

ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН УМЕНЬШАЕТ КОНЦЕНТРАЦИЮ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА И ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Шелковская О.В.^{1,2}, Иванов В.Е.¹, Карп О.Э.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцдино, Россия (142290, Московская обл., г. Пуцдино, ул. Институтская, 3), e-mail: olya_shelkovskaya@mail.ru

²Пуцдинский государственный естественно-научный институт, Пуцдино, Россия (142290, Московская обл., г. Пуцдино, просп. Науки, 3)

Дигидрокверцетин является природным флавоноидом, проявляющим широкий спектр биологической активности. Статья посвящена исследованиям антиоксидантных свойств дигидрокверцетина при радиоллизе воды, индуцированном рентгеновским излучением. Определение образующихся под действием рентгеновского излучения гидроксильных радикалов проводили с помощью флуоресцентного зонда кумарин-3-карбоновой кислоты, перекиси водорода с использованием красителя ABTS. Генерация гидроксильных радикалов и перекиси водорода в водных растворах под действием ионизирующей радиации в дозах от 1 до 20 Гр, как в присутствии, так и в отсутствие дигидрокверцетина линейно зависит от дозы. Дигидрокверцетин в диапазоне концентраций 0,1–1,0 ммоль/л проявляет антиоксидантные свойства *in vitro*, существенно уменьшая образование гидроксильных радикалов и перекиси водорода, индуцированных рентгеновским излучением в водных растворах.

Ключевые слова: флавоноиды, дигидрокверцетин, антиоксидант, рентгеновское излучение, активные формы кислорода, радиопротектор.

DIHYDROQUERCETIN REDUCES THE CONCENTRATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND HYDROXYL RADICALS INDUCED BY X-RAY-RADIATION

Shelkovskaya O.V.^{1,2}, Ivanov V.E.¹, Karp O.E.¹

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia (142290, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya St., 3), e-mail: olya_shelkovskaya@mail.ru

²Pushchino State Research Institute for Natural Sciences, Pushchino, Russia (142290, Moscow Region, Pushchino, Science Ave., 3)

Dihydroquercetin is a natural flavonoid which shows a wide spectrum of biological activity. The article is devoted to the study of antioxidant properties of dihydroquercetin during water radiolysis induced by X-rays. The hydroxyl radicals being formed under the action of X-radiation were quantified using a fluorescent probe, coumarin-3-carboxylic acid, and hydrogen peroxide was estimated with a dye, ABTS. It is established that generation of hydroxyl radicals and hydrogen peroxide in water solutions exposed to ionizing radiation at doses from 1 to 20 Gy is linearly dependent on the dose both in the presence and in the absence of dihydroquercetin. *In vitro*, dihydroquercetin in the range of concentrations from 0.1 to 1.0 mmol/l significantly reduces the formation of hydroxyl radicals and hydrogen peroxide in water solutions upon X-ray-irradiation, thereby exhibiting antioxidant properties.

Keywords: flavonoids, dihydroquercetin, antioxidant, X-ray-radiation, reactive oxygen species, radioprotector.

В настоящее время большой интерес представляет исследование свойств одного из классов природных соединений – флавоноидов и их биологической активности как возможных перспективных фармакологических препаратов для лечения различных заболеваний. Дигидрокверцетин (ДГК), известный также, как таксифолин, как представитель этого класса проявляет биологическую активность в ряде процессов. За счет комплексообразующих свойств ДГК выводит из организма тяжелые металлы, в том числе радионуклиды, что свидетельствует о его способности защищать организм

от окислительного стресса, обусловленного поступлением радионуклидов в организм, таким образом, подавляя процессы перекисного окисления липидов. Также дигидрокверцетин обладает противоопухолевой активностью [3]. Как биологически активная добавка к пище дигидрокверцетин – природный биофлавоноид, выделенный из коры сибирской лиственницы, производится фармакологической компанией ЗАО «Эвалар». Он способствует поддержанию нормального функционального состояния сердечно-сосудистой системы и способствует сохранению эластичности сосудов и капилляров [4]. Другим препаратом, содержащим ДГК и рекомендуемым для приема в тех же целях, является «Капилар» производства ОАО «Диод».

