

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ПРООКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ФЛАВОНОИДОВ

Е. В. Долгодилина, Т. А. Кукулянская

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Введение

Окисление чужеродных веществ, поступающих в организм, часто сопровождается образованием радикальных продуктов реакции, которые и определяют токсическое действие метаболитов. Наиболее эффективным средством защиты организма от патологического действия активных форм кислорода (АФК) и других радикальных продуктов являются антиоксидантные вещества фенольной природы, к которым относятся и флавоноиды [1,2]. Флавоноиды имеют в своей основе С6С3С6-скелет и отличаются между собой по степени окисленности пропановой цепочки, связывающей оба ароматических кольца. Биологическая активность флавоноидов обусловлена наличием реактивных гидроксильных и карбонильных групп. Наряду с антиоксидантным действием, проявляющимся в способности захватывать активные формы кислорода и ингибировать ферменты, участвующие в генерации АФК, флавоноиды могут проявлять прооксидантную активность. Примерами такого действия могут являться процессы генерации супероксиданион радикала и пероксида водорода в процессе аутоокисления флавоноидов [3] и восстановление ионов переходных металлов в низковалентные ионы, которые могут быть вовлечены в реакцию Фентона [4]. Образовавшиеся реакционно-способные радикалы и перекиси, взаимодействуя с эндогенными органическими молекулами, способствуют их аутоокислению, которое в организме чаще принимает форму перекисного окисления. Целью нашей работы было исследование антиоксидантных и прооксидантных свойств некоторых структурно близких флавоноидов.

Методы исследования

Перекисное окисление лецитина. Интенсивность процесса перекисного окисления оценивали по количеству образовавшегося малонового диальдегида, образующего окрашенный комплекс с 2-тиобарбитуровой, концентрацию которого определяли спектрофотометрически при $\lambda_{\text{max}}=532$ нм, используя $\epsilon = 156000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [5].

Пероксидазное окисление 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБД). Окисление ТМБД проводили в 0,1 М цитратно-ацетатном буфере (рН 5,5), содержащем 0,4 ммоль/л H_2O_2 , 10^{-11} моль/л пероксидазу хрена и ТМБД в концентрациях от 0,1 ммоль/л до 1 ммоль/л. За процессом окисления наблюдали спектрофотометрически по образованию окрашенных продуктов окисления ТМБД при $\lambda = 655$ нм. Концентрацию продуктов реакции определяли с использованием $\epsilon = 39000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [6].

Спектральные исследования. Измерения проводили на спектрофотометрах Solar PV 150, UV-VIS Cary-50 в УФ и видимом диапазоне длин волн в нетермостатируемых кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Результаты и обсуждение

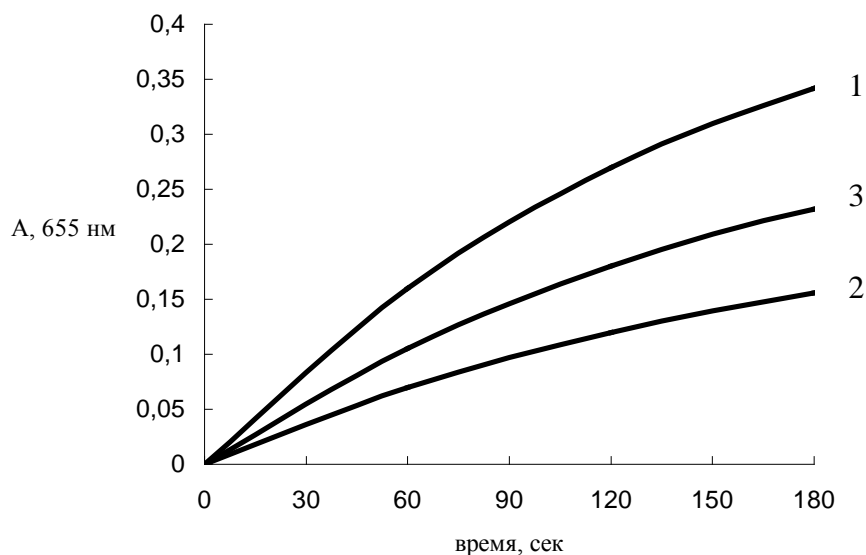
Хорошо известным является тот факт, что процесс перекисного окисления липидов является важной причиной накопления клеточных дефектов. Основным субстратом ПОЛ являются полиненасыщенные цепи жирных кислот, входящих в состав клеточных мембран, а также липопротеинов. Под действием активных форм кислорода происходит образование гидрофобных радикалов, взаимодействующих друг с другом [7]. Образующиеся липидные радикалы, а также 4-гидроксиноненаль и малоновый диальдегид (МДА), могут реагировать с молекулами белков и нуклеиновых кислот. Альдегидные

