

В.П. Курченко, вед. науч. сотрудник БГУ; Н.В. Гавриленко, науч. сотрудник БГУ;  
М.В. Матюнина, науч. сотрудник БГУ;  
Е.Г. Червяковский, мл. науч. сотрудник ИБОХ НАНБ; В.Н. Леонтьев, доцент

## ФЛАВОЛИГНАНЫ – ЭФФЕКТИВНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ И ГЕНОПРОТЕКТОРЫ

Benzidine is an indirect cancerogene. Its metabolic activation results in formation of active metabolites capable to damage DNA. Flavonoids from *Silybum marianum* inhibit efficiently the radical process of benzidine peroxidations. Such an antioxidant effect prevents from the formation of cross-links DNA by benzidine oxidants. Thus, flavonoids show antioxidant activity and are capable to provide geneprotector activity.

Загрязнение окружающей среды мутагенными и канцерогенными ксенобиотиками является наиболее серьезной антропогенной проблемой. Одним из возможных путей ее решения является поиск соединений, обладающих генопротекторными свойствами [1]. В этой связи большое внимание уделяется природным антиоксидантам, так как многие мутации, возникающие при действии химических веществ, являются результатом повреждения ДНК свободными радикалами. Для лечения заболеваний печени широко используется препарат из плодов расторопши пятнистой – силимарин, который оказывает антиоксидантное действие, ингибируя процессы перекисного окисления липидов, стимулирует биосинтез белка и ускоряет регенерацию поврежденных гепатоцитов [2]. Терапевтический эффект препаратов из семян расторопши связывают с наличием в них флаволигнанов, соединений, имеющих фенилхроманозую структуру, в которой находится один остаток кониферилового спирта. Основными флаволигнанами, входящими в состав силимарина, являются: силибинин, силидианин и силикристин. Уместно предположить, что, обладая антиоксидантными свойствами, данные флавоноиды будут препятствовать модификации молекул ДНК радикальными продуктами окисления ксенобиотиков. С целью проверки этого предположения нами исследовались антиоксидантные свойства флаволигнанов в радикальном процессе пероксидазного окисления бензидина, который является известным генотоксичным соединением, вызывающим перекрестные сшивки ДНК [8].

### Методы исследования

Выделение силимарина из плодов расторопши пятнистой вели методом спиртовой экстракции согласно [3].

Выделение и очистку индивидуальных флаволигнанов проводили методом препаративной колоночной хроматографии. В качестве сорбента использовали Тоуоперл HW-40 (20x2,8 см, элюент – 50%-ный изопропанол). Способность флаволигнанов предотвращать повреждение ДНК фага  $\lambda$  продуктами окисления бензидина определяли по изменению электрофоретической подвижности модифицированных молекул ДНК. Реакцию повреждения молекул ДНК проводили в 0,015 М трис-HCl буфере pH 7,4 с добавлением 0,05% Tween-20. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала фаговую ДНК (0,14 мкг), бензидин ( $5 \cdot 10^{-6}$  М), пероксидазу из хрена (ПХ) ( $10^{-7}$  М) и различные концентрации флаволигнанов ( $1,03 \cdot 10^{-6}$  –  $1,5 \cdot 10^{-5}$  М). Определение концентраций флаволигнанов проводили спектрофотометрически с использованием коэффициента молярной экстинкции для силибинина  $\epsilon = 2,15 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . Реакцию запускали добавлением перекиси водорода ( $10^{-3}$  М), после чего смесь инкубировали в течение 45 мин при 30°C. Для разделения и идентификации ДНК проводили горизонтальный электрофорез в 0,9%-ном агарозном геле в 0,1 М трис-фосфатном буфере pH 3,0 с 0,001 М ЭДТА [4]. Окисление силибинина проводили в 0,015 М трис-HCl буфере pH 7,4. Реакционная смесь содержала  $10^{-3}$  М силибинина,  $10^{-3}$  М перекиси

водорода и пероксидазу из хрена в различных концентрациях ( $10^{-7}$  –  $10^{-9}$  М). Реакцию проводили в течение 1 ч при температуре 30°C, после чего в реакционную смесь добавляли 96%-ный этанол в соотношении 1:1. Анализ продуктов окисления проводили методами ТСХ [5] и ВЭЖХ (колонка 4,6×250 стационарная фаза TSK-gel C-18, 5 мкм) [6].

