

ՀՀ ԳԱԱ Ա.Բ. ՆԱԼԲԱՆԴՅԱՆԻ անվ. ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՖԻԶԻԿԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՔՈՉԱՐՅԱՆ ԳԱՍՊԱՐ ՀՐԱՅԴԻ

**ՖԼԱՎՈՆՈՒԴՆԵՐԻ ՔՎԵՐՑԵՏԻՆԻ, ՄՈՐԻՆԻ, ՆԱՐԻՆԳԻՆԻ և ՌՈՒՏԻՆԻ
ՀԱԿԱՕՔՍԻԴԻԻՉ և ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ ԿԱՊՈՂ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

Բ.00.04 – “Ֆիզիկական քիմիա” մասնագիտությամբ
քիմիական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. А.Б. НАЛБАНДЯНА НАН РА

КОЧАРЯН ГАСПАР ГРАЙРОВИЧ

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ФЛАВОНОИДОВ - КВЕРЦЕТИНА,
МОРИНА, НАРИНГИНА И РУТИНА И ИХ СВЯЗЫВАНИЕ С ДНК**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук по специальности
02.00.04 - “физическая химия”

ЕРЕВАН – 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Ա.Բ. Նալբանդյանի անվ. Քիմիական ֆիզիկայի ինստիտուտի Գիտական խորհրդի կողմից

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս,
քիմ. գիտ. դոկտոր
Լ.Ա. Թավադյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

քիմ.գիտ. դոկտոր Ս.Դ. Արսենյան
քիմ.գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ռ.Լ. Վարդանյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի պետական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2016 թ. հունիսի 14-ին, ժամը 15-ին ՀՀ ԳԱԱ Ա.Բ. Նալբանդյանի անվան Քիմիական ֆիզիկայի ինստիտուտում գործող ՀՀ ԲՈՆՀ-ի 017 «Ֆիզիկական և անօրգանական քիմիա» մասնագիտական խորհրդում (0014, Երևան, Պ. Սևակի փող., 5/2):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Ա.Բ. Նալբանդյանի անվան Քիմիական ֆիզիկայի ինստիտուտի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2016 թ. մայիսի 13-ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
քիմիական գիտությունների թեկնածու

Հ.Գ. Հակոբյան

Тема диссертации утверждена Учёным советом Института химической физики им. А.Б. Налбандяна НАН РА

Научный руководитель:

академик НАН РА, доктор хим. наук
Л.А. Тавадян

Официальные оппоненты:

доктор хим. наук С.Д. Арсентьев
доктор хим. наук, профессор Р.Л. Варданян

Ведущая организация:

Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится “14” июня 2016 г. в 15⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета 017 ВАК РА “Физическая и неорганическая химия”, действующего при Институте химической физики им. А.Б. Налбандяна НАН РА (0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической физики НАН РА. Автореферат разослан “13” мая 2016 г.

Учёный секретарь Специализированного совета,
кандидат химических наук

А.Г. Акопян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

В связи с практической необходимостью получения новых эффективных биологически активных соединений в настоящее время активно ведутся работы по выявлению и получению смесей эффективных биоантиоксидантов и молекул, образующих комплексы с ДНК. К таким соединениям относятся биофлавоноиды, встречающиеся преимущественно в растениях.

Исследуемые в работе биофлавоноиды обладают антиоксидантными свойствами, реагируя с активными формами кислорода (АФК) и нейтрализуя их. В силу этого флавоноиды способны предотвращать патологии окислительного стресса, например, диабет, а также онкологические, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания. Следует отметить, что в организме одновременно присутствует большое количество биологически активных соединений, которые способны действовать кооперативно. Эти взаимодействия могут привести к проявлению неаддитивных эффектов, таких как синергизм и антагонизм. Исследование этих эффектов является актуальным направлением и для получения более эффективных лекарственных препаратов.

Актуальным направлением также является исследование влияния широко применяемого электронодонорного растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) на антиоксидантные характеристики исследуемых соединений. Это связано со свойствами ДМСО, такими как криозащита и способность легко, без повреждения тканей, проникать в организм. Таким образом, ДМСО может служить эффективным транспортным агентом для лекарственных препаратов. Кроме того, присутствие в реакционных смесях ДМСО моделирует влияние электронодонорных групп, присутствующих в биологических системах.

Молекула ДНК является основной мишенью для многих лекарственных препаратов. Поэтому изучение и определение параметров и механизмов взаимодействия соединений с ДНК, имеющих биологическое значение, является актуальным. Исследуемые нами флавоноиды оказывают положительное влияние на организм человека и могут выступать в качестве лекарственных препаратов, поэтому исследование их взаимодействия с ДНК является также актуальным. Одновременно важно выявить антиоксидантные способности биофлавоноидов, связанных с ДНК.

Из вышесказанного становится очевидным, что изучение неаддитивных эффектов в смесях флавоноидов с со-антиоксидантами, влияния среды диметилсульфоксида на антиоксидантные характеристики исследуемых соединений, а также определение параметров связывания флавоноид-ДНК является актуальной задачей и представляет большой теоретический и практический интерес.

Цель работы

Определение антиоксидантных свойств флавоноидов – кверцетина, рутина, морина, нарингина, включая их неаддитивное действие (синергизм, антагонизм) с водорастворимым аналогом α -токоферола тролоксом и аскорбиновой кислотой. Исследование связывания флавоноидов с ДНК и их способность защищать ДНК от окислительной деструкции.

С этой целью необходимо было:

- изучить совместное антиоксидантное действие исследуемых флавоноидов - рутина, кверцетина, морина и нарингина в паре с аскорбиновой кислотой и тролоксом в водной среде методами определения поглощающей емкости по отношению к кислород-центрированным радикалам (ORAC) и квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV);
- выявить химический механизм неаддитивных эффектов в исследуемых смесях антиоксидантов;
- изучить влияние электронодонорной среды диметилсульфида на антиоксидантные характеристики биофлавоноидов, тролокса и аскорбиновой кислоты;
- изучить различные способы связывания биофлавоноидов - кверцетина, рутина и морина с ДНК методом квадратно-волновой вольтамперометрии, а также определить константы связывания различных типов и число пар оснований ДНК, приходящихся на одну связанную молекулу биофлавоноида при различных ионных силах раствора;
- Выявить антиоксидантные свойства биофлавоноидов, связанных с ДНК.

