**Белорусский государственный университет**
**Биологический факультет**
**Кафедра биохимии**

# *Исследование антиоксидантных и прооксидантных свойств некоторых структурно близких флавоноидов*

***Магистерская диссертация***
***Долгодилиной Елены Викторовны***

***Научный руководитель***
***к.б.н., доцент***
***Кукулянская Татьяна Александровна***

**Минск 2009**

# Содержание


- Актуальность исследования
- Цель и задачи
- Материалы и методы
- Результаты
- Выводы

# Актуальность темы

- Свободные радикалы неминуемо образуются в клетке в процессе жизнедеятельности и, присутствуя в живых системах, вызывают повреждения макромолекул в клетке, что приводит к ряду негативных последствий.
- Как у растительных организмов, так и у животных имеются специальные антиоксидантные системы, функция которых и сводится к инактивации свободных радикалов. Условно такие системы можно разделить на две части: первая включает такие ферменты, как пероксидазу, каталазу, супероксиддисмутазу, а вторая - аскорбиновую кислоту, гидрохинон, кверцетин и другие низкомолекулярные соединения
- В ходе исследований показано, что наиболее токсичные радикальные продукты пероксидазного окисления удаляются, главным образом, отдельными биоантиоксидантами, к которым относятся и флавоноиды. Установлено также, что флавоноиды обладают выраженными антиаллергическими, антиканцерогенными, противовоспалительными и противовирусными свойствами

# Цели и задачи

***Цель настоящей работы:***

**изучение антиоксидантных и прооксидантных свойств структурно близких флавоноидов в процессах, сопровождающихся генерацией АФК, первичных и вторичных свободных радикалов.**

***В соответствии с целью данной работы были поставлены следующие задачи:***

1. **изучить влияние таких флавоноидов, как кверцетина, эпикатехина и гесперетина, на ПОЛ, вызванное различными индукторами;**
2. **исследовать влияние выше указанных флавоноидов на процесс метаболической активации аминобифенилов по пероксидазному пути окисления;**
3. **изучить возможность данных флавоноидов выступать в качестве субстратов для пероксидазы;**

# Материалы и методы

***В работе использовались следующие вещества и ферменты*:**

- **3,3’,5,5’-тераметилбензидин, кверцетин, гесперетин, эпикатехин, лецитин соевый производства «Sigma», США**
- **НАДН производства «Renaul» Венгрия**
- **Твин 20 производства «Ferak», Германия**
- **ДНК фага λ производства «Сибэнзим», Россия**
- ***о*-дианизидин, пероксид водорода, диметилформамид, $C_2H_5OH$, хлороформ, $FeSO_4$, тиобарбитуровая кислота и другие реактивы квалификации марки «ЧДА»**
- **пероксидаза из хрена (КФ 1.11.1.7) с Rz = 3 и СОД (КФ 1.15.1.1) производства «Fluka», США**

***Во время выполнения работы были использованы следующие методы анализа:***

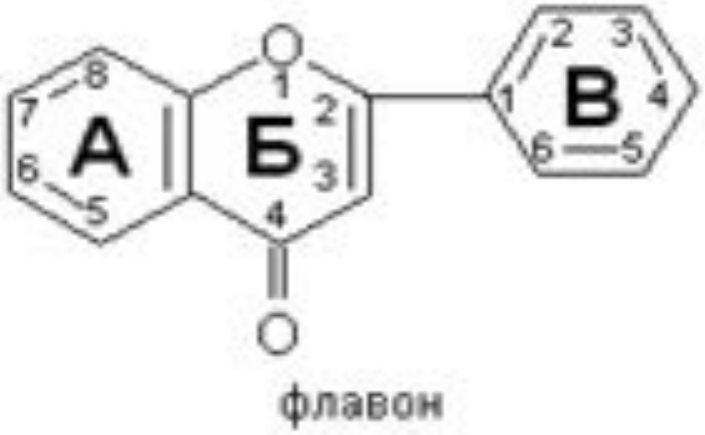
- **спектральные (измерения проводили на спектрофотометрах Solar PV 150, UV-VIS Cary-50 в УФ и видимом диапазоне длин волн )**
- **электрофоретические.**

# Основная часть

## Общая структура флавоноидов

- **Флавоноиды – это фенольные соединения, широко распространённые в природе.**

- **Общая структура флавоноидов ($C_6$ — $C_3$ — $C_6$ ) представлена двумя ароматическимих кольцами, соединенными тремя углеродными атомами, наиболее часто с образованием гетероциклического кольца**