Он блокирует фермент, ответственный за синтез холестерина, тем самым снижая его выработку в организме. Флавоноиды, в том числе и ДГК, повышают активацию Т-лимфоцитов путем стимулирования выработки интерферонов, таким образом, ДГК является эффективным иммуномодулятором [4]. В данной работе изучено влияние ДГК на генерацию активных форм кислорода в водной среде под воздействием ионизирующей радиации. Цель данной работы заключалась в исследовании антиоксидантных свойств дигидрокверцетина при радиолизе воды, индуцированном рентгеновским излучением.

Материалы и методы исследования.

В работе использовали высокоочищенные препарат дигидрокверцетин (ЗАО НПФ «Флавит», Россия), перекись водорода (ХимМед, Россия), кумарин-3-карбоновую кислоту, 7-ОН-кумарин-3-карбоновую кислоту (Aldrich, США), Трис(гидрокси-метил)аминометан, 2,2'-азино-ди(3-этил-2,3-дигид-робензотиазолин-6-сульфонат) аммония (ABTS) (Sigma, США). Также использованы следующие соли: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Amresco, США).

Облучение. Облучение растворов проводили на рентгеновской терапевтической установке РУТ-15 (15 мА, 200 кВ) (МосРентген, Россия) при мощности дозы 4 Гр/мин (фокусное расстояние 0,195 м) (Центр коллективного пользования ИБК РАН).

Определение концентрации гидроксильных радикалов. Для количественного определения концентрации гидроксильных радикалов в растворе использовали специфичный для ОН-радикалов флуоресцентный зонд – кумарин-3-карбоновую кислоту [9]. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия) (Центр коллективного пользования ИТЭБ РАН) с $\lambda_{\text{ex}} = 400$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 450$ нм. Калибровку производили с помощью коммерческой 7-ОН-кумарин-3-карбоновой кислоты.

Определение содержания перекиси водорода в растворе.

Для количественного определения перекиси водорода *in vitro* мы попытались

использовать высокочувствительный метод усиленной хемилюминесценции в системе люминол–4-йодофенол–пероксидаза [5]. Однако оказалось, что ДГК восстанавливал люминол, что приводило к тушению сигнала. Поэтому для определения перекиси водорода нами был разработан методический подход с использованием красителя 2.2'-азино-ди-3-этил-2.3-дигидробензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS). Данный краситель, оказался удобным для определения перекиси водорода, поскольку спектр его поглощения не перекрывается со спектром поглощения ДГК при длине волны 405 нм, на которой обычно измеряют оптическую плотность ABTS.

В ходе эксперимента растворы облучали рентгеновским излучением при различных концентрациях ДГК в фосфатном буфере (1мМ, рН 7,4) после чего наносили аликвоты образцов на дно лунок 96-луночных планшетов по 100 мкл/лунку. Затем добавляли равный объем красящего раствора, содержащего ABTS и пероксидазу в цитратном буфере (0,1 М, рН 4,0). Оптическую плотность образцов измеряли на планшетном фотометре (Thermo Scientific, Финляндия), используя длину волны 405 нм. Содержание перекиси водорода рассчитывали, используя калибровочные графики оптической плотности известной концентрации перекиси водорода в растворе. Исходную концентрацию перекиси водорода, используемую для калибровки, определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм с использованием коэффициента молярного поглощения $43,6 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [8].

Результаты и их обсуждение

Исследовано влияние ДГК в концентрациях 0,1, 0,5, 1 ммоль/л на радиационно-химический выход ОН-радикалов при воздействии рентгеновского излучения в дозе 1 Гр.

При добавлении ДГК в концентрациях 0,1 ммоль/л, 0,5 ммоль/л и 1,0 ммоль/л происходит уменьшение образования ОН-радикалов в водной среде на 14 %, 60% и 80% соответственно по сравнению с контролем (таб.1). Радиационно-химические выходы ОН-радикалов в воде 242 нмоль/л/Гр, в присутствии ДГК в концентрациях 0,1; 0,5; 1,0 ммоль/л радиационно-химические выходы равны 34; 155; 198 нмоль/л/Гр соответственно. Таким образом, ДГК в существенной мере снижает выход радиационно-индуцированных гидроксильных радикалов в водных растворах.