### Результаты и их обсуждение

В настоящее время в лабораторной практике используются самые разнообразные подходы для оценки генотоксичности различных химических соединений [7]. Суть самых простых из них состоит в использовании модельных систем повреждения молекул ДНК продуктами окисления мутагенных ксенобиотиков. Необходимо отметить, что эти тест-системы не описывают изменения функционирования генов, а свидетельствуют о разнообразных повреждениях ДНК. К основным типам таких повреждений ДНК относятся: одно- и двунитевые разрывы, межнитевые сшивки, сшивки ДНК-белок и щелочелюбильные повреждения. Эти повреждения, независимо от механизма их возникновения, являются мерой генетической активности химических соединений. Наши исследования антиоксидантной и генопротекторной активностей флаволигнанов проводились в системе повреждения ДНК фага  $\lambda$  свободнорадикальными продуктами пероксидазного окисления бензидина (БД). Для проявления своего мутагенного действия БД должен подвергнуться метаболической активации. Важное место в биотрансформации таких ксенобиотиков, как ароматические амины, принадлежит пероксидазам [8]. Под действием пероксидаз БД превращается в свободнорадикальный интермедиант, способный ковалентно связываться с молекулами ДНК, образуя между ними многочисленные поперечные сшивки.

Появление таких сшивок можно легко обнаружить по изменению электрофоретической подвижности агрегированных молекул ДНК, накапливающихся на старте. Внесение в реакционную смесь фенольных антиоксидантов – флаволигнанов предотвращает образование радикальных продуктов окисления бензидина и ингибирует процесс повреждения ДНК, что приводит к восстановлению ее электрофоретической подвижности (рис. 1).

На каждой из приведенных электрофореграмм имеются полосы, характеризующие электрофоретическую подвижность нативной фаговой ДНК (рис. 1, дорожки 1, 2), и полоса ДНК, агрегированной свободнорадикальными продуктами окисления бензидина (рис. 1, дорожка 3), остающейся на старте. При внесении в реакционную смесь различных концентраций флаволигнанов наблюдается постепенное восстановление электрофоретической подвижности ДНК, характерной для ее нативной структуры (рис. 1, дорожки 4–16). Все индивидуальные флаволигнаны (силибинин, силикрестин и силидианин), так же как и силимарин, предотвращали процесс образования сшивок между молекулами ДНК, что свидетельствует о их способности эффективно взаимодействовать с продуктами пероксидазного окисления БД. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что различные флаволигнаны препятствуют образованию сшивок ДНК, находясь в реакционной смеси в эквимоллярных концентрациях по отношению к концентрации БД. Это говорит о том, что на молекуле флаволигнана гибнет один радикальный продукт пероксидазного окисления бензидина.

Необходимо отметить, что силибинин (СБ), как и другие фенольные соединения, может служить в качестве субстрата для окисления в данной реакции (рис. 2). На хроматограмме четко прослеживается тенденция к исчезновению пятна, характерного для нативного силибинина (рис. 2, дорожки 1, 2), по мере увеличения концентрации ПХ появляется несколько новых пятен, характерных для продуктов окисления флаволигнана (рис. 2, дорожки 3–5), обладающих меньшей хроматографической подвижностью. Дальнейшее увеличение концентрации ПХ приводит к накоплению продуктов окисления силибинина в области старта (рис. 2, дорожка 6).

Особенности хроматографического разделения продуктов пероксидазного окисления флаволигнанов в стандартной системе разделения позволяет предположить, что происхо-



дит возникновение реакционноспособных метаболитов, способных к образованию конденсированных продуктов. Данные положения подтверждаются и методом ВЭЖХ (рис. 3).

