

DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.3.015>
УДК 577.338:577.1

Вейко А.Г.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

Veiko A.

Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

Флавоноиды: молекулярные свойства и антиоксидантный потенциал

Flavonoids: Molecular Properties and Antioxidant Potential

Резюме

Введение. Флавоноиды, одна из основных групп полифенолов, являются важными природными антиоксидантами и регуляторами клеточного окислительно-восстановительного баланса и проявляют разнообразные фармакологические эффекты. Настоящее исследование посвящено оценке молекулярной геометрии и электронных свойств некоторых флавоноидов и их взаимодействия с кислородом (автоокисление) и свободными радикалами (DPPH), хлорноватистой (гипохлорной) кислотой (хлорирование).

Цель. Оценить параметры реакций взаимодействия флавоноидов с окислителями и выяснить взаимосвязь молекулярных параметров и антиоксидантной активности ряда флавоноидов.

Материалы и методы. В работе использовали флавоноиды, принадлежащие к разным классам: кверцетин (флаванолы), катехин (флаванолы) и нарингенин (флаваноны). Параметры реакций гемолиза эритроцитов, восстановления DPPH и автоокисления флавоноидов оценивали спектрофотометрически. Молекулярное моделирование флавоноидов выполнено с помощью полуэмпирических и неэмпирических молекулярно-орбитальных квантово-химических расчетов.

Результаты. Согласно квантово-химическим расчетам, высокие избыточные отрицательные заряды С-колец кверцетина, катехина и нарингенина и небольшие положительные избыточные заряды В-колец позволяют рассматривать эти группировки молекул как центры для реакций электрофильного замещения. Кажущиеся скорости реакции (с^{-1} , 20 °С) 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.

Все изученные флавоноиды предотвращали HOCl-индуцированный лизис эритроцитов, IC_{50} ингибирования гемолиза составляет $1,0 \pm 0,2$ мкмоль/л (кверцетин), $1,1 \pm 0,2$ мкмоль/л (катехин) и $1,2 \pm 0,2$ мкмоль/л (нарингенин). На основании установленной стехиометрии реакции гемолиза при малых концентрациях гемолитического агента можно предположить взаимодействие одной молекулы HOCl с центром на мембране эритроцита.

Заключение. Кольца АС и В в молекуле кверцетина, но не катехина и нарингенина, расположены в одной плоскости. Эти группы были рассмотрены нами как наиболее вероятные центры реакций электрофильного замещения. 3'-ОН-группа В-кольца кверцетина имеет самый высокий избыточный отрицательный заряд и самую низкую энергию отрыва атома водорода среди исследованных флавоноидов. Лучшим восстановителем DPPH в ряду исследуемых флавоноидов является кверцетин. Нами не обнаружено восстановления DPPH нарингенином и его автоокисления.

Ключевые слова: нарингенин, кверцетин, катехин, молекулярная структура, квантовая химия, антиоксиданты.

Abstract

Introduction. Flavonoids are one of the main groups of polyphenols and important natural antioxidants and regulators of cellular redox balance with diverse pharmacological effects.

Purpose. In this study, we evaluated the molecular geometry and electronic properties of several flavonoids that belong to different classes: quercetin (flavonols), catechin (flavanols), naringenin (flavanones), and their interactions with oxygen (autoxidation), free radicals (DPPH), hypochlorous acid (chlorination).

Materials and methods. We used the spectroscopic methods for evaluation of the inhibition of hemolysis by flavonoids and parameters of flavonoid reduction of DPPH, autoxidation and chlorination. Molecular structures and molecular properties of flavonoids were evaluated with the methods of quantum chemistry.

Results. According to quantum chemical calculations, the C-rings of quercetin, catechin, and naringenin show the high excess negative charges and the B-rings show the small positive excess charges. The apparent reaction rates (s^{-1} , 20 °C) of the reduction of the stable DPPH radical by flavonoids are 0.34 ± 0.06 in the case of quercetin, 0.093 ± 0.02 in the case of catechin, respectively. For comparison, this parameter is $0.054 \pm 0.012 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in case of the known antioxidant glutathione. The stoichiometry of the DPPH-flavonoid (and DPPH-glutathione) reaction is 1:1. All studied flavonoids effectively interacted with hypochlorous acid and prevented HOCl-induced lysis of erythrocytes; IC_{50} of hemolysis inhibition is $1.0 \pm 0.2 \text{ } \mu\text{mol/l}$ (quercetin), $1.1 \pm 0.2 \text{ } \mu\text{mol/l}$ (catechin), and $1.2 \pm 0.2 \text{ } \mu\text{mol/l}$ (naringenin). In low concentrations of the hemolytic agent, the stoichiometry of the hemolysis reaction is $n=1.02$. It can be assumed that one HOCl molecule interacts with the center on the erythrocyte membrane in high concentrations of the agent $n=2.74$.

Conclusion. The AC and B rings in the quercetin molecule, but not in the catechin and naringenin molecules, are located in the same plane. It is possible to consider these groups of flavonoid molecules as centers for electrophilic substitution reactions. The 3'-OH group of the B-ring of quercetin has the highest excess negative charge and the lowest hydrogen abstraction energy among the studied flavonoids. Quercetin is the best DPPH reductant among the studied flavonoids. We found no reduction of DPPH by naringenin and no autoxidation.

Keywords: naringenin, quercetin, catechin, molecular structure, quantum chemistry, antioxidants.

■ ВВЕДЕНИЕ

Флавоноиды, вторичные метаболиты растений, – одна из основных групп полифенолов, состоящих из двух ароматических колец (А и В), соединенных трехуглеродной цепью, образующей оксигенированный гетероцикл (С-кольцо). Флавоноиды являются важными природными антиоксидантами, характеризующимися высокой биохимической активностью и разнообразными фармакологическими эффектами [1–3]. Будучи неотъемлемой частью рациона человека, они могут регулировать клеточный окислительно-восстановительный баланс и участвовать в окислительно-восстановительной сигнализации [4]. Специфические свойства полифенолов делают эти природные диетические пигменты кандидатами для разработки средств лечения и/или профилактики многих заболеваний [3].

Дисбаланс в соотношении уровня активных форм кислорода/азота/хлора и активности клеточной системы антиоксидантной защиты, приводящий к повреждению клеточных структур, определяется как окислительный стресс [5]. Было доказано, что окислительный стресс является важным механизмом цито- и генотоксичности, отмечается особая роль свободных радикалов в деструктивных процессах, таких как мутагенез, канцерогенез и старение [6]. Растет интерес к поиску экзогенных природных и синтетических антиоксидантов в качестве терапевтических и фармакологических средств [1–7].

Кверцетин, катехин, нарингенин демонстрируют различные биологические эффекты, включая антиоксидантную, противовоспалительную, антибактериальную, иммуномодулирующую, противоопухолевую и противодиабетическую активность. Антиоксидантная активность флавоноидов в биологических системах включает ингибирование окислительных реакций, удаление свободных радикалов, хелатирование ионов металлов [8], стимуляцию ферментов клеточной системы антиоксидантной защиты (ферменты фазы 2) путем активации механизма Nrf2-Keap1 [9].

Недавно мы предположили, что биохимические эффекты флавоноидов (кверцетин, катехин, нарингенин) частично связаны с модификацией структуры мембран, со способностью флавоноидов регулировать проницаемость митохондриальной мембраны и предотвращать окислительные процессы в мембране [1, 10, 11].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить параметры реакций взаимодействия флавоноидов с окислителями и выяснить взаимосвязь молекулярных параметров и антиоксидантной активности ряда флавоноидов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали катехин, нарингенин, 1,1-дифенил-2-пикрилгидразильный радикал (DPPH), гипохлорит натрия (NaOCl) производства Sigma-Aldrich (США), кверцетин (Acros Organics, США).

