

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. А.Б. НАЛБАНДЯНА**

КОЧАРЯН ГАСПАР ГРАЙРОВИЧ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.04 – «Физическая химия»**

Научный руководитель:
**Академик НАН РА,
доктор химических наук
Тавадян Л.А.**

ЕРЕВАН – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР | 9 |
| § 1.1 Активные формы кислорода и окислительный стресс. | 9 |
| § 1.2 Классификация и структура флавоноидов. | 10 |
| § 1.3 Неаддитивное действие (синергизм и антагонизм) в смесях биоантиоксидантов..... | 15 |
| § 1.4 Взаимодействие лигандов с ДНК..... | 18 |
| § 1.4.1 Ковалентное связывание лигандов с ДНК. | 21 |
| § 1.4.3 Нековалентное связывание. | 22 |
| § 1.5 Методы исследования связывания лигандов с ДНК..... | 24 |
| § 1.5.1 УФ-видимая спектроскопия. | 24 |
| § 1.5.2 Флуоресцентная спектроскопия..... | 25 |
| § 1.5.3 Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния. | 27 |
| § 1.5.4 Вольтамперометрия..... | 28 |
| § 1.6 Исследования связывания флавоноидов с ДНК. | 29 |
| § 1.7 Влияние антиоксидантов, включая флавоноиды, на процесс окислительного разрушения ДНК..... | 31 |
| § 1.7.1 Повреждение ДНК: Типы и причины..... | 31 |
| § 1.7.2 Роль антиоксидантов в защите ДНК от окислительных повреждений..... | 33 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 36 |
| § 2.1 Реактивы. | 36 |
| § 2.2 Оборудование. | 36 |
| § 2.3 Методы и ход выполнения экспериментов..... | 37 |
| § 2.3.1 Антирадикальные свойства биофлавоноидов. Неаддитивные эффекты в смесях биофлавоноидов с тролоксом и аскорбиновой кислотой. | 37 |
| § 2.3.1.1 Определение поглощающей емкости по отношению к кислородцентрированным радикалам (ORAC). | 37 |
| § 2.3.1.2 Электрохимические измерения SWV..... | 40 |
| § 2.3.2 Влияние среды-диметилсульфоксида на электрохимические и антирадикальные свойства флавоноидов, тролокса и аскорбиновой кислоты. | 44 |
| § 2.3.2.1ДФПГ кинетическая тестировка. | 44 |
| § 2.3.2.2 Электрохимические измерения DPV..... | 45 |
| § 2.3.2.3 Спектрофотометрические измерения..... | 45 |

| | |
|--|-----------|
| § 2.3.3 Связывание ДНК с биофлавоноидами. Антирадикальная защита ДНК биофлавоноидами. | 46 |
| § 2.3.3.1 Связывания ДНК с биофлавоноидами. Электрохимические измерения. | 46 |
| § 2.3.3.2 Методика исследования комплексообразования в системе ДНК-флавоноид. | 47 |
| § 2.3.3.3 Определение параметров связывания флавоноидов с ДНК. | 48 |
| § 2.3.3.4 Антирадикальная защита ДНК от окислительных повреждений, индуцированных ААРН. | 48 |
| ГЛАВА 3. АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БИОФЛАВОНОИДОВ. НЕАДДИТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ В СМЕСЯХ БИОФЛАВОНОИДОВ С ТРОЛОКСОМ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ. | 50 |
| ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОНОДОНОРНОГО РАСТВОРИТЕЛЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА БИОФЛАВОНОИДОВ, ТРОЛОКСА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ. | 66 |
| § 4.1 Влияние электронодонорного растворителя ДМСО на антиоксидантные свойства аскорбиновой кислоты. | 66 |
| § 4.2 Влияние электронодонорного растворителя ДМСО на антиоксидантные свойства биофлавоноидов и тролокса. | 75 |
| § 4.2.1 Антиоксидантные показатели исследуемых антиоксидантов в реакции с ДФПГ. | 75 |
| § 4.2.2 Влияние электронодонорного растворителя ДМСО на величину антирадикальной емкости флавоноидов. | 78 |
| ГЛАВА 5. СВЯЗЫВАНИЕ ДНК С БИОФЛАВОНОИДАМИ. АНТИРАДИКАЛЬНАЯ ЗАЩИТА ДНК БИОФЛАВОНОИДАМИ. | 82 |
| § 5.1 Связывание ДНК с биофлавоноидами. | 84 |
| § 5.2 Антирадикальная защита ДНК, связанными с ней биофлавоноидами. | 91 |
| ВЫВОДЫ | 93 |
| ЛИТЕРАТУРА | 94 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В настоящее время активно ведутся работы по выявлению и получению смесей эффективных биоантиоксидантов и молекул, образующих комплексы с ДНК, в связи с практической необходимостью получения новых эффективных биологически активных соединений. К таким соединениям относятся биофлавоноиды которые широко распространены 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 такие как 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. Данные взаимодействия могут приводить к проявлению неаддитивных эффектов таких как синергизм и антагонизм. Исследование этих эффектов является актуальным направлением и для получения более эффективных лекарственных препаратов и форм, включая антиоксиданты.