Научная новизна

- Определены антирадикальные емкости флавоноидов - нарингина, кверцетина, морина и рутина в физиологической среде по отношению к пероксильным радикалам и ДФПГ* (2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил).
- Предложен новый механизм, объясняющий неаддитивные эффекты в смесях биофлавоноидов с водорастворимым аналогом α -токоферола - тролоксом и аскорбиновой кислотой.
- Выявлен детальный механизм окисления аскорбиновой кислоты до дегидроаскорбиновой кислоты радикалом ДФПГ* и причины влияния ДМСО на реакционную способность аскорбиновой кислоты.
- Количественно, методом SWV, исследовано взаимодействие биофлавоноидов с ДНК, в результате чего выявлено, что флавоноиды могут связываться с ДНК несколькими различными способами.
- Определены антиоксидантные активности флавоноидов в связанном с ДНК состоянии.

Практическая значимость

Полученные данные могут быть полезными при скрининге биологически активных соединений, содержащихся в растениях, а также для разработки и синтеза на их основе

новых более эффективных антиоксидантов.

— Полученные результаты могут служить основой для исследования взаимодействия других фенольных соединений с биологически важными соединениями с целью получения более эффективных смесей, проявляющих неаддитивные эффекты.

Основные положения, выносимые на защиту

— Антирадикальные емкости индивидуальных флавоноидов и их смесей с тролоксом и аскорбиновой кислотой по отношению к пероксильным радикалам и ДФПГ*, неаддитивное действие антиоксидантов и их смесей, механизм проявления неаддитивных эффектов.

— Влияние ДМСО на антиоксидантные характеристики исследуемых соединений, механизм действия.

— Параметры связывания флавоноидов с ДНК, определение констант связывания и число пар оснований ДНК, приходящихся на одну связанную молекулу лиганда.

— Антиоксидантная способность флавоноидов, связанных с ДНК.

Апробация работы

Результаты, представленные в диссертации, докладывались на конференциях:

Международная молодежная конференция «Инновационные подходы в области науки»: 5-7 декабря, 2014г., г. Цахкадзор, Армения; International Youth conference «Science and Innovation 2015»: 25-27 September, 2015, Republic of Armenia, Tsaghkadzor; IX Международная конференция «Биоантиоксидант»: 29 сентября – 2 октября, 2015г., Москва.; III Conference of Young Researchers «Dialogues on Science»: 23-26 June, 2015, Yerevan, Armenia; IV международная конференция "Современные проблемы химической физики", 5-9 октября 2015 г., Ереван, Армения.

Публикации

Содержание работы опубликовано в 9 работах, в том числе 4-х научных статьях, а также тезисах докладов, представленных на вышеперечисленных конференциях.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, экспериментальной части, выводов, списка использованной литературы, включающего 230 наименований. Работа изложена на 114 страницах, содержит 36 рисунков, 11 схем и 9 таблиц.

Краткое содержание работы

В введении обоснована актуальность темы, изложены цели, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В первой главе приведены литературные данные относительно неаддитивных эффектов, различных видов связывания лигандов с ДНК и антирадикальной защиты ДНК

антиоксидантами. Представлен обзор физико-химических методов, используемых при исследовании вышеупомянутых задач.

Во второй главе описаны применённые в работе материалы и методы исследования, а также ход выполнения экспериментов.

В третьей главе приведены результаты экспериментов по определению и изучению неаддитивных эффектов - синергизма и антагонизма смесей биофлавоноидов с тролоксом и аскорбиновой кислотой.

В четвертой главе приведены результаты и описаны механизмы влияния растворителя диметилсульфоксида на антиоксидантные характеристики биофлавоноидов, тролокса и аскорбиновой кислоты.

В пятой главе изложены результаты, полученные при исследовании взаимодействия биофлавоноидов с ДНК и антирадикальной защиты ДНК биофлавоноидами.

В конце диссертации приводятся выводы, список сокращений и использованной литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БИОФЛАВОНОИДОВ. НЕАДДИТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ СМЕСЕЙ БИОФЛАВОНОИДОВ С ТРОЛОКСОМ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Неаддитивное действие характеризовалось величинами антипероксирадикальных емкостей антиоксидантов и их смесей, определяемых в тролоксовом эквиваленте методом ORAC. Одновременно в идентичных условиях методом SWV исследовалась кинетика расходования со-антиоксидантов или одного компонента - флавоноида. На рис. 1.1 (а и б) приведены экспериментальные данные, полученные методом ORAC - типичные кинетические кривые расходования флуоресцеина (FI) в реакции с пероксильными радикалами.

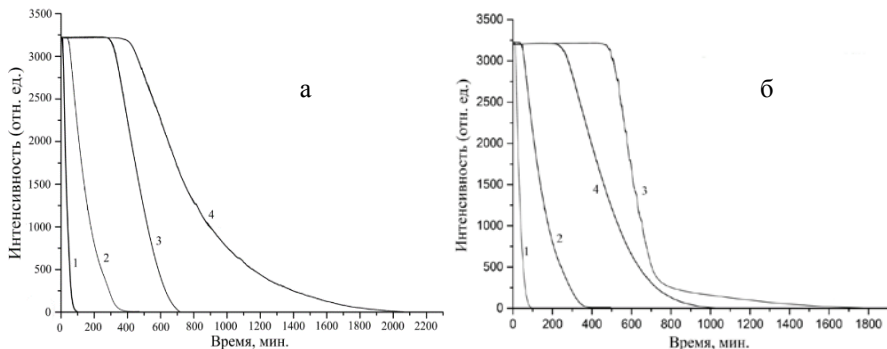


Рис. 1.1 а. Кинетические кривые уменьшения интенсивности флуоресценции FL при 515нм в результате реакции с пероксильными радикалами в отсутствии (1) и присутствии антиоксидантов: тролокс (2), рутин (3), смеси рутин – тролокс (4) при температуре 37⁰С. [AAPH]₀ = 1.53 × 10⁻²М, (суммарная скорость образования ROO• радикалов R_i = 2.6 × 10⁻⁹Мс⁻¹), концентрация антиоксидантов равна 5 × 10⁻⁶М, как взятые в отдельности, так и в смесях, [FL] = 10⁻⁶М. Растворитель – деионизированная вода.

1.1 б. В отсутствии (1) и в присутствии антиоксидантов: тролокс (2), кверцетин (3), смесь кверцетин – тролокс (4).

На основании кинетических данных расходования FL, инициированного AAPH (2,2'-Азо-бис (2-амидинопропан) гидрохлорид) в отсутствии и присутствии антиоксидантов, вычислены антипероксирадикальные емкости как индивидуальных антиоксидантов, так и их смесей, которые представлены в таблице 1.1.