Метанол, этанол и другие органические растворители и реагенты соответствовали квалификации ч.д.а. (Реахим, Россия) и были использованы без дополнительной очистки.

Флавоноиды использовали в виде свежеприготовленных исходных растворов (5 ммоль/л) в этаноле.

Молекулярное моделирование

Молекулярное моделирование флавоноидов было выполнено с помощью полуэмпирических и неэмпирических молекулярно-орбитальных квантово-химических расчетов. Полуэмпирический метод Остина (Модель 1, AM1) и метод *Ab initio* в рамках неограниченного формализма Хартри – Фока (UHF) в приближении самосогласованного поля и алгоритм Полака – Рибьера были рассмотрены для полной оптимизации геометрии молекулярных систем [12].

Все расчеты в данном исследовании проводили с использованием программного пакета HyperChem 8.0 (HyperCube, Inc.).

Энергию отрыва атома водорода гидроксильной группы рассчитывали как разность энергий связи в молекуле флавоноида и радикала, образующегося после удаления атома водорода с неспаренным электроном соответствующей гидроксильной группы.

Определение параметров взаимодействия DPPH – флавоноид

Параметры взаимодействия DPPH – флавоноид оценивали, регистрируя кинетические кривые восстановления стабильного радикала DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразила) флавоноидами. Взаимодействие DPPH с восстановителем, способным отдавать атом водорода, сопровождается уменьшением оптической плотности раствора радикала при длине волны 520 нм [13].

В нашем эксперименте 10 мкл раствора флавоноидов в различных концентрациях (в этаноле) вносили к 1990 мкл DPPH (100 мкмоль/л в этаноле) при 10–40 °С. Восстановление DPPH регистрировали спектрофотометрически по изменению оптической плотности при 520 нм (спектрофотометр UV-VIS Jasco V-650, Япония).

Автоокисление и хлорирование флавоноидов

Автоокисление флавоноидов контролировали спектрофотометрически (спектрофотометр UV-VIS Jasco V-650, Япония) в течение 3 часов, регистрируя изменения спектров поглощения флавоноидов (50 мкмоль/л) во время инкубации в открытых пробирках в темноте в этаноле / 10 ммоль/л PBS буфере, pH 7,4 смеси (30%/70%) при 10–50 °С при осторожном перемешивании. Для хлорирования флавоноиды (50 мкмоль/л) инкубировали с 25, 50, 75, 100 мкмоль/л хлорноватистой кислотой (HOCl) в 10 ммоль/л Na-фосфатном буфере, pH 7,4, в течение 5 минут при осторожном перемешивании и температуре 25 °С с последующей регистрацией спектров поглощения.

HOCl-индуцированный гемолиз. Эффекты флавоноидов

Эритроциты выделяли из гепаринизированной крови крыс центрифугированием (1500 об/мин, 5 мин.). После удаления плазмы и лейкоцитарного слоя эритроциты трижды промывали холодным (4 °С) фосфатно-солевым буферным раствором (PBC, 137 ммоль/л NaCl, 2,7 ммоль/л KCl, 1,5 ммоль/л KH_2PO_4 , 8 ммоль/л Na_2HPO_4 , pH 7,4). Эритроциты использовали непосредственно после выделения.

Все манипуляции с животными, выполняемые в эксперименте, были одобрены Этическим комитетом Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (протокол от 23.05.2016 № 29/16) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для научных целей.

Раствор гипохлорита натрия (NaOCl) при pH 7,4 представляет собой смесь HOCl и NaOCl в соотношении приблизительно 1:1 и впоследствии обозначается как HOCl [14].

Устойчивость эритроцитов к повреждению, вызванному хлорноватистой кислотой, оценивали как скорость HOCl-индуцируемого гемолиза. В суспензию эритроцитов (гематокрит 0,05%) вносили HOCl различных концентраций (5–85 мкмоль/л) в PBC, pH 7,4, при 25 °С,

после чего регистрировали кинетические кривые гемолиза спектрофотометрически (спектрофотометр UV-VIS Jasco V-650, Япония) по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов при 670 нм и 25 °С в присутствии или в отсутствие флавоноидов.

Статистический анализ

Результаты экспериментов выражали как среднее значение 4–5 измерений $\pm$ SEM. Различия между значениями параметров, измеренных в группах, анализировали с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна – Уитни. Нормальность распределения определяли тестом Шапиро – Уилка. Статистический анализ проводили с использованием программного пакета STATISTICA 6.0. Уровень значимости был установлен как $p \leq 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Взаимодействие флавоноидов с радикалами

Для оценки антиоксидантной активности полифенолов были выполнены эксперименты со стабильным свободным радикалом DPPH. Установлены параметры взаимодействия DPPH и флавоноидов (стехиометрия, кажущиеся константы скорости, энергия активации) с использованием зависимости скорости восстановления радикалов от концентрации флавоноидов при различных температурах (рис. 1, 2) и уравнения (1) и (2). Также для сравнения эффективности флавоноидов был включен в исследование один из основных внутриклеточных антиоксидантов – восстановленный глутатион (GSH) (рис. 3).

$$v = k c^n \quad (1),$$

где v – кажущаяся скорость восстановления;

n – порядок реакции;

c – концентрация антиоксиданта;

k – кажущаяся константа скорости восстановления DPPH.

Следует отметить, что регистрацию скорости реакции проводили в условиях избытка DPPH. Для расчетов стехиометрии и кажущейся константы скорости реакции уравнение (1) представляли в логарифмической форме:

$$\ln v = \ln k + n \ln C \quad (2).$$

Оцененная нами кажущаяся константа скорости восстановления DPPH при 20 °С составляла $0,34 \pm 0,06 \text{ с}^{-1}$ в случае кверцетина, $0,09 \pm 0,02 \text{ с}^{-1}$ – в случае катехина. Нарингенин не проявлял радикалсквенжерной активности в реакции с DPPH. Для сравнения также была определена кажущаяся константа скорости восстановления DPPH в случае известного антиоксиданта глутатиона – $0,054 \pm 0,012 \text{ с}^{-1}$.

Стехиометрия реакции кверцетина и катехина с DPPH 1:1, т. е. в одном акте взаимодействия одна молекула катехина или кверцетина восстанавливает одну молекулу DPPH. Такой же порядок реакции при взаимодействии DPPH с GSH.

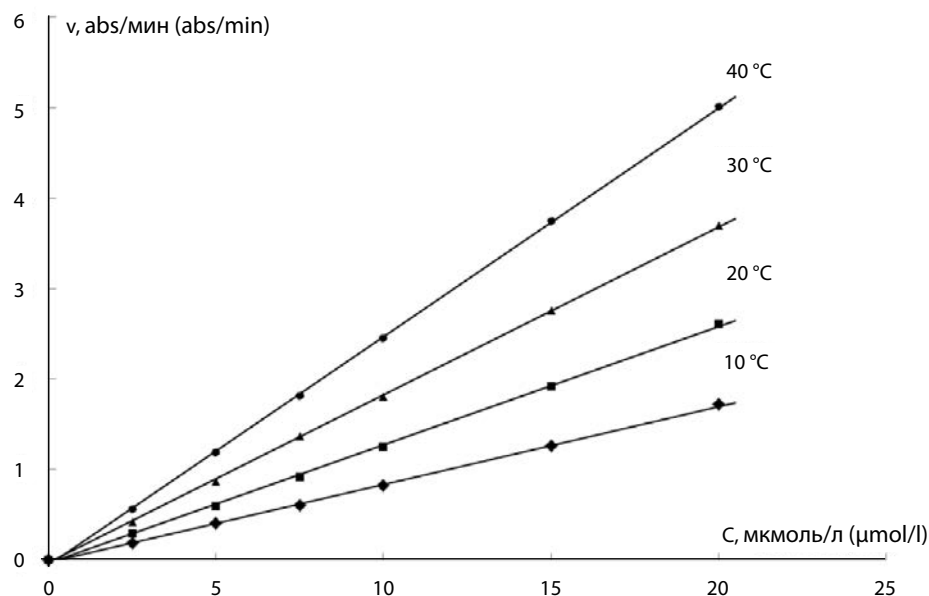


Рис. 1. Зависимость скорости восстановления DPPH от концентрации (2,5–20 мкмоль/л) кверцетина в этаноле при различных температурах

