

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА ДИГЛЮКОЗИДА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко*

*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика
Беларусь*

** Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Введение

В процессе метаболизма в клетках аэробных организмов постоянно образуются токсичные формы кислорода. Эти частицы способны инициировать повреждение различных белков и пептидов, азотистых оснований и нуклеиновых кислот, липидов и других биомолекул [1]. Существующие системы защиты организма от активных форм кислорода не всегда справляются с поддержанием оксидантно-антиоксидантного баланса, что не редко приводит к различным патологиям. Указанные предпосылки определяют актуальность целенаправленного поиска антиоксидантов и изучения их действия на конкретную окисляемую мишень.

Наиболее перспективными источниками получения антиоксидантов являются растения. Семена льна масличного богаты лигнанами, фенольными соединениями, обладающими антиокислительными свойствами. Основной лигнановый компонент семян льна – секоизоларицирезинола диглюкозид (СДГ), содержание которого составляет около 3%, что делает актуальным его получение из данного растительного источника.

Цель работы – выделение природного лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного с последующим модифицированием его структуры и сравнением антиоксидантных и генопротекторных свойств полученных соединений.

Методы исследования

Получение лигнансодержащего экстракта. Высушенные семена льна масличного, в количестве 120 г измельчали и обезжирили гексаном. К полученной массе (100 г) добавляли 2 000 мл 50% водного этанола и 80 мл 4М водного раствора NaOH, суспензию шестикратно подвергали обработке микроволновым излучением мощностью 150 Вт в течение 2 мин с перерывом в 1 мин. Экстракт отделяли от экстрагируемой массы и подкисляли до pH=3-4 6М раствором HCl. Упаривание водно-спиртового экстракта в вакууме при пониженном давлении на роторном испарителе дало 23,2 г сухого остатка.

Выделение СДГ из лигнансодержащего экстракта. Концентрат растворяли в воде и разделяли хроматографически на колонке (46×2,5 см) с ионообменником Diaion HP-20. Элюирование проводили ступенчатым градиентом водного этанола (10%, 15%, 20%, 40%) при скорости потока 5 мл/мин. Секоизоларицирезинола диглюкозид элюированный 40% этанолом, собирали, концентрировали и подвергали рехроматографии. Повторное разделение осуществляли на колонке (40×1,5 см), заполненной тем же ионообменным сорбентом с использованием аналогичного ступенчатого градиента. При промывании колонки 20% этанолом элюировались наиболее чистые фракции, содержащие СДГ, которые собирали, концентрировали и подвергали окончательной очистке на обращенно-фазном силикагеле С₁₈ (колонка 45×2 см). В качестве элюирующей системы использовали ступенчатый градиент водного этанола (10%, 25%, 50%) при скорости потока 0,7 мл/мин. Очищенный СДГ элюировался при промывании колонки 25%-ным водным этанолом.

Синтез производных СДГ. Получение секоизоларицирезинола осуществляли путем кислотного гидролиза диглюкозида секоизоларицирезинола в присутствии 2 М соляной кислоты в течение 4 ч при 98°C. Секоизоларицирезинол образовывался в виде светлорозового осадка, который не растворялся в воде.

Диацетильное производное секоизоларицирезинола получали реакцией с ацетилхлоридом, взятом в 77-ти кратном избытке, в течение 12 ч при комнатной температуре.

Спектры ЯМР записывались на приборе Bruker Avance. ИК-спектры снимались на спектрометре Nexus фирмы «Thermo Nicolet». Чистоту и индивидуальность полученных соединений контролировали методом ТСХ и ВЭЖХ. ТСХ-анализ проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, США) в системе растворителей: вода - изопропиловый спирт - водный аммиак (1:8:1) и этилацетат – петролейный эфир (2:3). Детектирование осуществляли с помощью трансиллюминатора с максимумом излучения в области 254 нм.

ВЭЖХ-хроматограммы лигнансодержащих фракций и масс-спектры полученных соединений получены на хромато-масс-спектрометре «Waters Micromass ZQ 2000» (Waters, США). Колонка – BDS HYPERSIL C₁₈, 250×4,6 мм. Детекцию осуществляли диодно-матричным детектором при длине волны 280 нм и масс-детектором с ионизацией электрораспылением (ESI). Элюирование проводили в линейном градиенте при использовании системы состоящей из ацетонитрила (раствор А) и воды с 0,1%-м содержанием муравьиной кислоты (раствор Б) (А : Б: 0-5 мин – 30 : 70, 20-30 мин – 70 : 30 и 50-65 мин – 100 : 0) со скоростью потока 0,7 мл/мин [2].

