



ров цианокобаламина и определение количественных характеристик антиоксидантной активности.

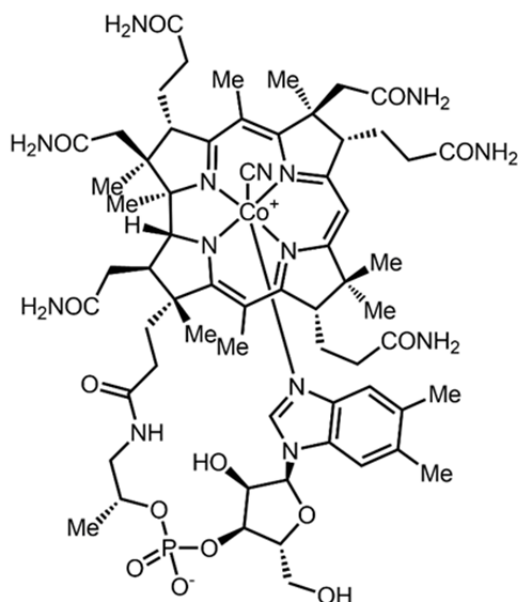


Рис. 1. Молекулярная структура витамина В12 (цианокобаламина).

Целью работы является изучение антипероксирадикальной активности цианокобаламина в водной среде при физиологических температуре и рН методами определения поглощающей емкости по отношению к кислородцентрированным радикалам (ORAC) и квадратично-волновой вольтамперометрии (SWV).

**Реактивы.** Цианокобаламин, 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) гидрохлорид (ААРН), 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (*Тролокс*), флуоресцеин (Fl)-3',6'-дигидроксиспиро[изобензофуран-1(3Н),9'-[9Н]ксантен]-3-она динатриевая соль, физиологический раствор (0.9%-й водный раствор хлорида натрия (NaCl)), фосфатный буфер (0.1M, рН=7.4) приобретены у химической компании Sigma-Aldrich (США). В экспериментах использовалась деионизированная вода с электрическим сопротивлением  $\geq 16$  МОм·см при 25<sup>0</sup>С (H<sub>2</sub>Economy, LLC, RA).

**Электрохимические измерения.** Измерения методом SWV проводились на биоаналитической системе 100В/В (Bioanalytical Systems (BAS), США). Вольтамперограммы снимались с использованием трехэлектродной схемы, где в качестве рабочего электрода использовался стеклоуглеродный электрод (GC) сечением 0.09 см<sup>2</sup>. Перед каждым определением GC электрод очищался в течение 3 мин посредством пудры из Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, размером частиц 0.5 мкм. Электрод сравнения – насыщенный хлорсеребряный Ag/AgCl/KCl вспомогательный – платиновый электрод. Работа электрохимической аналитической системы проверялась с помощью эталонных

растворов  $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . В качестве фонового электролита использовался фосфатный буфер (0.1 М, pH=7.4). Концентрированный раствор цианокобаламина ( $4 \times 10^{-4}$  М) готовился в физиологическом растворе.

SWV вольтамперограммы снимались в диапазоне потенциалов +1500 ÷ -1500 мВ (милливольт). Условия регистрации приведены в подписях к рис. 2.

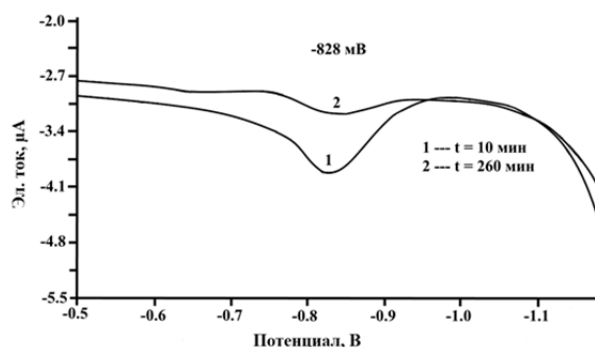


Рис. 2. Уменьшение величины тока при катодном потенциале  $-828 \pm 20$  мВ в SWV вольтамперограммах цианокобаламина в результате реакции с пероксильными радикалами. Концентрации  $[\text{цианокобаламин}]_0 = 2.5 \times 10^{-5}$  М,  $[\text{AAPH}]_0 = 2.5 \times 10^{-3}$  М (скорость зарождения радикалов  $R_i = 3.4 \times 10^{-9}$  Мс $^{-1}$ ),  $T = 37.0 \pm 0.2$  °С. Растворитель – деионизированная вода, фосфатный буфер (0.1 М, pH=7.4). Условия регистрации SWV: скорость развертки напряжения – 20 мВ/с, частота – 25 Гц, SWV амплитуда – 25 мВ.

