

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  $\lambda$  производства «Сибэнзим», Россия
- ❖ *o*-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  $R_z = 3$  и СОД (КФ 1.15.1.1) производства «Fluka», США

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

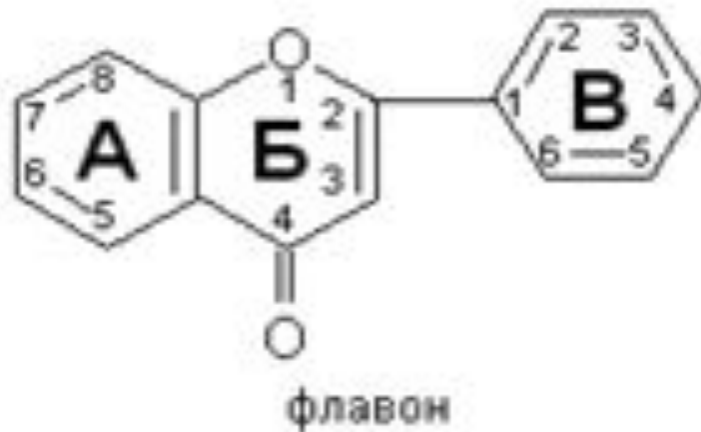
- ❖ спектральные (измерения проводили на спектрофотометрах Solar PV 150, UV-VIS Cary-50 в УФ и видимом диапазоне длин волн )
- ❖ электрофоретические.



# Основная часть

## Общая структура флавоноидов

- ◆ Флавоноиды – это фенольные соединения, широко распространённые в природе.
- ◆ Общая структура флавоноидов ( $C_6 — C_3 — C_6$ ) представлена двумя ароматическими кольцами, соединенными тремя углеродными атомами, наиболее часто с образованием гетероциклического кольца

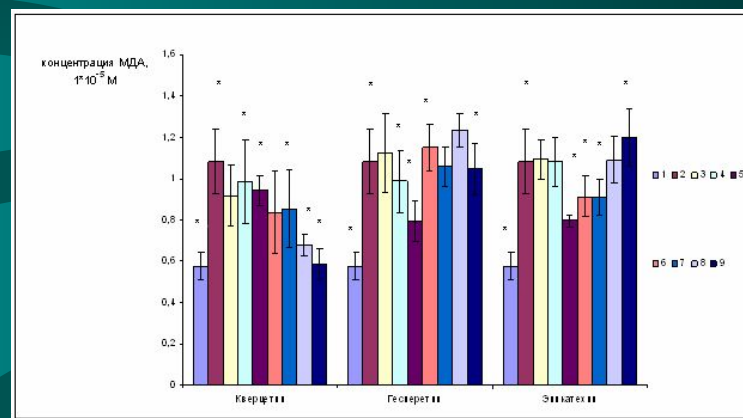
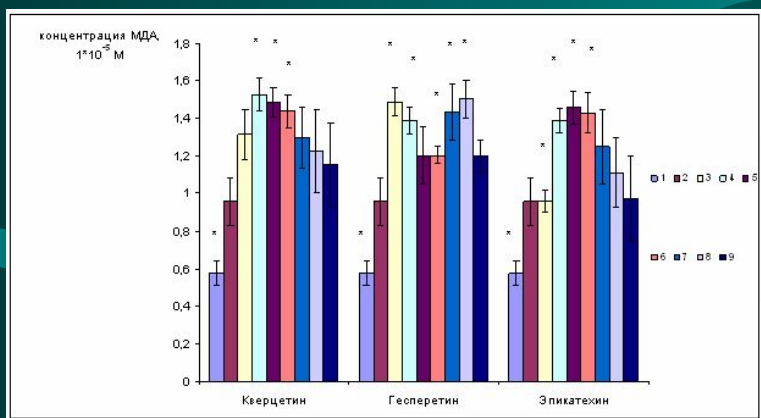


# Механизмы антиоксидантной активности флавоноидов могут быть следующие :

1. Подавление формирования активных форм кислорода путем ингибирования ферментов или хелатирование микроэлементов, участвующих в образовании свободных радикалов.
2. Удаление активных форм кислорода. Благодаря более низким окислительно-восстановительным потенциалам, флавоноиды (F1-ОН) 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  $\text{Fe}^{2+}/2 \cdot 10^{-5}$  М  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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)