Табл. 1.1. Значения антипероксирадикальных емкостей антиоксидантов (f_A) и их бинарных смесей в тролоксовом эквиваленте, а также степень со-антиоксидантного (синергического, антагонического) эффекта (НАД), определенные методом ORAC. Концентрации антиоксидантов, взятые в отдельности и в смесях, равны 5 × 10⁻⁶М. Температура 37⁰С. *В скобках приведена сумма f_A со-антиоксидантов.

Антиоксидант	f_A	f (antioxidant + Trolox)	f (antioxidant + AA)	%НАД(Тролокс)	%НАД(АК)
рутин	3.80	5.64 (>4.8)*	5.72(>4.78)	17.5	19
кверцетин	5.45	3.82 (<6.45)	5.06(<6.43)	-40	-21
морин	3.19	3.56(<4.019)	4.02(<4.17)	-15	-3.5
нарингин	4.11	5.48 (>5.11)	5.6 (>5.09)	7.2	10
аскорбиновая кислота	0.98	2.38	-	20	-
тролокс	1	-	2.38	-	20

Были проведены также кинетические исследования методом SWV расходования компонентов или одного из компонентов со-антиоксидантной смеси в условиях ORAC измерений за исключением флуоресцеина.

Из рис. 1.2 видно, что введение тролокса в реакционную смесь, содержащую рутин, приводит к замедлению расхода рутина. Аналогичная картина наблюдалась для смеси рутин – аскорбиновая кислота. При этом удалось выявить ускорение расхода тролокса в смеси.

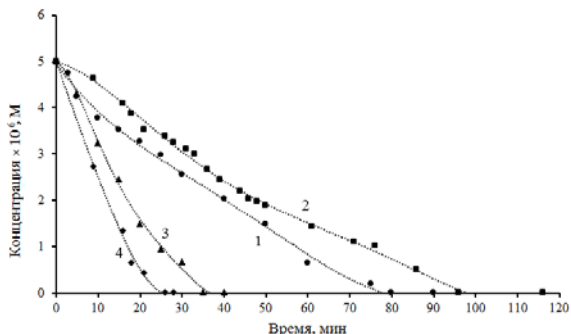


Рис. 1.2. Кинетические кривые расходования антиоксидантов – рутина в отсутствии тролокса (1), в присутствии тролокса (2), расходования тролокса в отсутствии (3) и присутствии (4) рутина. $[AAPH]_0 = 1.53 \times 10^{-2} M$, фосфатный буфер 0.1M, pH = 7.4.

В случае структурного аналога кверцетина, не содержащего гликозид, методом SWV удалось исследовать кинетику расхода только кверцетина. В этом случае добавки со-антиоксидантов аскорбиновой кислоты и тролокса ускоряют расход кверцетина. Ниже представлены кинетические модели реакции (схема 1.1 и 1.2), объясняющие явление синергизма и антагонизма смеси тролокса (ТН) с флавоноидами (FIOH). При этом предполагается, что в реакции участвует ОН группа флавоноида с наименьшим BDE (энергия диссоциации связи).

Схема 1.1. Синергизм (рутин, нарингин)

1. $ROO^{\cdot} + TH \rightarrow ROOH + T^{\cdot}$
2. $T^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOT$
3. $ROO^{\cdot} + FIOH \rightarrow FIO^{\cdot} + ROOH$
4. $FIO^{\cdot} + TH \rightarrow FIOH + T^{\cdot}$
5. $FIO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow$ не радикальные продукты

Схема 1.2. Антагонизм (кверцетин, морин)

1. $ROO^{\cdot} + TH \rightarrow ROOH + T^{\cdot}$
2. $T^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow ROOT$
3. $ROO^{\cdot} + FIOH \rightarrow FIO^{\cdot} + ROOH$
4. $T^{\cdot} + FIOH \rightarrow TH + FIO^{\cdot}$
5. $T^{\cdot} + FIO^{\cdot} \rightarrow$ не радикальные продукты

В целом, неаддитивное действие бинарной смеси антиоксидантов обусловлено, главным образом, возможностью смещения квазиравновесия с участием фенокисльных радикалов в сторону регенерации антиоксиданта с большей (синергизм) или меньшей (антагонизм) антиоксидантной емкостью соответственно (Схема 1.3).

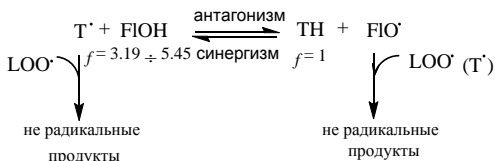


Схема 1.3. Схема превращений тролокса, со-антиоксиданта флавоноида и их фенокисльных радикалов.

2. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОНОДОНОРНОГО РАСТВОРИТЕЛЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА БИОФЛАВОНОИДОВ, ТРОЛОКСА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

2.1 Влияние электронодонорного растворителя ДМСО на антиоксидантные свойства аскорбиновой кислоты

Используя трёхэлектродную ячейку электроаналитическим методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPV) при температуре 37⁰С, исследовано влияние среды- ДМСО на окислительно-восстановительные свойства аскорбиновой кислоты (АК). Кроме того, проведены УФ-Вид спектрофотометрические кинетические измерения в этаноле реакций стабильного свободного 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразильного радикала (ДФПГ[•]) с антиоксидантами. Электрохимическое окисление аскорбиновой кислоты исследовано методом DPV в диапазоне сканирования от -400 до 100 мВ при наличии фонового электролита (NaCl) с постоянной концентрацией 0.1М (рисунок 2.1.1).

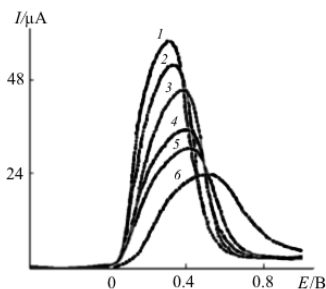


Рис.2.1.1. Вольтамперограммы ДИВ аскорбиновой кислоты с концентрацией 1.2×10^{-4} М в водном растворе, содержащий 0.1 М NaCl в отсутствии ДМСО (1) и присутствии 0.5 (2), 1.0 (3), 2.0 (4), 3.0 (5) и 4.0 М ДМСО (6), при скорости сканирования 20мВ/с, амплитуде импульса 50 мВ, длительности импульса 50мс и периоде импульса 200мс.

Как следует из вольтамперограмм, приведённых на рисунке 2.1.1, с повышением концентрации ДМСО пик формального анодного потенциала аскорбиновой кислоты (312 мВ) смещается в сторону положительных значений (522 мВ), а также наблюдается

понижение интенсивности пика окисления аскорбиновой кислоты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие растворителя ДМСО в растворе препятствует электрохимическому окислению нейтральной АК. Это обусловлено следующими причинами:

- диссоциация АК подавляется в растворах, содержащих ДМСО, в сравнении с водными растворами без ДМСО, поэтому доминирует молекулярная форма АК;
- вследствие образования водородных связей между молекулярной формой АК и ДМСО уменьшается реакционная способность АК как донора атомов водорода.

