

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'-тетраметилбензидин, кверцетин, гесперетин, эпикатехин, лецитин соевый производства «Sigma», США
- ❖ НАДН производства «Renaul» Венгрия
- ❖ Твин 20 производства «Ferak», Германия
- ❖ ДНК фага λ 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:

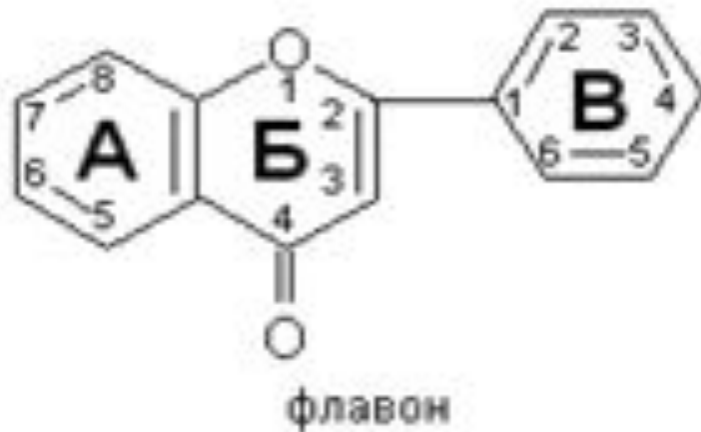
- ❖ спектральные (измерения проводили на спектрофотометрах Solar PV 150, UV-VIS Cary-50 в УФ и видимом диапазоне длин волн)
- ❖ электрофоретические.



Основная часть

Общая структура флавоноидов

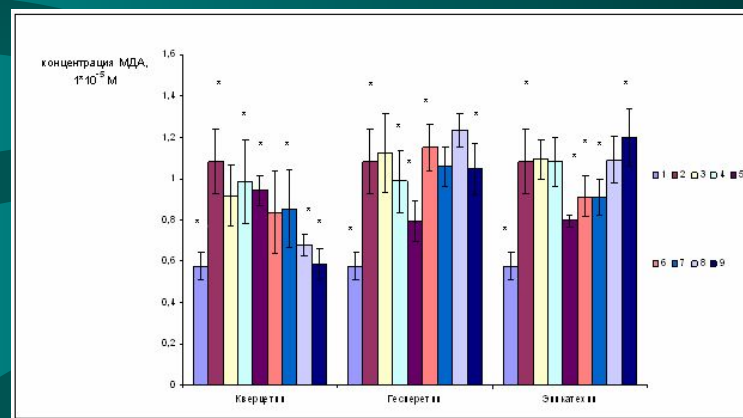
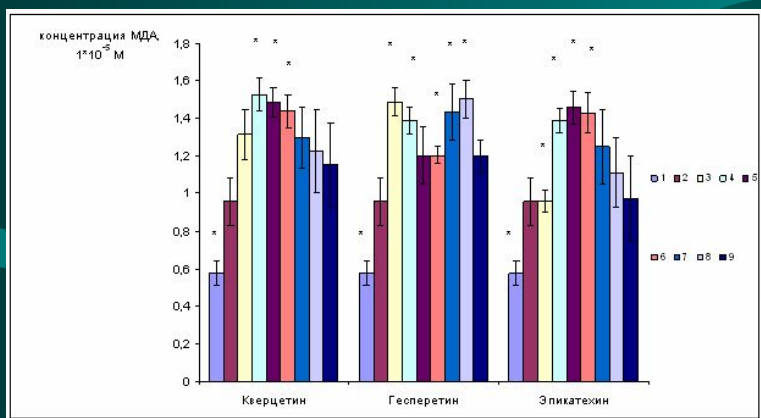
- ◆ Флавоноиды – это фенольные соединения, широко распространённые в природе.
- ◆ Общая структура флавоноидов ($C_6 — C_3 — C_6$) представлена двумя ароматическими кольцами, соединенными тремя углеродными атомами, наиболее часто с образованием гетероциклического кольца