Таблица 1

Влияние ДГК в концентрации 0,1; 0,5; 1,0 ммоль/л на образование перекиси водорода под действием рентгеновского излучения в дозе 10 Гр. Указаны средние значения и их стандартные ошибки (n=3)

Концентрация дигидрокверцетина, ммоль/л	Доза облучения, Гр	Концентрация H ₂ O ₂ , нмоль/л

0	0	< 4
0	10	803 ± 53
0,1	10	681 ± 42
0,5	10	482 ± 36
1,0	10	246 ± 25

При добавлении ДГК в концентрациях 0,1 ммоль/л, 0,5 ммоль/л и 1,0 ммоль/л происходит уменьшение образование перекиси водорода примерно на 20%, 40% и 70% соответственно по сравнению с контролем (таб. 2). Таким образом, при увеличении концентрации ДГК радиационно-индуцированная генерация перекиси водорода уменьшается. Данные радиационно-химического выходов были получены ранее. [10] В воде под действием ионизирующего излучения образуется около 80,5 нмоль/л/Гр перекиси водорода. Было показано, что в присутствии ДГК в концентрациях 0,1; 0,5; 1,0 ммоль/л радиационно-химические выходы равны 12; 32; 56 нмоль/л/Гр соответственно. Таким образом, ДГК в существенной мере снижает выход радиационно-индуцированной перекиси водорода в водных растворах.

Таким образом, дигидрокверцетин при радиоллизе воды, индуцированном рентгеновским излучением, проявляет существенные антиоксидантные свойства. Причем, его антиоксидантные свойства значительно более выражены, по сравнению с ранее исследованными гуанозином, инозином, ксантозином и другими пуриновыми производными [6,3,1]. Кроме того ДГК за счет комплексообразующих свойств способен выводить из организма тяжелые металлы, в том числе радионуклиды [3]. В связи с этим, дигидрокверцетин является перспективным соединением для исследования его применения как радиопротектора и радиозащитного соединения *in vivo*.

Таблица 2

Влияние ДГК в концентрации 0,1; 0,5; 1,0 ммоль/л на образование гидроксильных радикалов под действием рентгеновского излучения в дозе 1 Гр. Указаны средние значения и их стандартные ошибки (n=3)

Концентрация дигидрокверцетина, ммоль/л	Доза облучения, Гр	Концентрация ОН-радикалов, нмоль/л
0	0	<1
0	1	244 ± 5
0,1	1	212 ± 4
0,5	1	90 ± 2
1,0	1	46 ± 2

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00730-а и 14-44-03562-р_центр_а. Авторы благодарны директору ЗАО НПФ «Флавит» (Пушино) А.Б. Гаврилову за предоставленный препарат дигидрокверцетина.

Список литературы

1. Асадуллина Н.Р., Гудков С.В., Брусков В.И. Антиоксидантные свойства ксантозина при воздействии рентгеновского излучения. // *Фундаментальные исследования*. — 2011. -№ 10-1. — С. 22-25
2. Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Химическая и радиационная токсичность соединений урана. // *Российский химический журнал (Журнал РХО им. Д.И. Менделеева)*. 2014. Т. LVIII, № 3,4, с. 73-82.
3. Плотников М.Б., Тюкавкина Н.А., Плотникова Т.М. Лекарственные препараты на основе дигидрокверцетина. Издательство Томского университета, 2005. 224 с.
4. Попова Н.Р., Гудков С.В., Брусков В.И. Природные пуриновые соединения как радиозащитные средства. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. — 2014. Т. 54. -№ 1. — С. 38
5. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. // *Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина*. Пушино. — 2013. — С. 310
6. Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Влияние аминокислот на образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в воде и 8-оксогуанина в ДНК при воздействии рентгеновского излучения. // *Биохимия*. — 2008. — Т. 73. -№ 4. — С. 576-586
7. Bruskov V.I., Karp O.E., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Gudkov S.V. Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by x-ray radiation and their genotoxic action. // *Free Radical Research*. — 2012. — Vol. 46. -№ 10. — P. 1280-1290
8. Bruskov V.I., Popova N.R., Ivanov V.E., Karp O.E., Chernikov A.V., Gudkov S.V. Formation of long-lived reactive species of blood serum proteins by the action of heat. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2014. — Vol. 443. -№ 3. — P. 957-961
9. Garmash S.A., Smirnova V.S., Karp O.E., Usacheva A.M., Ivanov V.E., Chernikov A.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V., Berezhnov A.V. Pro-oxidative, genotoxic and cytotoxic properties of uranyl ions. // *Journal of Environmental Radioactivity*. — 2014. — Vol. 127. — P. 163-170
10. Ward J. F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities,

mechanisms of formation and reparability. // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. — 1988. — Vol. 35.
— P. 95-125

Рецензенты:

Буданцев А.Ю., д.б.н. профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино;

Гудков С.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино.