

Несколько больше выражены изменения на участке 2. Влияние пала отрицательно сказывается на таких видах как *Calasoma auropunctatum* Hrbst., *Loricera pilicornis* F., *Poecilus punctulatus* Schall., некоторых жуках pp. *Harpalus* Latr. и *Amara* Bon. и др.

Изменение почвенного покрова, почвенных условий и микроклимата отражается как на хищных формах, так и на миксофитофагах. Более чувствительными являются последние, поскольку выгорание подстилки и изменение микроклимата сужают для многих видов необходимое для них пространства экониш.

В целом проведенная работа позволяет заключить, что жужелицы довольно сильно реагируют на влияние пирогенного фактора, что обусловлено как изменением растительного покрова, так и микроклимата. Кроме того, на структуру сообщества жужелиц оказывает влияние развитие здесь других беспозвоночных, которые являются кормовыми объектами для них.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что подобные исследования необходимо продолжить. На основании собранных материалов появится возможность разработать рекомендации по проведению (в случае такой необходимости !) весенних палов на луговых угодьях в оптимальные сроки и с минимальной отрицательной нагрузкой на живую природу.

Литература

1. Александрович О. Р., Лопатин И. К., Писаненко А. Д., Цинкевич В. А., Снитко С. М. Каталог жесткокрылых (Coleoptera, Insecta) Беларуси.- Мн.: ФФИ РБ.- 1996.- 103 с.
2. Песенко Ю.А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. М.:Наука, 1982. 288 с.
3. Санько П.М. Естественные луга Белоруссии, их характеристика и оценка. Мн.:Наука и техника, 1983. 247 с.
4. Хотько Э. И. Определитель жужелиц (Coleoptera, Carabidae). Мн., «Наука и техника», 1978, 88 с.

ПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ФЛАВОЛИГНАНОВ В ПРИСУТСТВИИ НАДН И НАДФН

А. С. Щекатихина, Т. А. Кукулянская, В. П. Курченко

Обнаружено, что флавоноиды, содержащие фенольное В-кольцо способны аутоокисляться в отсутствие переходных металлов и генерировать активные формы кислорода в процессе пероксидазного окисления. Пероксидаза/ H_2O_2 катализирует одноэлектронное окисление флавоноида. Продукты окисления способны окислять НАДН до НАД-радикала, кото-

рый способен восстанавливать молекулярный кислород до супероксиданион радикала. В свою очередь, образовавшийся супероксиданион радикал, восстанавливает цитохром с (Fe^{3+}) и превращается в молекулярный кислород [1]. Было показано, что пероксидазному окислению по данному механизму подвергаются флаволигнаны такие как силимарин силибининового типа и чистый силибинин.

ВВЕДЕНИЕ

Флаволигнаны составляют сравнительно немногочисленную группу природных соединений, большая их часть выделена из плодов расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaerth. (Asteraceae) [2]. Наиболее характерными флаволигнанами плодов расторопши пятнистой являются силибинин, силикрестин и силидианин. Силимарин – флавоноид, состоящий в основном из силибинина с небольшим содержанием других стереоизомеров [3].

Известно, что силимарин проявляет гепатопротекторный эффект против таких гепатотоксичных веществ как CCl_4 , фаллоидин и α -аманитин и ряда других ксенобиотиков [4]. В связи с этим он широко применяется для лечения заболеваний печени. Однако флавоноиды не являются однородной группой со сходными химическими свойствами, и некоторые из них при определенных условиях могут окисляться молекулярным кислородом с образованием супероксиданион радикала [1].

Целью настоящей работы было изучение механизма окисления у силимарина и чистого силибинина в присутствии пероксидазы/ H_2O_2 и НАДН или НАДФН.

МЕТОДИКА

В работе использовали силимарин (silymarine) («Sigma», США), НАДН и НАДФН, пероксидазу хрена, супероксиддисмутазу, цитохром с («Fluka» США). Измерения проводили на спектрофотометре СФ-103, в нетермостатируемой кювете при комнатной температуре с длиной оптического пути 1 см. С целью получения достоверных величин измерений опыты проводили не менее трех раз.