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



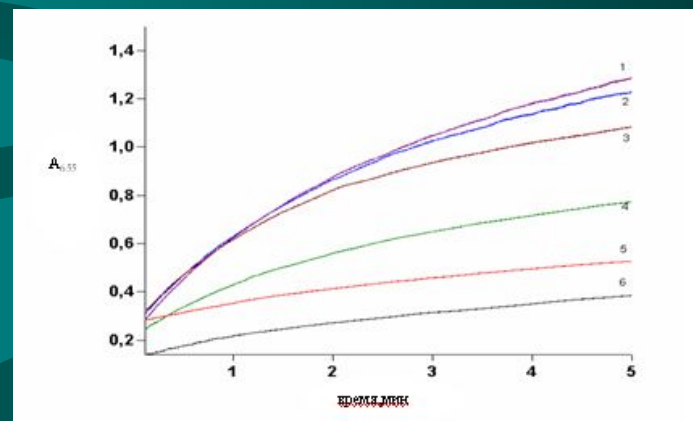
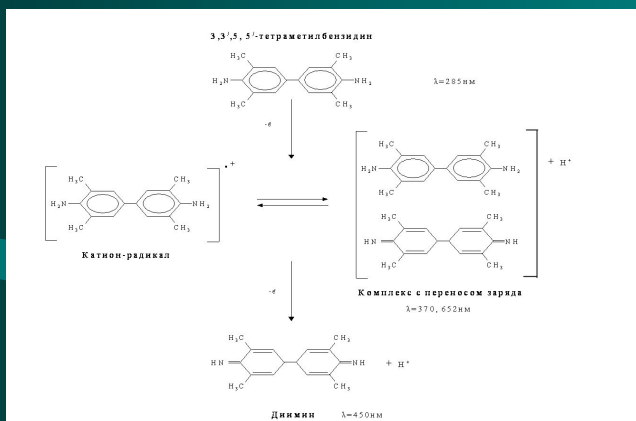
На рисунке слева представлено накопление продуктов ПОЛ, индуцированное СФ, в присутствии кверцетина, гесперетина и эпикатехина (1.- спонтанное ПОЛ, 2.- ПОЛ, индуцированное СФ ($2 \cdot 10^{-4}$ М $\text{Fe}^{2+}/2 \cdot 10^{-5}$ М H_2O_2) в отсутствие флавоноидов; для флавоноидов : 3.- $1 \cdot 10^{-7}$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



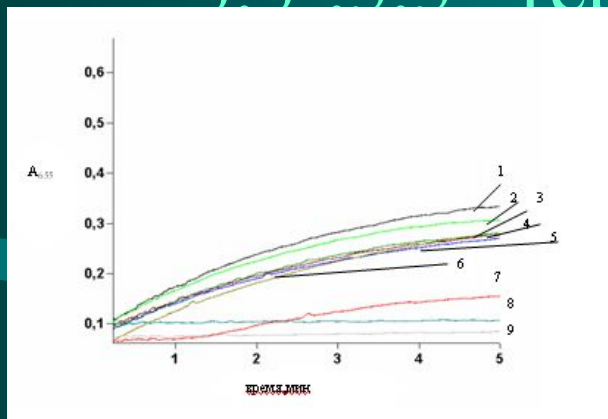
Подробный механизм
окисления ТМБД

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

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.

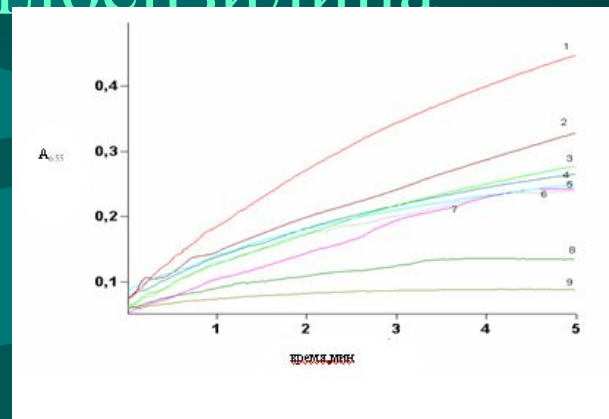


Влияние флавоноидов на процесс пероксидазного окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензилина



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.