Fig. 1. Dependence of the rate of DPPH reduction on the concentration (2.5–20 μmol/l) of quercetin in ethanol in different temperatures

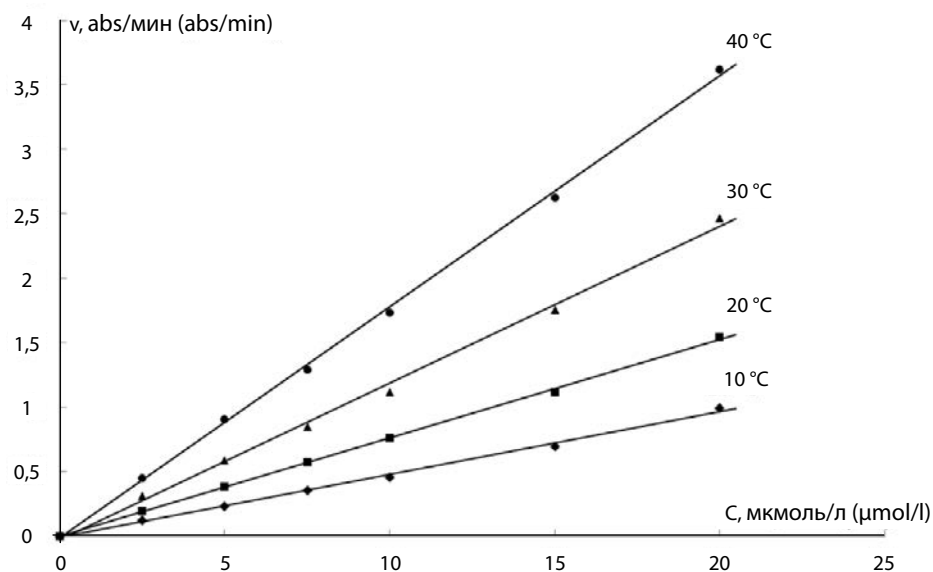


Рис. 2. Зависимость скорости восстановления DPPH от концентрации (2,5–20 мкмоль/л) катехина в этаноле при различных температурах

Fig. 2. Dependence of the rate of DPPH reduction on the concentration (2.5–20 μmol/l) of catechin in ethanol in different temperatures

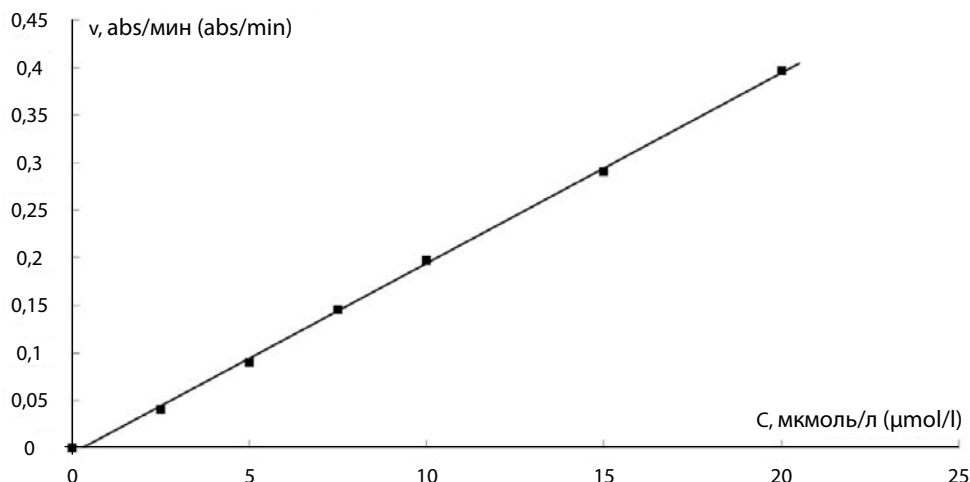


Рис. 3. Зависимость скорости восстановления DPPH от концентрации (2,5–20 мкмоль/л) глутатиона в этаноле при 20 °С

Fig. 3. Dependence of the rate of DPPH reduction on the concentration (2.5–20 μmol/l) of glutathione in ethanol in 20 °C

Для оценки зависимости скорости реакции от температуры согласно уравнению Аррениуса (3) рассчитана энергия активации переноса электрона на радикал DPPH.

$$v = Ae^{-\frac{\Delta E_a}{RT}} \quad (3),$$

где v – скорость реакции при температуре T (K);

A – предэкспоненциальный коэффициент;

R – газовая постоянная;

ΔE_a – энергия активации.

Энергия 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.

Молекулярные параметры и геометрия флавоноидов

На следующем этапе работы было выполнено моделирование молекулярной структуры и рассчитаны квантово-химические параметры нарингенина, кверцетина, катехина: избыточные заряды атомов, направления дипольных моментов, теплота образования, площадь поверхности и т. д. (табл. 1). Цель этапа – оценить биохимическую активность флавоноидов и установить функциональные группы молекул, обеспечивающие восстановление радикалов.

Оптимизация геометрии флавоноидов показала, что кольца АС и В в молекуле кверцетина (но не катехина и нарингенина) расположены в одной плоскости (рис. 4). Торсионный угол в молекуле кверцетина $C3-C2-B1'-B2' \approx 180^\circ$, это обусловлено, вероятно, наличием двойной связи $C2=C3$ в С-кольце кверцетина.

В молекуле DPPH наблюдается делокализация избыточного заряда и молекулярных орбиталей ВЗМО (высшей заполненной молекулярной орбитали) и НСМО (низшей свободной молекулярной орбитали) по структуре молекулы, что обеспечивает стабилизацию свободнорадикальной формы атома азота (рис. 4).

Дипольный момент молекул флавоноидов, согласно нашим полуэмпирическим моделям, возрастает в следующем порядке: кверцетин (0,99 D) < нарингенин (1,6 D) < катехин (2,1 D), что коррелирует с полярностью и растворимостью в воде флавоноидов, которая составляет для кверцетина 0,512 мг/л [15], для нарингенина – 4,38 мг/л [16], для катехина – 2260 мг/л [17].

