

2. Gut microbiota mediated allostasis prevents stress-induced neuroinflammatory risk factors of Alzheimer's disease. Prog Mol Biol Transl / S. Westfall, U. Iqbal, M. Sebastian, G. M. Pasinetti // Sci. – 2019. – Vol. 168. – P. 147-181.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНОЙ И РЕГУЛЯТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ФЛАВОНОИДОВ, ФИЗЕТИНА, КВЕРЦЕТИНА, АПИГЕНИНА, КЕМПФЕРОЛА, НАРИНГЕНИНА, НАРИНГИНА, В КЛЕТОЧНЫХ И БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

Заводник И. Б.¹, Савко А. И.¹, Вейко А. Г.¹, Ильич Т. В.¹,
Коваленя Т. А.¹, Климович И. И.²

¹Гродненский государственный университет имени Янки Купалы

²Гродненский государственный медицинский университет
Гродно, Беларусь

Введение. Флавоноиды, принадлежащие к обширному семейству полифенолов, являются вторичными метаболитами растений, представляют наиболее распространенную группу фитохимических веществ с высокой биохимической и физиологической активностью [1] и имеют важное значение как компоненты диеты человека. Флавоноиды имеют общий углеродный скелет С6-С3-С6 (бензо-γ-пирон), в тоже время существует широкий спектр структурного разнообразия флавоноидов, что связано с различной степени гидроксирования, метоксилирования, гликозилирования или глюкуронилирования [2], и что способствует большому разнообразию биологических свойств. Основная биологическая активность флавоноидов связана с их антирадикальными/антиоксидантными свойствами (редокс-потенциалом), которые обеспечиваются системой сопряженных колец и гидроксильных групп [3]. Флавоноиды также способны активировать ферменты детоксикации свободных радикалов, такие как НАД(Ф)Н-хинон оксидоредуктазы, глутатион-S-трансферазы или УДФ-глюкуронозилтрансферазы [4], взаимодействовать с белками и мембранными структурами, активировать, ингибировать, регулировать многие сигнальные каскады, как AMPK, MAPK, NF-κB – зависимые пути [5]. Многочисленные экспериментальные и эпидемиологические исследования демонстрируют благоприятные эффекты флавоноидов при инфекционных (бактериальных и вирусных) заболеваниях, нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, возрастных заболеваниях, диабете, раке и ряде других [6] при отсутствии побочных эффектов.

Цель. Сравнительное исследование антиоксидантной активности и регуляторных свойств ряда флавоноидов, физетина, кверцетина, апигенина, кемпферола, нарингенина, его гликозида нарингина, в клеточных (эритроциты, митохондрии) и бесклеточных системах.

Методы исследования. Флавоноиды вносили в суспензию эритроцитов или митохондрий в виде свежеприготовленных растворов (10 мМ) в этаноле, содержание этанола в пробе не превышало 0,5%. Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования в среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,02 М Трис-НCl и 0,001 М ЭГТА, pH 7,2. Респираторную активность изолированных митохондрий (0,5 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии флавоноидов регистрировали, используя электрод Кларка («Hansatech Instruments Limited», Великобритания) при постоянном легком перемешивании в среде 0,125 М KCl, 0,05 М сахарозы, 0,01 М Трис-НCl, 0,0025 М KH_2PO_4 , 0,005 М MgSO_4 , pH 7,2, 25 °C. Определение содержания GSH проводили, используя (5 мМ) реактив Элмана. Концентрацию стабильных продуктов перекисного окисления, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), определяли спектрофотометрически. Статистический анализ проводили с использованием программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 10.0.