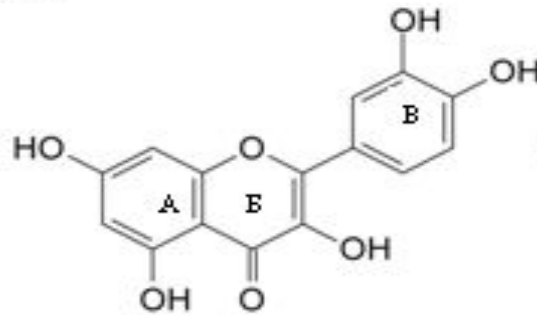
Пероксидазное окисление ТМБД в 0,1 М цитратно - ацетатном буфере рН 5,5 (конечный объём реакционной смеси составлял 2,5 мл и содержал $[H_2O_2]=0,4$ мМ/л, $[ПХ]=10^{-11}$ М, $[ТМБД]=0,6$ мМ/л) в присутствии эпикатехина:

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.

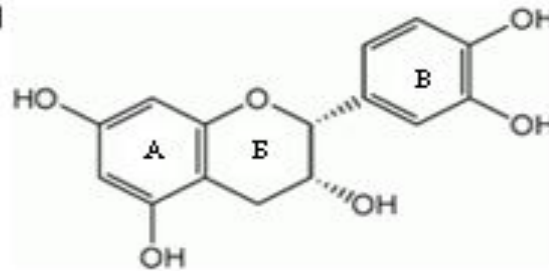


Химические формулы кверцетина, гесперетина и эпикатехина