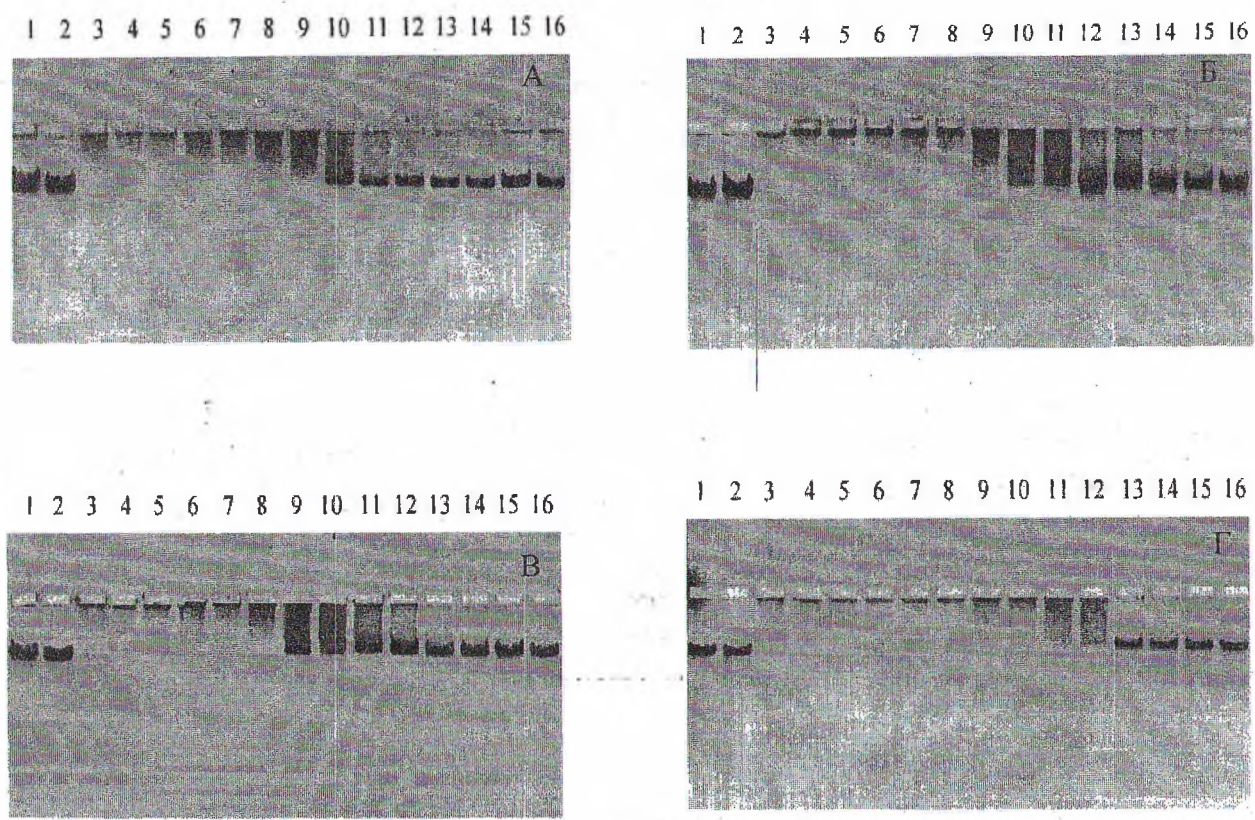


Рис. 1. Ингибирование процесса образования шивок ДНК фага λ в зависимости от концентрации флаволигнанов: А – силикрестина; Б – силибинина; В – силидианина; Г – силимарина. Дорожка 1 – ДНК фага λ; 2 – ДНК фага λ+пероксидаза+бензидин; 3 – ДНК фага λ+пероксидаза+бензидин+Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>; 4–16 – ДНК фага λ + пероксидаза + бензидин + Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> + флаволигнан (концентрация возрастает слева направо)