Поскольку восстановительные свойства флавоноидов связаны с гидроксильными группами, а именно с подвижностью их водородов [18, 19], были рассчитаны энергии диссоциации связи (Bond dissociation energy, BDE) гидроксильных групп флавоноидов. Полученные на основе

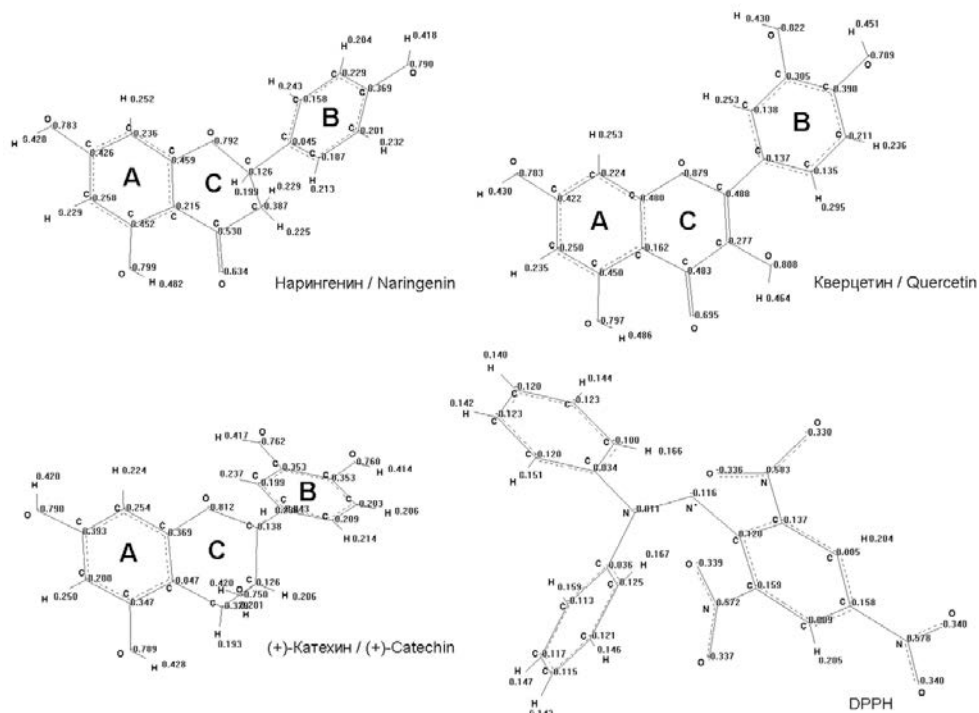


Рис. 4. Оптимизированные молекулярные структуры нарингенина, кверцетина, катехина с расчетными эффективными зарядами атомов, полученные на основе неэмпирического метода Ab initio 6-31G, а также DPPH на основе полуэмпирического метода AM1, с использованием неограниченного метода Хартри – Фока (UHF) в приближении самосогласованного поля и алгоритма Полака – Рибьера

Fig. 4. Optimized molecular structures of naringenin, quercetin, catechin, as well as DPPH, calculated using the semiempirical AM1 method and the unrestricted Hartree – Fock (UHF) method in the self-consistent field approximation and the Polak – Ribiere algorithm

Таблица 1

Квантово-химические параметры нарингенина, кверцетина, катехина, рассчитанные на основе полуэмпирического метода AM1, с использованием неограниченного метода Хартри – Фока (UHF) в приближении самосогласованного поля и алгоритма Полака – Рибьера

Параметры		Нарингенин	Кверцетин	(+)-Катехин
AM1				
Общая энергия, ккал/моль		-85033,734	-99164,773	-93070,182
Теплота образования, ккал/моль		-153,750	-216,317	-211,247
Дипольный момент, Д		1,602	0,986	2,107
QSAR свойства				
Объем, Å ³		736,63	753,52	764,33
Энергия гидратации, ккал/моль		-22,97	-32,53	-31,12
Ab initio (6-31G)				
E (ВЗМО), эВ		-8,8522	-8,2381	-8,5807
E (НСМО), эВ		2,0381	1,2298	3,4953
Общий избыточный заряд кольца	A	0,437	0,54	0,351
	B	0,069	0,128	0,018
	C	-0,26	-0,352	-0,049

Table 1

Quantum-chemical parameters of naringenin, quercetin, catechin calculated using the semiempirical AM1 method and the unrestricted Hartree – Fock (UHF) method in the self-consistent field approximation and the Polak – Ribiere algorithm

Parameters		Naringenin	Quercetin	(+)-Catechin
AM1				
Total energy, kcal/mol		-85033.734	-99164.773	-93070.182
Heat of formation, kcal/mol		-153.750	-216.317	-211.247
Dipole moment, D		1.602	0.986	2.107
QSAR properties				
Volume, Å ³		736.63	753.52	764.33
Hydration energy, kcal/mol		-22.97	-32.53	-31.12
Ab initio (6-31G)				
E (HOMO), eV		-8.8522	-8.2381	-8.5807
E (LUMO), eV		2.0381	1.2298	3.4953
The total net excess charge of the ring	A	0.437	0.54	0.351
	B	0.069	0.128	0.018
	C	-0.26	-0.352	-0.049

квантово-химических расчетов значения энергий дегидрогенизации флавоноидов (энергий гомолитического разрыва связи OH) представлены в табл. 2 и указывают на то, что наиболее низкие значения энергии отрыва атома водорода в положении 4'- в случае нарингенина, в положениях 3- и 3' - в случае кверцетина и в положениях 3'- и 4'- - в случае катехина (табл. 2).

Выполнено молекулярное моделирование распределения высшей заполненной молекулярной орбитали (ВЗМО) в молекуле флавоноидов. В случае кверцетина орбиталь делокализована по всей молекуле, этому способствует наличие двойной связи C2=C3, в молекулах катехина и нарингенина электронные орбитали локализованы преимущественно в кольце В. Лучшим восстановителем радикалов является кверцетин благодаря делокализации электронной плотности и наименьшей энергии разрыва связи в гидроксильной группе (табл. 2).

Таблица 2

Расчетные значения энергии (кДж/моль) отрыва атома водорода (энергия диссоциации связи) по радикальному механизму гидроксильных групп флавоноидов

Table 2

Calculated bond dissociation energies (kJ/mol) of the hydroxyl groups of flavonoids

	ОН-3	ОН-5	ОН-7	ОН-3'	ОН-4'
Нарингенин/Naringenin	–	–365,59	–352,19	–	–333,35
Кверцетин/Quercetin	–309,15	–367,35	–355,63	–316,69	–539,42
Катехин/Catechin	–435,34	–435,76	–334,85	–317,27	–313,93

Ингибирование флавоноидами гемолиза, индуцированного гипохлоритом

Взаимодействие HOCl, одного из наиболее сильных биологических окислителей, с эритроцитами приводит к эффективному гемолизу [20]. Нами было оценено влияние флавоноидов на устойчивость эритроцитов крыс к повреждению, вызванному хлорноватистой кислотой. На рис. 5 представлена зависимость скорости лизиса эритроцитов от концентрации HOCl (5–100 мкмоль/л).

Для оценки кооперативности взаимодействия хлорноватистой кислоты с клеточной мембраной в реакции гемолиза зависимость скорости гемолиза от концентрации агента представили в логарифмической форме в соответствии с уравнением (1) (рис. 6). Можно выделить несколько участков зависимости, различающихся кооперативностью

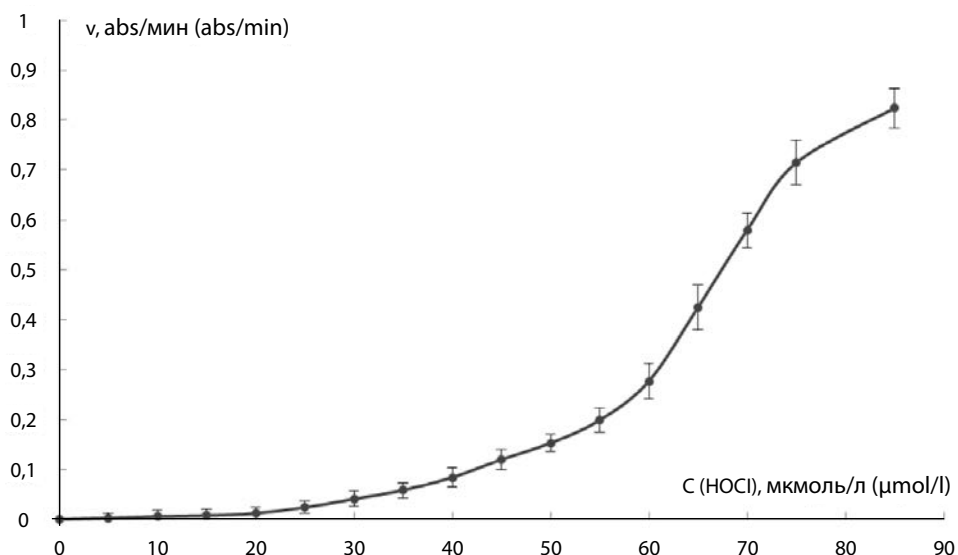


Рис. 5. Скорость гемолиза эритроцитов в присутствии различных концентраций HOCl. В суспензию эритроцитов (гематокрит 0,05% в PBS) вносили хлорноватистую кислоту