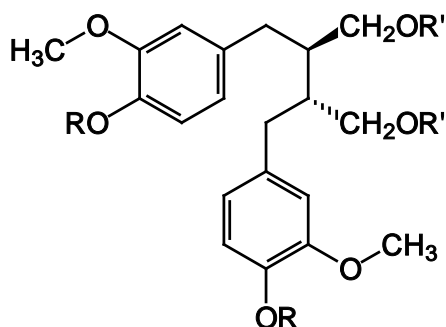
Антиоксидантная и генопротекторная активность лигнанов. Антиоксидантная и генопротекторная активность полученных лигнанов исследовалась в модельной системе свободнорадикального повреждения плазмидной ДНК pBR 322, инициированного реакцией Фентона в присутствии аскорбиновой кислоты. Для моделирования процесса повреждения плазмидной ДНК pBR 322 в пробирки Эппендорфа последовательно вносили 2 мкл фосфатного буфера (50 мМ; рН=7,4) и 2 мкл ДНК (50 мкг/мл), в том же объеме вносили растворы лигнанов, содержащие 3,5% процента метанола в концентрациях 2, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 мкМ (в пробирки без ингибитора помещали 2 мкл 3,5% метанола) после чего добавляли по 2 мкл свежеприготовленных растворов H₂O₂ (30 мМ), аскорбиновой кислоты (0,24 мМ), FeCl₃ (1,6 мМ). Следили, чтобы общий объем системы составлял 12 мкл. После инкубирования реакционной смеси при 37 °С в течение 1 ч добавляли 3 мкл раствора бромфенолового синего. Приготовленные пробы вносили в гель (по 12 мкл на дорожку). Электрофорез проводили при 60 В в три-ацетатном ЭДТА буфере (40 мМ трис-ацетата и 1 мМ ЭДТА; рН=7,4) содержащем раствор бромистого этидия. Для обнаружения ДНК гель просматривали на трансиллюминаторе. Регистрацию результатов осуществляли фотографически. Для количественной обработки полученных данных использовали программу TotalLab V2.0.

Результаты и обсуждение

Выделение СДГ осуществлялось путем получения лигнансодержащего экстракта из семян льна масличного и его последовательного разделения с помощью хроматографии. Получение экстракта проводилось по разработанному нами способу [3], который включал последовательные стадии обезжиривания измельченного льняного семени, гидролиз с последующей нейтрализацией и концентрированием полученного экстракта. Процесс экстракции проводили совместно с процессом щелочного гидролиза водно-этанольной смесью при воздействии микроволнового излучения. Это дало возможность значительно сократить время получения исходного экстракта и увеличить его выход до 23,2 % при содержании СДГ 61,2 мг/г в расчете на сухой экстракт. При этом применялись экологически безопасные растворители.

При очистке лигнансодержащего экстракта использовался ионообменный сорбент Diaion HP-20. Элюирование СДГ проводили водно-этанольными растворами. Окончательную очистку СДГ-обогащенной фракции осуществляли на обращенно-фазном силикагеле С₁₈, что также позволило осуществить разделение при помощи водного этанола в качестве подвижной фазы. Окончательная очистка позволила получить СДГ с чистотой 95%. Выход лигнана составил 1,03% по отношению к введенному экстракту [4].

После выделения СДГ было осуществлено последовательное превращение его в агликон (секоизоларицирезинол) и его последующая трансформация в диацетильное производное по фенольным гидроксилам (секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат) (рисунок 1).



$R'=b$ - глюкопиранозил, $R=H$ - секоизоларицирезинола диглюкозид (СДГ);
 $R', R=H$ - секоизоларицирезинол;
 $R'=H, R=COCH_3$ - секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат.