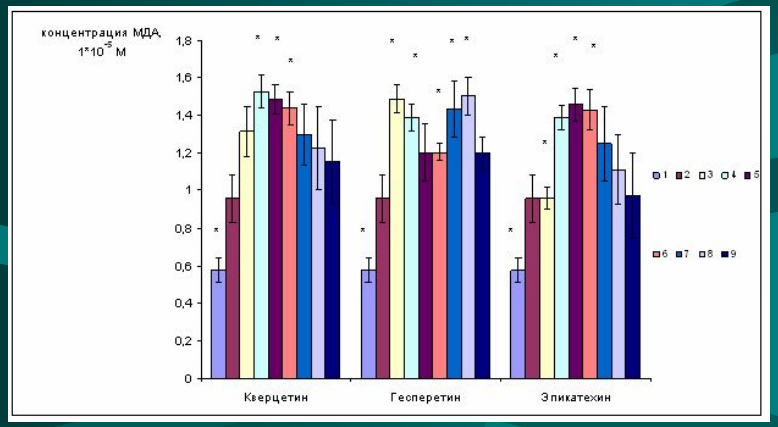
# Механизмы антиоксидантной активности флавоноидов могут быть следующие :

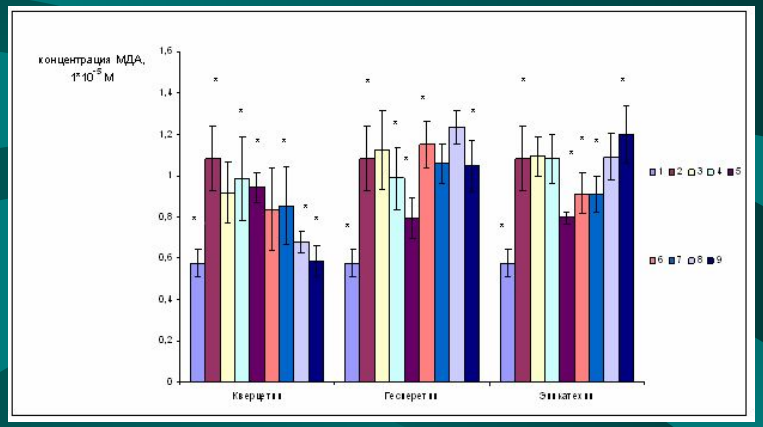
1. **Подавление формирования активных форм кислорода путем ингибирования ферментов или хелатирование микроэлементов, учавствующих в образовании свободных радикалов.**

2. **Удаление активных форм кислорода. Благодаря более низким окислительно-восстановительным потенциалам, флавоноиды (Fl-OH) способны восстанавливать высоко окисленные свободные радикалы**

3. **Сверхрегулирование или защита протекторов антиоксидантов**

# Накопление продуктов ПОЛ в присутствии кверцетина, гесперетина и эпикатехина



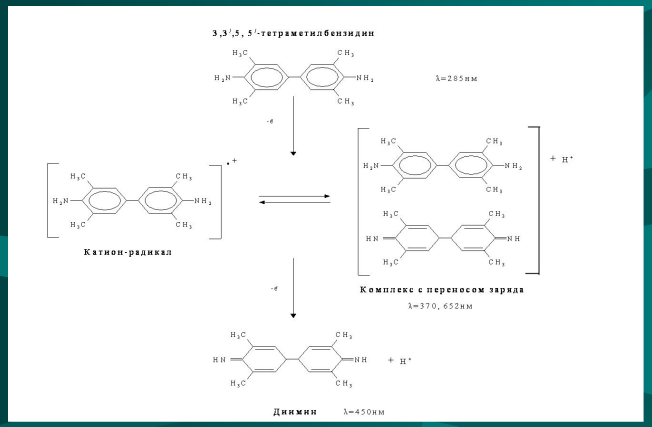




На рисунке слева представлено накопление продуктов ПОЛ, индуцированное СФ, в присутствии кверцетина, гесперетина и эпикатехина (1.- спонтанное ПОЛ, 2.- ПОЛ, индуцированное СФ ($2 \cdot 10^{-4}$М $Fe^{2+}$/$2 \cdot 10^{-5}$ М $H_2O_2$) в отсутствии флавоноидов; для флавоноидов : 3.- $1 \cdot 10^{-7}$М, 4. - $5 \cdot 10^{-7}$ М,5.- $1 \cdot 10^{-6}$ М,6.- $5 \cdot 10^{-6}$ М,7.- $1 \cdot 10^{-5}$ М, 8. - $5 \cdot 10^{-5}$ М,9. - $1 \cdot 10^{-4}$ М)