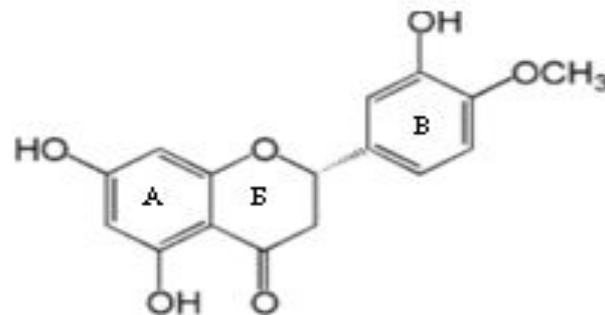
кверцетин



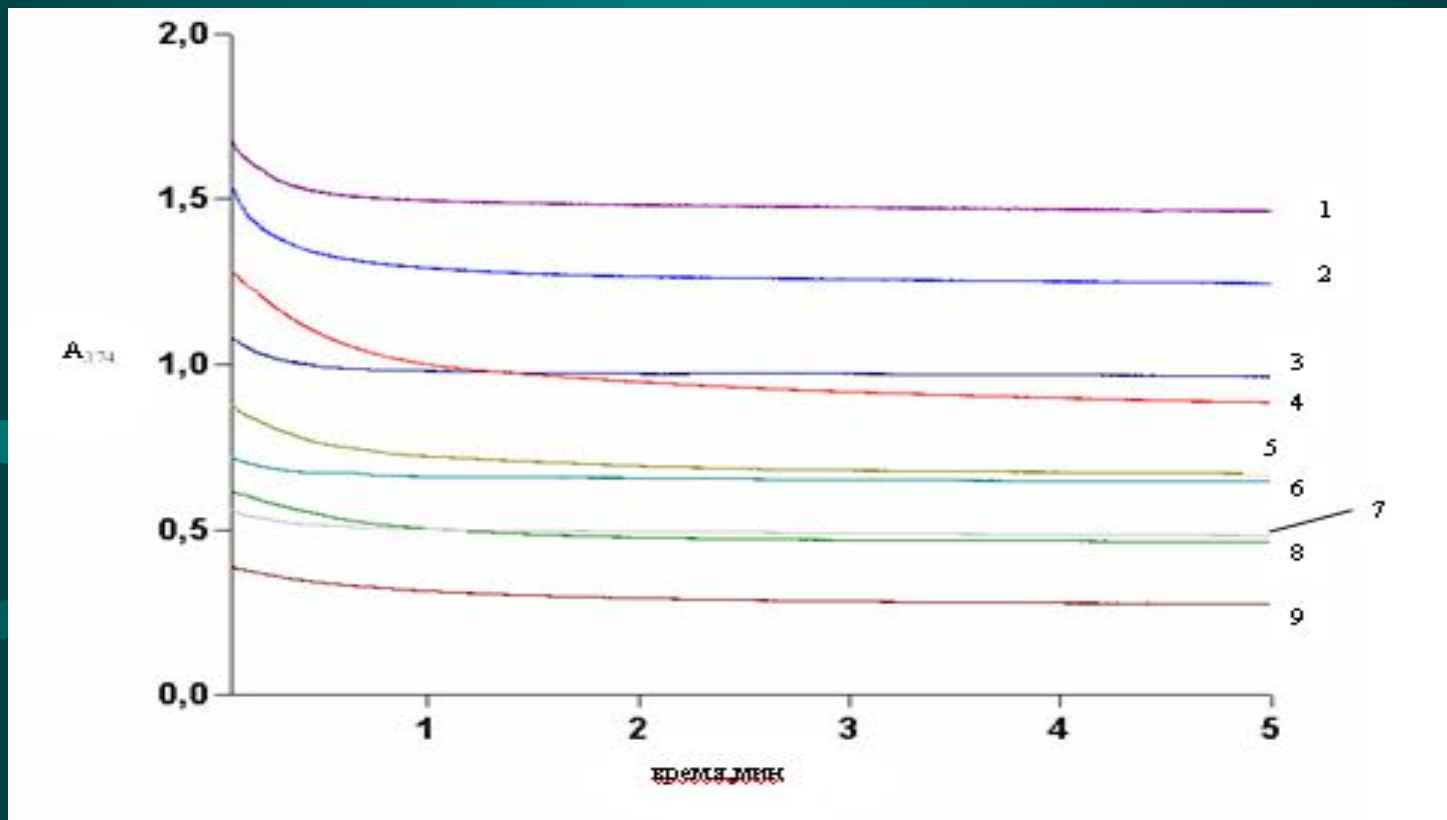
эпикатехин



гесперетин



Пероксидазное окисление кверцетина

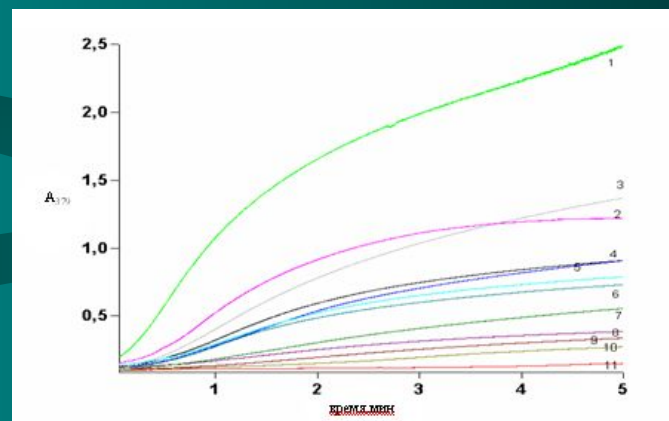
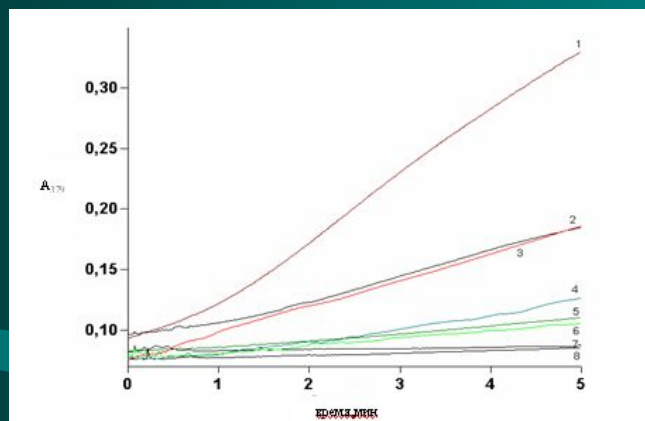


Окисление протекало в 0,1 М цитратно – ацетатном буфере (pH 5,5), $[ПХ] = 10^{-11}$ М, $[H_2O_2] = 50$ мкмоль/л:

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 (рН 5,5), $[H_2O_2]=50$ мкмоль/л :

