

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ КВЕРЦЕТИНА В СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЯХ И РАДИОПРОТЕКТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2023 г. А. Г. Лысенко^а, А. А. Фенин^а, *

^аРоссийский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1, Москва, 125480 Россия

*E-mail: fenin.a.a@muctr.ru

Поступила в редакцию 03.11.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 04.01.2023 г.

Методом стационарного радиолиза показано снижение, в результате образования комплекса с ионом меди, реакционной способности кверцетина в свободно-радикальных реакциях с 1-гидроксиэтильным радикалом и супероксидным анион-радикалом. Снижение отрицательного эффекта ионов меди возможно путем разрушения образующегося комплекса введением хелатирующих соединений таких как винная кислота и ЭДТА. Характер изменения реакционной способности соответствовал изменению радиопротекторной активности кверцетина по отношению к дрожжевым клеткам.

Ключевые слова: кверцетин, метало-комплексы флавоноидов, константа скорости, свободные радикалы, радиопротекторная активность

DOI: 10.31857/S0023119323030087, **EDN:** KDOJBR

ВВЕДЕНИЕ

Последствием избыточного образования свободных радикалов в организме человека является оксидативный стресс, приводящий к развитию разнообразных заболеваний [1].

Для противодействия окислительным реакциям, протекающим в организме по радикально-цепному механизму недостаточно одних защитных функций организма. Было проведено множество исследований (*in vivo*), которые показали, что флавоноиды могут быть отнесены к неферментативным антиоксидантам, которые способны в разной степени предотвращать развитие цепных свободно-радикальных реакций [2–4]. Связано это, в частности, с тем, что они способны образовывать стабильные хелатные комплексы с ионами металлов, в частности с ионами меди [5–7]. Употребление продуктов или биологически активных добавок, содержащих флавоноиды — один из способов снижения вредного воздействия окислительного стресса.

Медь — важный минерал, который присутствует в некоторых продуктах питания и доступен в качестве пищевой добавки. Она функционирует как компонент ряда металлоэнзимов, действующих как оксидазы для восстановления молекулярного кислорода. Так же она служит компонентом ферментов, обладающих окислительно-вос-

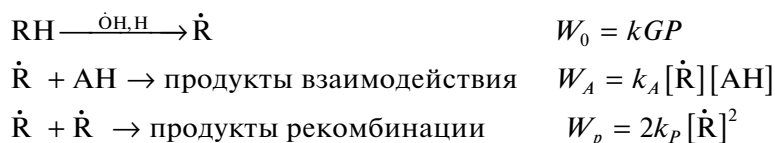
становительной активностью, т.е. участвует в окислительно-восстановительных процессах. Однако, с другой стороны, в комплексе с флавоноидами она может проявлять и прооксидантную активность [8–10].

Целью данной работы исследовать направление изменения реакционной способности кверцетина в свободно-радикальных реакциях при образовании комплекса с ионом меди.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Определение константы скорости реакции с 1-гидроксиэтильным радикалом методом стационарного радиолиза. Для удаления кислорода проводили продувку раствора закисью азота в течение 60 мин до облучения и непрерывно во время облучения. Водные растворы содержащие: трис(гидроксиметил)аминометан (0.1 М); HCl до pH 7.4; этанол (30 об. %) и кверцетин (или его комплекс с ионом меди состава 1 : 1) 1 мкМ облучали на рентгеновской трубке 5БХВ6-Мо при комнатной температуре при параметрах трубки: напряжение 40 кВ, ток 50 мА (мощность дозы 3 Гр/с по дозиметру Фрикке).

Происходящие при этом в системе процессы в первом приближении можно описать тремя уравнениями:



Искомую константу скорости, можно определить по скорости расходования вещества акцептора, и для существенного упрощения экспериментального определения необходимо создать условия, при которых концентрация радикала не будет зависеть от концентрации исследуемого соединения. Это реализуется в том случае, если скорость второй реакции значительно меньше третьей и ей можно пренебречь¹, при этом стационарная концентрация радикалов будет определяться выраже-

нием $[\dot{\text{R}}] = \sqrt{\frac{W_0}{2k_p}}$. Реакция акцептирования будет реакцией псевдопервого порядка по концентрации акцептора. И концентрация акцептора в зависимости от времени процесса будет описываться следующим выражением $\ln C_A = \ln C_0 - k_A [\dot{\text{R}}] t$, из углового коэффициента которой можно определить константу скорости реакции. Концентрацию кверцетина в растворе определяли методом жидкостной хроматографии на хроматографе "Acquity UPLC" со спектрофотометрическим детектором. Разделение проводили на колонке ACQUITY UPLC® BEH C18 100 × 2 мм 1.7 μm. Подвижная фаза: муравьиная кислота/вода/ацетонитрил 0.1/75/25.

