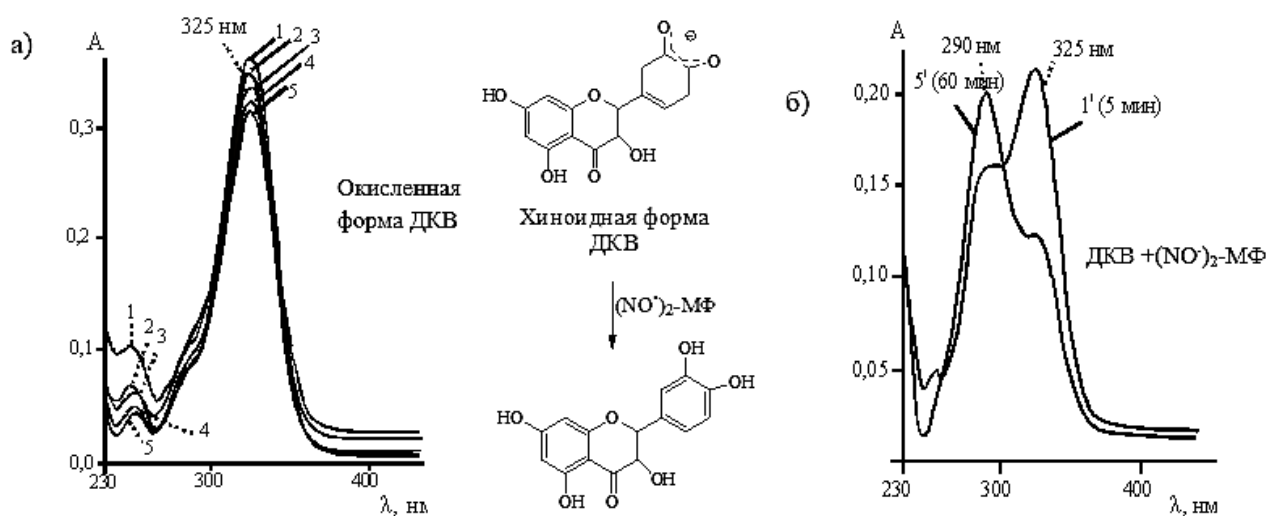


Рис. 3. Электронные спектры  $2 \cdot 10^{-5}$  М ДКВ в растворе  $4 \cdot 10^{-5}$  М NaOH во времени: а) 1–5 мин; 2–10 мин; 3–25 мин; 4–40 мин; 5–60 мин; б) в присутствии  $(NO^{\cdot})_2$ -МФ: 1–5 мин; 2–60 мин.

При погружении силикагеля с адслоями  $(NO^{\cdot})_2$ -МФ в присутствии  $O_2$ , доля окисленной формы ДКВ уменьшалась и появлялась новая полоса, характеризующая восстановленную форму ДКВ (рис. 3 а).

Таким образом, была доказана способность  $(NO)_2$ -МФ восстанавливать хиноидную форму дигидрокверцетина (ДКВ), то есть проявлять антиоксидантную активность по отношению к этому флавоноиду.

На основании данных биохемилюминесцентного исследования образцов крови показано, что антиоксидантная активность ( $I/S \cdot 10^2$ ) ДКВ увеличивалась в присутствии  $(NO)_2$ -МФ, а скорость нормализации СРО (АОА) ( $-\text{tg}2\alpha$ ), уменьшалась. Антиоксидантная активность бис-нитроксидного метанофуллерена и его смеси с ДКВ представлена в таблице 1.

Таблица 1

Хемилюминесцентный анализ интенсивности ПОЛ, индуцированного ионами  $Fe^{2+}$  и пероксидом водорода в крови

	Антиоксидантная активность, $I/S \cdot 10^2$		Скорость нормализации СРО (АОА), $-\text{tg}2\alpha$	
	–	+ ДКВ	–	+ ДКВ
Контроль				
$(NO)_2$ -МФ		8		

В таблице 2 приведены данные по влиянию  $(NO)_2$ -МФ на процессы ПОЛ по продуктам первой стадии липопероксидации.

Таблица 2

Флуоресцентный анализ ПОЛ по продуктам на первой стадии – диеновые (ДК) и триеновые конъюгаты (ТК) и основания Шиффа (ОШ)

	ДК	ТК	ОШ
$(NO)_2$ -МФ До лечения	$0,21 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$3,18 \pm 0,01$
После лечения	$0,19 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$	$4,11 \pm 0,01$
$(NO)_2$ -МФ + ДКВ До лечения	$0,21 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,03$	$4,24 \pm 0,02$
После лечения	$0,16 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	$2,17 \pm 0,02$

Таким образом, нами показано, что адсорбционные слои бис-нитроксидного метанофуллерена могут быть использованы в качестве модели антиоксидантной активности [2] по отношению к природным антиоксидантам – флавоноидам.

### *Список литературы*

1. Георгиевский В.П. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений / В.П. Георгиевский, А.И. Рыбаченко, А.Л. Казаков. – Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского университета, 1988. – 144 с.
2. Пиотровский Л.Б. Фуллерены в биологии / Л.Б. Пиотровский, О.И. Киселев // Сев.-Зап. отд-ние Рос. Акад. Мед. Наук. – СПб.: Росток, 2006. – С. 49.
3. Теселкин Ю.О. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина / Ю.О. Теселкин [и др.] // Биофизика. – 1996. – Т. 41. – Вып. 3. – С. 620–623.
4. Gubskaya V.P. Synthesis, structure and biological activity of nitroxide malonate methanofullerens / V.P. Gubskaya [et al.] // Org. Biomol. Chem. – 2007. – №5. – P. 976–981.