

ФИЗИОЛОГИЯ

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КВЕРЦЕТИНА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

Тухтаева Феруза Шоназаровна

Национальный Университет Узбекистана имени М.Улугбека,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: tuxtaevaf@bk.ru

Зулайхо Аминжановна Маматова

зав. кафедры Физиологии человека и животных, доцент,
Национальный Университет Узбекистана имени М.Улугбека,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: mamatiovazul@mail.ru

Гайибов Улугбек Гаппаржанович

мл. науч. сотр., Институт биоорганической химии АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: gayibov.ulugbek@gmail.com

ANTIRADICAL ACTIVITY OF QUERCETINE AND DIHYDROQUERCETINE

Feruza Tuxtaeva

National University of Uzbekistan named after M.Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent.

Zulayho Mamatova

Head of the Human and animal physiology department, dots.,
National University of Uzbekistan named after M.Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent.

Ulugbek Gayibov

Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences, Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

В данной статье изучена антирадикальная активность (АРА) по отношению к свободному радикалу 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу (ДФПГ) кверцетина и его производного дигидрокверцетина. Установлены количественные характеристики реакции восстановления ДФПГ исследованными полифенолами. Показана высокая способность изученных соединений тушению свободных радикалов.

ABSTRACT

In this article the antiradical activity (ARA) of quercetine and its derivative dihydroquercetine with respect to scavenge free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was discussed. The quantitative characteristics of the reaction of DPPH reduction by the studied polyphenols were established. The high ability of the studied compounds to quench free radicals has been shown.

Ключевые слова: свободные радикалы, ДФПГ, константа реакции

Keywords: free radicals, DPPH, rate constant

Известно, фенольные антиоксиданты широко применяются для предотвращения различных окис-

лительных процессов. Антиоксидантное действие полифенолов объясняют связыванием ионов тяже-

лых металлов, служащих катализаторами окислительных процессов, и взаимодействием с высокоактивными свободными радикалами. Благодаря этому фенольные соединения способны гасить цепные свободнорадикальные процессы [2, с.28]. Биологическая активность фенольных соединений таких как, антиоксидантные, адаптогенные, иммуномодулирующие, противоопухолевые и гипогликемические обусловлена их специфической структурой [6, с. 941; 4, с. 751].

Однако, несмотря на достигнутые успехи в области создания высокоэффективных препаратов с антиоксидантной активностью, во многих случаях их применение оказалось недостаточно эффективным. В связи с этим до сих пор остается актуальной задача синтеза и изучения новых антиоксидантных соединений для производства лекарственных препаратов.

Целью настоящей работы является изучение антиоксидантных свойств фенольных соединений и их взаимосвязь с химической структурой.

Материалы и методы.

Митохондрии выделяли из печени крыс массой 150-200 гр. методом дифференциального центрифугирования [8, с. 10]. Среда выделения митохондрий содержала 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-хлорида, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4.

Индукцию неферментативного Fe^{2+} /аскорбат-

зависимого ПОЛ проводили добавлением 10 мкМ $FeSO_4$ и 600 мкМ аскорбата. Инкубационная среда содержала 125 мМ KCl, 10мМ трис-HCl, pH 7,4. Количество белка митохондрий составляло 0,5мг на 1 мл среды инкубации.

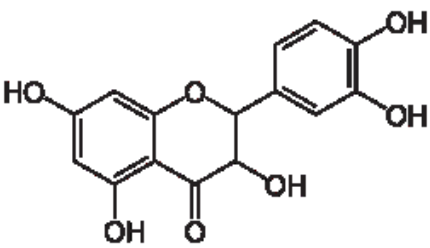
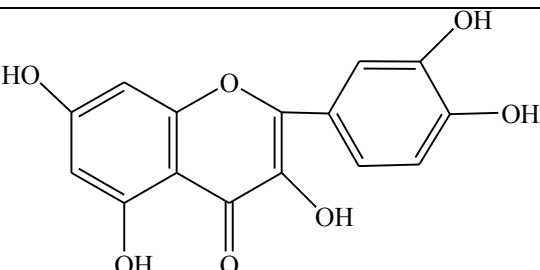
Антиоксидантную активность исследуемых соединений измеряли по ингибированию Fe^{2+} /аскорбат-зависимого набухания митохондрий печени крыс при 540 нм на фотометре ЛМФ-69. Выбор такого методического подхода обусловлен тем, что ранее была установлена линейная корреляционная взаимосвязь между интенсификацией процессов ПОЛ, индуцированного системой Fe^{2+} /аскорбиновая кислота и набуханием митохондрий [7, с. 1200]. Пероксидация липидов в системе Fe^{2+} /аскорбат на митохондриальной мембране оценивалась также другими авторами, измерением набухания митохондрий в условиях активации процессов ПОЛ [3, с. 505], что свидетельствует о пригодности использования этой модели, как тест-системы изучения антиоксидантных свойств различных веществ.