Рисунок 2 - Влияние флавоноидов на накопление продуктов перекисного окисления лецитина, индуцированного системой Фентона ($0,2 \cdot \text{ммоль/л Fe}^{2+}$, $0,02 \text{ ммоль/л H}_2\text{O}_2$).

* - различия достоверны при $p \leq 0,05$

Нами также было изучено влияние флавоноидов на процесс пероксидазного окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензида (ТМБД). Окисление аминобифенилов сопровождается образованием соответствующих катион-радикалов, комплексов с переносом заряда, дииминов, диимин-монокатионов. Реакционная способность образующихся свободнорадикальных промежуточных продуктов уменьшается с увеличением числа заместителей (метильных и метоксильных групп) по 3-, 3'-, 5-, и 5'-положениям ароматических структур.

Нами было установлено, что кверцетин в концентрациях $5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л в системе пероксидазного окисления ТМБД проявляет антиоксидантное действие и приводит к значительному снижению начальной скорости реакции V_0 с 7,2 до 0,004 мкмоль/л·мин (рис. 3). Эпикатехин также проявляет антиоксидантное действие, но с меньшей эффективностью (V_0 уменьшается лишь на порядок). Гесперетин в данной модельной системе свободнорадикального окисления не проявляет ни антиоксидантной, ни прооксидантной активностей.



1 – пероксидазное окисление ТМБД, 2 – в присутствии кверцетина, $0,6 \text{ мкмоль/л}$, 3 – в присутствии эпикатехина, $0,6 \text{ мкмоль/л}$.

Рисунок 3 - Влияние флавоноидов на пероксидазное окисление тетраметилбензида ($[\text{ТМБД}] = 0,6 \text{ ммоль/л}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,4 \text{ ммоль/л}$, $[\text{пероксидаза}] = 10^{-11} \text{ моль/л}$, $0,1 \text{ М}$ цитратно-ацетатный буфер, pH 5,5).

Многочисленные литературные данные свидетельствуют, что некоторые флавоноиды, в частности те, которые содержат катехольное кольцо, способны при определенных обстоятельствах окисляться [11, 13], в результате чего они могут генерировать токсичные хиноновые формы и даже продуцировать цитотоксичные количества перекиси водорода. Нами было изучена возможность пероксидазного окисления структурно близких и широко распространенных флавоноидов: кверцетина, эпикатехина и гесперетина. Было установлено, что кверцетин и эпикатехин являются субстратами для пероксидазы. При пероксидажном окислении эпикатехина образуется продукт с максимумом поглощения при $\lambda = 379 \text{ нм}$, а кверцетин – 374 нм . Окисление данных флавоноидов происходит с различной эффективностью. Максимальная скорость пероксидажного окисления кверцетина (концентрация пероксидазы - 10^{-11} моль/л)

достигается при его концентрации 45 мкмоль/л, а эпикатехина – 105 мкмоль/л. При изучении возможности пероксидазного окисления гесперетина не было зарегистрировано образование каких-либо окислительно модифицированных продуктов, как, впрочем, и уменьшение содержания гесперетина в реакционной смеси.