Результаты и их обсуждение. Флавоноиды в диапазоне концентраций 2,5-25 мкМ дозозависимо предотвращали окислительные повреждения эритроцитов: накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окисление глутатиона GSH, индуцируемое терт-бутил гидропероксидом. Оцененные нами значения IC₅₀, соответствующие концентрации флавоноида, ингибирующего на 50% процесс ПОЛ в мембранах эритроцитов, равны, соответственно, $3,9 \pm 0,8$ мкМ в случае физетина, $6,5 \pm 1,6$ мкМ в случае кемпферола, $8,1 \pm 2,1$ мкМ в случае апигенина, $37,8 \pm 4,4$ мкМ в случае нарингенина и $64,7 \pm 8,6$ мкМ в случае нарингина ($p < 0,05$). Антиоксидантный эффект флавоноидов был значительно выше в мембранных структурах по сравнению с цитоплазмой клеток. Эффективность ингибирования накопления ТБАРС в эритроцитах крыс уменьшалась в ряду физетин > кемпферол = апигенин > нарингенин > нарингин. Используя эффективность восстановления стабильного радикала DPPH флавоноидами был показан следующий порядок возрастания активности удаления свободных радикалов: кверцетин > катехин > лютеолин > таксифолин > кемпферол > апигенин, коррелирующий с изменением величины энергии удаления атома водорода гидроксильных групп полифенолов. Кажущиеся скорости реакции (с^{-1} , 20°C) восстановления стабильного радикала DPPH флавоноидами составляют $0,34 \pm 0,06$ в случае кверцетина, $0,09 \pm 0,02$ в случае катехина, соответственно. Для сравнения, этот параметр равен $0,054 \pm 0,012 \text{ с}^{-1}$ в случае известного антиоксиданта глутатиона. Энергии активации процесса восстановления DPPH для катехина составляет $\Delta E_a = 32,5 \pm 2,5$ кДж/моль, для кверцетина – $\Delta E_a = 23,0 \pm 2,5$ кДж/моль, для глутатиона – $\Delta E_a = 25,7 \pm 3$ кДж/моль. Используя флуоресцентные зонды ТМА-DPH и DPH, мы показали, что кверцетин, но не катехин и нарингенин, значительно уменьшает микротекуность (повышает жесткость) липосомального бислоя 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина на различной глубине. Эффект флавоноидов на структуру липидного бислоя мембран связан с ростом

гетерогенности бислоя, изменением текучести, упаковки липидных молекул и степени гидратации.

Все исследованные флавоноиды (10-50 мкМ) эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс свидетельствуя о нарушении сопряжения дыхания и фосфорилирования (наиболее эффективно влиял на скорость потребления кислорода митохондриями апигенин), и, за исключением кемпферола, стимулировали Ca^{2+} -индуцируемую диссипацию мембранного потенциала митохондрий. Можно предположить протонофорный/ионофорный эффект липофильных флавоноидов, представляющих собой слабые кислоты. Циклоспорин А и Рутений красный ингибируют стимулируемую флавоноидами Ca^{2+} -зависимую деполяризацию мембран, что указывает на участие в эффекте флавоноидов митохондриального кальциевого унипортера и процесса открытия пор высокой проницаемости.

Выводы. Флавоноиды, редокс-активные соединения, обладающие выраженными антиоксидантными свойствами, и которые способны регулировать клеточный окислительно-восстановительного баланс и респираторную активность, предотвращать окислительный стресс, можно рассматривать в качестве эффективных фармакологических агентов или нутрицевтиков. Способность флавоноидов модулировать митохондриальный биогенез, регулировать формирование пор высокой проницаемости, генерацию активных форм кислорода митохондриями, мембранный потенциал, активность электрон-транспортной цепи, кальциевый гомеостаз митохондрий представляет существенный интерес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent / A. Ullah, S. Munir, S. L. Badshah [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 22. – P. 1-39.
2. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance / G. Agati, E. Azzarello, S. Pollastri, M. Tattini // *Plant Science*. – 2012. – Vol. 196. – P. 67-76.
3. Leopoldini, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants / M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 125, № 2. – P. 288-306.
4. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications / R. J. Nijveldt, E. van Nood, D. E. van Hoorn [et al.] // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2001. – Vol. 74(4). – P. 418-425.
5. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application / D. Xu, M. J. Hu, Y. Q. Wang, Y. L. Cui // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 6. – P. 1-15.
6. Kumar, S. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview / S. Kumar, A. K. Pandey // *The Scientific World Journal*. – 2013. – Vol. 2013. – Art. 162750.