Реакционная смесь объемом 2 мл 0,1 М Трис- HCl , 1 мМ ЭДТА буфера, рН 7,4, содержала 25 мкМ флаволигнана (силимарина или силибинина), 0,1 мкМ пероксидазу, 200 мкМ НАДН или НАДФН и 25 мкМ перекиси водорода. Реакция запускалась добавлением пероксидазы. Окисление НАДН или НАДФН регистрировали по убыли оптической плотности на 340 нм. Окисление флаволигнанов регистрировали по убыли оптической плотности на максимумах поглощения силимарина и силибинина

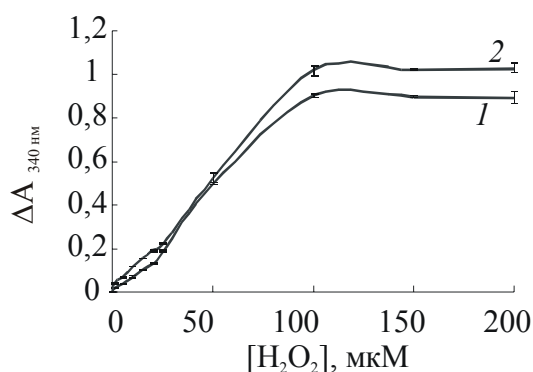


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от концентрации перекиси (1 200 мкМ) в 0,1 М Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА буфере, рН 7,4, 0,1 мкМ пероксидазы, 200 мкМ НАДН: 1 – 25 мкМ силимарин, 2 – 25 мкМ силибинин

НАДН от концентрации перекиси и от концентрации флаволигнанов в реакционной смеси (рис.1).

Из приведенных данных видно, что перекись способствуют окислению НАДН с высокой эффективностью (рис.1). Скорость окисления НАДН также зависит от концентрации флаволигнанов в реакционной смеси. Также нами было показано, что в отсутствие НАДН флаволигнаны активно окисляются пероксидазой, а при добавлении в реакционную смесь восстановленного НАДН, силимарин и силибинин не окислялись.

Таким образом, эти данные указывают на возможность протекания первой реакции пероксидазного окисления флаволигнанов с образованием окисленных форм последних. Окисленные флавоноиды способны восста-

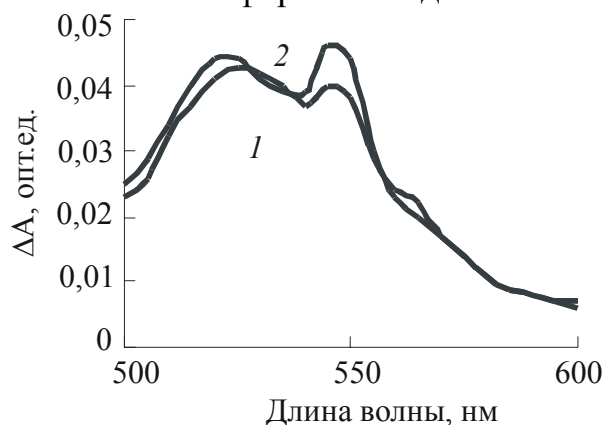


Рис. 2. Спектр поглощения реакционной смеси после 2 минут инкубации 0,1 М Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА буфер, рН 7,4, 10 мкМ флаволигнана (силимарина или силибинина), 200 мкМ НАДН, 10 мкМ H₂O₂, 0,1 мкМ HRP, 40 мкМ цитохром с: 1 – без флаволигнанов, 2 – с силимарином

при 290 нм и 325 нм. При измерении образования супероксиданион радикала в реакционную смесь вносили 10 мкМ цитохрома с. Восстановление окисленной формы цитохрома с регистрировали по возрастанию оптической плотности при 550 нм [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально определяли зависимость степени окисления

НАДН, что, по-видимому, сопровождается генерацией НАД-радикала. В литературе имеются данные, что взаимодействие НАД-радикала с кислородом приводит к генерации супероксиданион радикала.

Образование супероксиданион радикала в процессе пероксидазного окисления флаволигнанов в присутствии НАДН определяли по восстановлению цитохрома с.