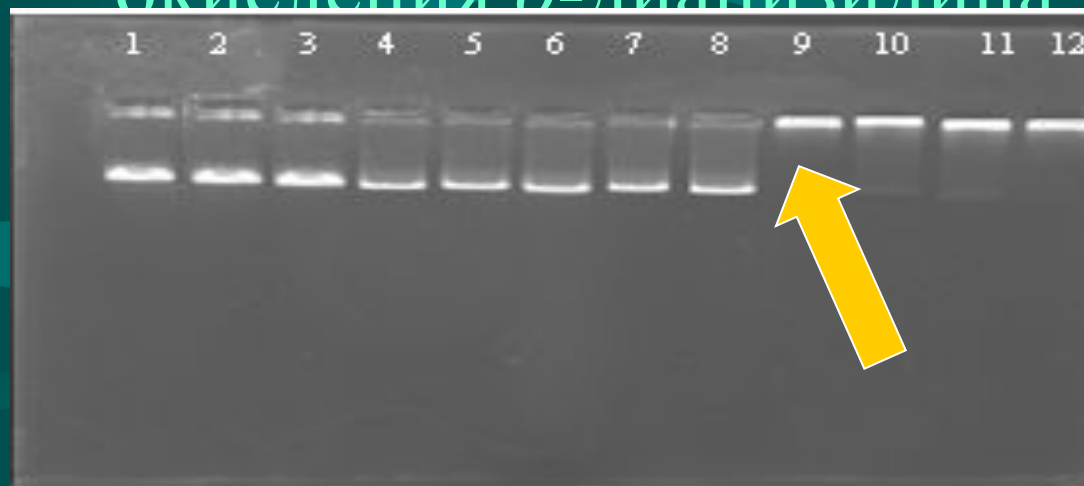
На рисунке слева: $[PX]=10^{-11}$ М, 1 - [эпикатехин] = 105 мкмоль/л, 2 - [эпикатехин] = 95 мкмоль/л, 3 - [эпикатехин] = 85 мкмоль/л, 4 - [эпикатехин] = 75 мкмоль/л, 5 - [эпикатехин] = 55 мкмоль/л, 6 - [эпикатехин] = 25 мкмоль/л, 7 - [эпикатехин] = 20 мкмоль/л, 8 - [эпикатехин] = 5 мкмоль/л.

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 λ , инкубированной в системе пероксидазного

