

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ И ПРООКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ КОНДЕНСИРОВАННЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Д. А. Туровец, Д. О. Кулик

ВВЕДЕНИЕ

Как стало известно в последние годы, свободные радикалы являются необходимыми метаболитами, обеспечивающими протекание многих физиологических реакций, и их стационарный уровень поддерживается антиоксидантной системой. Однако нарушение сбалансированности между системами генерации свободных радикалов и антиоксидантной системой приводит к развитию окислительного стресса [2].

Многие фенольные соединения из растительных тканей, поступающие в пищу, являются потенциальными антиоксидантами: флавоноиды и меланины могут работать как ловушки активных форм кислорода (АФК) [4]. Антирадикальные свойства меланинов связаны с наличием большого числа сопряжённых двойных связей в их молекулах, а также с наличием различных функциональных групп [8]. Наибольший вклад в антирадикальную активность флавоноидов вносят катехольная группа кольца В и гидроксил в положении С-3. Кроме того, наличие двойной связи между углеродными атомами С-2 и С-3 также усиливает их антирадикальные свойства [2].

Наряду с антиоксидантным, флавоноиды способны проявлять прооксидантное действие. Этому способствует их способность окисляться—восстанавливаться, получая электрон, как от органических продуктов, так и от металлов переменной валентности [6]. При этом прооксидантная активность флавоноидов так же, как в случае ингибирования OH^\bullet и перекисных радикалов, прямо зависит от наличия OH -заместителей и двойной связи С2-С3 между кольцами А и В, а также от концентрации [5, 7]. Целью нашей работы было исследование антиоксидантных и прооксидантных свойств конденсированных фенольных соединений, таких как флавоноиды и меланины.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) и лецитина оценивали по количеству образованных ТБК-активных продуктов, измеряя их спектрофотометрически на «Ultrospec 100 pro» при длине волны 532 нм, используя $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ [3].

Электрофорез ДНК проводили в 0,9% агарозном геле в 0,1 М трифосфатном буфере (рН 8,0) с 0,001 М ЭДТА, добавляя лидирующий краситель бромфеноловый синий. ДНК из эритроцитов цыплят инкубировали в присутствии различных систем генерации АФК. Изучали возможность предотвращения повреждения ДНК меланином и флавоноидами.

Аутоокисление кверцетина проводили в фосфатном буфере (0,02 М, рН 7,8), используя кверцетин в ДМСО (14 мкМ). Измеряли оптическую плотность на «Ultrospec 100 pro» при $\lambda = 406$ нм на нулевой и двадцатой минуте протекания реакции, соответственно до и после окисления.

Системы генерации свободных радикалов использовались следующие: Fe/аскорбатная система – $[\text{Fe}^{2+}] = 50$ мкмоль/л; [аскорбат] = 0,5 ммоль/л; система Фентона – $[\text{Fe}^{2+}] = 1$ мкмоль/л, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,1$ мкмоль/л; $[\text{FeSO}_4] = 1$ мкмоль/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что ПОЛ может индуцироваться под действием различных систем генерации гидроксильных радикалов, таких как Fe/аскорбатная система, система Фентона, а также в присутствии металлов переменной валентности, таких как медь и железо. Внедряясь в липидный слой клеточных мембран, радикал гидроксила инициирует реакции цепного окисления липидов, что приводит к повреждению мембран, нарушению их функций и гибели клеток [2]. Известно, что некоторые флавоноиды [6] и меланины [8] подавляют как ферментативное, так и неферментативное ПОЛ. Следствием антирадикального действия флавоноидов [2] и меланинов [8] является ингибирование реакции Фентона и других процессов с участием активных форм кислорода. Нами была изучена способность различных флавоноидов, таких как гесперидина, гесперетина и силимарина, а также меланина влиять на интенсивность процессов ПОЛ, индуцированного различными системами генерации гидроксильных радикалов.

На основании полученных нами результатов можно судить об антиоксидантной способности некоторых флавоноидов уменьшать процессы ПОЛ. Наиболее эффективно флавоноиды подавляли процессы ПОЛ при инкубации с системой Фентона и в среде ионов железа. Меланины наиболее эффективно ингибировали ПОЛ в концентрации 0,8 мг/мл.

Также было исследовано влияние флавоноидов на перекисное окисление лецитина, инкубированного в присутствии системы генерации гидроксильных радикалов.