Определение влияния меди на реакционную способность по отношению к супероксидному анион радикалу (СОАР). Реакционную способность в этом случае изучали методом конкурирующих акцепторов с использованием нитросинего тетразолия в качестве индикатора. Облучение проводили насыщенных кислородом воздуха водных растворов содержащих: трис(гидроксиметил)аминометан (0.1 М); HCl до pH 7.4; этанол (30 об. %); нитросиний тетразолий (0.6 мМ) и кверцетин (или его комплекс с ионом меди состава 1 : 1) 1 мкМ. Параметры питания трубки: напряжение 20 кВ, ток 75 мА (мощность дозы 0.15 Гр/с). Уменьшение мощности дозы, по сравнению с предыдущим экспериментом, делалось для снижения выхода реакции диспропорционирования СОАР, что позволило бы определить константу скорости реакции по ингибированию образования диформаза. Однако достигнуть условий, когда все образующиеся СОАР будут перехватываться нитросиним тетразолием не удалось, в результате чего было при-

нято решение ограничиться измерением скорости накопления диформаза, поскольку вне зависимости от того перехватываются все радикалы или нет скорость накопления будет зависеть от реакционной способности акцептора или его комплекса. Накопление диформаза определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 550 нм на спектрофотометре СФ-2000 в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Оценка радиопротекторной активности. Радиопротекторную активность оценивали по отношению к изменению выхода ионов калия из облученных дрожжевых клеток (диплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* раса Феодосия-7 в логарифмической фазе роста) по методике, использованной ранее [11]. Дрожжи подвергали воздействию рентгеновского облучения в условиях аналогичных определению константы скорости, облучали в дозе 0.5 кГр и измеряли, через час после облучения, концентрацию K^+ с помощью калий-селективного электрода (Россия) на рН метре/ионометре "Эко-тест 2000" (Россия). Концентрацию K^+ в растворе дрожжей облученных без добавок принимали за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования влияния добавок на скорость образования диформаза по реакции нитросинего тетразолия с СОАР представленные на рис. 1а показали, что наиболее активно перехватывает СОАР ионы меди. Добавление кверцетина к ионам меди приводит к снижению ее активности, хотя сам по себе кверцетин является акцептором СОАР. Тот факт, что именно образование комплекса приводит к этому снижению, подтверждает эксперимент с добавлением винной кислоты. Добавление винной кислоты к растворам не приводило к существенному снижению скорости накопления диформаза и не увеличивало активности кверцетина, но в значительной мере изменяло активность комплекса путем его разрушения.

Аналогичный эффект получен и при анализе реакционной способности по отношению к 1-гидроксиэтильному радикалу. Константы скоростей реакции с этим радикалом для кверцетина, комплекса кверцетина с медью и комплекса кверцетина с медью при наличии винной кислоты имели следующие значения: $(1.10 \pm 0.03) \times 10^6$; $(7.43 \pm 0.66) \times 10^5$; $(1.14 \pm 0.07) \times 10^6$. Образующийся комплекс характеризовался меньшей константой скорости,

¹ Выполнение данного условия были проверены путем сопоставления выходов 2,3-бутандиола (продукта димеризации 1-гидроксиэтильных радикалов) в холостом опыте и при наличии кверцетина. Результаты показали, что при концентрации кверцетина меньше 100 мкМ выходы практически не отличаются.