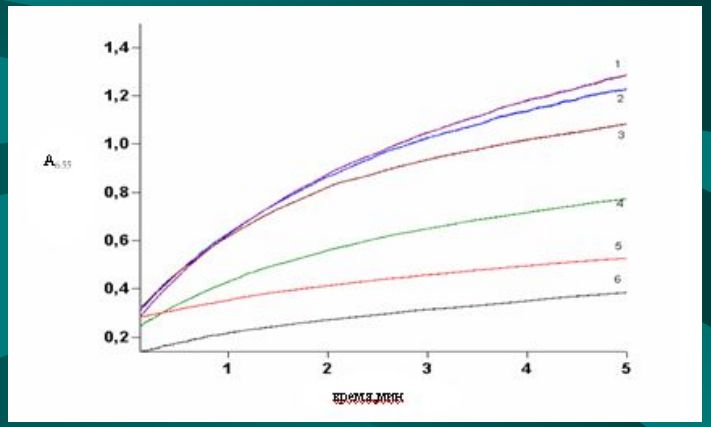
На рисунке справа представлено накопление продуктов ПОЛ, индуцированное $Fe^{2+}$, в присутствии кверцетина, гесперетина и эпикатехина (1.- спонтанное ПОЛ, 2.- ПОЛ, индуцированное $Fe^{2+}$ в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М в отсутствие флавоноидов; для флавоноидов : 3.- $1 \cdot 10^{-7}$М, 4. - $5 \cdot 10^{-7}$ М, 5. - $1 \cdot 10^{-6}$ М,6.- $5 \cdot 10^{-6}$ М,7.- $1 \cdot 10^{-5}$ М, 8. - $5 \cdot 10^{-5}$ М,9. - $1 \cdot 10^{-4}$ М)

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

# Пероксидазное окисление 3, 3’,5,5’-тераметилбензидина (ТМБД)



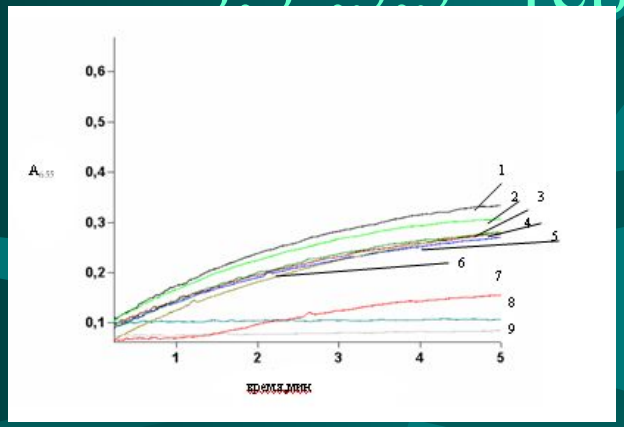

Подробный механизм окисления ТМБД

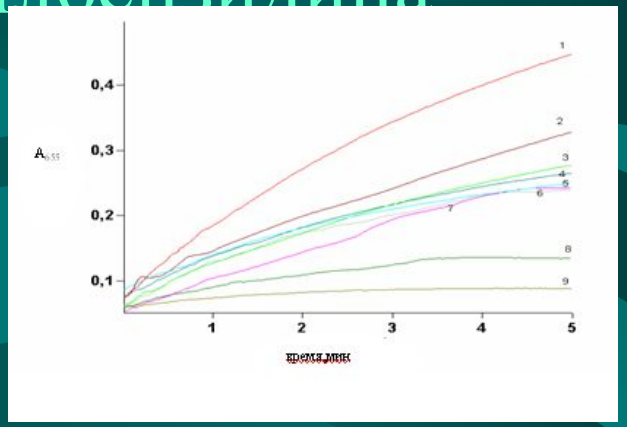



Пероксидазное окисление ТМБД в 0,1 М цитратно - ацетатном буфере pH 5,5 (конечный объём реакционной смеси составлял 2,5 мл и содержал $[H_2O_2]$=0,4 ммоль/л, [ПХ]=$10^{-11}$М):

1-[ТМБД] = 1 ммоль/л, 2-[ТМБД] = 0,8 ммоль/л, 3-[ТМБД] = 0,6 ммоль/л, 4-[ТМБД] = 0, 4 ммоль/л, 5-[ТМБД] = 0, 2 ммоль/л, 6-[ТМБД] = 0,1 ммоль/л.

# Влияние флавоноидов на процесс пероксидазного окисления 3,3’,5,5’-тераметилбензидина




Пероксидазное окисление ТМБД в 0,1 М цитратно - ацетатном буфере pH 5,5 (конечный объём реакционной смеси составлял 2,5 мл и содержал $[H_2O_2]$=0,4 мМ/л, [ПХ]=$10^{-11}$ М, [ТМБД]= 0,6 мМ/л) в присутствии кверцетина:

