

УДК [546.26:678.746.222]:543.

*О. В. Алексеева*¹, *Н. А. Багровская*¹, *О. Г. Ситникова*², *С. Б. Назаров*²

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИСТИРОЛА

STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FULLERENE-CONTAINING NANOCOMPOSITES

¹Учреждение Российской академии наук Институт химии растворов РАН,
Иваново, Россия. E-mail: ova@isc-ras.ru

²ФГУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова»
Минздравсоцразвития России, Иваново

Изучено взаимодействие между фуллереном и полистиролом в композиционных пленках. Исследовано влияние концентрации фуллеренов в нанокompозитах на процесс перекисного окисления липидов в сыворотке крови in vitro. Установлено, что полимерные композиты в зависимости от концентрации нанокompозитов обладают способностью как активировать, так и подавлять процессы свободнорадикального окисления липидов сыворотки крови.

Ключевые слова: полистирол, фуллерен, нанокompозиты, антиоксидантная активность, липиды, хемилюминесценция

The interaction between the fullerene and polystyrene in the composite films was studied. The effect of the concentration of fullerenes in nanocomposites on the process of lipid peroxidation in blood serum in vitro was investigated. It is found that the polymer composites, depending on the concentration of nano-carbon particles have the ability to activate as well as inhibit free radical oxidation processes serum lipid.

Key words: polystyrene, fullerene, nanocomposites, antioxidant activity, lipid, chemiluminescence

Введение

Одним из перспективных направлений современного материаловедения является получение композиционных полимерных материалов, которые могут быть использованы в биологии, медицине и фармакологии. Особое внимание уделяется фуллеренсодержащим полимерам, объединяющим уникальные свойства фуллеренов со свойствами полимеров. В настоящее время синтезированы различные производные фуллеренов, проявляющие обширный спектр биологической активности: противоопухолевой, антивирусной, антибактериальной, нейропротекторной и антиоксидантной [1]. Биологическая активность фуллеренов обусловлена липофильностью молекул, вследствие чего они могут проникать в мембрану клетки; электронодефицитностью, приводящей к взаимодействию со свободными радикалами, и способностью возбужденных форм C₆₀ образовывать активные формы кислорода [2]. В работе [3] показано, что механизм биологического действия фуллерена зависит от способа введения его в среду: в кристалли-

ческом виде, в виде молекулярно-коллоидного раствора или водорастворимого комплекса с органическими соединениями. При этом обнаружено, что наибольшую биологическую активность фуллерен проявляет в форме водорастворимого полимерного комплекса, что связано, по мнению авторов, с более низкой степенью ассоциации молекул наноуглеродных частиц. Среди полимеров, способных связывать наноуглеродные частицы, следует отметить полистирол, который выпускается крупнотоннажно и находит широкое применение в различных отраслях промышленности. Можно предположить, что введение фуллеренов в полимерную матрицу приведет к созданию биокмозитов, которые могут найти практическое применение в качестве матриц для внутренней адресной доставки лекарств, антисептических препаратов и антиоксидантов, применяемых для нормализации свободнорадикальных процессов окисления липидов в живых организмах. В настоящее время для регулирования скорости свободнорадикального окисления используют не только природные, но и синтетические препараты [4]. Однако, некоторые антиоксиданты, как и многие лекарственные препараты, могут проявлять побочное действие. Поэтому возникает необходимость поиска соединений, обладающих высокой антиоксидантной активностью и безвредных для человека.

Целью настоящей работы явилось исследование взаимодействия между фуллереном и полистиролом в композиционных пленках и биологической активности фуллереносодержащих нанокмозитов по отношению к процессу перекисного окисления липидов в сыворотке крови *in vitro*.