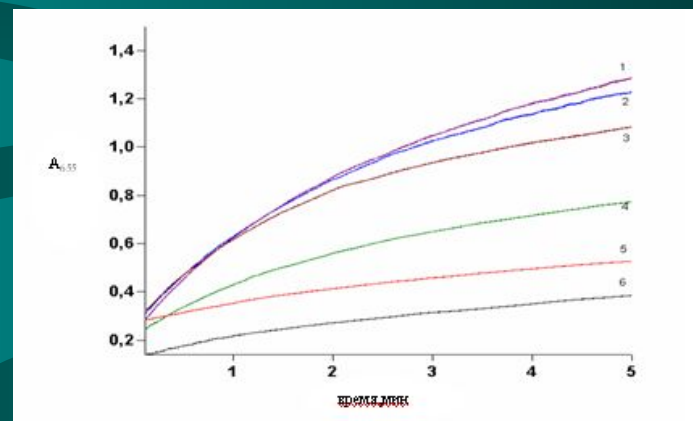
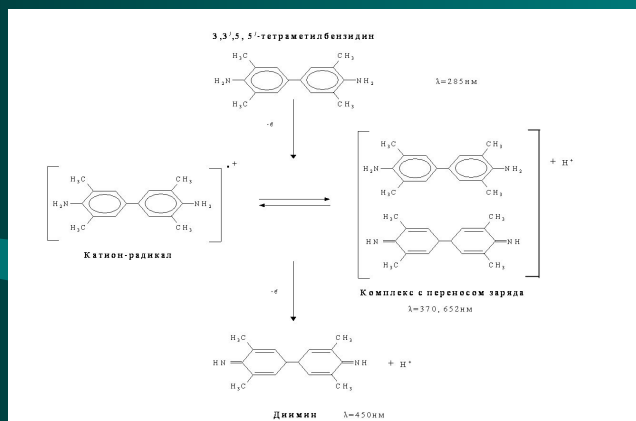
На рисунке справа представлено накопление продуктов ПОЛ, индуцированное  $\text{Fe}^{2+}$ , в присутствии кверцетина, гесперетина и эпикатехина (1.- спонтанное ПОЛ, 2.- ПОЛ, индуцированное  $\text{Fe}^{2+}$  в концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  М в отсутствие флавоноидов; для флавоноидов : 3.-  $1 \cdot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



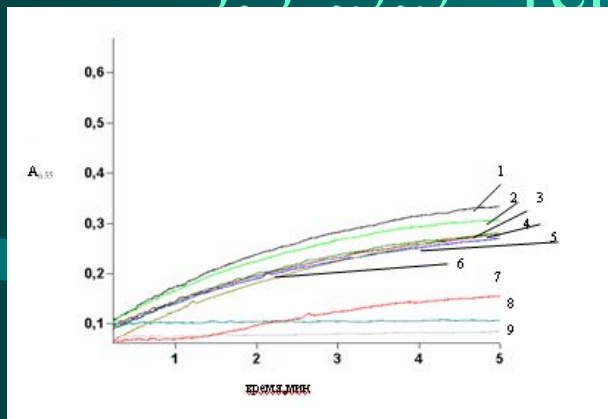
Подробный механизм  
окисления ТМБД

Пероксидазное окисление ТМБД в 0,1 М цитратно - ацетатном буфере рН 5,5 (конечный объём реакционной смеси составлял 2,5 мл и содержал  $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,4$  ммоль/л,  $[\text{ПХ}]=10^{-11}\text{М}$ ):

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.