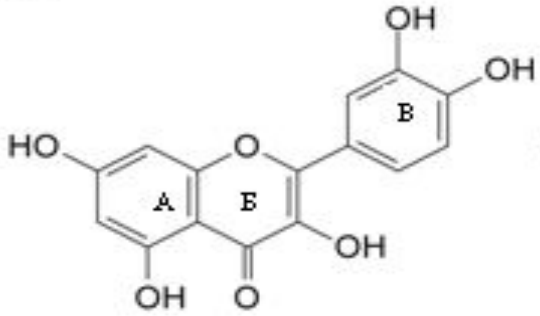
1 - [кверцетин] =0 мкМ/л, 2 - [кверцетин] =0,01 мкМ/л, 3 - [кверцетин] =0,04мкМ/л, 4 - [кверцетин] =0,08 мкМ/л, 5 - [кверцетин] =0,12 мкМ/л, 6 - [ кверцетин] =0,2 мкМ/л, 7 - [кверцетин] =0,6 мкМ/л, 8 - [кверцетин] =1 мкМ/л, 9 - [ кверцетин] =4 мкМ/л.

Пероксидазное окисление ТМБД в 0,1 М цитратно - ацетатном буфере pH 5,5 (конечный объём реакционной смеси составлял 2,5 мл и содержал $[H_2O_2]$=0,4 мМ/л, [ПХ]=$10^{-11}$М, [ТМБД]= 0,6 мМ/л) в присутствии эпикатехина:

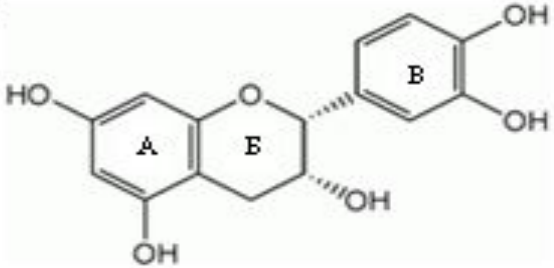
1 - [эпикатехин] =0 мкМ/л, 2 - [эпикатехин] =0,01 мкМ/л 3 - [эпикатехин] =0,04 мкМ/л, 4 - [эпикатехин] =0,08 мкМ/л 5 - [эпикатехин] =0,12 мкМ/л, 6 - [ эпикатехин] =0,2 мкМ/л 7 - [эпикатехин] = 0,6 мкМ/л, 8 - [эпикатехин] = 1 мкМ/л, 9 - [ эпикатехин] = 4 мкМ/л.