Изменения в реакционной системе цианокобаламина с пероксильными радикалами, генерируемые путем термического распада водорастворимого азосоединения – ААРН в насыщенном кислородом водном растворе, периодически регистрировались в течение 300 мин при температуре  $37 \pm 0.2$  °С.

**Метод определения поглощающей емкости по отношению к кислородцентрированным радикалам («Oxygen Radical Absorbtion Capacity», ORAC).** Метод ORAC основан на измерении во времени интенсивности флуоресценции флуоресцеина, связывающего генерируемые кислородцентрированные радикалы [10-12]. Антиоксиданты, вводимые в реакционную среду, взаимодействуя с радикалами замедляют свободнорадикальное расходование FI.

Кинетика изменения интенсивности флуоресценции FI регистрировалась флуоресцентным спектрометром Perkin-Elmer с компьютерной регистрацией. Длина волн возбуждаемого и эмиссионного света была равна 485 и 510 нм, соответственно. В экспериментах учитывалось и корректировалось снижение флуоресценции флуоресцеина из-за поглощения цианокобаламина в диапазоне 480-510 нм. Антипероксирадикальная активность – антипероксирадикальная емкость  $f_{AO}$  цианокобаламина определя-

лась по площади между двумя кинетическими кривыми уменьшения интенсивности флуоресценции FI в отсутствие и в присутствии цианокобаламина и стандартного антиоксиданта – *Тролокса* по методике, приведенной в [10, 11]. Интегрирование соответствующих площадей осуществлялось по закону трапеции с помощью компьютерной вычислительной программы Microcal Origin 8.0.

Пероксильные (2-амидинопропил пероксильные) радикалы генерировались термическим распадом ААРН в насыщенном кислородом водном растворе при температуре  $37 \pm 0.1$  °С.

**Результаты.** Как видно из SWV вольтамперограмм цианокобаламина, приведенных на рис. 2, характерный редокс потенциал цианокобаламина наблюдается при  $-828 \pm 20$  мВ. Этот потенциал восстановления относится к обратимому одноэлектронному переходу Co(II)/Co(I) [13-14] или двухэлектронному переходу Co(III)/Co(I) [15].

При генерации пероксильных радикалов в реакционном растворе в течение времени величина тока, соответствующая характерному редокс потенциалу цианокобаламина  $-828 \pm 20$  мВ уменьшается, как представлено на рис. 2. На рис. 3 приведена кинетика уменьшения величины силы тока в

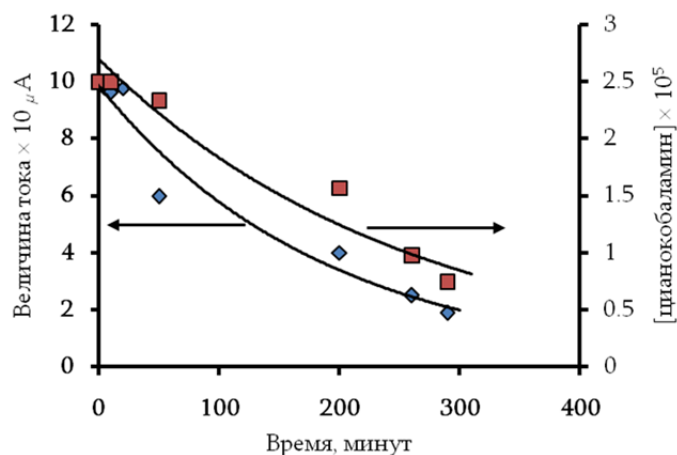


Рис. 3. Кинетика уменьшения величины тока при катодном потенциале  $-828 \pm 20$  мВ и соответственно концентрации цианокобаламина в результате реакции с пероксильными радикалами, полученные методом SWV. Условия эксперимента и регистрации SWV см. подпись к рисунку 2.

течение реакции. Это свидетельствует о том, что цианокобаламин прямо реагирует с пероксильными радикалами. При этом происходят необратимые структурные изменения в молекуле цианокобаламина, в ближайшей координационной сфере Co(III). Так как центральный металлоэлемент Co находится в окисленном состоянии и не способен окисляться, можно сделать вывод, что с пероксильными радикалами реагируют относительно активные реакционные центры лиганда.