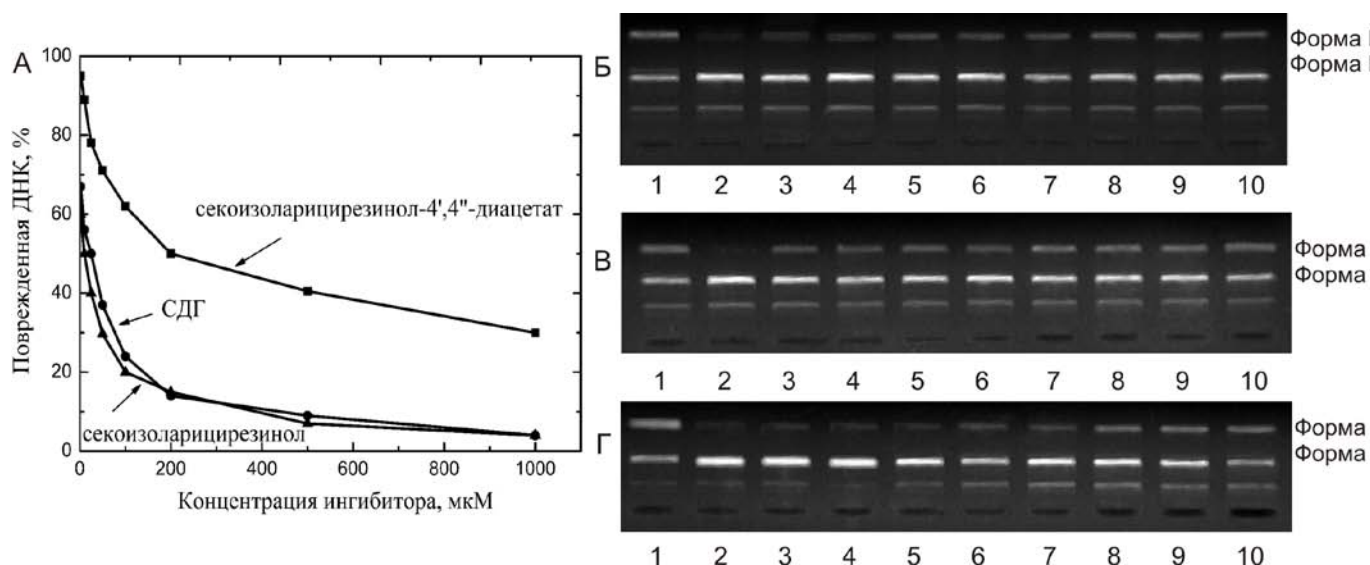
Рисунок 1 – Структуры полученных соединений.

Структуры трех соединений были подтверждены на основании данных ИК-, масс и ЯМР-спектроскопии. В ЯМР 1H спектрах всех полученных соединений в области 6.49–6.92 м.д. наблюдается три сигнала, характерных для протонов 1,3,4 -тризамещенного бензольного кольца. Синглетный сигнал при 3.65–3.80 м.д. принадлежит протонам метоксигруппы в ароматическом кольце. Также в спектре присутствуют сигналы алифатической части агликонового фрагмента. Мультиплетный сигнал принадлежит метиновому протону. Метиленовые протоны бензильной группы проявляются в виде двух дублет дублетов в области при 2.40–2.58, 2.57–2.81 м.д., соответственно. В ИК-спектрах всех трех соединений имеются полосы поглощения в области 3350-3400 cm^{-1} , относящиеся к валентным колебаниям гидроксильной группы.

Для оценки антиоксидантной активности какого-либо соединения определяющим фактором являются условия выявления антиоксидантных свойств, особо подчеркивается важность того, какие инициатор и мишень окисления.

Инициацию образования активных форм кислорода в данном исследовании осуществляли с помощью реакции Фентона [1] в присутствии аскорбиновой кислоты. В результате реакции образуется чрезвычайно реакционноспособный гидроксид-радикал ($\bullet OH$), который способен наиболее эффективно из всех активных форм кислорода взаимодействовать с различными окисляемыми объектами.

В качестве объекта окисления нами была выбрана плазмидная ДНК pBR 322, которая состояла из 30% суперспирализованной формы I и 60% формы II (суперспирализованная ДНК с односторонним надрезом). Под действием образующегося в результате реакции Фентона гидроксид-радикала в суперспирализованной форме I образуются односторонние надрезы и она переходит в менее компактную форму II, при этом уменьшается ее электрофоретическая подвижность (рисунок 2, дор. 2). При добавлении в реакционную систему лигнанов в различной концентрации наблюдалось ингибирование процесса одностороннего надреза плазмидной ДНК (рисунок 2, дор. 3-10).



А: Зависимость количества поврежденной ДНК от концентрации лигнанов.

Б, В, Г: Электрофореграммы зависимости количества поврежденной ДНК от концентрации лигнана. Дор. 1 – буфер + ДНК, дор. 2 – буфер + ДНК + H_2O_2 + аскорбиновая кислота + $FeCl_3$, дор. 3–10 – компоненты дор. 2 + СДГ (Б), секоизоларицирезинол (В), секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат (Г) в концентрациях 2, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 мкМ, соответственно.