Кинетическое поведение ДФПГ* в реакции с аскорбиновой кислотой, как показывают УФ-Вид спектрофотометрические кинетические измерения, характеризуется резким снижением его концентрации сразу после смешивания компонентов в спиртовых растворах (рисунок 2.1.2).

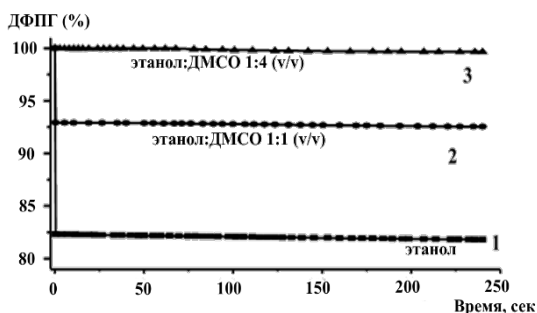


Рис. 2.1.2. Временная зависимость процентного содержания остаточного ДФПГ* при разных содержаниях ДМСО в этанольных растворах в отсутствие ДМСО (1) и присутствии EtOH – ДМСО в соотношениях 1:1 (2) и 1:4 (3). Во всех случаях концентрация аскорбиновой кислоты и ДФПГ* составляла 6×10^{-6} и 6.25×10^{-5} М соответственно, температура: $T = 22 \pm 1$ °С.

Как следует из данного рисунка, с повышением содержания ДМСО в растворе расход ДФПГ* уменьшается. На схеме 2.1.1 представлен предлагаемый детальный механизм окисления АК до дегидроаскорбиновой кислоты (ДГА) радикалом ДФПГ*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ДМСО значительно сокращает окислительную способность АК за счет образования молекулярных комплексов между АК и ДМСО посредством межмолекулярных водородных связей.

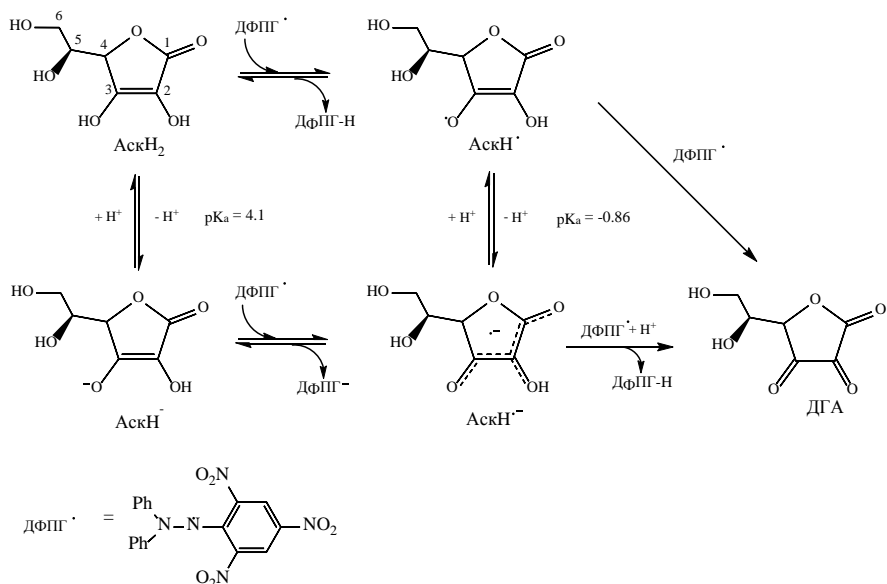


Схема 2.1.1. Механизм окисления АК радикалом ДФПГ·.

2.2 Влияние электронодонорного растворителя ДМСО на антиоксидантные свойства биофлавоноидов и тролокса

В таблице 2.2.1 приведены значения антирадикальных емкостей (n) исследуемых флавоноидов, тролокса, а также аскорбиновой кислоты, определенных в реакции с ДФПГ· согласно формуле (2.2.1):

$$n = \frac{[\text{ДФПГ}]_0 - [\text{ДФПГ}]_\infty}{[\text{Антиоксидант}]_0} \quad (2.2.1)$$

где $[\text{ДФПГ}]_0$, $[\text{ДФПГ}]_\infty$ - исходные и конечные концентрации ДФПГ соответственно, $[\text{Антиоксидант}]_0$ - исходная концентрация исследуемого антиоксиданта. Расчеты проводились по кинетическим кривым, представленным на рис. 2.2.1.

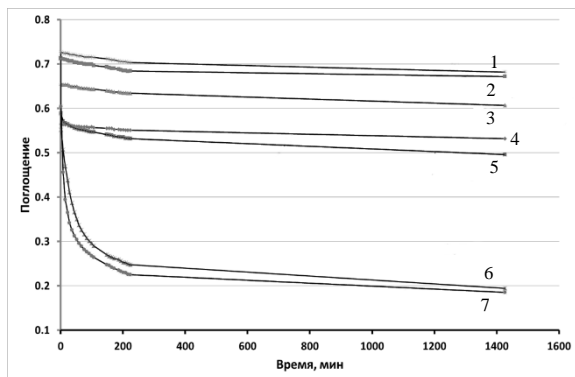


Рис.2.2.1 Кинетические кривые расходования ДФПГ в реакции в отсутствии (1) и присутствии исследуемых антиоксидантов – нарингина (2), тролокса (3), аскорбиновой кислоты (4), морина (5), рутина (6) и кверцетина (7). T= 22±1°C, [ДФПГ]₀ = 6.25×10⁻⁵ M, [Антиоксидант]₀ = 6×10⁻⁵ M, растворитель – этанол.

Таблица 2.2.1. Величины антирадикальной емкости n исследуемых антиоксидантов. T=22±1°C, [ДФПГ]₀ = 6.25×10⁻⁵ M, [Антиоксидант]₀ = 6×10⁻⁵ M и 1.8×10⁻⁵ M (*).

Растворитель / Антиоксидант	этанол	этанол : ДМСО (v/v) 1:1	этанол : ДМСО (v/v) 1:4	этанол *
	n			
Аскорбиновая кислота	2.74	0.03	0.04	2.37
Тролокс	1.6	0.27	0.11	2.27
Морин	3.28	0.35	0.47	3.01
Рутин	7.86	3.13	0.93	-
Кверцетин	8.02	5.32	3.08	-
Нарингин	0.71	0.23	0.05	0.36

При соотношении ДМСО : этанол (v/v) 1 : 1 величина антирадикальной емкости (n) уменьшается от 2.2 до 100 раз. Это обусловлено образованием прочной межмолекулярной водородной связи между атомами водорода фенольных ОН (схема 2.2.1) и ОН групп АА с ДМСО, приводящей к блокированию антирадикальных групп.