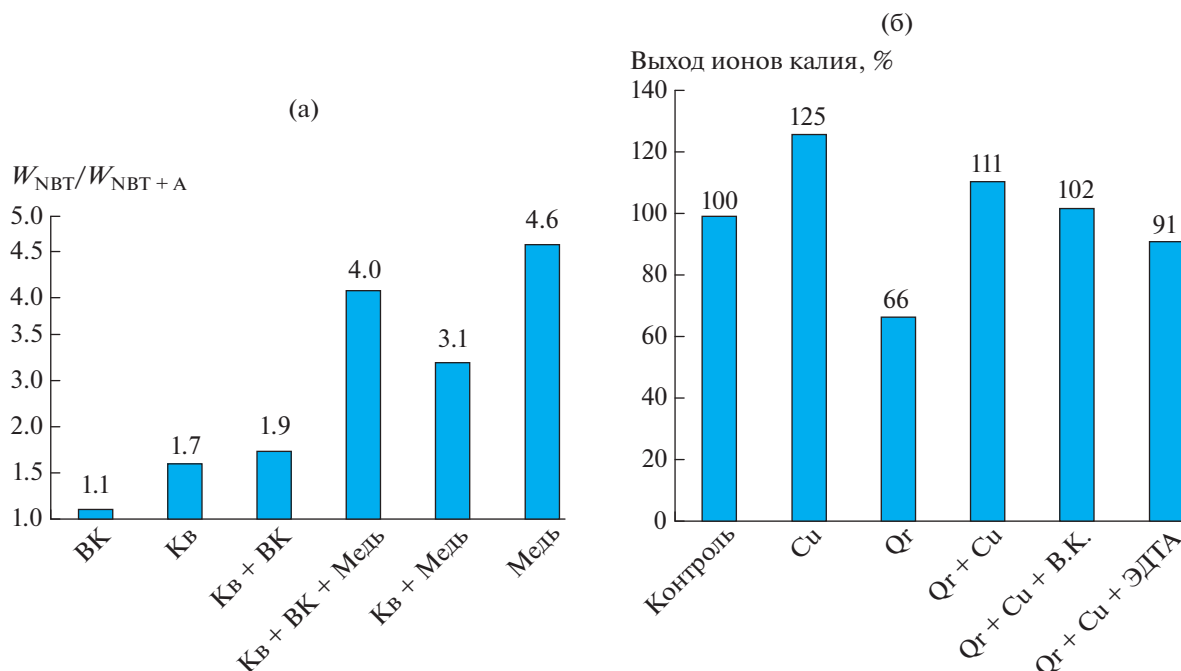


Рис. 1. (а) Ингибирование образования диформаза; (б) выход калия из дрожжевых клеток после воздействия гамма-излучения в дозе 500 гр, % в присутствии кверцетина, ионов меди и хелаторов.

нежели кверцетин. Разрушение этого комплекса приводило к увеличению активности кверцетина к исходным значениям.

Результаты исследования радиопротекторной активности (рис. 1б) находятся в полном согласии с результатами реакционной способности также демонстрируя, что образование комплекса препятствует защитным свойствам кверцетина. Введение более сильного, по сравнению с винной кислотой, хелатора ЭДТА приводит к логичному увеличению протекторной активности, снижая число ионов меди находящихся в комплексе с кверцетином, повышая число свободных молекул кверцетина.

Таким образом, комплекс меди с кверцетином является менее реакционноспособным, нежели чем ион меди и кверцетин. Следовательно, в состав БАД, позиционирующихся как добавки антирадикального действия, введение минеральных компонентов нецелесообразно, либо должно комбинироваться с введением хелатирующих соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудряшов Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / Под ред. В.К. Мазурика, М.Ф. Ломанова. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004. 448 с.
2. Zeng Y., Song J., Zhang M., Wang H., Zhang Y., Suo H. // *Antioxidants* (Basel). 2020. V. 9(8). P. 732. PMID; PMCID: PMC7465758. <https://doi.org/10.3390/antiox908073232796543>
3. Raman S.T., Ganeshan A.K., Chen C., Jin C., Li S.H., Chen H.J., Gui Z. // *Pharmacogn Mag.* 2016. V. 12(46). P. 128–33. PMID; PMCID: PMC4809167. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.17791027076749>
4. Terao J. // *The J. Medical Investigation: JMI.* 1999. V. 46(3–4). P. 159–168. PMID: 10687310
5. Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. // *Fitoterapia.* 2011. T. 82. № 4. С. 513.
6. Lekka C.E. et al. // *The J. Physical Chemistry B.* 2009. T. 113. № 18. С. 6478.
7. Костюк В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В.А. Костюк, А.И. Потапович. Минск. 2004. С. 10–16; С. 82–98.
8. Jomová K., Hudecova L., Lauro P., Simunkova M., Alwasel S.H., Alhazza I.M., Valko M. // *Molecules.* 2019. V. 24(23). P. 4335. PMID; PMCID: PMC6930463. <https://doi.org/10.3390/molecules2423433531783535>
9. Žuvela P., David J., Yang X., Huang D., Wong M.W. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20(9). P. 2328. PMID; PMCID: PMC6539043. <https://doi.org/10.3390/ijms2009232831083440>
10. Simunkova M., Barbierikova Z., Jomova K., Hudecova L., Lauro P., Alwasel S.H., Alhazza I., Rhodes C.J., Valko M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22(4). P. 1619. PMID; PMCID: PMC7915082. <https://doi.org/10.3390/ijms2204161933562744>
11. Суворова А.А., Фенин А.А. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2010. Т. 50. № 2. С. 180.