При сравнении спектров поглощения реакционной смеси до и после реакции, видно, что на 550 нм появляется пик, который до ре-

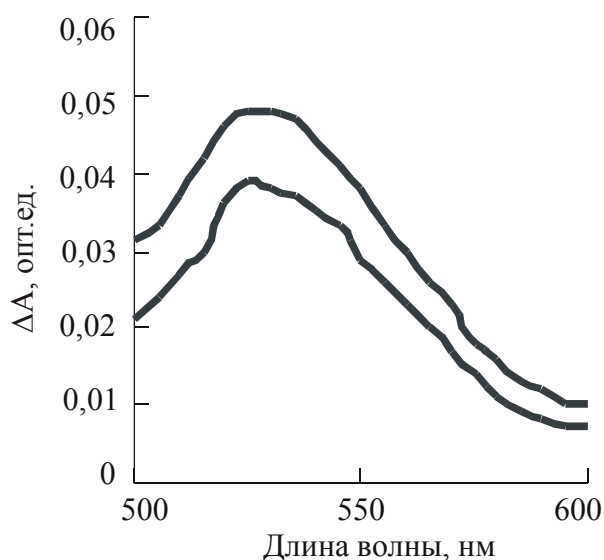
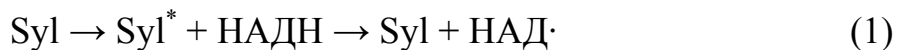


Рис. 3. Спектр поглощения реакционной смеси в присутствии СОД после 2 минут инкубации 0,1 М Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА буфер, рН 7,4, 10 мкМ флаволигнана (силимарина или силибинина), 200 мкМ НАДН, 10 мкМ Н₂О₂, 0,1 мкМ HRP, 40 мкМ цитохром с, 1 мкМ СОД: 1 – без флаволигнанов, 2 – с силимарином

из рисунка 3, СОД полностью ингибирует процесс восстановления цитохрома с, это позволяет сделать нам вывод о том, что пероксидазное окисление флаволигнанов происходит с образованием супероксиданион радикала.

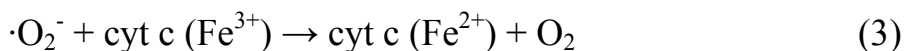
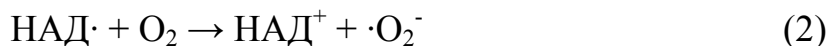
Также нами были изучены спектры поглощения флаволигнанов до и после реакции пероксидазного окисления. Было показано, что основные изменения можно зарегистрировать при длинах волн 290 нм и 335 нм. Спектр поглощения реакционной смеси, содержащей силимарин, изменяется в ходе реакции следующим образом: пик на 290 нм увеличивается, причем в присутствии СОД увеличение оптической плотности более значительное, а пик на 335 нм уменьшается, и при добавлении СОД к реакционной смеси уменьшение более сильное. Для спектров поглощения реакционной смеси, содержащей силибинин, характер изменений сохраняется, что и для силимарина. Таким образом, можно заключить, что как без СОД, так и в присутствии фермента в реакционной смеси как силимарин, так и силибинин окисляются.

Таким образом, нами был исследован один из возможных механизмов пероксидазного окисления силимарина силибининового типа и чистого силимарина и показано, что этот механизм протекает через генерацию супероксиданион радикала:



акции отсутствовал (рис. 2). Увеличение оптической плотности при 550 нм свидетельствует о том, что цитохром с восстанавливается. Причем, силимарин способствует более интенсивному восстановлению цитохрома с. Силибинин на восстановление цитохрома с практически не ока

Для доказательства того, что процесс пероксидазного окисления флаволигнанов в присутствии НАДН протекает с генерацией супероксиданион радикала, нами была исследована способность СОД ингибировать реакцию восстановления цитохрома с. Как видно



Также нами было изучен этот же механизм окисления, но в присутствии НАДФН. Было показано, что, как и НАДН, НАДФН способен окислять силимарин, причем значительных различий в протекании реакции окисления не было зарегистрировано.

Таким образом, не исключено, что при усиленном суточном потреблении силимарина или силибинина, в процесс окисления последних могут вовлекаться как НАДН, так и НАДФН, что может существенно увеличить продукцию супероксиданион радикала.

Литература

1. *Chan T., Galati G., O'Brien P.J.* Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones and flavanones.// *Chemico-Biological Interactions*. 1999. Vol. 122. P. 15–25.
2. *Куркин В.А., Запесочная В.Г.* Флаволигнаны и другие природные лигнаноиды. Проблемы структурного анализа. // *Химия природ. соединений*. 1987. №1. С. 11–35.
3. *Zhao J., Agarwal R.* Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implications in cancer chemoprevention.// *Carcinogenesis*. 1999. Vol. 20, № 11. P. 2101–2108.
4. *Middleton E. JR., Kandaswami C., Theoharides T. C.* The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer // *Pharmacological Reviews*. 2000. Vol. 52. № 4. P. 673-751.