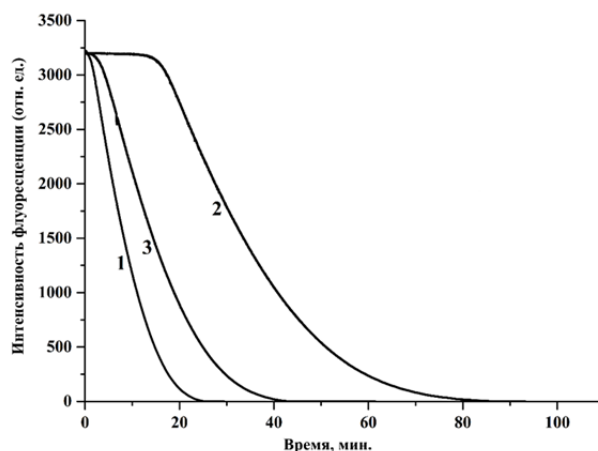


Рис. 4. Кинетические кривые уменьшения интенсивности флуоресценции F1 при 510 нм в результате реакции с пероксильными радикалами в отсутствие (1) и присутствии антиоксидантов: Тролокс (2), цианокобаламин (3) при температуре  $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ .  $[\text{AAPH}]_0 = 2 \times 10^{-2} \text{M}$  (скорость зарождения радикалов  $R_f = 2.72 \times 10^{-8} \text{M s}^{-1}$ ),  $[\text{Тролокс}]_0 = 10^{-5} \text{M}$ ,  $[\text{цианокобаламин}]_0 = 10^{-5} \text{M}$ . Растворитель — деионизированная вода, фосфатный буфер (0.1M, pH=7.4).

Как видно из результатов, полученных методом ORAC (рис. 4), цианокобаламин ингибирует свободнорадикальное расходование F1, т.е. проявляет себя как антиоксидант. Эти данные также свидетельствуют, что витамин B12 прямо реагирует с пероксильными радикалами. На основе экспериментальных данных в представленной работе впервые определено значение антипероксирадикальной емкости цианокобаламина. Величина  $f_{ac}$  равна  $0.5 \pm 0.05$ . Это дает основание говорить о существенной антиоксидантной активности цианокобаламина, а также указывает на наличие прямой реакции пероксильных радикалов с цианокобаламином.

**Обсуждение.** При выявлении реакционного центра витамина B12, участвующие в окислении пероксильными радикалами, исходили из того, что эти реакции происходят при достаточно мягких условиях (практически при физиологических условиях). Это является ключевой характеристикой проявления антиоксидантных свойств витамина B12. Химический процесс окисления осуществляется пероксильными радикалами ( $\text{ROO}^\bullet$ ), которые по реакционно-окислительной способности существенно уступают таким эссенциальным радикалам как гидроксильный ( $\text{OH}^\bullet$ ) и алкоксильный ( $\text{RO}^\bullet$ ) радикалы. Цианокобаламин является кобальтовым комплексом нуклеотида 5,6-диметилбензимидазола и макроциклической корриновой системы. Атом кобальта связан координационными связями с атомами азота трех пирролиновых циклов и ковалентной связью с четвертым атомом азота пирролидинового кольца (рис. 1). Центральный атом кобальта находится в степени окисления Co(III) и не подвержен дальнейшему окислению. Отдельные молекулярные составляющие витамина B12 трудноокисляемы: корриновый макроцикл, алкиламидные группы, пятиугле-

родный сахарид (рибоза), связанный с фосфатной группой (фосфорный эфир  $\alpha$ -D-рибозы). Некоординированный 5,6-метилбензиимидазол в сравнительно мягких условиях также не окисляется. В более жестких условиях (бихроматом калия) окисляются 5,6-замещенные метильные группы бензольного кольца [16, 17]. Однако приведенные в настоящей работе экспериментальные данные однозначно указывают на то, что цианокобаламин реагирует с пероксильными радикалами, дезактивируя их, и замедляет окисление флуоресцеина пероксильными радикалами. Об антирадикальной активности цианокобаламина также свидетельствуют литературные данные, согласно которым цианокобаламин ингибирует цепные реакции окисления метиллинолеата и протеинов низкой плотности [18,19].