Fig. 5. The rate of hemolysis of erythrocytes in the presence of various concentrations of HOCl. Hypochlorous acid was added to the erythrocyte suspension (hematocrit 0.05% in PBS)

взаимодействия клеток с гемолитическим агентом. При малых концентрациях гемолитического агента стехиометрия реакции $n=1,02$, можно предположить взаимодействие одной молекулы HOCl с центром на мембране эритроцита, что приводит к разрушению клетки. При больших концентрациях агента $n=2,74$ можно предположить взаимодействие трех молекул HOCl с одним центром.

Флавоноиды дозозависимо предотвращали разрушение эритроцитов в присутствии гипохлорной кислоты (рис. 7). Концентрации флавоноидов, ингибирующие лизис эритроцитов, значительно ниже гемолитических концентраций HOCl; оцененные нами значения IC_{50} ингибирования гемолиза составляют для нарингенина $1,2 \pm 0,1$ мкмоль/л, для кверцетина – $1 \pm 0,1$ мкмоль/л, для катехина – $1,1 \pm 0,1$ мкмоль/л.

Исходя из изменений спектров поглощения флавоноидов в присутствии гипохлорной кислоты, можно предположить, что цитопротекторный эффект флавоноидов в значительной степени обусловлен непосредственным взаимодействием с HOCl (хлорированием флавоноидов, рис. 8) и снижением ее эффективной концентрации в суспензии эритроцитов.

Известно, что гидроксильные группы оказывают положительный мезомерный эффект, выступая электрон-донорами по отношению к бензольному кольцу и облегчая электрофильное замещение. Согласно

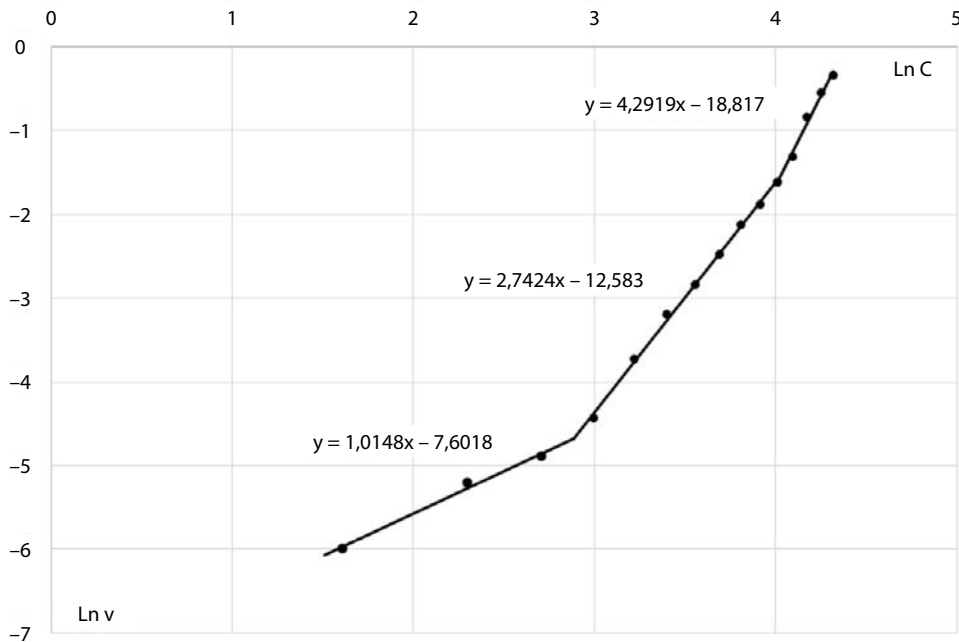


Рис. 6. Зависимость скорости HOCl-индуцируемого гемолиза эритроцитов от концентрации хлорноватистой кислоты, представленная в логарифмической форме

Fig. 6. Dependence of the rate of HOCl-induced hemolysis of erythrocytes on concentration of hypochlorous acid, presented in logarithmic form

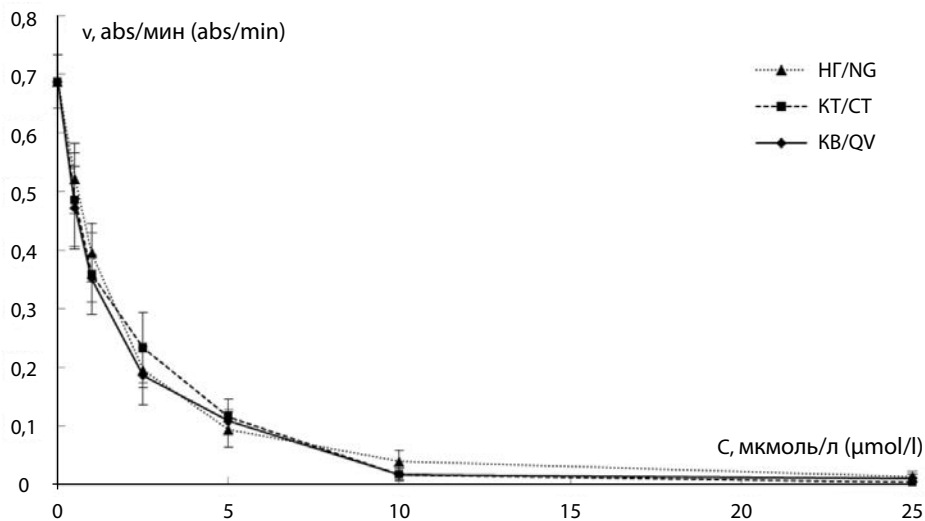


Рис. 7. Ингибирование HOCl-индуцированного гемолиза эритроцитов флавоноидами (кверцетин, катехин, нарингенин). HOCl (75 мкмоль/л) вносили в суспензию эритроцитов (гематокрит 0,05%) в отсутствие или в присутствии различных концентраций флавоноидов в PBS, pH 7,4, при 25 °C

Fig. 7. Inhibition of HOCl-induced hemolysis of erythrocytes by flavonoids (quercetin, catechin, narungenin). HOCl (75 $\mu\text{mol/l}$) was added to suspension of erythrocytes (hematocrit 0.05%) in the absence or in the presence of various concentrations of flavonoids in PBS, pH 7.4, in 25 °C