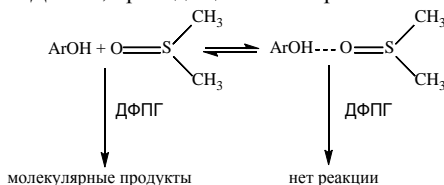


Схема 2.2.1 Влияние ДМСО на реакцию фенольных соединений с ДФПГ.

3. СВЯЗЫВАНИЕ ДНК С БИОФЛАВОНОИДАМИ. АНТИРАДИКАЛЬНАЯ ЗАЩИТА ДНК БИОФЛАВОНОИДАМИ

3.1 Связывание ДНК с биофлавоноидами

ДНК является одной из главных мишеней для многочисленных низкомолекулярных веществ – лигандов, биологическая активность которых проявляется влиянием на структуру и функциональные свойства ДНК. С этой точки зрения, исследование связывания лигандов с ДНК является одним из актуальных вопросов скрининга, молекулярного дизайна биоактивных веществ. По основному механизму связывания с ДНК лиганды делятся на интеркаляторы, желобково и внешне связывающиеся соединения.

Как видно из рис.3.1.1, при добавлении раствора ДНК к раствору флавоноида наблюдается понижение силы тока окислительного потенциала флавоноида. На рис.3.1.1 представлены графики зависимости понижения силы тока от добавляемой концентрации ДНК. На основе кривых титрования получены нелинейные кривые связывания в координатах Скетчарда, из которых определены значения константы связывания (K) и числа пар оснований ДНК (n), приходящихся на одну связанную молекулу флавоноида из изотерм адсорбции, согласно уравнению (3.1.1).

$$r / C_f = K [1 - (2n - 1)r] \quad (3.1.1)$$

Используя изменения пиков силы тока, были рассчитаны r/C_f и r и построены кривые связывания исследуемых биофлавоноидов с ДНК, которые как выявляется, непрямолинейные.

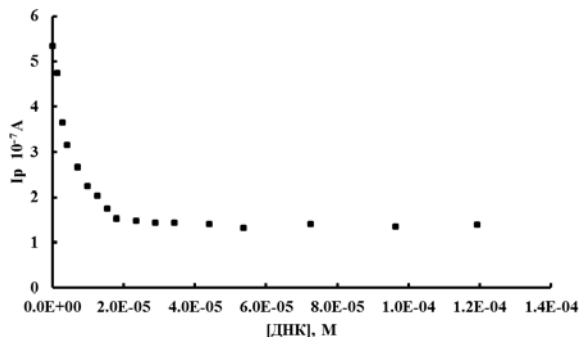


Рис. 3.1.1 Графики зависимости понижения силы тока от концентрации ДНК, полученные при прямом титровании. К раствору флавоноида $C_{AO} = 2 \times 10^{-6}$ М (титруемому веществу морину) добавлялся небольшими порциями раствор титранта (ДНК, $C_{DNA} = 1.06 \times 10^{-3}$ М).

На рис.3.1.2 представлена кривая связывания биофлавоноида (морина) с ДНК при ионной силе раствора 0.002 М (аналогичные кривые получены также при ионных силах раствора 0.02 и 0.154 М и для других биофлавоноидов).

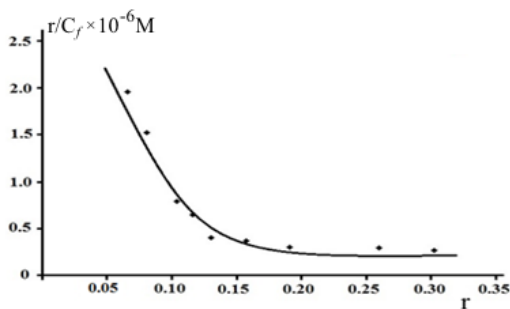


Рис. 3.1.2. Кривая связывания морина с ДНК при ионной силе раствора 0.002 М в координатах Скетчарда.

Анализ полученных кривых связывания флавоноидов с ДНК выявил, что исследуемые соединения могут связываться по крайней мере двумя способами. На основании изотерм адсорбции с помощью уравнения (3.1.1) определены значения констант связывания (K) и числа нуклеотидов (n), приходящихся на одну связанную молекулу флавоноида для двух способов связывания. Значения K и n обобщены в таблице 3.1.1. Из таблицы 3.1.1 следует, что один из способов связывания указанных выше флавоноидов с ДНК является сильным, по сравнению с другим, и соответствует интеркаляционному способу.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что биофлавоноиды - кверцетин, морин и рутин могут связываться с ДНК двумя способами. При этом проявление этих способов связывания не зависит от ионной силы раствора. С другой стороны, от ионной силы раствора зависит сродство этих флавоноидов с ДНК. В частности, при увеличении ионной силы от 0.002 до 0.02 М значения констант связывания этих флавоноидов с ДНК интеркаляционным способом уменьшаются. Однако при увеличении ионной силы еще примерно на порядок (до 0.154 М) значения K_1 в случае морина и рутина резко возрастают, в то время как в случае кверцетина значение K_1 остается неизменным. При слабом способе связывания значения K_2 проявляют небольшую тенденцию к уменьшению, в зависимости от ионной силы раствора, что может быть следствием связывания молекул биофлавоноидов с сахарофосфатным остовом ДНК.

Таблица 3.1.1. Константы связывания (K_1 , K_2) и число пар оснований ДНК (n_1 , n_2), приходящихся на одну связанную молекулу лиганда. K_1 – константа связывания для интеркаляции; K_2 – константа связывания для внешнего связывания.