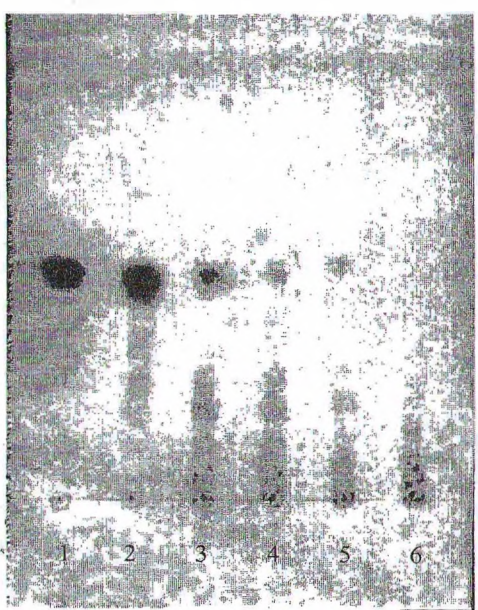


Рис. 2. Хроматограмма продуктов пероксидазного окисления силибинина в зависимости от концентрации пероксидазы. Дорожка 1 – СБ; 2 – СБ+ПХ (10<sup>-6</sup> М); 3 – СБ+ПХ (10<sup>-9</sup> М)+Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>; 4 – СБ+ПХ (10<sup>-8</sup> М)+Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>; 5 – СБ+ПХ (10<sup>-7</sup> М)+Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>; 6 – СБ+ПХ (10<sup>-6</sup> М)+Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>



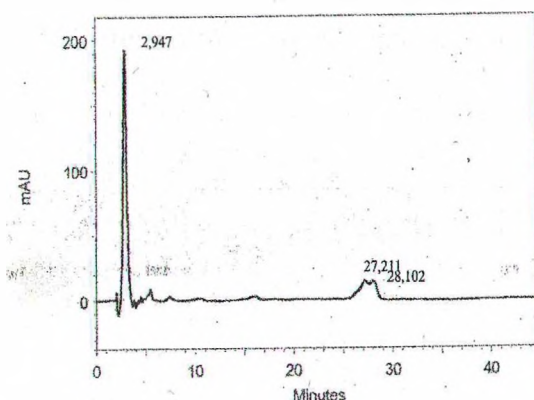
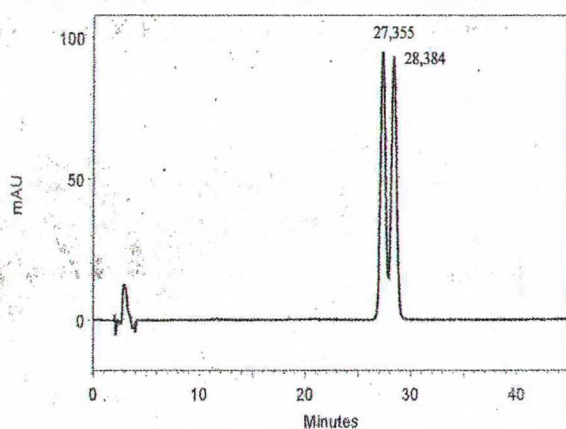


Рис. 3. Профили элюции силибинина («Sigma») и продуктов его окисления пероксидазой из хрена. А – силибинин; Б – продукты окисления силибинина пероксидазой ( $10^{-7}$  М) в присутствии перекиси водорода

Уместно предположить, что продукты пероксидазного окисления силибинина и других флаволигнанов могут сохранить свои антиоксидантные свойства и вступать в реакции взаимодействия с продуктами окисления БД, предотвращая повреждение ДНК. Полученные результаты (рис. 4) подтвердили это.