Белок определяли по биуретовой реакции [5, с. 755].

Структурные формулы фенольных соединений приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Исследуемые фенольные соединения и их химические структуры

№	Исследуемые соединения	Химическая структура
1	Дигидрокверцетин	
2	Кверцетин	

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программы "Origin 6.1". Данные оценивали, используя параметрический t-критерий Стьюдента, выражали в виде $M \pm m$. Достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. кверцетин – флавоноид, содержит в своем каркасе две OH^- группы, обладает, как и другие фенольные соединения, протонаторной активностью [1, с. 110]. Изучение действия кверцетина на Fe^{2+} -аскорбат-зависимое набу-

хание показало, что начиная с концентрации 1 мкМ исследуемое соединение ингибирует процесс ПОЛ.

Из рисунка 3 видно, что кверцетин, начиная с концентрации 1 мкМ, ингибирует Fe^{2+} /аскорбат-зависимое набухание митохондрий, при этом значение ингибирования составило $10,1 \pm 1,5\%$. Эффект кверцетина на процесс ПОЛ в мембранах митохондрий зависел от концентрации препарата, т.е. с увеличением концентрации кверцетина в инкубационной среде процент ингибирования становится более высоким.

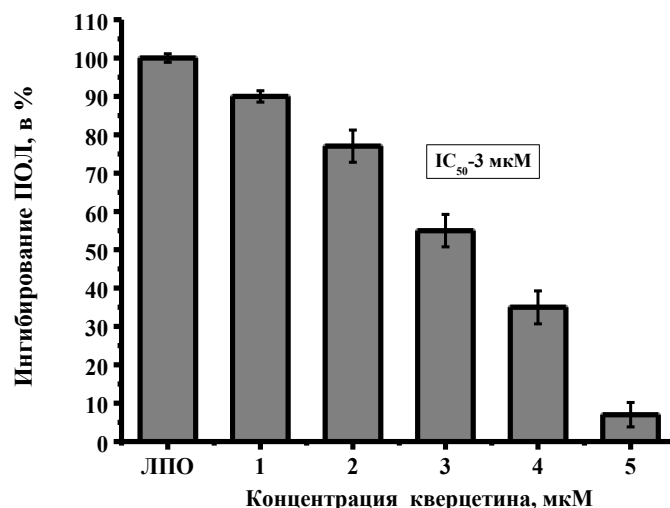


Рисунок 1. Действия кверцетина на ПОЛ-индуцированное набухание митохондрий

Примечание: Условия эксперимента см. в раздел материалы и методы, $n = 4$, $P < 0,05$.
 Концентрация пирогаллола IC_{50} – считали в \log (мкМ).

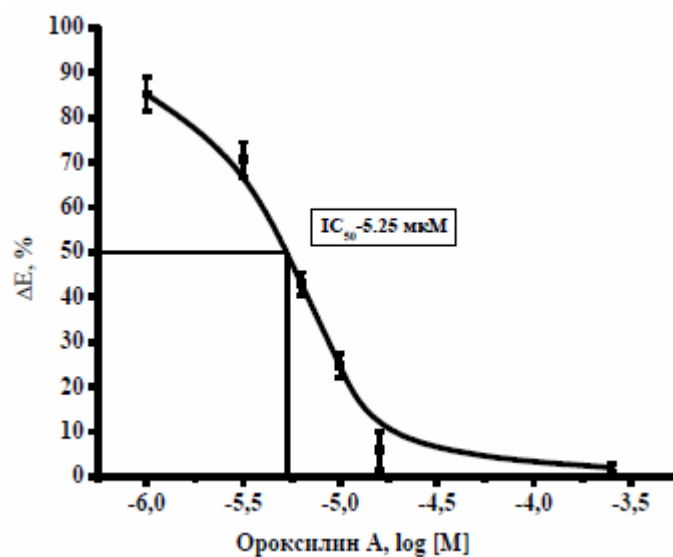


Рисунок 2. Действие дигидрокверцетина на набухание митохондрий в условиях активации ПОЛ

Примечание: Условия эксперимента см. в раздел материалы и методы, $n = 4$.