# Химические формулы кверцетина, гесперетина и эпикатехина

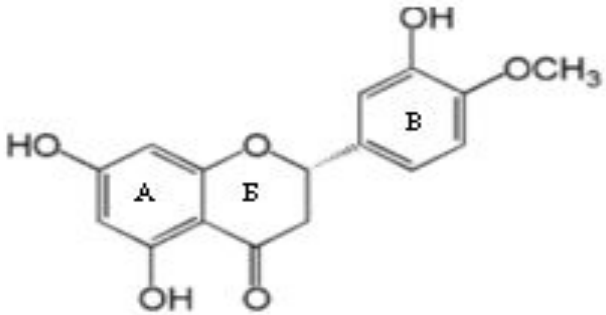
кверцетин



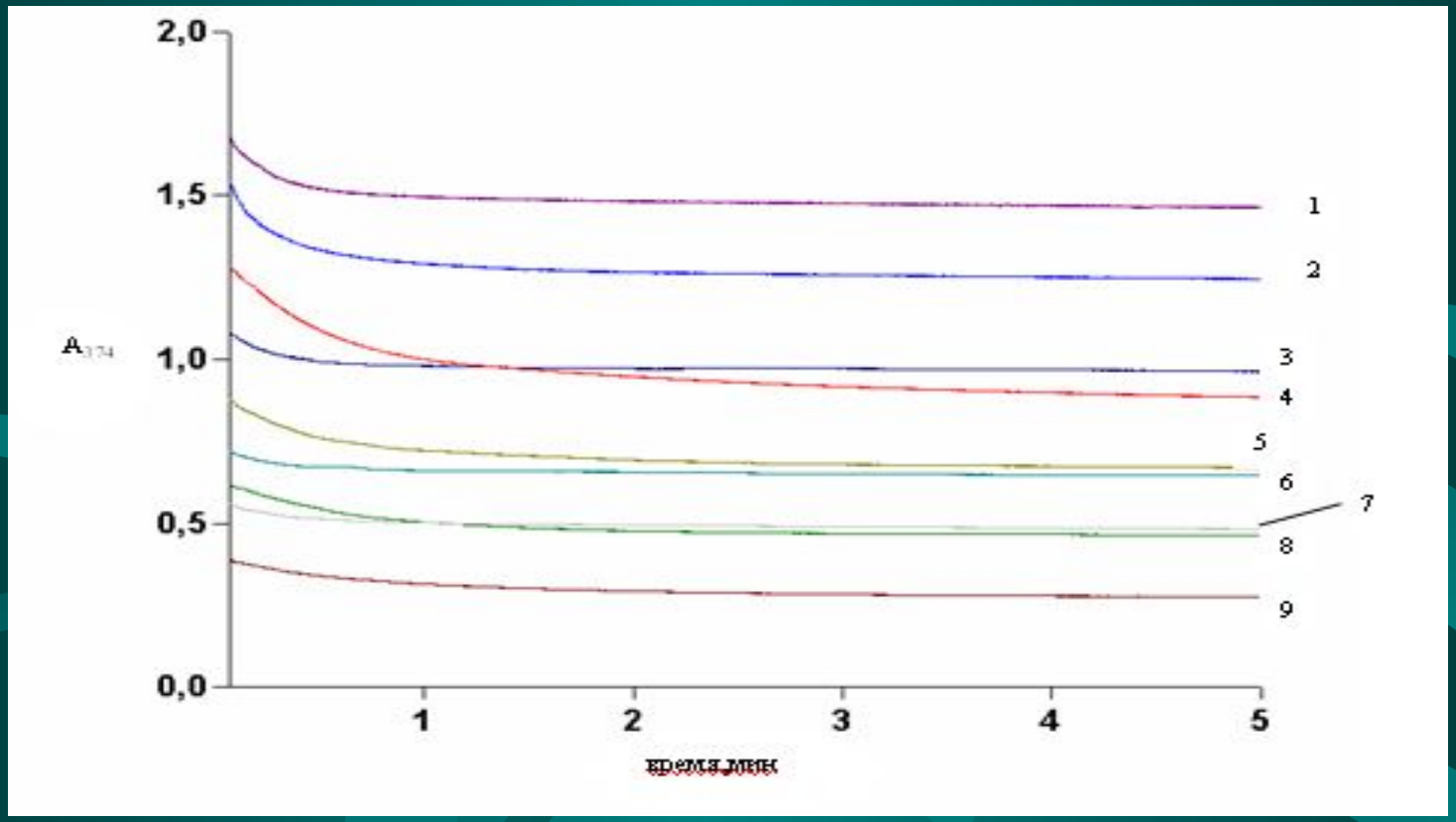

эпикатехин




гесперетин



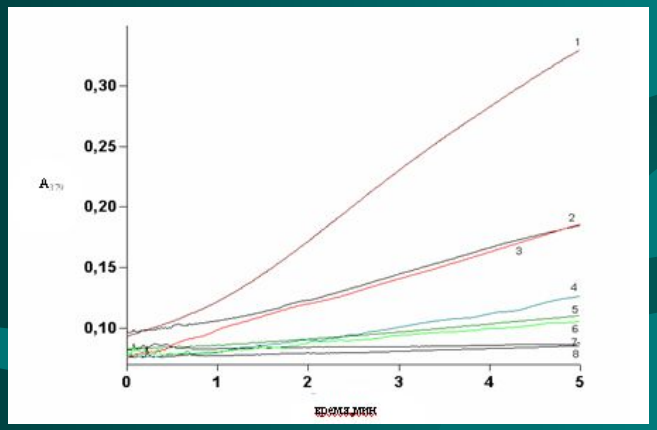
# Пероксидазное окисление кверцетина

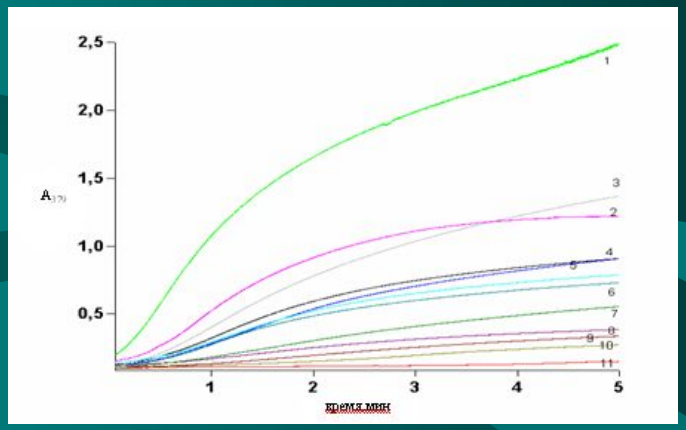



Окисление протекало в 0,1 М цитратно – ацетатном буфере (pH 5,5), [ПХ]= $10^{-11}$ М, $[H_2O_2]$=50 мкмоль/л:

1 - [кверцетин] = 75 мкмоль/л, 2 - [кверцетин] = 65 мкмоль/л, 3 - [кверцетин] =55 мкмоль/л, 4 - [кверцетин] =45 мкмоль/л, 5 - [кверцетин] =35 мкмоль/л, 6 - [кверцетин] = 25 мкмоль/л, 7 - [кверцетин] = 20 мкмоль/л, 8 - [кверцетин] = 10 мкмоль/л, 9 - [кверцетин] = 5 мкмоль/л.