Флавоноиды	Ионная сила I, M					
	0.002		0.02		0.154	
	$K_1 \cdot 10^5$; M ⁻¹	$K_2 \cdot 10^5$; M ⁻¹	$K_1 \cdot 10^5$; M ⁻¹	$K_2 \cdot 10^5$; M ⁻¹	$K_1 \cdot 10^5$; M ⁻¹	$K_2 \cdot 10^5$; M ⁻¹
рутин	2.0±0.5	0.016±0.005	0.15±0.05	0.024±0.005	8.5±0.1	0.011±0.005
морин	2.4±0.5	0.073±0.005	0.27±0.05	0.091±0.005	10.0±0.5	0.055±0.005
кверцетин	4.3±0.5	0.16±0.05	1.05±0.05	0.13±0.05	1.3±0.5	0.030±0.05
	$n_1 \approx 4-6$	$n_2 \approx 1-2$	$n_1 \approx 4-6$	$n_2 \approx 1-2$	$n_1 \approx 4-6$	$n_2 \approx 1-2$

3.2 Антирадикальная защита ДНК связанными с ней биофлавоноидами

ААРН-иницированное окисление ДНК в присутствии антиоксидантов проводилось с целью выявить способность флавоноидов защищать ДНК от пероксирадикалов. Исследование проводилось при трех разных концентрациях антиоксидантов при постоянной концентрации ДНК. При соотношении флавоноид/ДНК-1:100, когда все молекулы флавоноидов находятся в интеркалированном с ДНК состоянии (смотри рисунок 3.2.1.), флавоноиды не проявляют антипероксирадикальную активность и не защищают ДНК от пероксильных радикалов. Это объясняется тем, что в интеркалированном состоянии все активные антирадикальные центры - фенольные ОН группы этих молекул практически полностью блокируются межмолекулярными связями с ДНК.

При соотношении флавоноид/ДНК 1:10 часть молекул флавоноидов находится в интеркалированном с ДНК состоянии, а основная часть молекул флавоноидов, помимо интеркаляции, - во внешне слабосвязанном (электростатически) состоянии с ДНК, т.е. образует своеобразную «шубу» на ДНК. При таком соотношении флавоноид/ДНК, как видно из рисунка 3.1.3, степень окислительного повреждения ДНК очень низка. Флавоноиды при внешне связанном состоянии с ДНК проявляют антипероксирадикальную активность и защищают ДНК от окислительного повреждения пероксильными радикалами.

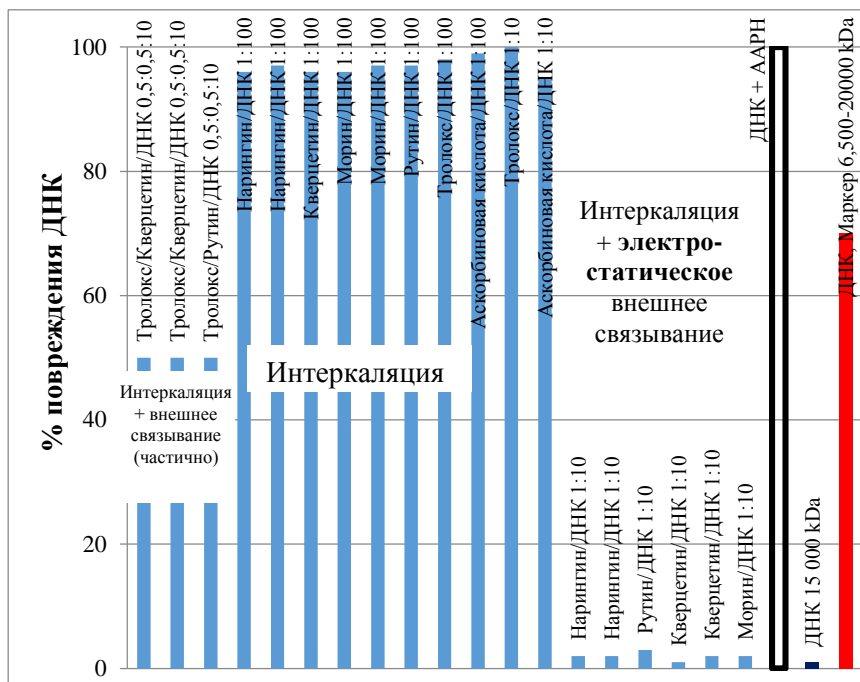


Рис. 3.2.1. Диаграмма уровней повреждения ДНК в присутствии флавоноидов, АА и тролокса, при различных соотношениях антиоксидант/ДНК. Концентрация $[ДНК]=1.1 \times 10^{-3} М$, постоянна, $[ААРН]=1.53 \times 10^{-2} Т=37^{\circ} С$, водная среда, фосф. буфер (рН=7.4).

Причина этого в том, что при внешнем связывании в молекулах флавоноидов фенольные ОН группы относительно свободны по сравнению с интеркалированными молекулами и, как следствие, проявляют антипероксирадикальную активность. Как видно из рисунка 3.2.1., антиоксидантная активность флавоноидов проявляется и при соотношении флавоноид/ДНК 1:50, но в меньшей степени. В этих условиях концентрация электростатически внешне связанных с ДНК молекул флавоноидов относительно низка и, как следствие, низок антирадикальный эффект, а относительная доля поврежденной ДНК высока. В целом антирадикальная активность и способность защищать ДНК от пероксильных радикалов являются одной из прямых причин и доказательств биологической и биоантиоксидантной активности биофлавоноидов.

Как видно из рисунка 3.2.1, тролокс (водорастворимый аналог α -токоферола) и аскорбиновая кислота антипероксирадикальную активность не проявляют. Это объясняется тем, что антирадикальные центры этих соединений при связывании с ДНК блокируются межмолекулярными связями.

На основе полученных данных показано, что флавоноиды в реальных биологических условиях и системах, включая биологические организмы, могут проявлять антипероксирадикальную активность и защищать ДНК от окислительного повреждения.

ВЫВОДЫ

1. Методами ORAC и кинетической ДФПГ тестировки определены антирадикальные емкости флавоноидов - кверцетина, рутина, морина и нарингина по отношению к пероксильным и ДФПГ радикалам. Выявлена причина различия этих величин для пероксирадикалов и ДФПГ, определяющаяся тепловым эффектом реакций отрыва атома водорода радикалами от гидроксильных групп флавоноидов.
2. Методами ORAC и SWV обнаружено неаддитивное действие (синергизм, антагонизм) смесей исследуемых флавоноидов с тролоксом и аскорбиновой кислотой. Выявлен детальный механизм этого явления. При доминировании свободно-радикальной реакции регенерации со-антиоксиданта с большей антирадикальной емкостью наблюдается явление синергизма, а с меньшей – антагонизма.
3. Кинетической ДФПГ тестировкой и методами вольтамперометрии (ДИВ, SWV) установлено, что электронодонорный растворитель ДМСО уменьшает антирадикальную емкость флавоноидов в результате образования межмолекулярных водородных связей между ДМСО и участвующими в реакции гидроксильными группами флавоноидов.
4. Выявлен и предложен механизм стабилизирующего действия ДМСО на нейтральную форму молекулы аскорбиновой кислоты, приводящего к уменьшению степени ее превращения в реакции с ДФПГ и последующим ее постоянством во времени.
5. Методом SWV количественно охарактеризованы и интерпретированы различные типы связывания с ДНК флавоноидов – кверцетина, рутина и морина. Методом электрофореза выявлены их антипероксирадикальные свойства при окислительном повреждении ДНК в зависимости от типа их связывания с ней.