Для объяснения экспериментально наблюдаемых данных предполагается, что в процессах мягкого окисления участвует 5,6-бензиимидазольный нуклеотид, одним атомом азота аксиально-координированный с атомом кобальта, а другим атомом азота ковалентно связанный с сахаридом. Участие 5,6-диметилбензиимидазольного нуклеотида в реакции становится возможным именно из-за координации имидазольного азота с центральным металлоэлементом. Это приводит к активации атома водорода у атома углерода 2 имидазольного кольца и относительной стабилизации промежуточных структур при реакции отрыва атома водорода или присоединения кислородцентрированных радикалов к имидазольному кольцу. В итоге 5,6-диметилбензиимидазольный нуклеотид становится реакционно-активным по отношению к пероксильному радикалу. В результате реакции присоединения к двойной связи образуется промежуточный радикал с неспаренным электроном на атоме азота, который стабилизируется сопряжением с 5,6-диметилзамещенным бензольным кольцом и вследствие координации с центральным металлоэлементом комплекса Co(III). Далее азотцентрированный радикал реагирует со вторым пероксильным радикалом, как показано на схеме (рис.5).

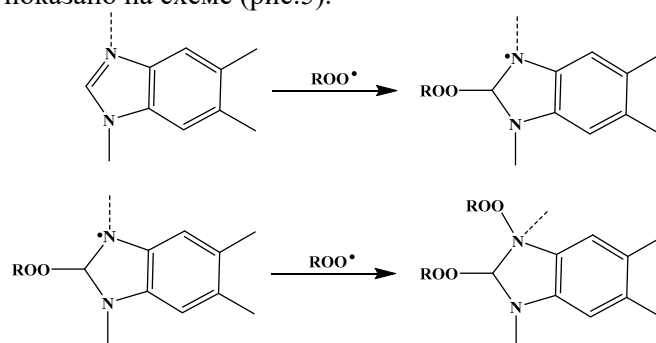


Рис. 5. Схема реакции пероксильных радикалов с 5,6-бензиимидазольным нуклеотидом цианокобаламина.

Явление активации реакционных центров лигандов наблюдалось и для других комплексов, у которых центральный металлоэлемент и свобод-

ный лиганд не активны по отношению к исследуемым свободным радикалам. Однако благодаря координации с центральным металлоэлементом потенциально реакционноактивные центры лиганда активируются. В итоге металлокомплекс приобретает антипероксирадикальную и антиоксидантную активность. Такой эффект наблюдается у замещённых салицилатных комплексов Cu(II), Fe(III) [20].

**Выводы.** На основе полученных экспериментальных данных установлено, что в водной среде при физиологических условиях витамин B12 не реагирует с пероксильными радикалами и способен ингибировать цепные окислительные процессы, включая реакции пероксидного окисления липидов, в которых носителем цепи являются пероксильные радикалы. Предложен возможный механизм химической реакции цианокобаламина с пероксильными радикалами.

Полученные в настоящей работе результаты являются важной информацией для выявления химических механизмов взаимодействия цианокобаламина с пероксильными радикалами, играющими одну из ключевых ролей в процессе окислительного стресса в организме, и для повышения эффективности лечебной терапии с использованием витамина B12.

Работа выполнена в рамках тематического финансирования ГКН РА (18Т-1D318) 2018-2020 гг.

Институт химической физики им. А. Налбандяна НАН РА  
e.mail: tavadyan@ichph.sci.am

**С. Г. Минасян, Л. Н. Мхитарян, З. О. Манукян,  
академик Л. А. Тавадян**

### **Антипероксирадикальная активность витамина B12**

Изучена антипероксирадикальная активность цианокобаламина (витамин B12) в водной среде при физиологических температуре и pH методами определения поглощающей емкости по отношению к кислородцентрированным радикалам (ORAC) и квадратично-волновой вольтамперометрии (SWV). Установлено, что в водной среде витамин B12 непосредственно реагирует с пероксильными радикалами. На основе кинетических данных, полученных методом ORAC, впервые определена антипероксирадикальная емкость цианокобаламина. Предложены механизм антипероксирадикальной активности и соответствующий реакционный центр цианокобаламина.