Методика эксперимента

В работе использовали полистирол («Aldrich», Germany) с $M=1,4 \cdot 10^5$ и полидисперсностью $M_w/M_n = 1,64$, смесь фуллеренов (продукт фирмы «Фуллереновые технологии», Санкт-Петербург), очищали по методике [5]. Фуллереносодержащие полистирольные композиты готовили, растворяя отдельно навески полимера и смеси C_{60} - C_{70} в о-ксилоле, смешивая затем эти растворы в необходимой пропорции. Концентрации смеси фуллеренов в композите варьировали от 0,01 до 1,0 мас. % Композиционные пленки получали методом полива раствора полимера на стеклянную подложку. Толщина пленки составила 70 мкм. ИК-спектры пленок регистрировали в области $400 - 4000 \text{ см}^{-1}$ на спектрофотометре Avatar 360 FT-IR ESP.

В качестве объекта исследования процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) использовали «сливную» сыворотку крови от 10 пациенток клиник ФГУ «Ив. НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздравсоцразвития России. Предварительно пробирки, содержащие 1 мл «сливной» сыворотки крови и образцы исходной или композиционной пленок размером $1,5 \text{ см}^2$ и массой 5 мг с определенной концентрацией фуллеренов (0,01; 0,03; 0,1 и 1,0 мас. %), инкубировали при 4°C в течение 1 часа. Исследование влияние концентрации фуллеренов в нанокмозите на свободнорадикальные процессы в сыворотке крови проводили методами индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) и электронной-спектроскопии *in vitro*. В качестве индукторов ХЛ применяли перекись водорода с сульфатом железа FeSO_4 . В измерительную кювету вносили 0,1 мл сыворотки крови, 0,4 мл фосфатного буфера ($\text{pH}=7,5$), 0,4 мл 0,01М раствора сульфата железа и 0,2 мл 2 %-го раствора H_2O_2 . Регистрацию свечения проводили в течение 40 с на приборе БХЛ-06М. Количественно процесс ПОЛ характеризовали максимальной амплитудой свечения (I_{max}), тангенсом угла наклона кинетической кривой ХЛ (t_{ga}), светосуммой свечения (S), являющейся интегральным показателем интен-

сивности ХЛ и коэффициентом К ($K=I_{\max}/S$). Контролем служила «сливная» сыворотка крови.

Содержание малонового диальдегида (МДА), конечного продукта ПОЛ, определяли по реакции образования триметинового комплекса МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрическим методом при $\lambda = 532$ нм на спектрофотометре СФ-46 по методике [6]. Суммарную антиоксидантную активность (АОА, %) определяли по методу [7] путем измерения концентрации МДА до и после инкубации проб.

Показатели «сливной» сыворотки (контроль) были приняты за 100 %.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартного пакета программ SDS и Microsoft Excel. Учитывая характер распределения, отличный от нормального, описание представлено в виде медианы – середины распределения изучаемого признака и интерквартильного интервала ($ME[Q_{25}; Q_{75}]$) Сравнение средних величин в группах проводили с использованием критерия Wilcoxon. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ [8].

Обсуждение результатов

Выяснение характера структурно-химических изменений в полистироле в результате его модификации было проведено на основании анализа колебательных спектров исходных и композиционных пленок (рис. 1).

В ИК-спектре полистирола в виде дублетов проявляются полосы валентных колебаний связей С=C бензольного кольца в областях $1600 - 1585$ см^{-1} и $1500 - 1400$ см^{-1} . Полосы плоскостных деформационных колебаний связей С-Н цикла находятся в области $1300 - 1000$ см^{-1} . Внеплоскостные деформационные колебания связей С-Н цикла проявляются при $900 - 675$ см^{-1} [9]. Полосы валентных колебаний в фенильных кольцах обычно оказываются очень чувствительны к возможности сопряжения π -электронной плотности кольца с реакционноспособными группами. В ИК-спектре молекулы фуллере́на четыре колебания являются активными с полосами поглощения при $527, 577, 1183$ и 1429 см^{-1} [10]. Наиболее чувствительными к переносу заряда являются колебания полосы поглощения при 1429 см^{-1} .