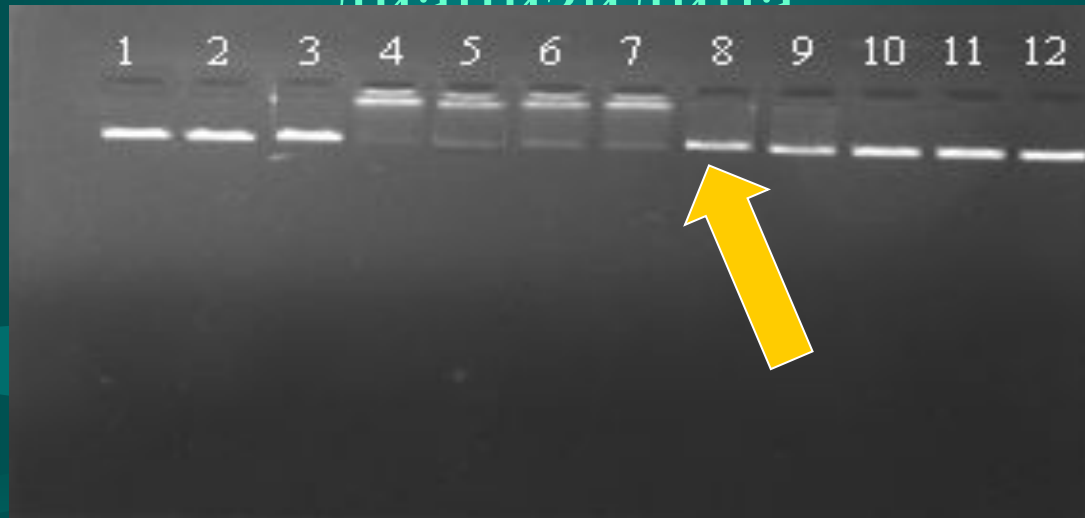
окисления *o*-дианизидина



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

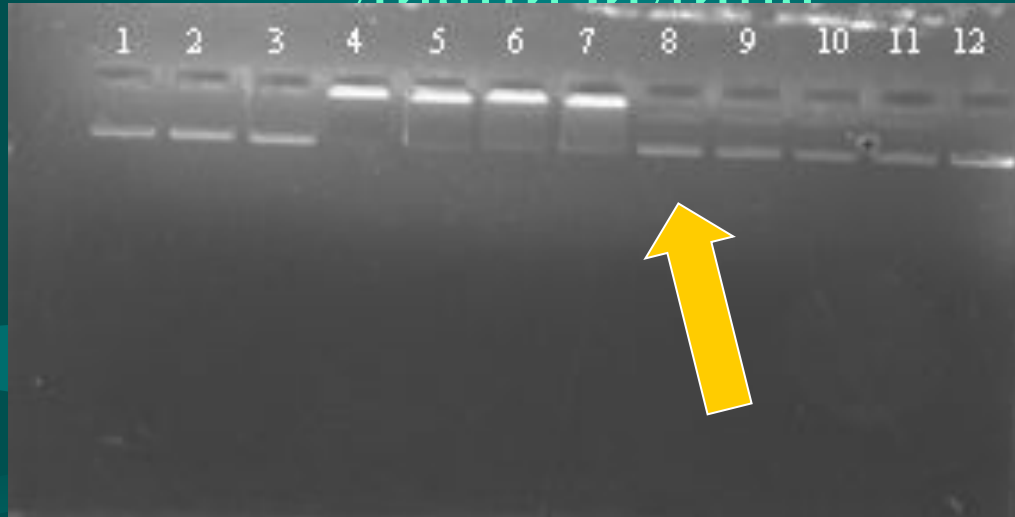
Влияние кверцетина на повреждение ДНК продуктами пероксидазного окисления *o*-дианизидина



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

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

Влияние эпикатехина на повреждение ДНК продуктами пероксидазного окисления *o*- дианизилина

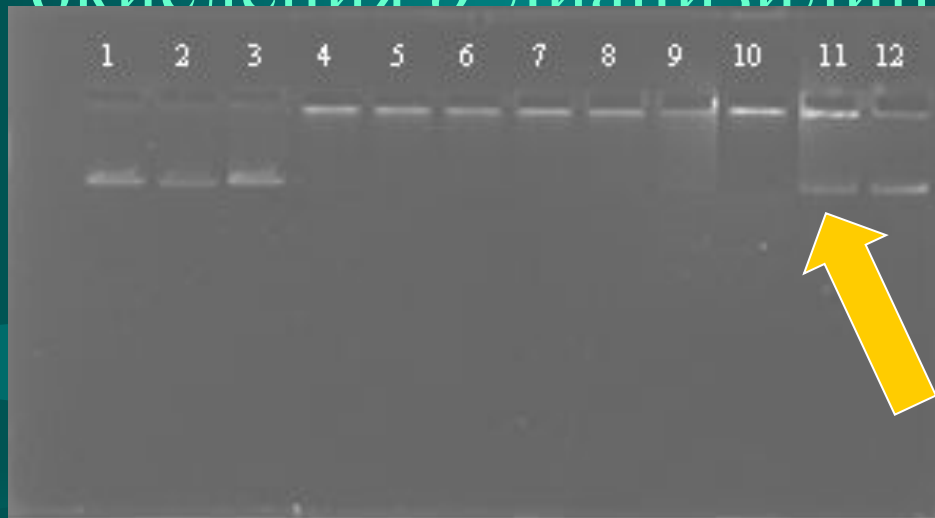


Электрофореграмма ДНК фага λ , инкубированной в системе пероксидазного окисления *o*-дианизилина ($[o\text{-дианизидин}] = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $[\text{ДНК}] = 0,4 \text{ мкг}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1$ ммоль/л, $[\text{ПХ}] = 10^{-7}$ моль/л) с различными концентрациями эпикатехина:

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



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



Электрофореграмма ДНК фага λ , 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 :

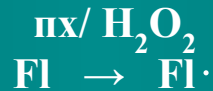
1. ДНК, 2. ДНК, ПХ, H_2O_2 , 3. ДНК, ПХ, *o*-дианизидин, 4. ДНК, ПХ, H_2O_2 , *o*-дианизидин, 5. ДНК, ПХ, H_2O_2 , *o*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 6. ДНК, ПХ, H_2O_2 , *o*-дианизидин, гесперетин $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 7. ДНК, ПХ, H_2O_2 , *o*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 8. ДНК, ПХ, H_2O_2 , *o*-дианизидин, гесперетин $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, 9. ДНК, ПХ, H_2O_2 , *o*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 10. ДНК, ПХ, H_2O_2 , *o*-дианизидин, гесперетин $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, 11. ДНК, ПХ, H_2O_2 , *o*-дианизидин, гесперетин $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 12. ДНК, ПХ, H_2O_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 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/ H_2O_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