Таким образом, нами была исследована активность некоторых флавоноидов в свободнорадикальных процессах перекисного окисления лецитина и пероксидазного окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Как видно из полученных результатов в данных модельных системах исследованные флавоноиды проявляют как антиоксидантное, так и прооксидантное действие. Направленность и эффективность их действия обусловлена их структурными особенностями и концентрацией в реакционной смеси. Наибольшую антиоксидантную активность в процессе пероксидазного окисления ТМБД проявляет кверцетин. Это, вероятно, обусловлено тем, что кверцетин эффективно модифицируется в системе H_2O_2 /пероксидаза и при совместном окислении с ТМБД является, так называемым, «медленным субстратом» и ингибитором окисления аминобифенила. Возможность пероксидазного окисления кверцетина с достаточно высокой эффективностью связана с его структурными особенностями – наличие катехольного В-кольца и карбонильной группы (рис. 1). Однако, именно кверцетин оказывает наибольшее прооксидантное действие в системах перекисного окисления липидов, индуцированных ионами Fe^{2+} . Это также связано с его структурными особенностями – присутствием в структуре катехольного кольца, так как флавоноиды с подобной структурой могут аутоокисляться в присутствии переходных металлов и генерировать активные формы кислорода, которые могут быть причиной окисления липопротеинов низкой плотности или однонитевых разрывов в ДНК [14].

Список литературы

1. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах. // СОЖ. - 2000. - Том 6, 12.- С. 13-19.
2. Сорокина И.В., Крысин А.П., Хлебникова Т.Б. и др. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободнорадикальному окислению // Новосибирск: ГПНТБ СО РАН. – 1997. – Вып. 46 - 68 с.
3. Dangles, O., Dufour, C. and Fargeix, G. Inhibition of lipid peroxidation by quercetin derivatives: antioxidant and prooxidant effects. // J. Chem. Soc.- 2000. - Vol.2. - P. 1215-1222.
4. Cao, G., Sofic, E. and Prior R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure- activity relationships. // Free Radical Biol. Med. - 1997. - Vol. 22. - P. 749-760.
5. Современные методы в биохимии / Под ред. Ореховича В. Н. М.: Медицина, 1977.
6. Курченко, В. П., Выдумчик, Н. В., Пикулев, А. Т. Сравнительное изучение окисления бензидина и его аналогов микросомальной гидроксиглирующей системой печени и гемопротеидами крови // Материалы всесоюзного симп. - Ленинград, 1985. - С. 41-43.
7. Владимиров, Ю. А., Арчаков, А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972.- 252 с.
8. Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., Marnett, L.J. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. // J Biol Chem. - 2003. - Vol. 278. - P. 31426-31433.
9. Graefe, E. U., Witting, J., Mueller, S. et al. Pharmacokinetics and Bioavailability Quercetin Glycosides in Humans // J. Clin. Pharmacol. - 2001. - N 41. - P. 15-25.
10. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. The Effect of Plants Flavonoids on Mammalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease, and Cancer // Pharmacological Reviews. - 2000. - 52, N 4. - P. 15-25; 673 -751.
11. Galati, G., Sabzevar, O., Wilson, J. X., O'Brien, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. // Toxicology. - 2002. - Vol. 177. - P. 91- 104.

12. Halliwell B., Gutteridge M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford, 1998.
13. Chan, T.S., Galati, G., Pannala, A.S., Rice Evans, C., O'Brien, P.J. Simultaneous detection of the antioxidant and prooxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidase system. // Free Radic. Res.- 2003. - Vol. 37.- P. 787-794.
14. Chan T., Galati G., O'Brien P.J. Oxygen activation during peroxidase catalyzed metabolism of flavones and flavanones.// Chemico-Biological Interactions. – 1999. – Vol. 122. – P. 15-25.