Также актуальным направлением 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 квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV) и определения поглощающей емкости по отношению к кислород-центрированным радикалам (ORAC).
- Выявить химический механизм неаддитивных эффектов в исследуемых смесях антиоксидантов.
- Изучить влияние электронодонорной среды диметилсульфоксида 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[•].
- 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 и обсуждались на конференциях:

1. Քոչարյան Գ.Հ. Ռուտինի և ապոքսինաթթվի հակապերօքսիդանտիկական ակտիվության սիներգիկ էֆեկտի ուսումնասիրությունը ֆլուորաչափական սպեկտրոսկոպիայի և քառակուսային վոլտամպերոմետրական եղանակներով. Материалы Международной Молодежной конференции «Иновационные подходы в области науки»: 5-7 декабря, 2014г., г. Цахкадзор, Армения.
2. Քոչարյան Գ.Հ., Մինասյան Ս.Հ., Թավադյան Լ.Ա. Ռուտինի և ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության ուսումնասիրությունը քառակուսի ալիքային վոլտամպերաչափական (ՔԱՎ) եղանակով. Proceedings of the International Youth conference «Science and Innovation 2015»: 25-27 September, 2015, Republic of Armenia, Tsaghkadzor.
3. 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.
4. 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.

5. 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.

Публикации

Содержание работы опубликовано в 9 работах, в том числе 4 научные статьи в рецензируемых журналах, удовлетворяющих требованиям ВАК, а также тезисы докладов, представленные на вышеперечисленных конференциях.

1. Քոչարյան Գ.Զ. Ֆլավանոիդների և ասկորբինաթթվի խառնուրդների հակապերօքսիդանտիկ վալյին ակտիվության սիներգիստական և անտագոնիստական էֆեկտները. *Հայաստանի ճարտարագիտական ակադեմիայի լրագրեր*, 2015, հ.12, №4, 762-767.
2. 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.
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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

§ 1.1 Активные формы кислорода и окислительный стресс

В последнее время большое внимание уделяется антиоксидантам. Данный интерес связан с активным ростом, распространением и омоложением многих болезней и заболеваний таких как рак, атеросклероз, сердечно-сосудистые, церебрально-васкулярные и нейродегенеративные заболевания. По данным всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [1] сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире: ни по какой другой причине ежегодно не умирает столько людей, сколько от ССЗ. По оценкам, в 2008 году от ССЗ умерло 17,3 миллиона человек, что составило 30% всех случаев смерти в мире. Из этого числа 7,3 миллиона человек умерло от ишемической болезни сердца и 6,2 миллиона человек в результате инсульта. К 2030 году около 23,3 миллиона человек умрет от ССЗ, главным образом, от болезней сердца и инсульта, которые, по прогнозам, останутся единственными основными причинами смерти.

Рак также является одной из основных причин смерти в мире – в 2008 году произошло 7,6 миллиона случаев смерти от рака (около 13% всех случаев смерти). По прогнозам, смертность от рака будет продолжать расти и в 2030 году произойдет 13,1 миллиона случаев смерти от рака. [2]. Необходимо отметить, что во многих случаях причина столь разных болезней и заболеваний обусловлена активными формами кислорода (АФК) и азота (АФА), включая свободные радикалы. [3]. Окислительный стресс можно определить как отсутствие баланса между возникновением активных форм кислорода и азота и способностью организма нейтрализовать их [4,5]. Свободные радикалы представляют собой реакционноспособные химические соединения, обладающие неспаренным электроном во внешней электронной оболочке [6]. В живых организмах активные формы кислорода образуются при митохондриальном дыхании в процессе восстановления молекулярного кислорода (O_2) до воды (H_2O) при участии цитохромоксидазы Рис. 1.1.

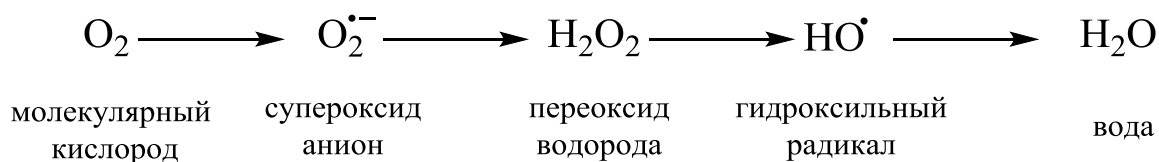


Рис. 1.1. Восстановление молекулярного кислорода (O_2) до воды (H_2O) в процессе митохондриального дыхания.

Основные формы свободных радикалов, а также их нерадикальные формы представлены в таблице 1.1. К их числу относятся супероксид анион ($\text{O}_2^{\bullet-}$), гидроксил (OH^\bullet), гидропероксил (HOO^\bullet) радикалы. Образование свободных радикалов имеет как положительное, так и отрицательное воздействие. При превышении физиологической нормы свободные радикалы разрушают клетки и их составляющие. [7-9].

Таблица 1.1 Основные формы активных кислородных компонентов. [7].

| Название | Химическая формула |
|---------------------|-------------------------|
| Нерадикальные формы | |
| Пероксид водорода | H_2O_2 |
| Синглетный кислород | O_2 |
| Гипохлорная кислота | HOCl |
| Озон | O_3 |
| Свободные радикалы | |
| Гидроксильный | OH^\bullet |
| Супероксидный | $\text{O}_2^{\bullet-}$ |
| Нитрооксидный | NO^\bullet |
| Липопероксильный | LOO^\bullet |

Наиболее эффективным средством защиты организма от патологического действия активных форм кислорода (АФК) и других радикальных продуктов являются антиоксидантные вещества фенольной природы, к которым относятся и флавоноиды [10, 11].