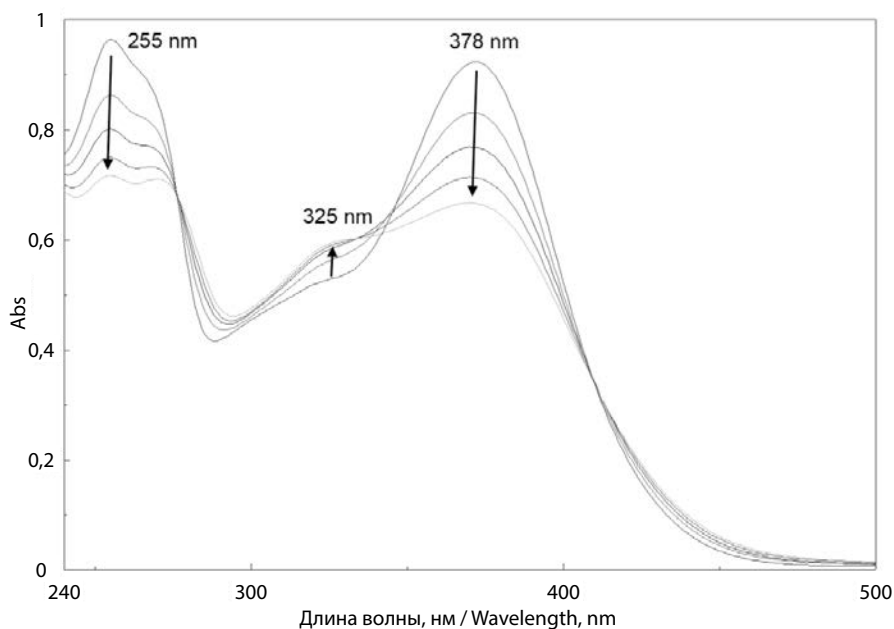


Рис. 8. Изменения спектра поглощения 25 мкмоль/л кверцетина в присутствии 25 мкмоль/л, 50 мкмоль/л, 75 мкмоль/л, 100 мкмоль/л гипохлорной кислоты

Fig. 8. Changes in the absorption spectrum of 25 $\mu\text{mol/l}$ quercetin in the presence of 25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 75 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ hypochloric acid

нашим расчетам *Ab initio*, избыточные отрицательные заряды атомов углерода в кольцах молекул флавоноидов в положениях C6-, C8-, C1'-, C2'-, C5'-, C6'- катехина и кверцетина и C3-, C6-, C8-, C3'- и C5'- в случае нарингенина позволяют рассматривать эти группировки как центры для реакций электрофильного замещения – возможного присоединения атомов хлора в молекулах флавоноидов.

Автоокисление флавоноидов: эффект антиоксидантов

Еще одним примером редокс-реакций флавоноидов является реакция их автоокисления. Окисление флавоноидов атмосферным кислородом (автоокисление) приводит к характерному изменению их спектров поглощения во времени. При автоокислении кверцетина наблюдалось уменьшение максимумов поглощения при 255 нм и 378 нм и появление нового пика при 329 нм (в смеси этанол/фосфатный буфер, 30%/70%, pH 7,4, рис. 9). Автоокисление катехина приводило к появлению нового максимума при 435 нм, и мы не наблюдали спектральных изменений нарингенина во время инкубации на воздухе.

На рис. 10 представлены кинетические кривые автоокисления кверцетина, регистрируемые по изменению оптической плотности при

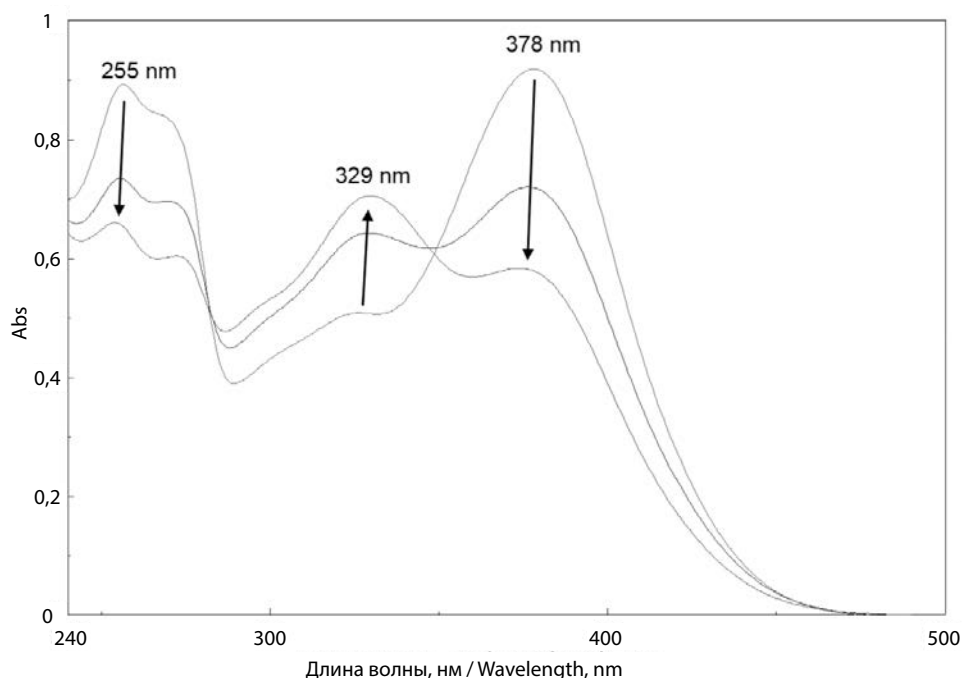


Рис. 9. Спектры поглощения кверцетина при автоокислении в смеси этанол/PBS (30%/70%), pH 7,4, концентрация флавоноидов – 50 мкмоль/л, температура автоокисления – 50 °С, интервал регистрации – 1 час

Fig. 9. Absorption spectra of quercetin during autooxidation in ethanol/PBS (30%/70%), pH 7.4, flavonoid concentration – 50 $\mu\text{mol/l}$, autooxidation temperature – 50 °C, recording interval – 1 hour

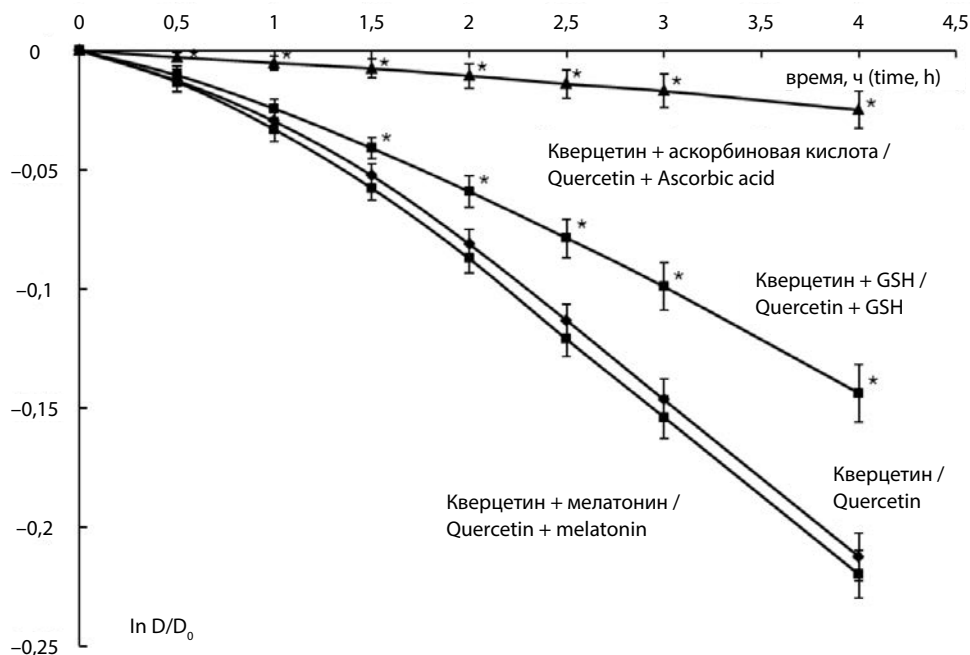


Рис. 10. Зависимость от времени оптической плотности кверцетина (D_{379}) в отсутствие антиоксидантов и в присутствии мелатонина, восстановленного глутатиона, аскорбиновой кислоты в смеси этанол/PBS (30%/70%), pH 7,4, при 25 °C, концентрация флавоноида – 50 мкмоль/л

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с самим кверцетином.