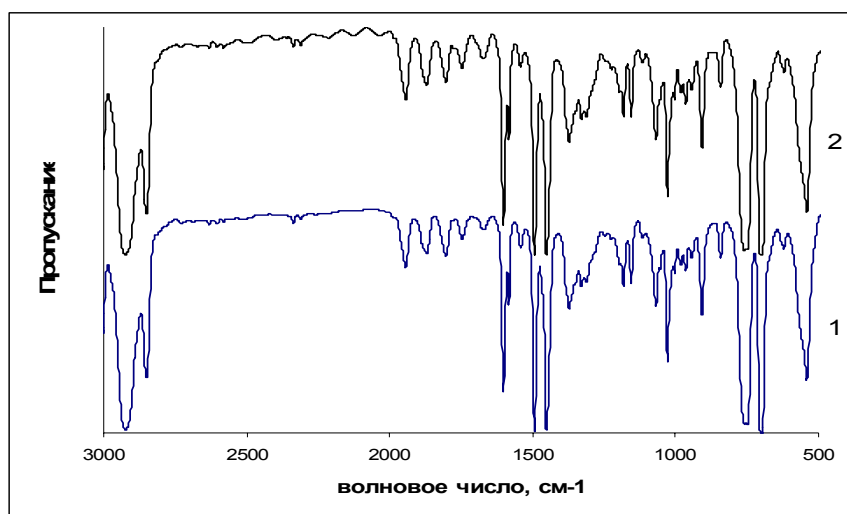


Рис. 1. ИК-спектры: 1 – ПС пленка; 2 – нанокompозит с содержанием $C_{60}-C_{70}$ 0,1 мас. %

Качественных изменений в ИК-спектрах пленок, допированных фуллереном, по сравнению с исходной ПС-пленкой не наблюдается (рис. 1). Следует заметить, что ИК-спектры не поддаются количественной интерпретации вследствие перекрывания полос, соответствующих колебаниям фенильного кольца и фуллерена (1451, 1429 см⁻¹). В работе предпринята попытка полуколичественного анализа ИК-спектров образцов пленок с использованием метода базовой линии и внутреннего стандарта, в качестве которого была выбрана полоса поглощения связи С-Н с максимумом при 908 см⁻¹ [11]. В табл. 1 приведены отношения оптических плотностей характеристических полос поглощения при 1452 см⁻¹ и 1601 см⁻¹ к оптической плотности полосы при 908 см⁻¹. Эти данные свидетельствуют о том, что в спектрах фуллереносодержащих ПС-пленок наблюдаются существенные изменения относительных интенсивностей полос поглощения при 1601 см⁻¹ и 1452 см⁻¹. Можно предполагать, что в модифицированной пленке осуществляется нековалентное взаимодействие донорной макромолекулы полистирола с акцепторной молекулой фуллерена.

Таблица 1

Относительные интенсивности полос поглощения в спектрах ПС и композиционных пленок

Концентрация С ₆₀ -С ₇₀ в композите, мас. %	D ₁₄₅₂ /D ₉₀₈	D ₁₆₀₁ /D ₉₀₈
0	2,44	2,13
0,01	2,19	2,08
0,03	3,16	2,28
0,10	2,81	2,31
1,0	3,45	2,40

Биологическая активность полученных фуллереносодержащих ПС-пленок была изучена по отношению к пероксид-радикалам, генерируемым в тесте пероксидного окисления липидов в «сливной» сыворотке крови методом ХЛ. Кинетика индуцированной ХЛ, сопровождающая окисление липидов, была исследована в присутствии ПС пленки и нанокompозитов. На рис. 2 представлены кинетические хемилюминесцентные зависимости, характеризующие протекание ПОЛ в некоторых системах. В табл. 2 суммированы основные показатели ХЛ для всех исследуемых систем.

Как видно на рис. 2, в течение 2 с от начала реакции на кинетических кривых наблюдается всплеск свечения ХЛ, связанный с выходом свободных радикалов. При этом увеличение интенсивности свечения (I_{max}) по сравнению с аналогичным показателем для контрольной сыворотки крови отмечается для систем, содержащих нанокompозиты с концентрацией фуллеренов 0,01; 0,03 и 0,1 мас. % (p < 0,05), (табл. 2).