При исследовании флавоноида дигидрокверцетина в концентрациях 0,1-3 мкМ его ингибирующее действие на Fe^{2+} -аскорбат-индуцированное набухание митохондрий оказалось концентрационно-зависимым. Эксперименты показали, что

максимальная эффективность наблюдается при концентрации 3 мкМ дигидрокверцетина, при этом составила $IC_{50} = 1$ мкМ (рис.2).

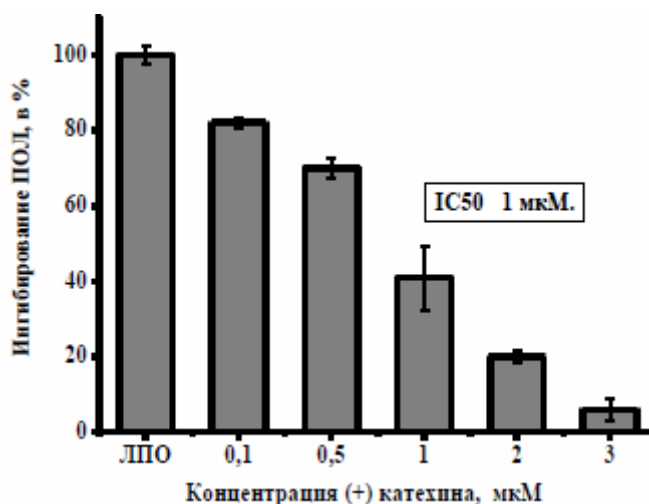


Рисунок 3. Действие дигидрокверцетина на ПОЛ-индуцированное набухание митохондрий печени крыс

Примечание: Условия эксперимента см. в раздел материалы и методы, $n = 4$, $P < 0,05$. Концентрация пирогаллола IC_{50} – считали в \log (мкМ).

Таким образом, антиоксидантная активность изученных фенольных соединений зависит от их структуры и концентраций, усиливается по мере

увеличения количества ОН-групп в их структуре, соответственно, что представлено в нижеследующей таблице 2.

Таблица 2.

Ингибирование флавоноидными соединениями Fe^{2+} -аскорбат-индуцированное набухание митохондрий

Фенольные соединения	Количество ОН-групп в кольце	IC_{50} (мкМ)	Максимальная ингибирующая концентрация (мкМ)
Дигидрокверцетин	5	$3,0 \pm 4,2$	$5,0 \pm 3,2$
Кверцетин	5	$1,0 \pm 8,0$	$3,0 \pm 2,7$

Примечание: Концентрации, вызывающие полумаксимальное ингибирование фенольных соединений IC_{50} – считали в \log (мкМ).

Таким образом, нами установлено, что фенольные соединения: кверцетин и дигидрокверцетин оказывают протекторное действие на митохондрии, уменьшая повреждающее действие Fe^{2+} /аскорбат. На основании IC_{50} , антиоксидантная активность фенольных соединений может быть представлена следующим рядом: кверцетин > дигидрокверцетин. Из исследованных соединений наиболее эффективным на модели митохондрий оказался флавоноид кверцетин.

Причиной развития многих заболеваний человека и животных являются свободные радикалы. Тушению этих свободных радикалов способствует антиоксидантная система организма. Также в современной практике широко используются антиоксиданты. Антиоксиданты способны нейтрализовать активность свободных радикалов, защищая таким образом клетки от окисления [1, с. 110].

В литературных данных широко представлена способность полифенольных соединений к высокой антиоксидантной активности за счет электрон - донорных функциональных групп в их молекуле, таких как альдегидная и гидроксильная.

Определение антиоксидантной активности биологически активных соединений методом набухания

митохондрий является одним из классических методов изучения антиоксидантной активности (АОА). В литературе АОА полифенолов связывают как с их способностью хелатировать различные ионы металлов [9, с. 16248], так и непосредственно взаимодействовать с такими активными формами кислорода как O_2^{\bullet} [10, с. 1035], ОН-радикалами и синглетным кислородом [11, с. 18]. Полифенолы могут также взаимодействовать и/или связывать компоненты реакционной среды, что может приводить к искажению результатов [12, с. 7]. В этом случае применение метода накопления МДА не позволяет непосредственно оценивать вклад каждого из этих эффектов в общую антиоксидантную активность препаратов. Исключение данных ошибок позволяет использование соединений, несущих свободную валентность, каковыми являются стабильные органические радикалы [13, с. 242]. К примеру, ортозамещенные дифенолы имеют четыре электрона, которые могут восстанавливать различные радикалы [14, с. 789]. В этом случае, антирадикальная активность полифенолов непосредственно коррелирует с их АОА.