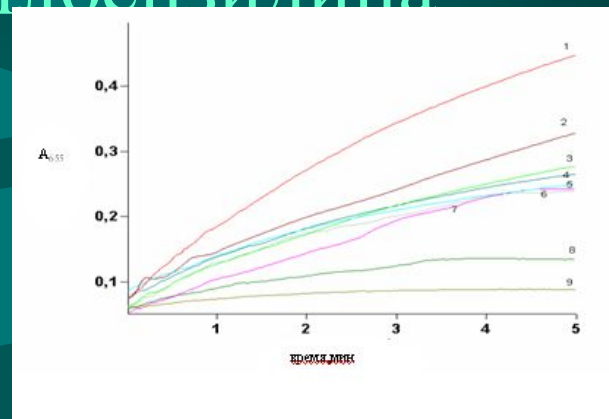


# Влияние флавоноидов на процесс пероксидазного окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензилина



Пероксидазное окисление ТМБД в 0,1 М цитратно - ацетатном буфере рН 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] = 0,04 мкМ/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.



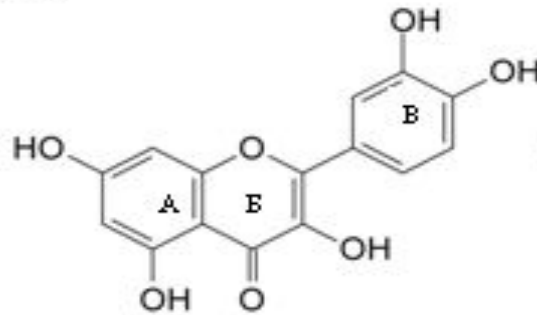
Пероксидазное окисление ТМБД в 0,1 М цитратно - ацетатном буфере рН 5,5 (конечный объём реакционной смеси составлял 2,5 мл и содержал  $[H_2O_2]=0,4$  мМ/л,  $[ПХ]=10^{-11}$  М,  $[ТМБД]=0,6$  мМ/л) в присутствии эпикатехина:

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.