§ 1.2 Классификация и структура флавоноидов

Флавоноиды - это обширная группа низкомолекулярных полифенольных соединений, имеющих в своей основе скелет состоящий из $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ углеродных единиц и

отличаются между собой по степени окисленности пропановой цепочки связывающей ароматические кольца [12]. (см. таблицу 1.2)

Флавоноиды широко распространены в растениях и выполняют множество функций. Они относятся к вторичным метаболитам, которые непосредственно не отвечают за рост, фотосинтез, размножение и другие основные функции растений [13]. Флавоноиды отвечают за пигментацию растений и их невосприимчивость к бактериям, грибкам, вирусам и насекомым [14]. На сегодняшний день известно около 8000 различных природных флавоноидов и их количество продолжает расти. [15,16]. В растениях данные соединения выполняют защитную функцию, предохраняя растения от радиации, патогенов и ультрафиолетового излучения. Интерес к этим соединениям возрастает поскольку они обладают рядом свойств, которые благоприятно воздействуют на здоровье человека. Флавоноиды являются неотъемлемыми элементами рациона человека [17]. Они проявляют различные виды биологической активности, влияющие на многочисленные метаболические пути и оказывают противовирусное, противовоспалительное, антимуtagenное, мутагенное, антипролиферативное и противоопухолевое действие [18].

Биологическая активность флавоноидов обусловлена наличием функциональных гидроксильных групп [19]. Как было отмечено, флавоноиды обладают многими биохимическими свойствами, однако, наиболее важным свойством почти всех классов флавоноидов является антиоксидантная активность. Антиоксидантная активность флавоноидов зависит от расположения функциональных групп. В нейтрализации АФК и АФА наиболее важную роль играют гидроксильные группы колец В, которые выступают в качестве доноров электронов и протонов атомов водорода, тем самым нейтрализуя свободные радикалы [20]. Флавоноиды эффективно подавляют пероксидное окисление липидов в биологических тканях. Они исключают клеточные повреждения путём прямой нейтрализации свободных радикалов (Рис.1.2а) или путём хелатирования переходных металлов (Рис.1.2б) которые катализируют реакции генерации свободных радикалов (реакции Фентона схема 1.1) [21-23].

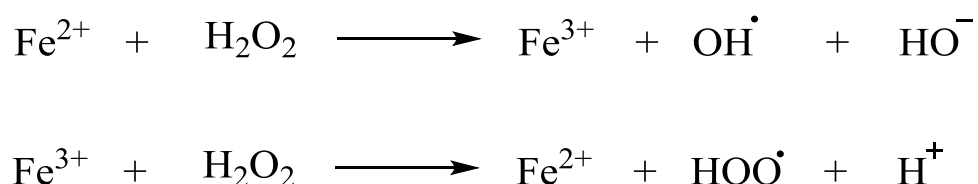


Схема. 1.1 Взаимодействие ионов железа с пероксидом водорода с образованием радикалов OH^\bullet , HO_2^\bullet .