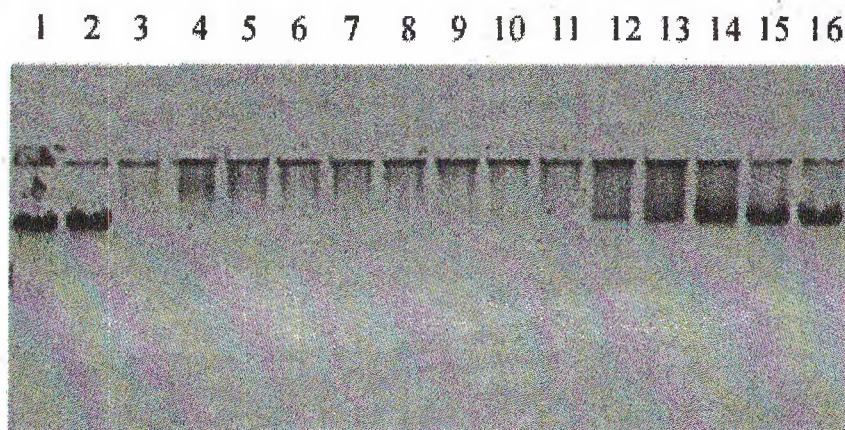


Рис. 4. Ингибирование процесса образования сшивок ДНК фага  $\lambda$  в зависимости от количества продуктов окисления СБ. Дорожка 1 – ДНК фага  $\lambda$ ; 2 – ДНК фага  $\lambda$  + ПХ + БД; 3 – ДНК фага  $\lambda$  + ПХ + БД +  $H_2O_2$ ; 4 – 16 – ДНК фага  $\lambda$  + ПХ + БД +  $H_2O_2$  + окисленный СБ (концентрация возрастает слева направо)

Продукты пероксидазного окисления силибинина проявляют антиоксидантные и генопротекторные свойства, но в концентрациях, существенно меньших, чем силибинин. В ходе пероксидазного окисления бензидина (рис. 5) образуются радикальные электрондефицитные продукты. Флаволигнаны, представляющие собой полифенольные соединения, способны донировать электрон от  $-OH$  группы. Этот электрон инактивирует радикальные продукты окисления бензидина.

В результате этого процесса силибинин превращается в фенокислительный радикал (рис. 6), который значительно более стабилен, чем восстановленный им один из радикальных промежуточных продуктов пероксидазного окисления бензидина.

Результатом такого взаимодействия является снижение стационарной концентрации радикальных продуктов, вызывающих повреждение ДНК. В условиях *in vivo* происходит довольно

быстрая реакция восстановления феноксильного радикала силибинина восстановленным глутатионом или НАДФН<sub>2</sub>. В условиях *in vitro* возможно дальнейшее окисление силибинина.