# Пероксидазное окисление эпикатехина



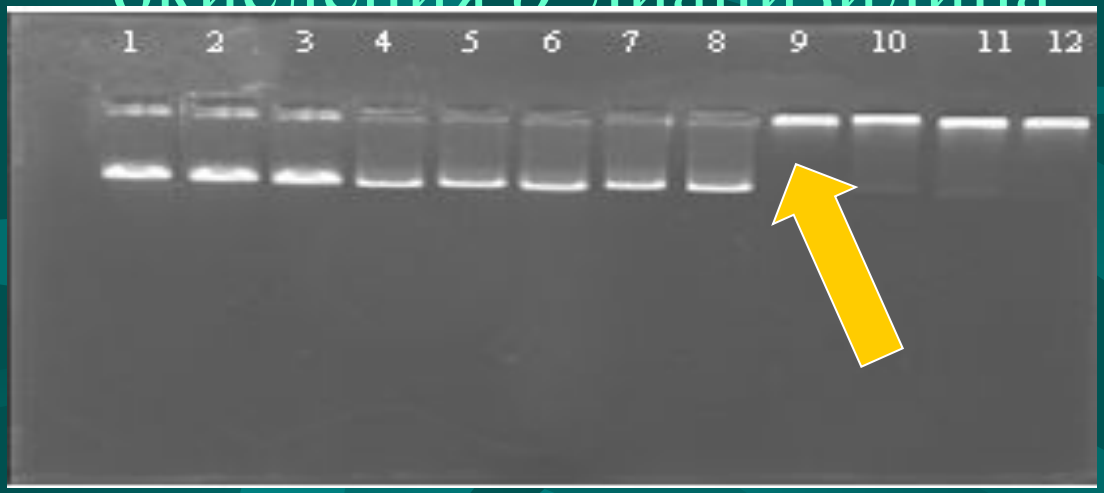




Окисление протекало в 0,1 М цитратно – ацетатном буфере (pH 5,5), $[H_2O_2]$=50 мкмоль/л :

На рисунке слева: [ПХ]= $10^{-11}$ М, 1 - [эпикатехин] = 105 мкмоль/л, 2 - [эпикатехин] = 95 мкмоль/л, 3 - [эпикатехин] =85 мкмоль/л, 4 - [эпикатехин] =75 мкмоль/л, 5 - [эпикатехин] =55 мкмоль/л, 6 - [эпикатехин] = 25 мкмоль/л, 7 - [эпикатехин] = 20 мкмоль/л, 8 - [эпикатехин] = 5 мкмоль/л.

На рисунке справа: [ПХ]= $10^{-9}$ М, 1 - [эпикатехин] = 105 мкмоль/л, 2 - [эпикатехин] = 95 мкмоль/л, 3 - [эпикатехин] =75 мкмоль/л, 4 - [эпикатехин] =65 мкмоль/л, 5 - [эпикатехин] =55 мкмоль/л, 6 - [эпикатехин] = 45 мкмоль/л, 7 - [эпикатехин] = 35 мкмоль/л, 8 - [эпикатехин] = 25 мкмоль/л, 9 - [эпикатехин] = 20 мкмоль/л, 10 - [эпикатехин] =10 мкмоль/л, 11 - [эпикатехин] =5 мкмоль/л

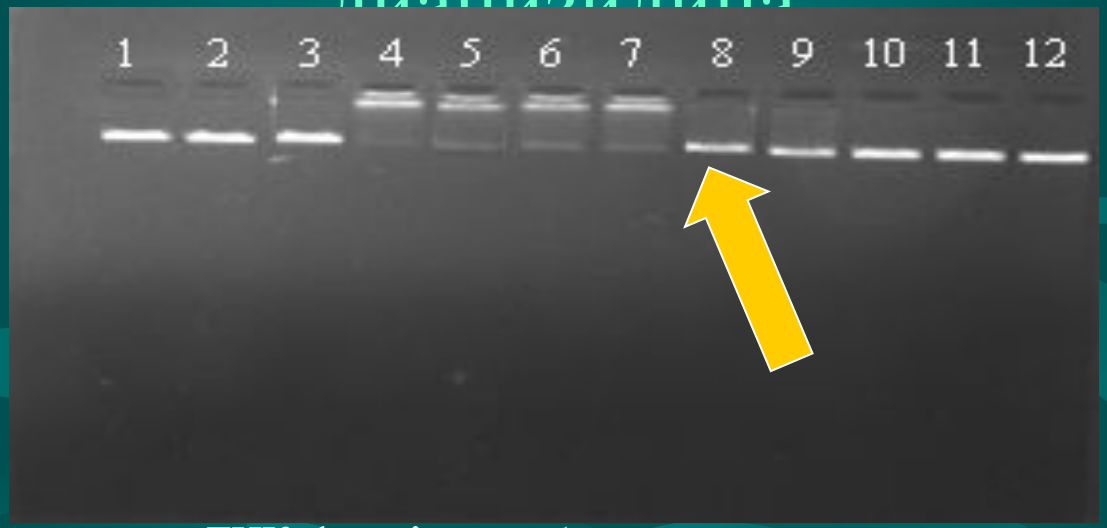
# Электрофореграмма ДНК фага λ, инкубированной в системе пероксидазного окисления *о*-дианизидина