Рисунок 2 – ДНК-протекторная активность лигнанов в отношении гидроксид-радикалов, образующихся в результате реакции Фентона.

Как видно из рисунка 2А СДГ ($IC_{50}=25$ мкМ) и секоизоларицирезинол ($IC_{50}=10$ мкМ) проявляют себя как мощные антиоксиданты, в то время как ингибирующая активность секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата значительно ниже ($IC_{50}=200$ мкМ), что связано с введением в его структуру ацильных остатков по фенольным гидроксилам (IC_{50} – концентрация антиоксиданта, при которой происходит ингибирование процесса окисления на 50%).

В организме млекопитающего СДГ метаболизируется с помощью ферментных систем кишечной микрофлоры до энтеродиола и энтеролактона (рисунок 3), называемых лигнанами млекопитающих или энтеролигнанами [5]. Данные соединения обладают также антиоксидантной активностью [6-9].

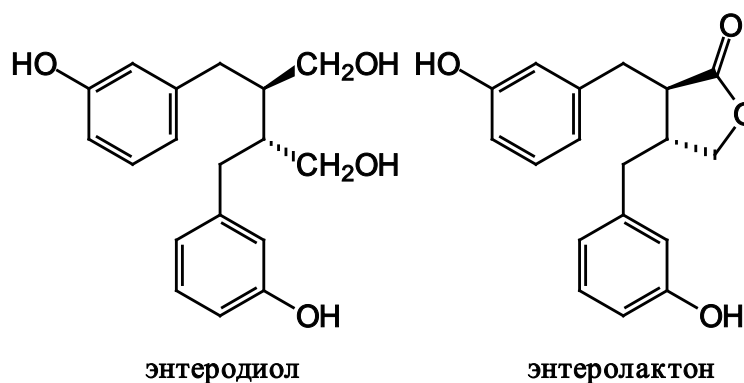
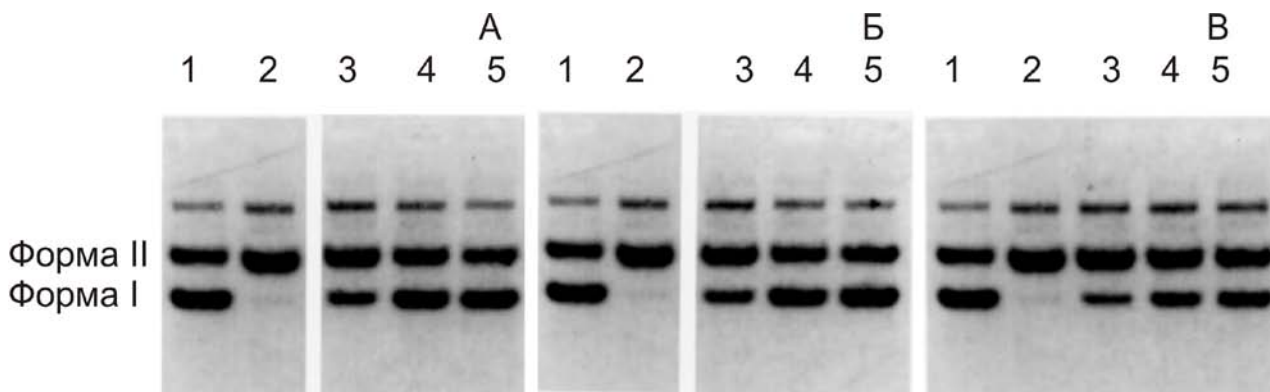


Рисунок 3 – Структуры энтеролигнанов [5].

В опытах [5] при инициации окисления плазмидной ДНК с помощью реакции Фентона в присутствии ЭДТА лигнан СДГ равно как и энтеролигнаны в концентрации 100 мкМ проявляли 100% ингибирующую активность (рисунок 4, дор. 4), что хорошо согласуется с полученными данными.



Дор. 1 – буфер + ДНК, дор. 2 – буфер + ДНК + ЭДТА + H_2O_2 + Fe^{2+} , дор. 3–5 – компоненты дор. 2 + СДГ (А), энтеродиол (Б), энтеролактон (В) в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ, соответственно.

Рисунок 4 – Электрофореграммы зависимости количества поврежденной ДНК от концентрации СДГ и энтеролигнанов [6].