Fig. 10. Time dependence of the change in the optical density of quercetin (D_{379}) in the absence of antioxidants and in the presence of melatonin, reduced glutathione, ascorbic acid in ethanol/PBS mixture (30%/70%), pH 7.4, in 25 °C, flavonoid concentrations – 50 $\mu\text{mol/l}$

Note: * $p < 0.05$ if compared with quercetin.

279 нм в отсутствие и в присутствии антиоксидантов: восстановленного глутатиона, аскорбиновой кислоты и мелатонина. С использованием зависимости изменения поглощения флавоноидов от времени (уменьшение D_{378} в случае кверцетина и увеличение D_{435} – в случае катехина) были определены кажущиеся начальные скорости реакций автоокисления при различных температурах (10–50 °C) и рассчитаны энергии активации реакций согласно уравнению Аррениуса (2). Энергия активации процесса автоокисления кверцетина равна $50,78 \pm 6,28$ кДж/моль, катехина – $58,07 \pm 8,8$ кДж/моль.

Антиоксиданты (100 мкмоль/л), такие как аскорбиновая кислота (полностью), восстановленный глутатион (частично), но не мелатонин, предотвращали автоокисление флавоноидов (рис. 10).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Окислительно-восстановительные реакции кверцетина, катехина, нарингенина, их промежуточных и стабильных продуктов окисления,

взаимосвязь между антиоксидантной активностью флавоноидов и их электронной структурой широко изучаются в течение нескольких десятилетий. Способность негликозилированных флавоноидов функционировать как сквенжеры АФК связана с количеством гидроксильных групп, а также со способностью отдавать атом водорода и образовывать стабильные феноксильные радикалы [21].

В данном исследовании флавонол (кверцетин) показал себя более эффективным антиоксидантом по сравнению с флаван-3-олом (катехином) и флаванолом (нарингенином) и имеет значительно меньшую энергию активации. Кверцетин и катехин демонстрируют гораздо более высокую скорость реакции с радикалами в сравнении с GSH. Одна молекула флавоноида расходуется на восстановление одного радикала DPPH. Такое же стехиометрическое соотношение сохраняется и для глутатиона. В случае высокого избытка концентраций флавоноидов при восстановлении DPPH ранее была оценена стехиометрия 1:1 для флавоноидов с одной гидроксильной группой, стехиометрия 1:2 – для флавоноидов с двумя гидроксильными группами в В-кольце [22]. Ранее были определены значения IC_{50} для взаимодействия флавоноидов с DPPH, для катехина – $5,06 \pm 0,08$ мкмоль/л, для кверцетина – $4,36 \pm 0,10$ мкмоль/л [23].

Энергия активации реакции восстановления DPPH оказалась выше по сравнению с энергией активации процесса диффузии – не каждое столкновение между молекулами реагентов приводит к восстановлению DPPH.

Отрицательный избыточный заряд на группах OH флавоноидов может играть доминирующую роль в реакциях с радикалами и обеспечивает их биологическую активность. Рассчитанные в наших экспериментах значения избыточных отрицательных зарядов позволили предположить о группах OH в положениях 3'- и 7- в кверцетине, 4'- в нарингенине и 5- и 7- в катехине как о наиболее вероятных местах отрыва атома водорода при радикальном восстановлении. Zhu и соавторы предположили, что в случае кверцетина группы 3'-OH и 4'-OH обладают наименьшими значениями BDE [23].

Самые низкие энергии диссоциации у 3'-OH-группы кверцетина и 4'-OH-группы нарингенина и катехина позволяют предположить, что данные группы являются наиболее активными центрами этих молекул флавоноидов.

Квантово-химические расчеты показывают, что абсолютные значения теплоты образования флавоноидов уменьшаются в порядке нарингенин > катехин > кверцетин в соответствии со стабильностью молекул. Ранее было установлено, что величина теплоты образования отрицательно коррелирует с антиоксидантной активностью полифенолов [24].

Энергия нижней свободной молекулярной орбитали (НСМО) флавоноидов увеличивается в порядке кверцетин < нарингенин < катехин, а энергия высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) увеличивается в порядке нарингенин < катехин < кверцетин. Кверцетин имеет наибольшее значение энергии ВЗМО.

Таким образом, кверцетин является лучшим донором электронов среди исследованных флавоноидов (обладает самым высоким восстановительным потенциалом). Флавоноиды имеют низкое значение энергии НСМО и являются слабыми акцепторами электронов. Визуализация

молекулярных орбиталей флавоноидов указывает на преимущественную локализацию ВЗМО и НСМО в бензольном кольце В, данная область с наибольшей плотностью ВЗМО является самой предпочтительной при взаимодействии с окислителями в окислительно-восстановительных реакциях.

Автоокисление флавоноидов может участвовать в образовании активных форм кислорода. Ранее была предложена моноэкспоненциальная кинетика ($k=6,45 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) автоокисления кверцетина, указывающая на одноэлектронное окисление аниона кверцетина с последующими двумя быстрыми стадиями радикального диспропорционирования и сольватации растворителя с полученным хиноном. Основными продуктами автоокисления кверцетина (а также ферментативного, химического и электрохимического окисления) являются депсид, фенольные кислоты и аддукты кверцетина и растворителя [25, 26]. Энергии активации автоокисления кверцетина и катехина выше, чем при взаимодействии флавоноидов с DPPH. В выполненных нами экспериментах нарингенин не восстанавливал DPPH и не самоокислялся, но эффективно взаимодействовал с хлорноватистой кислотой.

Хлорноватистая кислота (HOCl), вырабатываемая активированными нейтрофилами, связана со многими патологическими процессами [27].

Ранее была определена последовательность клеточных событий после воздействия HOCl на эритроциты: быстрые морфологические трансформации клеток, структурные переходы мембран, окисление клеточных компонентов, модификации ферментов и коллоидно-осмотический гемолиз [20]. Флавоноиды дозозависимо предотвращали HOCl-индуцированный гемолиз; несмотря на различия в структуре исследуемых флавоноидов, выявить статистически достоверные различия в эффективности предотвращения лизиса эритроцитов не удалось. Мы предположили прямое взаимодействие флавоноидов с хлорноватистой кислотой и снижение эффективной концентрации HOCl в суспензиях эритроцитов.

Таким образом, кверцетин и катехин (но не нарингенин) эффективно окисляются радикалом DPPH и кислородом воздуха, при этом исследованные флавоноиды эффективно предотвращают HOCl-индуцированный гемолиз. Лучший антиоксидант кверцетин имеет наивысшее значение энергии ВЗМО и планарную структуру, а также оптимальную делокализацию ВЗМО из-за двойной связи $C2=C3$ в С-кольце. 3'-гидроксильная группа кверцетина имеет самый низкий уровень энергии диссоциации связи и самый высокий избыточный отрицательный заряд, и ее следует рассматривать как наиболее активный восстановительный центр.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассчитанная планарная конформация кверцетина оптимальна для делокализации электронов AC- и В-колец в молекуле. Молекулы катехина и нарингенина без двойной связи $C2=C3$ в С-кольце не имели плоской структуры и подобного распределения электронных орбиталей. Моделирование карт ВЗМО показывает, что электронные орбитали в кверцетине делокализованы на кольце В, на двойной связи $C2=C3$ и частично – на кольцах А и С, в то время как в катехине и нарингенине –

преимущественно на кольцах В. Рассчитанные энергии диссоциации гидроксильных групп в 4'-положении в случае нарингенина, в 3- и 3'-положениях в случае кверцетина и в 3'- и 4'-положениях в случае катехина позволили предположить эти группы как наиболее вероятные центры отрыва атома водорода в реакциях радикального восстановления.