Электрофореграмма ДНК фага λ, инкубированной в системе пероксидазного окисления *о*-дианизидина ([ДНК] =0,4мкг, [$H_2O_2$] = 1 ммоль/л, [ПХ] = $10^{-7}$ моль/л):

1. ДНК, 2. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, 3. ДНК, ПХ, *о*-дианизидин $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 4. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $10^{-7}$ моль/л, 5. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $2{,}5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 6. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 7. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $10^{-6}$ моль/л,8. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $2{,}5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 9. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 10. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $10^{-5}$ моль/л, 11. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 12. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

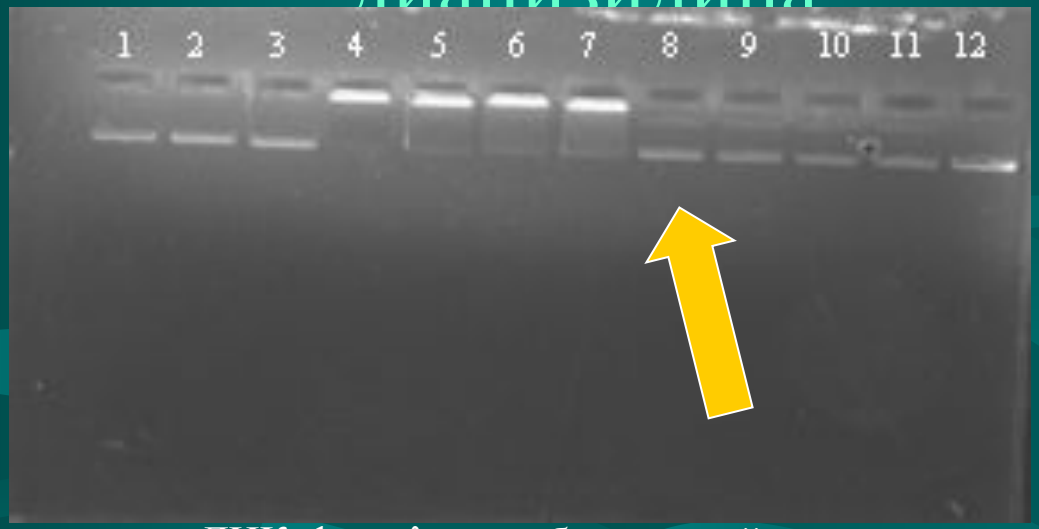
# Влияние кверцетина на повреждение ДНК продуктами пероксидазного окисления *о*-дианизидина




Электрофореграмма ДНК фага λ, инкубированной в системе пероксидазного окисления *о*-дианизидина ( [*о*-дианизидин]= $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, [ДНК] =0,4мкг, [$H_2O_2$] = 1 ммоль/л, [ПХ] = $10^{-7}$ моль/л) с различными концентрациями кверцетина :

1. ДНК, 2. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, 3. ДНК, ПХ, *о*-дианизидин, 4. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, 5. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, кверцетин $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 6. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, кверцетин $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 7. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, кверцетин $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 8. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, кверцетин $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 9. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, кверцетин $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 10. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, кверцетин $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 11. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, кверцетин $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 12. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, кверцетин $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

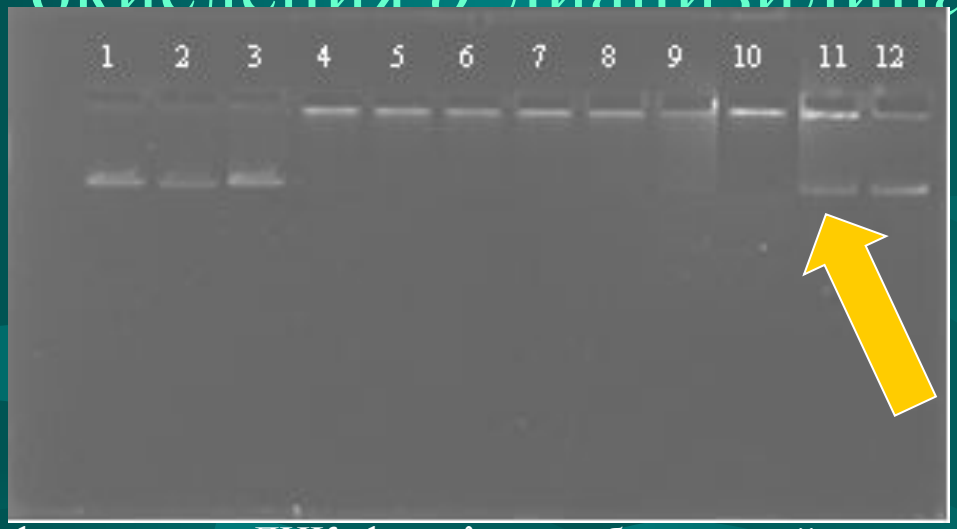
# Влияние эпикатехина на повреждение ДНК продуктами пероксидазного окисления *о*-дианизидина