В анализах, проводимых в отсутствие ЭДТА (т.е. в условиях опыта аналогичных нашему) лигнаны могут выступать в роли слабого хелатообразующего агента. При этом энтеродиол проявлял большую ингибирующую активность по сравнению с СДГ (рисунок 5А, 5Б). Это объясняется присутствием в структуре СДГ двух глюкозидных остатков, что значительно снижает его хелатообразующую способность и создает пространственные затруднения при защите молекулы ДНК от свободных радикалов.

Дор. 1 – буфер + ДНК, дор. 2 – буфер + ДНК + H_2O_2 + аскорбиновая кислота + $FeCl_3$, дор. 3–5 – компоненты дор. 2 + СДГ (А), энтеродиол (Б), энтеролактон (В) в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ, соответственно.

Рисунок 5 - Электрофореграммы зависимости количества поврежденной ДНК от концентрации СДГ и энтеролигнанов [6].

Эти данные подтверждают множественность механизмов действия антиоксидантов. В данном случае энтеролигнаны, секоизоларицирезинол, секоизоларицирезинол-4',4''-

диацетат больше себя проявляют не как доноры протона, а как комплексообразователи. Они лучше ингибируют металлозависимую реакцию свободнорадикального окисления по сравнению с СДГ за счет связывания катионов металлов переходной валентности, катализирующих реакции образования активных форм кислорода.

Несмотря на способность лигнанов хелатировать катионы металлов, ведущим механизмом антиоксидантного действия веществ этой группы остается взаимодействие с образующимися в ходе реакции свободными радикалами или с перокси-радикалами, поэтому наиболее мощными антиоксидантами являются секоизоларицирезинол и СДГ. При этом в связывании со свободными радикалами могут принимать участие не только фенольные гидроксилы, но и алифатические гидроксильные группы. Этот фактор также объясняет меньшее значение IC_{50} секоизоларицирезинола по сравнению с СДГ. Бутандиольное строение лигнана является более эффективным по сравнению с бутиролактонным (рисунок 5Б, 5В) с точки зрения антиоксидантной активности. Совокупность этих факторов объясняет максимальную ингибирующую активность энтеродиола по сравнению с СДГ и энтеролактоном, а также наличие хотя и не большой, но антиоксидантной активности секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата.

Таким образом, было осуществлено выделение природного лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного, а также синтез его производных и сравнение антиоксидантных свойств полученных соединений. В качестве модельной системы использовался процесс свободнорадикального повреждения плазмидной ДНК рBR 322, инициированного реакцией Фентона в присутствии аскорбиновой кислоты. В результате было показано, что наименьшую антиоксидантную активность проявлял секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат, в то время как антиокислительные свойства секоизоларицирезинола незначительно отличались от антиоксидантной активности природного СДГ.

Список литературы

1. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 43, №7. – С. 13–19.
2. Coran, S.A. High-performance thin-layer chromatographic-densitometric determination of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed / S.A. Coran, V. Giannellini, M. Bambiotti-Alberti // J. Chromatogr. A. 2004. – Vol. 1045. – P. 217–222.
3. Стасевич, О.В. Эффективный способ получения лигнансодержащего экстракта из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Вестн. БГУ. Сер. 2. – 2009. – №2. – С. – 26–29.
4. Стасевич, О.В. Выделение секоизоларицирезинола диглюкозида из лигнансодержащего экстракта *Linum Usitatissimum*. / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Химия природных соединений – 2009. – № 1. – С. 21–23.
5. Muir, A.D. Flax lignans – analytical methods and how they influence our understanding of biological activity / A.D. Muir // Journal of AOAC International. – 2006. – Vol. 89, №4. – P. 1147–1157.
6. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone / D.D. Kitts [et al.] // Molecular and Cellular Biochemistry – 1999. – Vol. 202. – P. 91–100.
7. Hu, C. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro / C. Hu, Y.V. Yuan, D.D. Kitts // Food and Chemical Toxicology – 2007. – Vol. 45. – P. 2219–2227.
8. Prasad, K Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone/ K. Prasad // Int. J. Angiol. – 2000. – Vol. 9, № 4. – P. 220–225.

9. Niemeyer, H.B. Differences in the antioxidant activity of plant and mammalian lignans
/ H.B. Niemeyer, M. Metzler // Journal of Food Engineering – 2003. – Vol. 56. – P. 255–256.