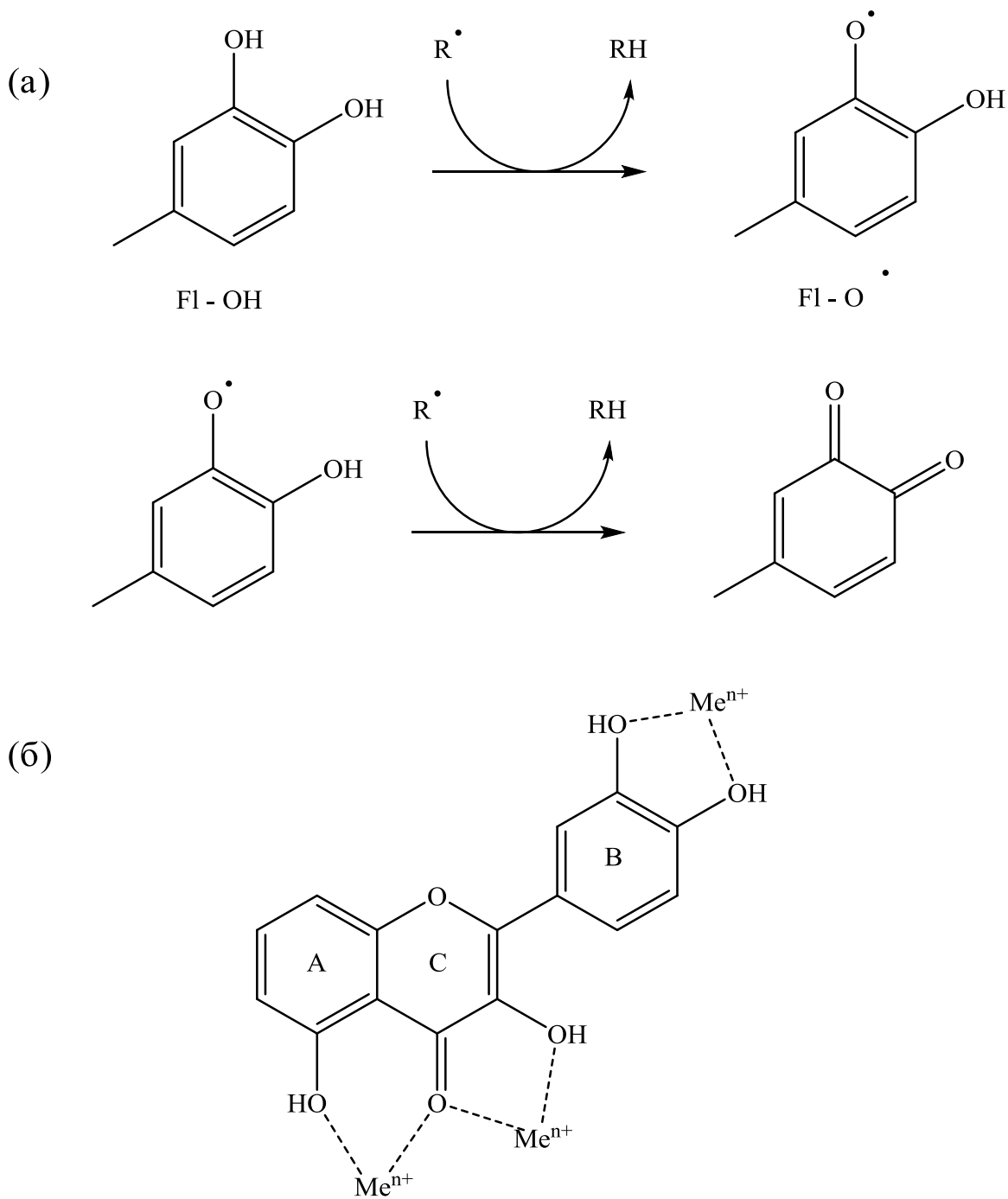
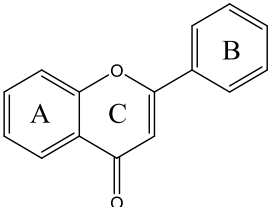
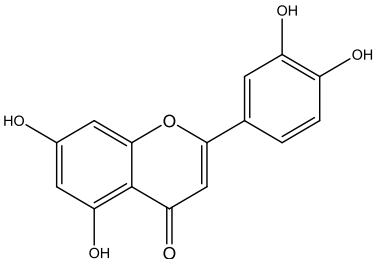
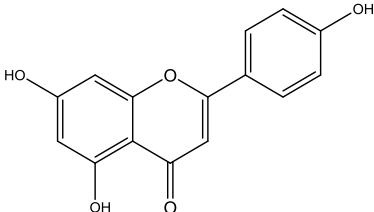
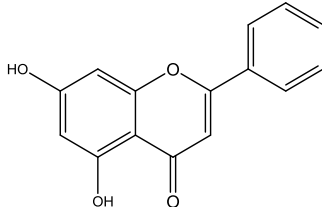
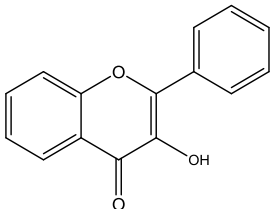
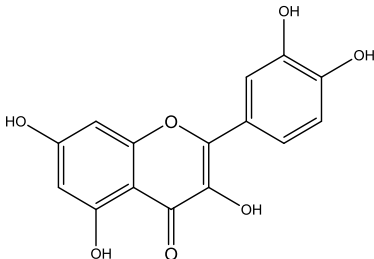
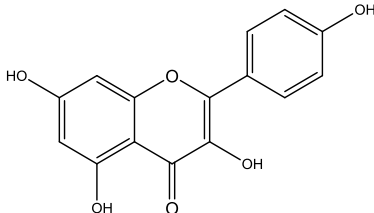
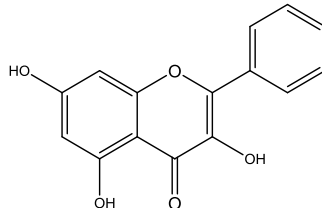
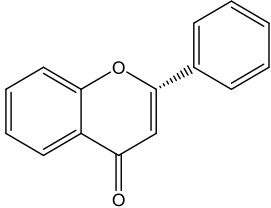
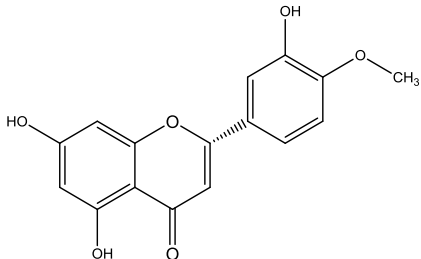
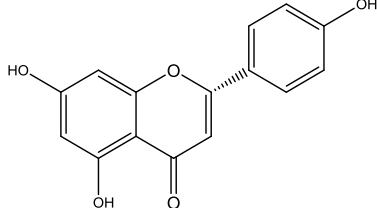


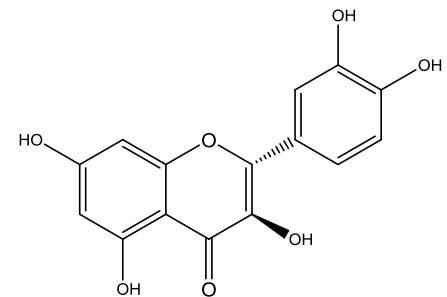
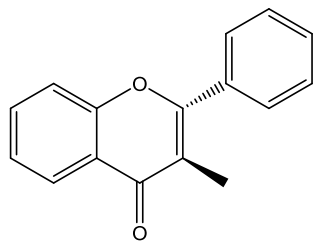
Рис 1.2. (а) реакция нейтрализации АФК (R^\bullet) флавоноидами и (б) хелатирование каталитически активных ионов металлов флавоноидом (Me^{n+} ион металла). [24].

Флавоноиды разделяются на различные классы, такие как флавоны (флаван, апигенин и лютеолин), флавонолы (кверцетин, мирцетин и кемпферол), флаваноны (гесперидин, нарингин) и другие. Их общие структуры представлены в таблице 1.2

Таблица 1.2 Основные классы флавоноидов и их примеры [24].