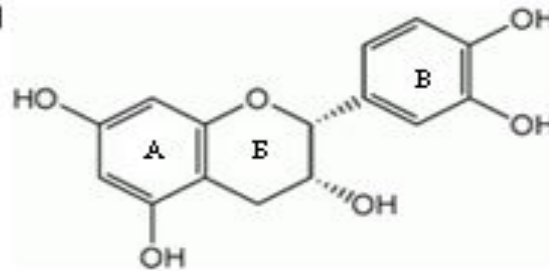


# Химические формулы кверцетина, гесперетина и эпикатехина

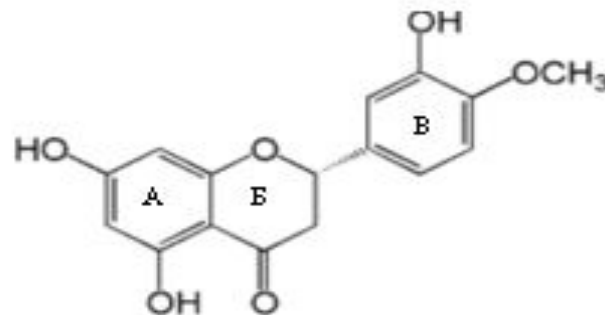
кверцетин



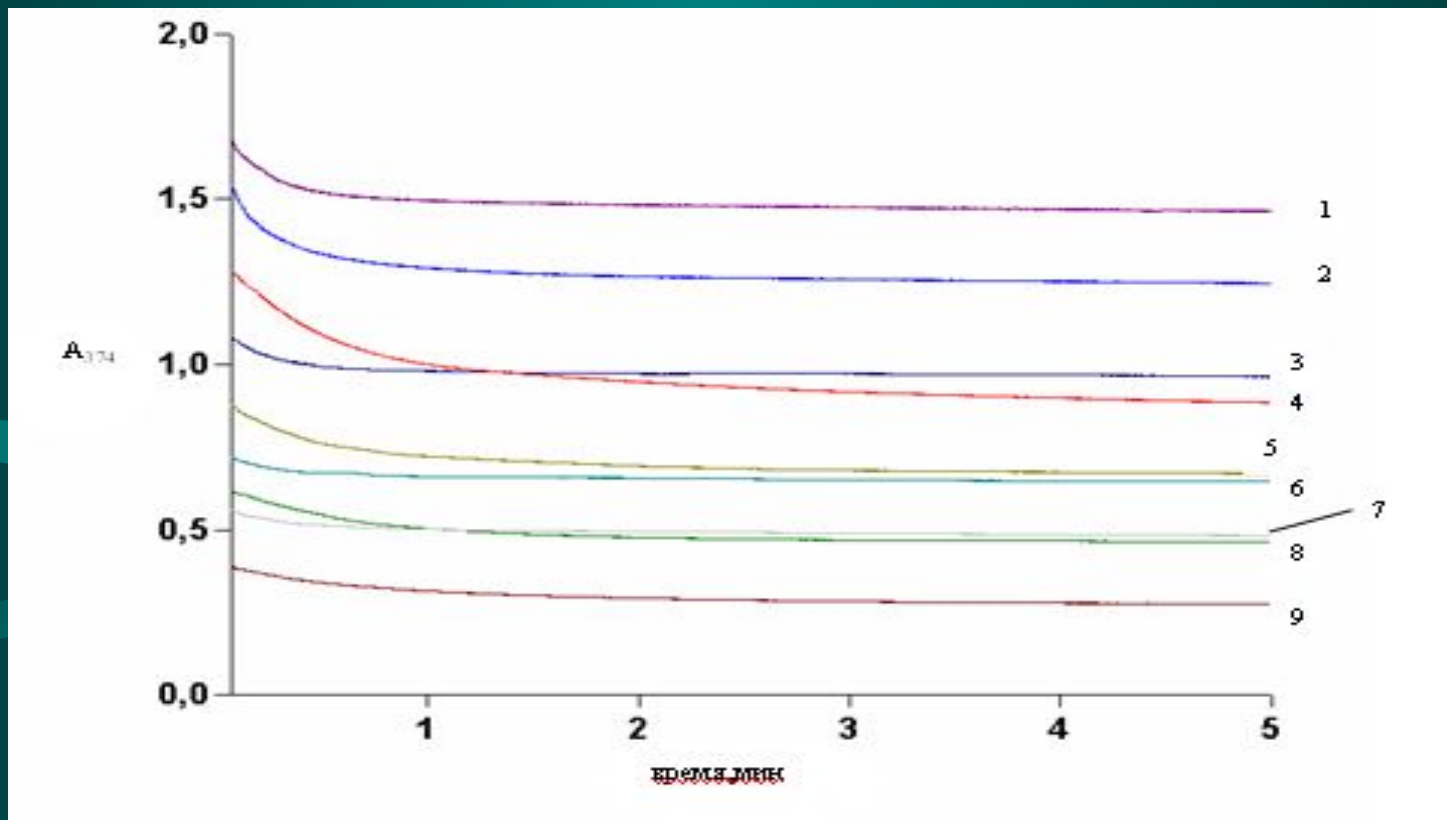
эпикатехин



гесперетин



# Пероксидазное окисление кверцетина

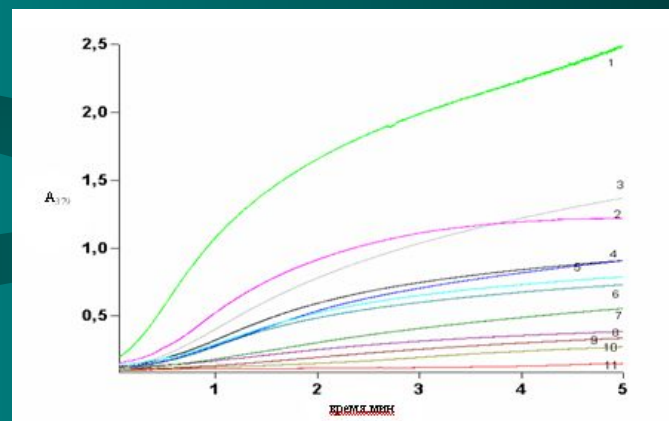
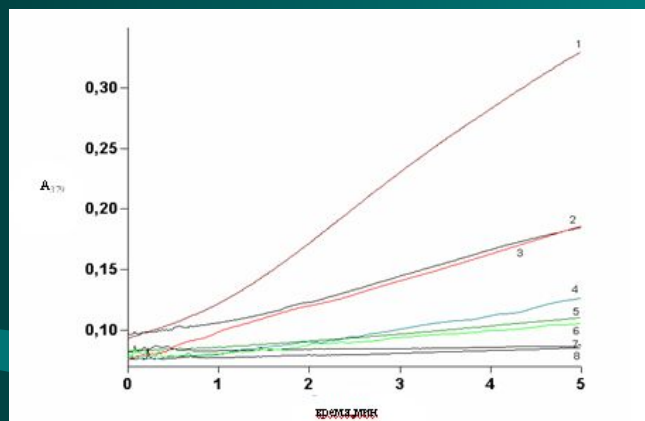