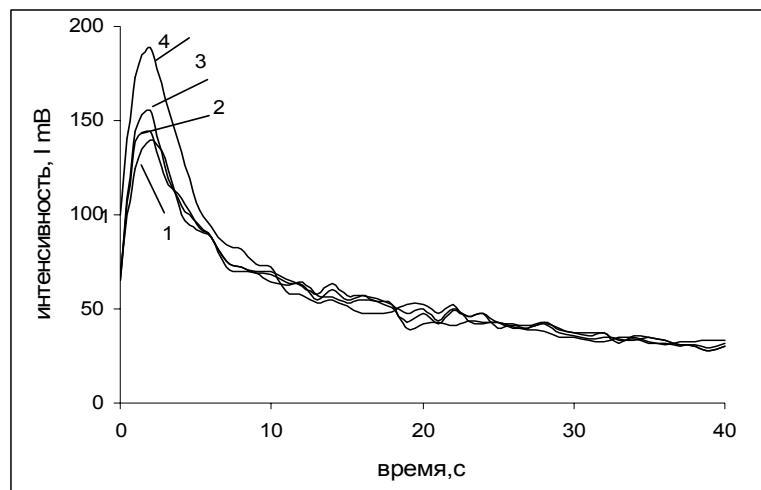


Рис. 2. Кинетика ХЛ в различных системах:

1 – «сливная» сыворотка крови; 2 – сыворотка крови в присутствии ПС-пленки;
3,4 – в присутствии нанокомпозитов, содержащих 1,0 и 0,03 мас. % фуллеренов, соответственно

По-видимому, это связано с образованием в биологической жидкости свободных радикалов липидов и активных форм кислорода (HO_2^\cdot , O_2^\cdot , O_2^- , OH^\cdot). Следует отметить, что значение светосуммы (S) оказалось достоверно увеличенной только в сыворотке крови, содержащей ПС пленки с концентрациями ($\text{C}_{60}\text{-C}_{70}$) – 0,01 и 0,03 мас. %, ($p < 0,05$). В данном случае полимерные композиты проявляют себя как прооксиданты. При введении в систему композита, содержащего 1,0 мас. % фуллеренов, достоверного увеличения показателей I_{max} и S не отмечено.

Таблица 2

Показатели хемилюминесценции «сливной» сыворотки крови под действием полистирольной пленки и фуллеренсодержащих композитов

Концентрация $\text{C}_{60}\text{-C}_{70}$ в композите, мас. %	Показатели ХЛ, % (медиана, 25; 75 процентели)			
	S	I_{max}	tga	K
Контроль n=6	100,0 (100,0; 100,0)	100,0 (100,0; 100,0)	100,0 (100,0; 100,0)	100,0 (100,0; 100,0)
0 n=6	96,0 (81,0; 105,0)	97,0 (87,0; 104,0)	97,5 (87,0; 112,5)	103,0 (103,0; 107,0)
0,01 n=6	121,5* (111,0; 134,0)	131,5* (114,0; 143,0)	139,0* (112,0; 190,0)	105,0* (102,0; 111,0)
0,03 n=6	115,0* (107,0; 126,0)	125,0* (114,0; 152,0)	146,0* (119,0; 180,0)	107,0* (101,0; 117,0)
0,1 n=6	105,0 (98,0; 108,0)	110,0* (105,0; 112,0)	110,0 (96,0; 118,0)	107,0 (88,0; 108,0)
1,0 n=6	96,0 (96,0; 108,0)	111,0 (100,0; 117,0)	121,0* (112,0; 128,0)	108,0* (104,0; 110,0)

n – число опытов, * – достоверные результаты

Кроме того, в «сливной» сыворотки крови в присутствии фуллеренсодержащих пленок выявлено достоверное повышение показателей tga и К ($p < 0,05$), (табл. 2). Результаты ХЛ свидетельствуют о том, что композиты с концентрацией фуллеренов 0,01 и 0,03 мас. % могут влиять на реакцию ПОЛ как про-, так и антиоксиданты, в то время как пленки с концентрацией ($C_{60}-C_{70}$) – 1,0 мас. %. – только как антиоксиданты. Вероятно, в присутствии в «сливной» сыворотке крови композита с более высоким содержанием фуллеренов, электронодефицитные молекулы наночастиц взаимодействуют с активными формами кислорода, предотвращая окисление липидов. Достоверного изменения показателей ХЛ в «сливной» сыворотке крови в присутствии исходной полистирольной пленки не выявлено.