Таким образом, далее исследовали антирадикальную активность полифенольных соединений

кверцетин и дигидрокверцетин. Для оценки АРА в данной работе использована методика спектрофотометрического измерения кинетики восстановления

молекул стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) антиоксидантами [15, с. 565].

Таблица 3.

Значения K , IC_{50} и t_{50} при реакции ДФПГ с исследуемыми полифенолами

$K \cdot 10^{-3}, c^{-1}$		$IC_{50}, \mu M$		$t_{50}, \text{сек}$	
DQ	Q	DQ	Q	DQ	Q
1,2	5,3	14,3	7,2	105	9,6

Анализ полученных данных позволяет заключить, что изученные препараты обладают высокой антирадикальной активностью по сравнению с известными антиоксидантами механизм действия которых заключается в отдаче подвижного водорода свободному радикалу, в

результате чего происходит обрыв цепи реакции ПОЛ. Скорость реакции изученных препаратов с ДФПГ различна.

Данный факт, также, подтверждается коэффициентом корреляции $r=0.94$ между проявлением антиоксидантных и антирадикальных свойств.

Список литературы:

1. Асраров М.И., Комилов Э.Ж., Эшбакова К.А. Матер. Межд. науч. конф. «Роль протонной активности флавоноида ороксилена в проявлении его биологически активных свойств». – Ташкент, Узбекистан, 2013. – С.110.
2. Саламатов, А. А. Разработка комплексной технологии биологически активных веществ из шрота яблок и лекарственных форм на их основе : автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук / А. А. Саламатов. – Курск, 2009 – 28 с.
3. Almeida A.M., Bertoncini C.R. Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe²⁺-citrate // *An. Acad. Bras. Cienc.* – 2006. – 78. – P.505-514.
4. Cao G., Sofic E., Prior R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships // *Free Rad. Biol. Med.* – 1997. – 22. – P. 749-760.
5. Gornal A.G., Bardawill C.J., David M. Determination of serum protein by means of biuret reaction // *J. Biol. Chem.* – 1949. – 177. – P. 751-766.
6. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996. – 20. – P. 933-956.
7. Takei M., Hiramatsu M., Mori A. Inhibitory effects of calcium antagonists on mitochondrial swelling induced by lipid peroxidation or ascorbic acid in the rat brain in vitro // *Neurochem. Res.* – 1994. - 19. – P. 1199-1206.
8. Schneider W.C., Hogeboom G.H. Cytochemical studies of mammalian tissues: the isolation of cell components by differential centrifugation // *Cancer. Res.* – 1951. – 11. – P. 1-22.
9. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interaction with the environment // *Molecules.* – 2014. – V. 16. – P. 16240-16265.
10. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants // *J. Nat. Prod.* – 2000. – V. 63. – P. 1035-1042.
11. Гайилов У.Г., Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Рахимов Р.Н., Абдуллажанова Н.Г., Асраров М.И., Арипов Т.Ф. Антиоксидантные и мембраноактивные свойства ПС-1 // *Узбекский биологический журнал.* – 2017. – № 2. – С. 19-23.
12. Абдуллаева Г.Т., Гайилов У.Г., Комилов Э.Дж., Миробидов С.А., Абдуллажанова Н.Г., Асраров М.И. Гетасан полифенолининг антиоксидантлик ва антирадикаллик хоссалари // *ЎзМУ хабарлари.* – Ташкент, 2017. – № 3/2. – С. 6-9.
13. Салахутдинов Б.А., Гайилов У.Г., Максимов В.В., Сонькина С.Н., Тукфатуллина И.И., Узбеков В.В., Салихов Ш.И. Влияние энантиомеров госсипола на модельные и биологические мембраны // *Международный симпозиум по фенольным соединениям.* – Москва, 2009, С. 242-243.
14. Fruehauf J.P., Meyskens F.L. Reactive oxygen species: A breath of life or death? // *Clinical Cancer research.* – 2007. – V. 13. – P. 789-796.
15. Мельничук В.А. Экспресс-метод определения антирадикальной активности лекарственных веществ // *Хим. Фарм. журн.* – 1985. – V.5. – С. 565-567.