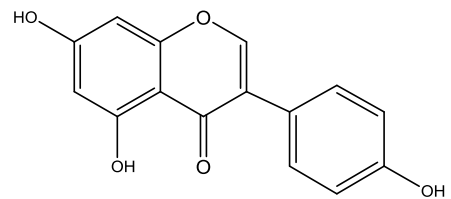
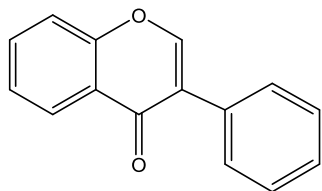
| Классы флавоноидов | Скелеты соединений | Примеры | | |
|--------------------|---|--|---|--|
| Флавоны |  |  <p data-bbox="891 619 1016 643">Лютеолин</p> |  <p data-bbox="1312 619 1438 643">Апигенин</p> |  <p data-bbox="1787 619 1890 643">Крисин</p> |
| Флаванолы |  |  <p data-bbox="920 954 1055 978">Кверцетин</p> |  <p data-bbox="1330 954 1435 1010">Каемпферол</p> |  <p data-bbox="1816 954 1921 978">Галагин</p> |
| Флаваноны |  |  <p data-bbox="1077 1353 1227 1377">Гесперетин</p> |  <p data-bbox="1632 1353 1783 1377">Нарингенин</p> | |

Флавонолы

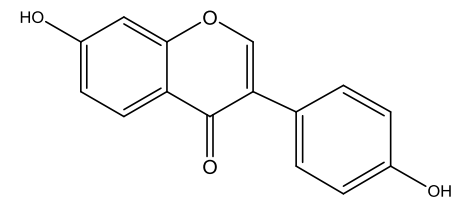


Таксифлоин

Изофлавоны

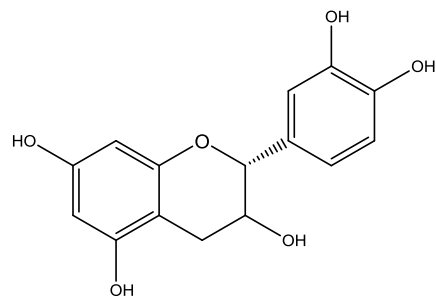
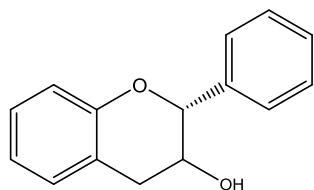


Генистеин

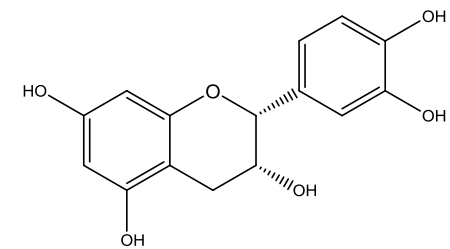


Даидзеин

Флаван-3-олы



Катехин



Эпикатехин

Различные классы биофлавоноидов отличаются по степени окисления и по замещению кольца С, в то время как индивидуальные соединения внутри класса различаются по замещению кольца А и В [24].

Флавоноиды также имеют способность взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами (ДНК, РНК). Эти взаимодействия представляют большой интерес, поскольку ДНК является основной внутриклеточной мишенью для канцерогенов, стероидов и для некоторых классов противоопухолевых и антибиотических лекарственных препаратов. Исходя из этих свойств биофлавоноиды представляют большой интерес как в химии, так и в медицине. На их основе синтезировано множество лекарственных препаратов, также они широко используются в косметических средствах и при составлении диет [25,26].

§ 1.3 Неаддитивное действие (синергизм и антагонизм) в смесях биоантиоксидантов

Особый интерес представляют исследования синергетических и антагонических эффектов в смесях антиоксидантных соединений. Данный интерес связан с тем, что в реальных биологических системах регуляция протекания свободно-радикальных превращений происходит посредством кооперативного участия множества антиоксидантов. [27, 28].

Аддитивное действие - суммарный эффект действия смеси равен сумме эффектов входящих в смесь компонентов. Аддитивность характерна для веществ одностороннего действия, когда составляющие смеси оказывают влияние на одни и те же системы организма.

Потенцированное действие (синергизм) - компоненты смеси действуют так, что одно вещество усиливает действие другого. Эффект синергизма больше аддитивного.

Антагоническое действие - компоненты смеси действуют так, что одно вещество ослабляет действие другого. Эффект меньше аддитивного [29].

Существует несколько механизмов проявления синергизма между ингибиторами (антиоксидантами). В комбинации двух или более различных антиоксидантов, в которой один антиоксидант восстанавливает другой, один антиоксидант окисляется первым (в первую очередь), тем самым защищая другой, более эффективный [30]. Восстановление более

эффективного (основной антиоксидант) акцептора свободных радикалов с помощью менееэффективного акцептора радикалов (со-антиоксидант, синергист) происходит часто в том случае, когда один акцептор радикалов имеет более высокий окислительно-восстановительный потенциал чем другой антиоксидант. Как правило, антиоксиданты, которые обладают более высоким окислительно-восстановительным потенциалом выступают в качестве первичного антиоксиданта. Восстановление первичного антиоксиданта приводит к более сильному антиоксидантному эффекту, чем простая сумма индивидуальных эффектов [30,31].