Результаты диссертации опубликованы в следующих работах

1. Маркарян Ш.А., Тавадян Л.А., Кочарян Г.Г., Шагинян Г.А. Влияние диметилсульфоксида на электрохимические и антирадикальные свойства аскорбиновой кислоты. *Известия Академии наук, Серия Химическая*, 2013, т.7, с.1625-1629.
2. Քոչարյան Գ.Հ. Ֆլավոնոիդների և ասկորբինաթթվի խառնուրդների հալապերօքսիդանդիկալային ակտիվության սիներգիստական և անտագոնիստական էֆեկտները. *Հայաստանի ճարտարագիտական ակադեմիայի լրաբեր.* 2015, հ.12, №4, 762-767.
3. Kocharyan G.H., Minasyan S.H., Tavadyan L.A. Interaction of flavonoids: Morin, quercetin and rutin, with DNA. *Proceedings of the Yerevan State University, Chemical and Biological Sciences*, 2016, v.1, pp.49-54.
4. Кочарян, Г.Г., Минасян, С.Г., Манукян, З.О., Тавадян, Л.А. Синергические и антагонические эффекты антипероксирадикальных свойств смесей биофлавоноидов с тролоксом в водной среде. *Химический Журнал Армении*, 2016, т.69, с.22-32.

Результаты также докладывались и обсуждались на конференциях

5. Քոչարյան Գ.Հ. //Ռուտինի և ասկորբինաթթվի հակապերօքսիտադիկալային ակտիվության սիներգիկ էֆեկտի ուսումնասիրությունը ֆյոտոբաշտափական սպեկտրոսկոպիայի և քառակուսային վոլտամպերոմետրական եղանակներով// Материалы Международной Молодежной конференции «Инновационные подходы в области науки»: 5-7 декабря, 2014г., г. Цахкадзор, Армения.
6. Քոչարյան Գ.Հ., Մինասյան Ս.Հ., Թավադյան Լ.Ա. //Ռուտինի և ԴԼԹ-ի հետ փոխազդեցության ուսումնասիրություն քառակուսի ալիքային վոլտամպերաչափական (ՔԱՎ) եղանակով// Proceedings of the International Youth conference «Science and Innovation 2015»: 25-27 September, 2015, Republic of Armenia, Tsaghkadzor.
7. Кочарян Г.Г., Минасян С.Г., Тавадян Л.А. //Исследование методом вольтамперометрии и ORAC синергизма действия антиоксидантов – рутина, нарингина, кверцетина, морина и аскорбиновой кислоты// Тезисы докладов IX Международной конференции «Биоантиоксидант»: 29 сентября – 2 октября, 2015г., Москва.
8. Kocharyan G.H. //Study of synergic effect of antyperoxyradical activity of rutin and trolox with fluorescence spectroscopy and squarewave voltammetry methods// Book of Abstracts of III Conference of Young Researchers «Dialogues on Science»: 23-26 June, 2015, Yerevan, Armenia.
9. Кочарян Г.Г., Минасян С.Г., Тавадян Л.А. //Исследование методом вольтамперометрии и ORAC синергизма и антагонизма действия антиоксидантов – рутина, нарингина, кверцетина, морина в паре с тролоксом в водных средах// Тезисы Докладов IV Международной конференции «Современные проблемы химической физики»: 5-9 октября, 2015г., Ереван, Армения.

**ՃԼԱՎՈՆՈՒԴՆԵՐ՝ ՔՎԵՐՑԻՏԻՆԻ, ՄՈՐԻՆԻ, ՆԱՐԻՆԳԻՆԻ և ՌՈՒՏԻՆԻ
ՀԱԿԱՕՔՍԻԴԻԶ և ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ ԿԱՊՈՂ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

ԱՄՓՈՓՈՒԹՅՈՒՆ

Աշխատանքի արդիականությունը

Ներկայումս իրականացվում են կենսահակաօքսիդիչների և ԴՆԹ-ի հետ կոմպլեքս առաջացնող միացությունների, դրանց խառնուրդների լայնածավալ հետազոտություններ: Նպատակն է ստանալ նոր, արդյունավետ կենսակտիվ միացություններ ու համադրություններ, դեղաբանական նոր ձևեր: Այդպիսի միացություններից են կենսաֆլավոնոիդները, որոնք լայնորեն տարածված են բույսերում և հայտնի են իրենց հակաօքսիդիչ հատկություններով:

Օրգանիզմներում միաժամանակ առկա են բազմաթիվ կենսակտիվ միացություններ: Դրանք գործում են կոպերատիվ ձևով և կարող են ցուցաբերել ոչ ադիտիվ էֆեկտներ՝ սիներգիզմ և անտագոնիզմ: Այդ պատճառով ոչ ադիտիվ էֆեկտների ուսումնասիրությունը ներկայումս արդիական գիտական ուղղություն է:

Արդիական է նաև հակաօքսիդիչների ակտիվության վրա էլեկտրոնոդոնոր միացությունների ազդեցության ուսումնասիրությունը: Բժշկության մեջ կիրառվող դիմեթիլսուլֆօքսիդի (ԴՄՍՕ) առկայությունը ռեակցիոն միջավայրերում մոդելավորում է կենսաբանական համակարգերում առկա էլեկտրոնոդոնոր միացությունների ազդեցության էֆեկտները:

Ներկայումս արդիական են նաև ԴՆԹ-ի հետ կենսակտիվ միացությունների, այդ թվում կենսաֆլավոնոիդների, փոխազդեցության ուսումնասիրությունները:

Աշխատանքի հիմնական նպատակը: Ուսումնասիրել ֆլավոնոիդների և կենսահակաօքսիդիչների համատեղ ոչ ադիտիվ էֆեկտները, ԴՄՍՕ-ի ազդեցությունը ֆլավոնոիդների ու կենսահակաօքսիդիչների ակտիվության ու դրա մեխանիզմի վրա, ուսումնասիրել ԴՆԹ-ի հետ ֆլավոնոիդների փոխազդեցություններն ու դրանց էֆեկտները ֆլավոնոիդների հակաօքսիդիչ ակտիվության վրա:

Ատենախառության նպատակն է.