**Ս. Հ. Մինասյան, Լ. Ն. Մխիթարյան, Չ. Օ. Մանուկյան,  
ակադեմիկոս Լ. Ա. Թավադյան**

### **Վիտամին B12-ի հակապերօքսիլիզադիկալային ակտիվությունը**

Թթվածնակենտրոն ռադիկալների կլանման տարողության որոշման (ORAC) և քառակուսի ալիքային վոլտամպերաչափական (SWV) եղանակներով ուսումնասիրվել

Է ցիանկոբալամինի (վիտամին B12) հակապերօքսիլոռադիկալային ակտիվությունը ջրային միջավայրում, ֆիզիոլոգիական pH և ջերմաստիճանում: Ցույց է տրվել, որ ջրային միջավայրում վիտամին B12-ը, անմիջականորեն ռեակցում է պերօքսիլ ռադիկալների հետ: ORAC մեթոդով ստացված կինետիկական տվյալների հիման վրա առաջին անգամ որոշվել է ցիանկոբալամինի հակապերօքսիլ ռադիկալային տարողությունը: Առաջարկվել են հակապերօքսիլ ռադիկալային մեխանիզմ և ցիանկոբալամինի համապատասխան ռեակցիոն կենտրոն:

**S. H. Minasyan, L. N. Mkhitaryan, Z. H. Manukyan,  
academician L. A. Tavadyan**

### **Antiperoxyradical Activity of Vitamin B12**

Antiperoxyradical activity of cyanocobalamin (vitamin B12) was studied in aqueous medium at the physiological temperature and pH, using the methods on determination of absorption capacity in relation to oxygen-centered radicals (ORAC) and square-wave voltammetry (SWV). It was established that in aqueous medium vitamin B12 directly reacts with peroxy radicals. Based on the kinetic data obtained by the ORAC method antiperoxyradical capacity of cyanocobalamin was determined for the first time. A mechanism for antiperoxyradical reactivity of cyanocobalamin and appropriate reaction center have been suggested.

### **Литература**

1. *Giedyk M., Goliszewska K., Gryko D.* – Chemical Society Reviews. 2015. V. 44. № 11. P. 3391-3404.
2. *Brown K. L.* – Chemical reviews. 2005. V. 105. № 6. P. 2075-2150.
3. *Gruber K., Puffer B., Kräutler B.* – Chemical Society Reviews. 2011. V. 40. № 8. P. 4346-4363.
4. *Mc Caddon A.* – Biochimie. 2013. V. 95. – № 5. P. 1066–1076.
5. *Misra U. K., Kalita J., Singh S. K., Rahi S. K.* – Mol. Neurobiology. 2017. V. 54. № 2. P.1278–1284.
6. *Bito T., Misaki T., Yabuta Y. et al.* – Redox Biology. 2017. V. 11. P. 21–29.
7. *Mc Caddon A., Hudson P. R.* – Future Neurology. 2007. V. 2. № 5. P. 537–547.
8. *Solomon L.* – Am. J. Med. 2016. V. 129. № № 1. P. 115.9-115.16.
9. *Alzoubi K., Khabour O., Khader M. et al.* – Drug Chem. Toxicology. 2014. V. 37. № 3. P.276–280.
10. *Parker T. L., Miller S. A., Myers L. E.* – Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010. V. 58. P. 209–217.
11. *Gao G., Alessio H. M., Cutler R. G.* – Free Radical Biology and Medicine. 1993. V. 14. № 3. P. 303-311.
12. *Amorati R., Valgimigli L.* – Free Radical Research. 2015. V. 49. № № 5. P. 633–649.
13. *Derevenkov I. A., Salnikov D. S., Silaghi-Dumitrescu R.* – Coordination Chemistry Reviews. 2016. V. 309. P. 68–83.
14. *Hernandez S. R., Ribero G. G., Goicoechea H. C.* – Talanta. 2003. V. 61. P. 743-753.



15. *Lovander M. D., Lyon J. D., Parr D. L.* – Journal of The Electrochemical Society. 2018. V. 165. № 2. P. G18-G49.
16. *Higashi-Okai K., Nagino H., Yamada K., Okai Y.* – J. UOEH. 2006. V. 28. № 4. P. 359-368.
17. *Ronco A. M., Garrido A., Llanos M. N. et al.* – Lipids. 2005. V. 40. P.259–264.
18. *Рубцов М. В., Байчиков А. Г.* Синтетические химико-фармацевтические препараты. М. Медицина. 1971. 168 с.
19. *Reinhold K., Rens P.* – Liebigs Ann. Chem. 1969. V. 729. P. 231 -233.
20. *Tavadyan L. A., Tonikyan A. K., Minasyan S. H.* – Inorganica Chimica Acta. 2002. V. 328. P. 1-12.