В качестве примера можно привести смесь хорошо известных и изученных антиоксидантов аскорбиновой кислоты и α -токоферола приведенной в схеме 1.2. Потенциал окисления токоферола составляет $E = +500$ мВ, и он выступает в качестве первичного антиоксиданта, так как потенциал окисления аскорбиновой кислоты составляет $E = +220-330$ мВ, и она выступает в качестве синергиста [32]. Токоферол (ТН) передает атом водорода пероксирадикалу (ROO^{\bullet}) с образованием токофероксильного радикала (T^{\bullet}). Аскорбиновая кислота в свою очередь передает атом водорода токофероксильному радикалу, восстанавливая его с образованием полугидроаскорбильного радикала (As^{\bullet}) и далее дегидроаскорбиновой кислоты (DHAs) [33]. Тем самым регенерируется активный антиоксидант – α -токоферол, и одновременно предотвращая нежелательные прооксидантные реакции с учетом токофероксильных радикалов [30,34].

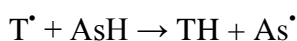
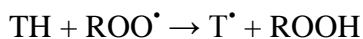


Схема 1.2 Реакции объясняющие синергетический эффект в смеси аскорбиновой кислоты с α -токоферолом [33].

В случае взаимодействия двух или более антиоксидантов, которые обладают разными механизмами антиоксидантного действия, также может проявляться синергический эффект антиоксидантного действия. В качестве примера можно привести комбинацию металхелаторов и акцепторов свободных радикалов. Их смеси демонстрируют синергизм в ингибировании окисления составляющих пищевых продуктов. Такие хелаторы металлов как фосфолипиды, ингибируют катализируемые ионами металлов процессы окисления [35],

приводя к низкому уровню концентрации радикалов. Хелаторы металлов действуют в основном на стадии инициирования, а акцепторы свободных радикалов в цепном процессе на стадии обрыва цепи [36].

Фосфатидилинозитол с токоферолами действует как синергист, подавляя окисление липидов благодаря образованию неактивных комплексов с металлами, ускоряющими окисление. [37]. Смеси кверцетина и α -токоферола проявляют синергизм, замедляя окисление жиров по механизму, в котором α -токоферол действует как акцептор (поглотитель) свободных радикалов, в то время как кверцетин играет роль хелатора металла [38].

Антагонизм между антиоксидантами наблюдается при восстановлении менее эффективного антиоксиданта более эффективным, а также при окислении более эффективного антиоксиданта радикалами менее эффективного. Антагонизм наблюдался между α -токоферолом и розмариновой или кофеиновой кислотами [39,40], между катехином и кофеиновой кислотой, а также между кофеиновой кислотой и кверцетином [39]. Богатые полифенолами экстракты растений проявляют сильный антагонизм с α -токоферолом при окислении жиров [41], в частности, подсолнечного масла [42].

Исследование неаддитивных свойств, особенно синергизма, имеет большое значение для фармацевтики при производстве лекарственных препаратов [43].

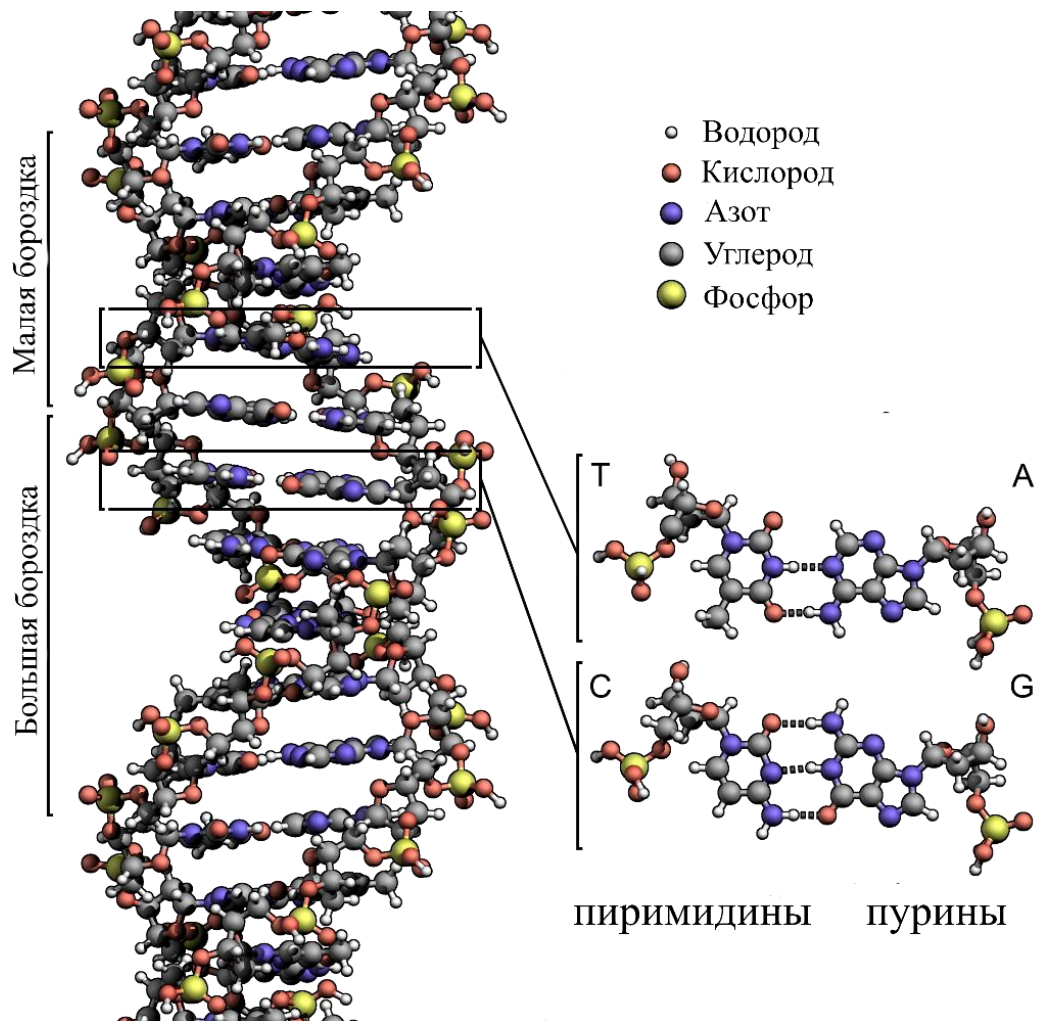
Правильный подбор компонентов способствует:

1. Увеличению эффективности препаратов.
2. Уменьшению количества (дозы) при увеличении или сохранении той же эффективности, тем самым избегая токсичности.
3. Сведению к минимуму или замедлению развития лекарственной резистентности.
4. Обеспечению выборочного синергизма.