Интенсивность ПОЛ была также оценена по содержанию липидных перекисей в сыворотке крови, которые определены в форме малонового диальдегида и показателя суммарной антиоксидантной активности методом электронной спектрофотометрии. Результаты исследований представлены в табл. 3.

На основании данных табл. 3 установлено, что под воздействием нанокompозита, содержащего 0,03 мас. % фуллеренов, в «сливной» сыворотке крови происходит увеличение уровня МДА ($p < 0,01$). Введение в систему образцов пленок с более высоким содержанием нанокompозитных частиц приводит к понижению значений этого показателя. При этом увеличение уровня АОА выявлено в присутствии полимерных композитов с концентрациями ($C_{60}-C_{70}$) – 0,03; 0,1 и 1,0 мас. % ($p < 0,05$), что свидетельствует об антиоксидантном эффекте в данных системах по сравнению с контрольной сывороткой крови (табл. 3).

Таблица 3

Показатели перекисного окисления липидов (МДА, АОА) «сливной» сыворотки крови в присутствии полистирольной пленки и фуллеренсодержащих композитов

Концентрация $C_{60}-C_{70}$ в композите, мас. %	Показатели ПОЛ, % (медиана, 25; 75 проценты)	
	МДА	АОА
Контроль n=6	100,0 (100,0; 100,0)	100,0 (100,0; 100,0)
0 n=6	103,0 (80,0; 106,0)	108,0 (104,0; 109,0)
0,03 n=6	113,0* (108,0; 115,0)	116,0* (112,0; 121,0)
0,1 n=7	94,0 (91,0; 102,0)	110,0* (110,0; 118,0)
1,0 n=5	96,5 (86,0; 104,5)	107,0* (103,0; 111,0)

Вероятно, что с ростом концентрации фуллеренов в полимерной пленке, увеличивается число активных центров, способных эффективно захватывать и инактивировать свободные радикалы [12].

Выводы

Таким образом, предположено, что при модифицировании полистирола наноуглеродными частицами фуллеренов, в композиционной пленке осуществляется нековалентное взаимодействие донорной макромолекулы полимера с акцепторной молекулой фуллерена. Установлено, что полимерные нанокompозиты в зависимости от концентрации наноуглеродных частиц обладают способностью как активировать, так и подавлять процессы свободнорадикального окисления липидов сыворотки крови *in vitro*.

Список литературы

1. Андреева С. М., Баикатова Ю. Н., Петрухина А. О. и др. // Фуллерены. Нанотрубки. Наноуглеродные структуры. 2008. № 16. С. 89 – 102.
2. Tatiana Ros // Twenty Years of Promises: Fullerene in Medicinal Chemistry Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes. 2008. P. 1.
3. Пиотровский Л. Б., Еропкин М. Ю., Еропкина Е. М. и др. // Психофармакол. биол. наркол. 2007. Т. 7. № 2. С. 1548.
4. Оковитый С. В. // ФАРМиндекс-Практик. 2003. Вып. 5. С. 85.
5. Евлампиева Н. П., Дмитриева Т. С., Меленевская Е. Ю. и др. // ВМС. Серия А. 2007. Т. 49. № 3. С. 447.
6. Ishihara M. // Clin. Chim. Acta. 1978. Vol. 84. P. 1.
7. Промыслов М. В., Демчук М. Л. // Вопросы медицинской химии. 1990. № 4. С. 90.
8. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М. : МедиаСфера, 2002. 312 с.
9. Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений : пер. с англ. / под ред. А. А. Мальцева. М. : Мир, 1977. 590 с.
10. Конарев Д. В., Любовская Г. Н. // Успехи химии. 1999. Т. 68. № 1. С. 22 – 44.
11. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия : пер. с англ. / под ред. А. А. Мальцева. М. : Мир, 1982. 328 с.
12. Сыренский А. В., Галагудза М. М., Егорова Е. И. // Артериальная гипертензия. 2004. Т. 10. № 3. С. 5.

Поступила в редакцию 30.06.2011 г.