Окисление протекало в 0,1 М цитратно – ацетатном буфере (pH 5,5),  $[ПХ] = 10^{-11}$  М,  $[H_2O_2] = 50$  мкмоль/л:

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 :

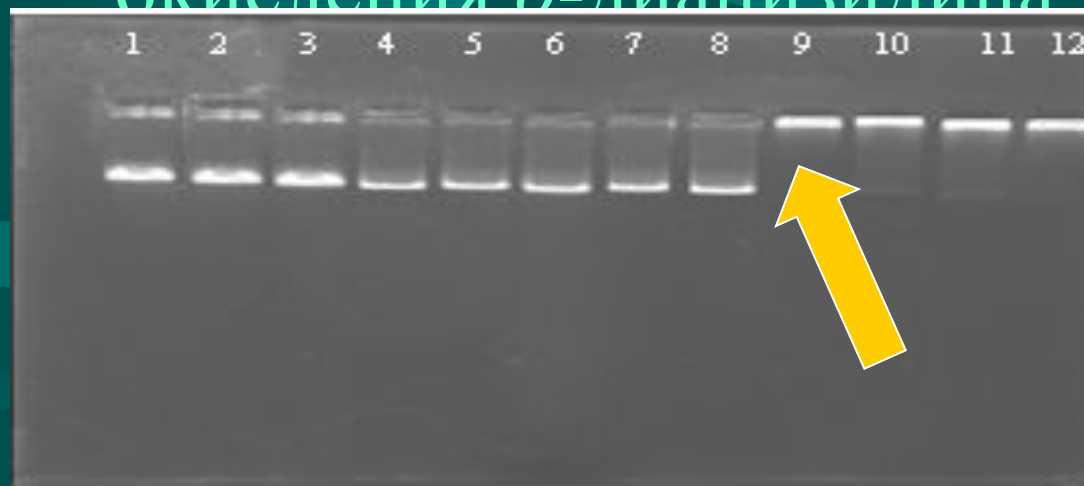
На рисунке слева:  $[PX]=10^{-11}$  М, 1 - [эпикатехин] = 105 мкмоль/л, 2 - [эпикатехин] = 95 мкмоль/л, 3 - [эпикатехин] = 85 мкмоль/л, 4 - [эпикатехин] = 75 мкмоль/л, 5 - [эпикатехин] = 55 мкмоль/л, 6 - [эпикатехин] = 25 мкмоль/л, 7 - [эпикатехин] = 20 мкмоль/л, 8 - [эпикатехин] = 5 мкмоль/л.

На рисунке справа:  $[PX]=10^{-9}$  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 $\lambda$ , инкубированной в системе пероксидазного