Таким образом, исследование синергических и антагонических эффектов в различных смесях антиоксидантов имеет как научный (изучение механизмов возникновения данных эффектов), так и практический интерес при синтезе новых препаратов и разработке лекарственных композиций. Комбинации лекарственных средств были изучены многими как многообещающий подход для лечения сложных заболеваний, таких как рак, воспаление и сахарный диабет 2 типа и др. [44-46].

§ 1.4 Взаимодействие лигандов с ДНК

ДНК — это полимерная молекула, состоящая из двух спиралей, каждая одиночная цепь которой состоит из нуклеотидов гуанина (G), аденина (A) (пурины), тимина (T) и цитозина (C) (пиримидины), которые соединены через фосфодиэфирные связи, а также с



дезоксирибозой. К последней, в свою очередь, присоединена фосфатная группа рис.1.3.

Рис.1.3. Структура двойной спирали ДНК. Одиночные цепи соединены водородными связями. Слева – двойная спираль ДНК. Справа показано спаривание оснований по закону комплементарности, аденина с тимином и гуанина с цитозином. Пунктирными линиями представлены водородные связи.

Две нити соединяются между собой через водородные связи, где аденин образует две водородные связи с тимином, а цитозин образует три водородные связи с гуанином [47,48]. Каждое основание повернуто по отношению к предыдущему на 36° . На каждый виток

приходится около 10 пар оснований, ход спирали — 34 Å. Между остовами двух отдельных цепей имеются две широкие бороздки. Различают малую (12 Å) и большую (22 Å) бороздки. Большая бороздка видна на модели снизу и сверху, малая бороздка — в центре [49,50].

Дезоксирибонуклеиновая кислота (молекула ДНК), имеющая решающее биологическое значение, имеет две основные функции.

1. Транскрипция – это процесс считывания информации, закодированной в структуре ДНК, с последующим синтезом белков, которые участвуют во всех важнейших процессах организма.
2. Репликация – процесс синтеза дочерней дезоксирибонуклеиновой кислоты на основе родительской молекулы ДНК. В ходе деления родительской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной родительской клетки [47].

Нарушение данных функций молекулы ДНК приводит к возникновению различных патологических процессов и развитию различных заболеваний. Объяснение и понимание механизма взаимодействия биологически активных соединений (лигандов), которые зачастую обладают противоопухолевой, антибактериальной и антивирусной активностью, с ДНК, имеет большое значение. Для получения новых соединений терапевтического значения необходима информация об их структурной стабильности и механизмах взаимодействия с различными клеточными структурами. Большое внимание уделяется определению детального механизма взаимодействия лиганд – биополимер [51]. Нуклеиновая кислота является основной мишенью для многих противоопухолевых, антибактериальных и противовирусных препаратов (лигандов), которые используются в терапии [52]. Большинство противоопухолевых препаратов оказывают свое цитотоксическое действие через взаимодействие с ДНК, тем самым вызывая генотоксический стресс с последующей активацией запрограммированной гибели клетки, апоптоза. Цитотоксическое действие лигандов проявляется путем блокирования функций ДНК [53,54]. Взаимодействие между лигандом и ДНК происходит двумя способами: ковалентным и нековалентным связыванием. Примеры некоторых широко изученных лигандов приведены в таблице 1.3 [55].

Таблица 1.3. Примеры широко известных лигандов, связывающихся с ДНК по различным механизмам [55].

| Примеры соединений взаимодействующих с ДНК. | | |
|---|-----------------------|--------------------------------------|
| Лиганды связываются с ДНК нековалентно | | Лиганды связываются с ДНК ковалентно |
| Желобковое связывание | ДНК интеркаляторы | |
| Беренил | Аминоакридин | Бусульфан |
| Ариламин алкоголь | Ариламин алкоголь | Камптотецин |
| Блеомицин | Кумарин | Хлорамбуцил |
| Хлорохин | Цистодитин J | Цисплатин |
| Хромомицин А3 | Дипламин | Циклодисон |
| Диамидино-2-фенилиндол | УО-1 и УОУО-1 | |
| Дистамицин А | Даунорубицин | |
| Гуанил бисфурвмидин | Хинолин и хиноксалины | |
| Митрамицин | Бромистый этидий | |
| Нетамицин | Профлавин | |
| Нетропсин | Эхиномицин | |
| Пентамидин | Хлорфенамин | |
| SN6999 | Метапирилен | |
| SN7167 | Тамоксифен | |
| Ноеchst 33258 | Доксорубицин | |
| | М-AMSA (амсакрин) | |
| | Индол | |

§ 1.4.1 Ковалентное связывание лигандов с ДНК

Многие противоопухолевые лиганды связываются с ДНК ковалентно через алкилирование и образование поперечных сшивок. Ковалентный способ связывания является необратимым и обязательно приводит к полному ингибированию функций ДНК. Главной особенностью ковалентного связывания является высокая степень связывания. Цис-платин (цис-диамминдихлороплатина(II)) является известным соединением, которое ковалентно связывается с молекулой ДНК через образование внутри- и межнитевых сшивок рис.1.4. Он используется в качестве противоопухолевого препарата, и обладает выраженными цитотоксическими, бактерицидными и мутагенными свойствами [56,57].