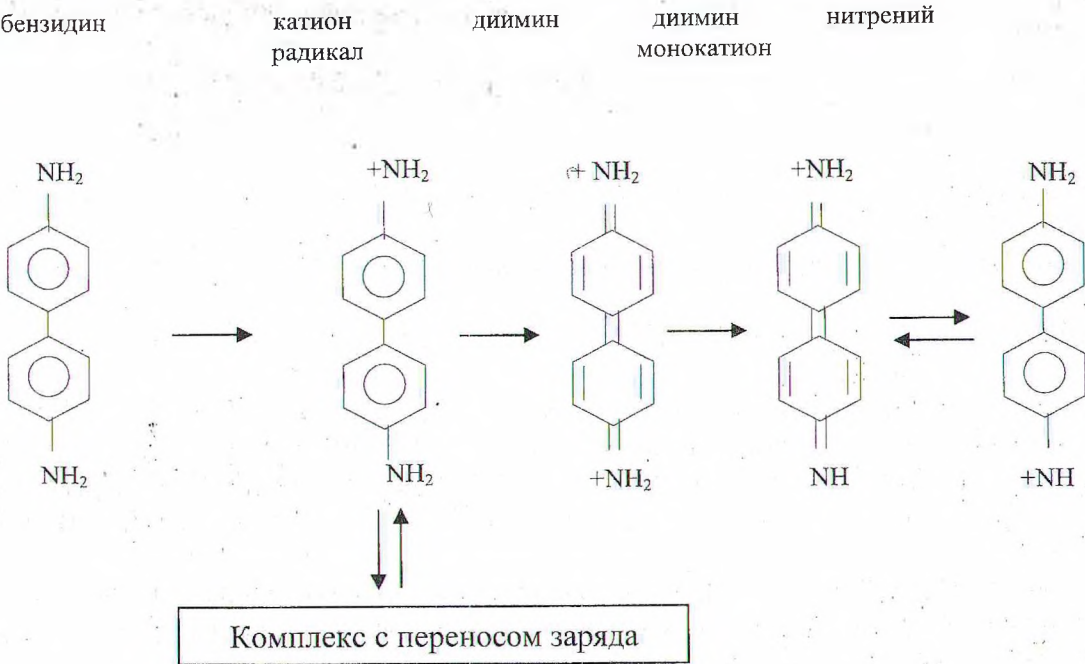


Рис. 5. Продукты, образующиеся в ходе пероксидазного окисления бензидина

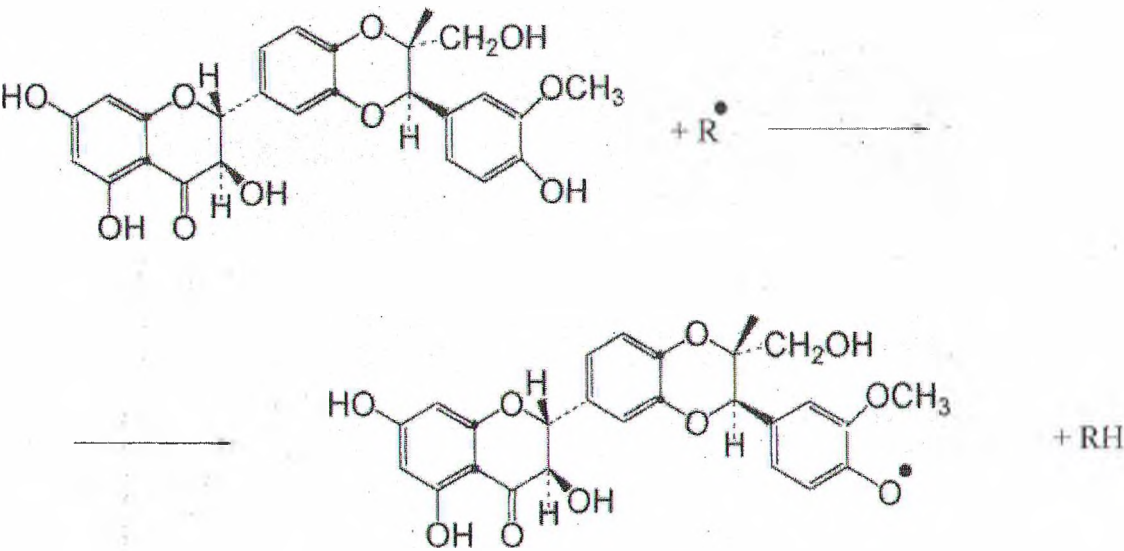


Рис. 6. Схема взаимодействия силибинина с радикальными продуктами пероксидазного окисления бензидина

Таким образом, силимарин и индивидуальные флаволигнаны, входящие в его состав, проявляя антиоксидантную активность, способны эффективно предотвращать повреждения ДНК промежуточными радикальными продуктами пероксидазного окисления бензидина. В основе защитного действия флаволигнанов лежит их способность непосредственно реагировать с ними, образуя стабильный феноксильный радикал. Кроме того, продукты окисления силибинина также способны проявлять генопротекторную активность.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Абилов С.К. Химический мутагенез. Итоги науки и техники. Общая генетика. М.: ВИНТИ, 1986. Т. 9. 96 с.
2. Бунятян Н.Д., Герасимова О.А., Сахарова Т.С., Яковлева Л.В. Природные антиоксиданты - как гепатопротекторы. Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. Т. 62, № 2. С. 64-67.
3. Куркин В.А. и др. Способ получения экстракта расторопши пятнистой. Патент РФ № 2 102 999, 1998.
4. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука. 1981. 288 с.
5. Wagner H., Bladt S., Zgoinski E.M. Plant Drug Analysis. A Thin-Layer Chromatography Atlas. NY Springer Verlag., 1984, 320 p.
6. Куркин В.А. и др. Количественное определение силибина и суммы флаволигнанов в плодах *Silybum marianum* (L) Gaerth Раст. рес. Вып. 3. 1996. С. 80-86.
7. Абилов С.К., Порошенко Г.Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных бластомогенных свойств химических соединений. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, Токсикология, 1986. Т. 14. 171 с.
8. Сенчук В.В., Курченко В.П. Биохимические механизмы пероксидазного окисления ксенобиотиков. - В кн.: Выбранные науковыя працы Беларускага дзяржаўнага ўніверсітэта. Мн., 2001. С. 62-78.