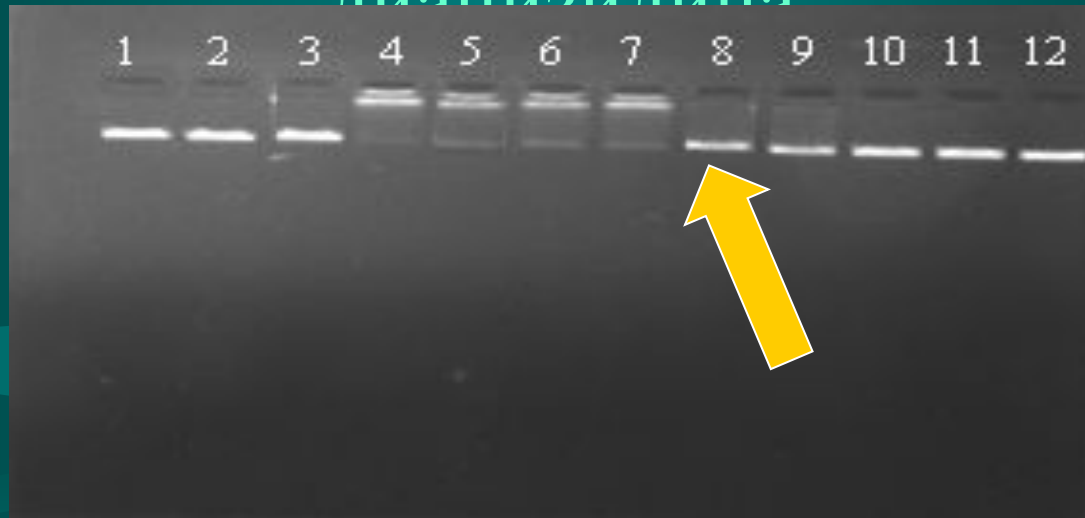
## окисления *o*-дианизидина



Электрофореграмма ДНК фага  $\lambda$ , инкубированной в системе пероксидазного окисления *o*-дианизидина ( $[\text{ДНК}] = 0,4 \text{ мкг}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1 \text{ ммоль/л}$ ,  $[\text{ПХ}] = 10^{-7} \text{ моль/л}$ ):

1. ДНК, 2. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3. ДНК, ПХ, *o*-дианизидин  $5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ , 4. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $10^{-7} \text{ моль/л}$ , 5. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$ , 6. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $5 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$ , 7. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $10^{-6} \text{ моль/л}$ , 8. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ моль/л}$ , 9. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $5 \cdot 10^{-6} \text{ моль/л}$ , 10. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $10^{-5} \text{ моль/л}$ , 11. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ , 12. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин  $5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ .

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

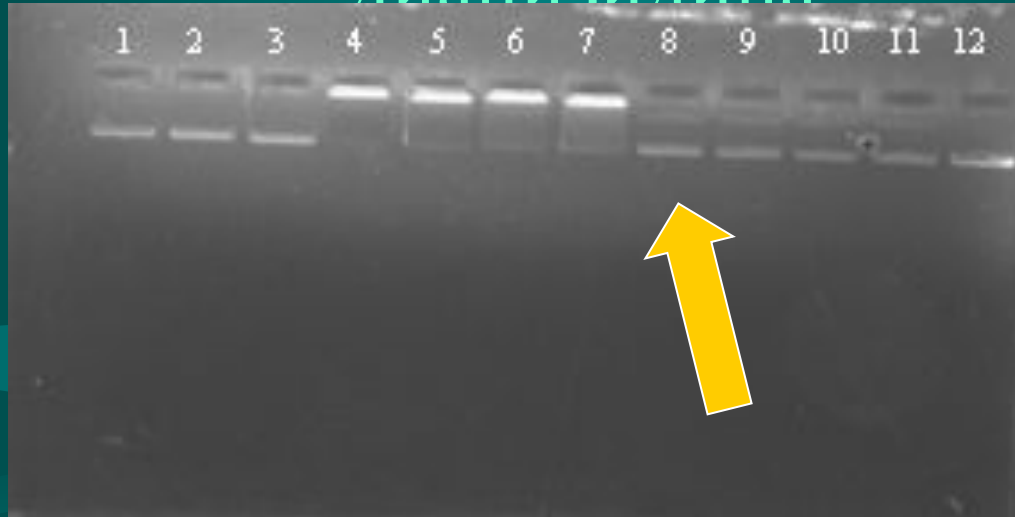


Электрофореграмма ДНК фага  $\lambda$ , инкубированной в системе пероксидазного окисления *o*-дианизидина ( $[o\text{-дианизидин}] = 5 \cdot 10^{-6}$  моль/л,  $[\text{ДНК}] = 0,4$  мкг,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1$  ммоль/л,  $[\text{ПХ}] = 10^{-7}$  моль/л) с различными концентрациями кверцетина :

1. ДНК, 2. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3. ДНК, ПХ, *o*-дианизидин, 4. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, 5. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, кверцетин  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 6. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, кверцетин  $5 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 7. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, кверцетин  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л, 8. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, кверцетин  $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л, 9. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, кверцетин  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л, 10. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, кверцетин  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л, 11. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, кверцетин  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л, 12. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, кверцетин  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л.