Известно, что разнообразная биологическая активность флавоноидов обусловлена наличием в их молекулах реактивных гидроксильных и кар-

бонильных групп [2]. Во многих исследованиях *in vitro* в присутствии ионов металлов переменной валентности у флавоноидов выявляется как антиоксидантный, так и прооксидантный эффект [6]. Как видно из полученных данных, в присутствии гесперидина и гесперетина окисление лецитина происходит интенсивнее, чем без него, т.е. флавоноиды действуют в данном случае как прооксиданты.

Согласно литературным данным, флавоноиды не являются однородной группой соединений со сходными химическими свойствами, некоторые из них при определенных условиях могут окисляться молекулярным кислородом. Например, кверцетин легко окисляется в 0,02 М фосфатном буфере. Было показано, что процесс аутоокисления кверцетина включает стадию образования анион-радикала кислорода, который способен в качестве интермедиата участвовать в свободнорадикальном окислении молекулы флавоноида, но может взаимодействовать и с другими субстратами [2]. Ряд экспериментальных данных свидетельствует, что защитный эффект флавоноидов и меланинов [8] обусловлен их способностью перехватывать АФК и, в первую очередь, анион-радикал кислорода [2]. Нами было исследовано влияние силимарина, гесперидина, гесперетина и меланина на процесс аутоокисления кверцетина.

Было выявлено, что флавоноиды способны уменьшать интенсивность реакции аутоокисления кверцетина в микромолярных концентрациях, в то время как меланины не проявили антиоксидантного действия.

Известно, что реакции, катализируемые пероксидазой, характеризуются переносом водорода от молекулы субстрата к перекисям, в результате чего возникают радикалы субстратов, являющиеся сильнореакционными соединениями [1]. В ходе многочисленных исследований показано, что наиболее токсичные радикальные продукты пероксидазного окисления удаляются, главным образом, отдельными биоантиоксидантами, к которым относятся и флавоноиды [5]. Нами была исследована способность силимарина, гесперидина, гесперетина и меланина предотвращать повреждения ДНК, возникающие в результате пероксидазного окисления орто-дианизидина (о-ДА).

В результате эксперимента было выявлено, что все исследуемые флавоноиды проявляют антиоксидантное действие в концентрации 100 мкмоль/л. Меланины эффективно предотвращают повреждения ДНК во всех исследуемых концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами были исследованы антиоксидантные и прооксидантные свойства некоторых флавоноидов и меланинов в различных

системах генерации активных форм кислорода. Было показано, что как флавоноиды, так и меланины способны ингибировать процессы ПОЛ. Многочисленные литературные данные подтверждают, что образование комплексов флавоноидов с ионами переходных металлов приводит к ингибированию свободнорадикальных процессов [2]. Прооксидантное действие при перекисном окислении лецитина флавоноиды проявляли в микромолярных концентрациях. При этом наибольшую прооксидантную активность проявлял гесперетин. Изучаемые флавоноиды подавляли процесс аутоокисления кверцетина, в отличие от меланина, что может быть связано со слишком низкими его концентрациями, которые использовались в эксперименте. Было показано, что флавоноиды и меланины эффективно снижают степень повреждений ДНК при инкубации с пероксидазной системой окисления о-ДА. Антиоксидантная активность в данном случае также зависит от концентрации исследуемых фенольных соединений.

Литература

1. *Андреева В.А.* Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. М., 1988. С. 3.
2. *Костюк В.А., Потапович А.И.* Биорадикалы и биоантиоксиданты: Монография. Мн., 2004.
3. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1977. С. 66-67.
4. *Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V.* Antioxidants, Oxidative Damage and Deposition Stress: a Review // *Annals of Botany*. 2003. №91. P. 179-194.
5. *Bustamante J., Bredeston L., Malanga G. and Mmordoh J.* (1993), Role of Melanin as a Scavenger of Active Oxygen Species. // *Pigment Cell Research*. 1993. V.6. P. 348–353.
6. *Cao G., Sofic E., Prior R.L.* Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships // *Free Radic. Biol. Med.* 1997.V. 22. P. 749-760.
7. *Halliwel B., Gutteridge M.C.* Free radicals in biology and medicine. Oxford, 1998.
8. *Korytowski W., Sarna T., Zareba M.* Antioxidant Action of Neuromelanin: The Mechanism of Inhibitory Effect on Lipid Peroxidation // *Archives of Biochemistry and Biophysics* V. 319. Issue 1. 1995. P. 142-148.