1. Որոշել հետազոտվող ֆլավոնոիդների՝ ռուտինի, քվերցետինի, մորինի և նարինգինի համատեղ հակաօքսիդիչ ազդեցությունը ասկորբինաթթվի և տրոլոքսի հետ խառնուրդներում, ջրային միջավայրում, թթվածնակենսոտն ռադիկալներին նկատմամբ կլանման տարողության որոշման (ORAC) և քառակուսա-ալիքային

վոլտամպերաչափական (SWV) եղանակներով:

2. Առաջարկել հետազոտվող հակաօքսիդիչների խառնուրդներում դիտվող ոչ ադիտիվ էֆեկտների քիմիական մեխանիզմը:
3. Որոշել կենսաֆլավոնոիդների, տրոլոքսի և ասկորբինաթթվի հակաօքսիդիչ բնութագրերի վրա դիմեթիլսուլֆօքսիդ էլեկտրոդոնորային լուծիչի ազդեցությունը:
4. Հետազոտել և քանակապես բնութագրել ԴՆԹ-ի հետ կենսաֆլավոնոիդների՝ քվերցետինի, ռուտինի և մորինի կապման տարբեր ձևերը SWV եղանակով:
5. Որոշել ԴՆԹ-ի հետ կապված կենսաֆլավոնոիդների հակաօքսիդիչ հատկությունները:

Աշխատանքի գիտական նորություն

- Որոշվել են ֆլավոնոիդների՝ քվերցետինի, ռուտինի, մորինի և նարինգինի հակառադիկալային տարողությունները պերօքսիլ և ԴՖՊՀ ռադիկալներին նկատմամբ:
- Առաջարկվել է կենսաֆլավոնոիդների՝ ասկորբինաթթվի ու α -տոկոֆերոլի ջրալուծ անալոգ տրոլոքսի հետ խառնուրդների ոչ ադիտիվ հակաօքսիդիչ էֆեկտների բացատրության նոր մեխանիզմ:
- Բացահայտվել են ԴՖՊՀ ռադիկալներով մինչև դեհիդրոասկարբինաթթվի՝ ասկարբինաթթվի օքսիդացման մանրամասն մեխանիզմը և ասկարբինաթթվի ռեակցունակության վրա ԴՄՍՕ-ի ազդեցության պատճառները:
- SWV եղանակով ուսումնասիրվել է ԴՆԹ-ի հետ կենսաֆլավոնոիդների փոխազդեցության քանակական բնութագրերը, բացահայտվել է ԴՆԹ-ի հետ ֆլավոնոիդների կապման տարբեր եղանակները:
- Որոշվել են ԴՆԹ-ի հետ տարբեր ձևերով կապված վիճակում գտնվող ֆլավոնոիդների հակաօքսիդիչ ակտիվությունները:

Աշխատանքի կիրառական նշանակությունը: Ստացված արդյունքները և եզրակացությունները կարող են օգտակար լինել ֆլավոնոիդների հիմքի վրա նոր, արդյունավետ հակաօքսիդիչային, ոչ ադիտիվ էֆեկտներ ցուցաբերող պրեպարատների և դեղաբանական ձևերի մշակման համար:

Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրապարակումները: Ստենախոսության արդյունքները ներկայացվել են միջազգային 5 գիտաժողովում, հիմնական արդյունքները հրապարակվել են գիտական 9 աշխատանքում (4 հոդված, 5 թեզիս՝ գիտաժողովների թեզիսների ժողովածուներում):

Ստենախոսության ծավալը և կառուցվածքը: Ստենախոսությունը բաղկացած է ներածությունից, 5 գլխից, եզրակացությունից, գրականության ցանկից:

Ստենախոսությունը ներկայացված է 114 էջի վրա, ներառում է 9 աղյուսակ, 36 նկար, 11 սխեմա: Գրականության ցանկը ընդգրկում է 230 հղում:

**THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF FLAVONOIDS - QUERCETIN, MORIN,
NARINGIN AND RUTIN AND THEIR BINDING TO DNA**

RESUME

Actuality of the research. Currently intensive investigations are carrying out devoted to bioantioxidants and substances or their mixtures capable of forming complexes with DNA. The main objective is to obtain new efficient biologically active substances and combinations, new pharmaceutical forms. Among these are bioflavonoids, widespread in plants and known due to antioxidant properties.

A great many bioactive substances are present in organisms. They act jointly and may exhibit nonadditive effects: synergy and antagonism. For this reason studying of nonadditive effects currently is an urgent scientific direction.

The studies of the effect of electron-donor substances on activity of antioxidants are also actual. Presence of dimethylsulfoxide (DMSO), a widely used in medicine solvent, in reaction media simulates effects of electron-donor substances in biological systems.

At present interactions of biologically active substances, including bioflavonoids, with DNA are among the topical directions.

The main purpose of the research. To study combined nonadditive effects of flavonoids and bioantioxidants; the influence of DMSO on activity of flavonoids and bioantioxidants, as well as on the acting mechanism; to study interactions of flavonoids with DNA and their influence on antioxidant activity of flavonoids.

The purpose of the research.

1. To determine combined antioxidant effect of flavonoids under study: rutin, quercetin, morin and naringin in mixtures with ascorbic acid and trolox in the aqueous medium by application of the methods of absorption capacity in relation to oxygen-centered radicals (ORAC) and square-wave voltammetry (SWV).
2. To offer chemical mechanism of nonadditive effects observed in the mixtures of antioxidants under study.
3. To determine the effect of electron-donor solvent dimethylsulfoxide on antioxidant characteristics of bioflavonoids, trolox and ascorbic acid.
4. To study and characterize quantitatively different bonding forms of the bioflavonoids (quercetin, rutin and morin) with DNA by the SWV method.
5. To reveal antioxidant properties of the bioflavonoids bonded with DNA.

Scientific novelty of the research.

- Antiradical capacities of the flavonoids: quercetin, rutin, morin and naringin in relation to peroxy and DPPH radicals were determined.
- A new mechanism was offered to explain nonadditive antioxidant effects in the mixtures of bioflavonoids with ascorbic acid and trolox, a water-soluble analog of α -tocopherol.

- Detailed oxidation mechanism of ascorbic acid by DPPH radicals into dihydroascorbic acid and the reasons of DMSO influence on the reactivity of ascorbic acid were identified.
- Quantitative characteristics of interactions between bioflavonoids and DNA were studied by the SWV method. Different types of bonding between flavonoids and DNA were identified.
- Antioxidant activities of flavonoids bonded with DNA by different types were determined.

Practical significance of the research.

The results and conclusions of the presented work guarantee the use for processing of molecular designs and for new antioxidant efficient pharmaceutical forms exhibiting nonadditive effects on the basis of flavonoids.

Approbation of the Thesis and publications

The results of the thesis were presented in five international scientific conferences. The main results were published in nine scientific works, including four articles and five conference abstracts.

The volume and structure of the Thesis

The thesis consists of an Introduction, 5 chapters, Conclusions, the list of References. It includes 114 pages, 9 Tables, 36 Figures and 11 schemes. The bibliography contains 230 references.