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



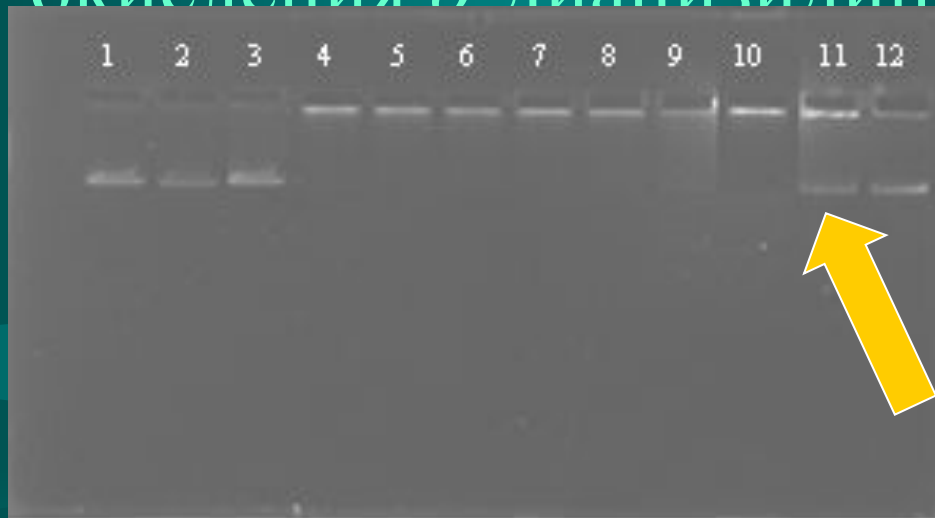
Электрофореграмма ДНК фага  $\lambda$ , инкубированной в системе пероксидазного окисления *o*-дианизидина ( $[o\text{-дианизидин}] = 5 \cdot 10^{-6}$  моль/л,  $[\text{ДНК}] = 0,4 \mu\text{кг}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1$  ммоль/л,  $[\text{ПХ}] = 10^{-7}$  моль/л) с различными концентрациями эпикатехина:

1. ДНК, 2. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3. ДНК, ПХ, *o*-дианизидин, 4. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, 5. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, эпикатехин  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 6. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, эпикатехин  $5 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 7. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, эпикатехин  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л, 8. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, эпикатехин  $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л, 9. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, эпикатехин  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л, 10. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, эпикатехин  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л, 11. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, эпикатехин  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л, 12. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, эпикатехин  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л.





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



Электрофореграмма ДНК фага  $\lambda$ , инкубированной в системе пероксидазного окисления *o*-дианизидина ( $[o\text{-дианизидин}] = 5 \cdot 10^{-6}$  моль/л,  $[\text{ДНК}] = 0,4 \mu\text{г}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1$  ммоль/л,  $[\text{ПХ}] = 10^{-7}$  моль/л) с различными концентрациями гесперетина :

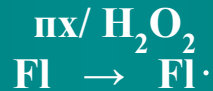
1. ДНК, 2. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3. ДНК, ПХ, *o*-дианизидин, 4. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, 5. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, гесперетин  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 6. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, гесперетин  $5 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 7. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, гесперетин  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л, 8. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, гесперетин  $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л, 9. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, гесперетин  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л, 10. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, гесперетин  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л, 11. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, гесперетин  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л, 12. ДНК, ПХ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *o*-дианизидин, гесперетин  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

# Выводы

1. Было показано, что в процессе перекисного окисления лецитина, индуцированного системой Фентона ( $[\text{Fe}^{2+}] = 2 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \cdot 10^{-5}$  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  $\text{Fe}^{2+}$  ( $2 \cdot 10^{-4}$  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'-тетраметилбензидина, 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/  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В случае кверцетина наиболее вероятным механизмом является одноэлектронное окисление флавоноида:



(одноэлектронное окисление)



5. Установлено, что все три флавоноида – кверцетин, эпикатехин и гесперетин - проявляют антиоксидантные свойства и ингибируют повреждение ДНК радикалами, образующимися в ходе пероксидазного окисления *o*-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*