Энергии активации восстановления стабильного радикала DPPH флавоноидами составляют $23,0 \pm 2,5$ кДж/моль (кверцетин) и $32,5 \pm 2,5$ кДж/моль (катехин) соответственно. Для глутатиона значение энергии активации равно $25,7 \pm 3$ кДж/моль. Стехиометрия восстановления DPPH кверцетином и катехином составляет 1:1. Стехиометрическое соотношение 1:1 сохраняется и для глутатиона. Энергии активации автоокисления флавоноидов составляют $50,8 \pm 6,1$ кДж/моль (кверцетин), $58,1 \pm 7,2$ кДж/моль (катехин) соответственно, а нарингенин не проявлял радикалсквенжерной активности с DPPH и слабо самоокисляется. Все изученные флавоноиды эффективно предотвращали индуцированный НОС1 лизис эритроцитов за счет прямого поглощения хлорноватистой кислоты (хлорирование флавоноидов), IC_{50} (мкмоль/л) ингибирования гемолиза составляет для нарингенина $1,2 \pm 0,1$ мкмоль/л, для кверцетина – $1 \pm 0,1$ мкмоль/л, для катехина – $1,1 \pm 0,1$ мкмоль/л.

Работа выполнена в рамках финансируемого проекта НИР «Коррекция биоэнергетической функции митохондрий сердца крыс: механизм кардиопротекторного действия природных полифенолов и хинонов», ГПНИ Конвергенция 2021–2025.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Veiko A.G., Sekowski S., Lapshina E.A., Wilczewska A.Z., Markiewicz K.H., Zamaraeva M., Zhao H-C., Zavodnik I.B. (2020) Flavonoids modulate liposomal membrane structure, regulate mitochondrial membrane permeability and prevent erythrocyte oxidative damage. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, vol. 1862, no 11, p. 183442. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2020.183442>.
2. Tarachovsky Y.S., Kim Y.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. (2013) *Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine*, Pushchino: Sunchrobook, 2013, 310 p. (in Russian)
3. Shahidi F., Ambigaipalan P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, vol. 18, pp. 820–897. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
4. Dorta D.J., Pigoso A.A., Mingatto F.E., Rodrigues T., Pestana C.R., Uyemura S.A., Santos A.C., Curti C. (2008) Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytotherapy Research*, vol. 22, no 9, pp. 1213–1218. Available at: <https://doi.org/10.1002/ptr.2441>.
5. Sies H. (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, vol. 82, no 2, pp. 291–295. Available at: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.
6. Brieger K., Schiavone S., Miller Jr., Krause K-H. (2012) Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, vol. 142, no 3334, p. 13659. Available at: <https://doi.org/10.4414/smww.2012.13659>.
7. Veiko A.G. (2019) Computer modeling of the structure and properties of biologically active compounds and drugs. *Pharmacology in silico. News of Biomedical Sciences*, vol. 19, no 3, pp. 117–132.
8. Caro A.A., Davis A., Fobare S., Horan N., Ryan C., Schwab C. (2019) Antioxidant and pro-oxidant mechanisms of (+)-catechin in microsomal CYP2E1-dependent oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, vol. 54, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.09.001>.
9. Kapoor R., Sirohi V.K., Gupta K., Dwivedi A. (2019) Naringenin ameliorates progression of endometriosis by modulating Nrf2/Keap1/HO1 axis and inducing apoptosis in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 70, pp. 215–226. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.003>.
10. Veiko A.G., Ilyich T.V., Lapshina E.A., Buko V.U., Zavodnik I.B. (2018) Quantum-chemical modeling of the electronic structure of quercetin and inhibition by quercetin and quercetin-hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex of lipid peroxidation in mitochondria and erythrocytes of rats. *Bulletin of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Science Series*, vol. 63, no 4, pp. 500–512. Available at: <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-500-512>.

11. Ilyich T.V., Veiko A.G., Lapshina E.A., Zavodnik I.B. (2018) Quercetin and its cyclodextrin complex inhibit oxidative damage to mitochondria and erythrocytes: in vitro experiments and quantum chemical calculations. *Biophysics*, vol. 63, no 4, pp. 690–702. Available at: <https://doi.org/10.1134/S0006302918040075>.
12. Onishi T. (2018) *Quantum Computational Chemistry: Modelling and Calculation for Functional Materials*. Singapore: Springer. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5933-9>.
13. Kedare S.B., Singh R.P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, vol. 48, no 4, pp. 412–422. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
14. Visser M.C., Carr A.C., Chapman A.L. (1998) Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: Insights into the mechanism of lysis. *Biochemical Journal*, vol. 330, no 1, pp. 131–138.
15. Strugała P., Tronina T., Huszcza E., Gabrielska J. (2017) Bioactivity in vitro of quercetin glycoside obtained in *Beauveria bassiana* Culture and its interaction with liposome membranes. *Molecules*, vol. 22, no 9, p. 1520. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules22091520>.
16. Wen J., Liu B., Yuan E., Ma Y., Zhu Y. (2010) Preparation and Physicochemical Properties of the Complex of Naringenin with Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin. *Molecules*, vol. 15, no 6, pp. 4401–4407. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules15064401>.
17. Srinivas K., King J.W., Howard L.R., Monrad J.K. (2010) Solubility of gallic acid, catechin, and protocatechuic acid in subcritical water from (298.75 to 415.85) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 55, no 9, pp. 3101–3108. Available at: <https://doi.org/10.1021/jc901097n>.
18. Veiko A.G. (2020) Molecular structure, quantum-chemical parameters, mechanism of cytoprotective effect and the contribution of functional groups to antioxidant potential of flavonoids. *Vestnik of Vitebsk State Medical University*, vol. 19, no 5, pp. 27–39. Available at: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2020.5.27>.
19. Parcheta M., Świsłocka R., Orzechowska S., Akimowicz M., Choińska R., Lewandowski W. (2021) Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials*, vol. 14, no 8, pp. 1984. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma14081984>.
20. Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Zavodnik L.B., Soszyński M., Bartosz G., Bryszewska M. (2002) Hypochlorous acid-induced oxidative damage of human red blood cells: Effects of tert-butyl hydroperoxide and nitrite on the HOCl reaction with erythrocytes. *Bioelectrochemistry*, vol. 58, no 2, pp. 127–135. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00126-8](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00126-8).
21. Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A. (2001) Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 74, no 4, pp. 418–425. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>.
22. Butković V., Klasinc L., Bors W. (2004) Kinetic Study of Flavonoid Reactions with Stable Radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no 10, pp. 2816–2820. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf049880h>.
23. Zhu L., Chen J., Tan J., Liu X., Wang B. (2017) Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures. *Molecules*, vol. 22, no 3, pp. 195. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules22030195>.
24. Meng Q., Yang Z., Jie G., Gao Y., Zhang X., Li W., Li B., Tu Y. (2014) Evaluation of Antioxidant Activity of Tea Polyphenols by a Quantum Chemistry Calculation Method – PM6. *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 2, no 12, pp. 965–972. Available at: <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-12-17>.
25. Zhou A., Sadik O.A. (2008) Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: A mechanistic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no 24, pp. 12081–12091. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf802413v>.
26. Gushchina S.V., Kosman V.M., Zenkevich I.G. (2009) Some regularities of quercetin oxidation by air oxygen in water solutions. *Vestnik of Saint-Petersburg University. Physics and chemistry*, no 1, pp. 94–101.
27. Zavodnik L.B., Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Boko V.U., Bryszewska M.J. (2002) Hypochlorous acid-induced membrane pore formation in red blood cells. *Bioelectrochemistry*, vol. 58, no 2, pp. 157–161. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(02\)00151-2](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(02)00151-2).

Подана/Submitted: 15.05.2021

Принята/Accepted: 06.09.2021

Контакты/Contacts: Wei93@yandex.ru