Электрофореграмма ДНК фага λ, инкубированной в системе пероксидазного окисления *о*-дианизидина ( [*о*-дианизидин]= $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, [ДНК] =0,4мкг, [$H_2O_2$] = 1 ммоль/л, [ПХ] = $10^{-7}$ моль/л) с различными концентрациями эпикатехина:

1. ДНК, 2. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, 3. ДНК, ПХ, *о*-дианизидин, 4. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, 5. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, эпикатехин $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 6. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, эпикатехин $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 7. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, эпикатехин $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 8. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, эпикатехин $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 9. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, эпикатехин $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 10. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, эпикатехин $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 11. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, эпикатехин $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 12. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, эпикатехин $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

# Влияние гесперетина на повреждение ДНК продуктами пероксидазного окисления *о*-дианизидина




Электрофореграмма ДНК фага λ, инкубированной в системе пероксидазного окисления о-дианизидина ([*о*-дианизидин]= $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, [ДНК] =0,4мкг, [$H_2O_2$] = 1 ммоль/л, [ПХ] = $10^{-7}$ моль/л) с различными концентрациями гесперетина :

1. ДНК, 2. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, 3. ДНК, ПХ, *о*-дианизидин, 4. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, 5. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 6. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, гесперетин $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 7. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 8. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, гесперетин $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 9. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 10. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, гесперетин $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 11. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 12. ДНК, ПХ, $H_2O_2$, *о*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

# Выводы

1. Было показано, что в процессе перекисного окисления лецитина, индуцированного системой Фентона ([$Fe^{2+}$]= $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, ([$H_2O_2$]= $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л), кверцетин, эпикатехин и гесперетин проявляют прооксидантные свойства. Наибольшая прооксидантная активность проявляется кверцетином в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, гесперетином - $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, эпикатехином - $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.
2. Установлено, что если в качестве индуктора перекисного окисления липидов выступает $Fe^{2+}$ ($2 \cdot 10^{-4}$ моль/л), то кверцетин проявляет антиоксидантные свойства и максимальная антиоксидантная активность наблюдается в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Эпикатехин и гесперетин в указанных условиях проявляют как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства. Гесперетин проявляет антиоксидантную активность в концентрациях $5 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, а прооксидантную - $5 \cdot 10^{-6}$ и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Эпикатехин выступает антиоксидантом в концентрациях с $1 \cdot 10^{-6}$ по $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, а при концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л наблюдается прооксидантный эффект.

3. Показано, что кверцетин и эпикатехин в концентрациях 1 мкмоль/л и 4 мкмоль/л проявляют антиоксидантные свойства в отношении процесса пероксидазного окисления 3,3’,5,5’-тераметилбензидина, при этом кверцетин гораздо эффективнее подавляет окисление данного аминобифенила. Наиболее вероятно, что при совместном окислении тетраметилбензидина и флавоноидов (кверцетина, эпикатехина) происходит активация окисления медленно окисляемого субстрата (флавоноида) и частичное или полное ингибирование превращения быстро окисляемого субстрата (аминобифенила)

4. Было установлено, что кверцетин и эпикатехин, проявляя антиоксидантные свойства, способны подвергаться окислению в системе пероксидаза/ $H_2O_2$. В случае кверцетина наиболее вероятным механизмом является одноэлектронное окисление флавоноида:

$$Fl \xrightarrow{пх/\ H_2O_2} Fl^{\cdot}$$

( одноэлектронное окисление)

$$Fl^{\cdot} + НАДН \rightarrow Fl + НАД^{\cdot}$$

$$НАД^{\cdot} + O_2 \rightarrow НАД^{+} + {}^{\cdot}O_2^{-}$$

5. **Установлено, что все три флавоноида – кверцетин, эпикатехин и гесперетин - проявляют антиоксидантные свойства и ингибируют повреждение ДНК радикалами, образующимися в ходе пероксидазного окисления *о*-дианизидина. Наиболее эффективными ингибиторами являются кверцетин, эпикатехин (в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л), менее эффективен гесперетин ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л).**

# *Спасибо за внимание!!!*

*Exit*