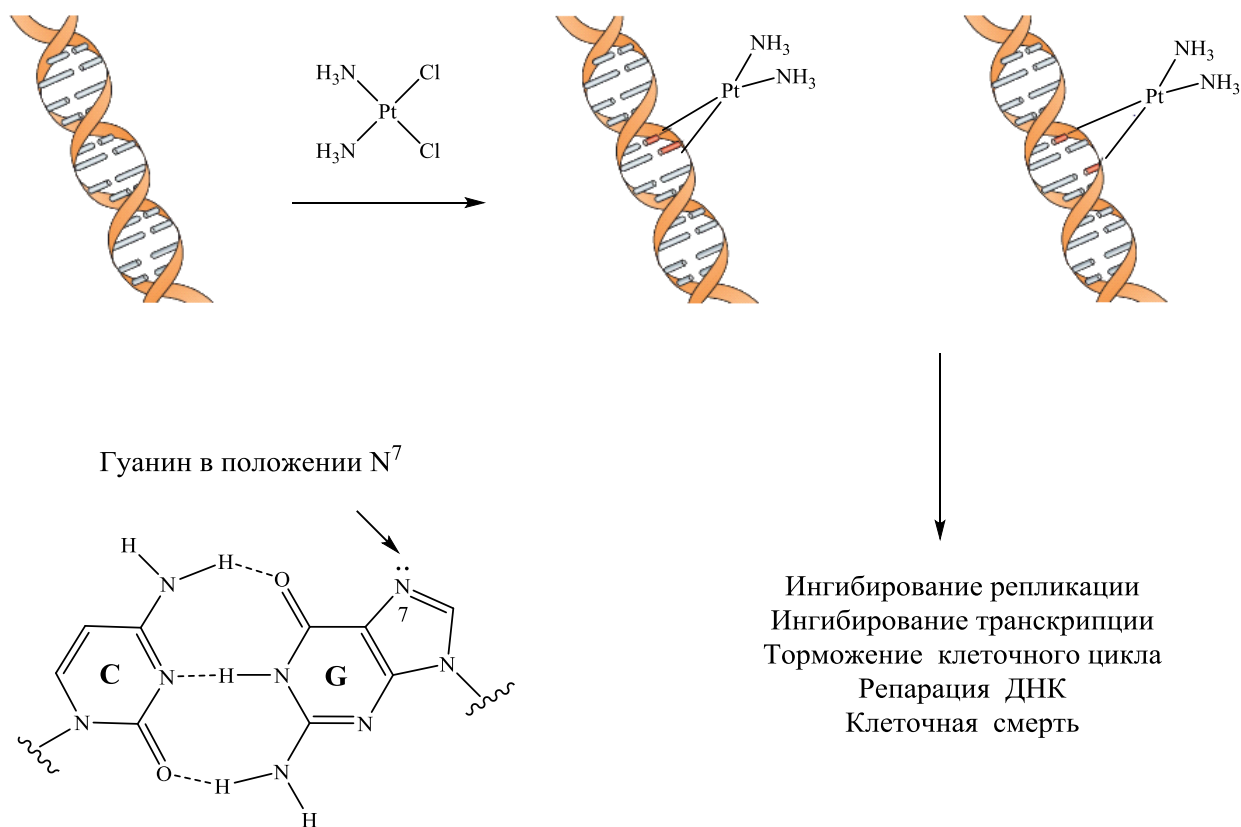


Рис.1.4 Цис-платин подвергается гидратации с образованием $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ и $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ внутри клетки. Атом платины цисплатина ковалентно связывается в позиции N⁷ пуринов с образованием 1,2- или 1,3- перекрестных сшивок. Комплекс Цисплатин-ДНК вызывает различные клеточные реакции, такие как ингибирование репликации, ингибирование транскрипции, торможение клеточного цикла, репарация ДНК и апоптоз [57].

Алкилирующие соединения. Данные соединения также используют в качестве противоопухолевых препаратов, которые повреждают ДНК, оказывая цитотоксическое действие [58]. Они чаще всего взаимодействуют с гуанином, алкилируя азот гуанина в 7-ом положении рис.1.4. Алкилирование гуанина приводит к образованию дефектных нуклеотидов, которые нарушают функции ДНК [59].

§ 1.4.2 Нековалентное связывание

Соединения, которые связываются нековалентно с ДНК, в основном, оказывают меньший цитотоксический эффект. Хотя влияние нековалентного взаимодействия вещества с ДНК на спиральные молекулярные и биохимические пути четко не охарактеризованы, наиболее важные эффекты включают конформационные и связанные с ними структурные изменения ДНК, которые приводят к нарушению нормального взаимодействия ДНК с белками (например, топоизомеразами), а также влиянию на митохондриальную ДНК и ее функции. Нековалентный способ связывания является обратимым. Нековалентно взаимодействующие с ДНК агенты могут менять конформацию ДНК и крутящее натяжение, прерывать взаимодействие белок – ДНК, и потенциально привести к разрушению скрутки ДНК. Все эти взаимодействия могут оказать существенное влияние на экспрессию генов [60]. Имеется три вида нековалентного связывания: внедрение лиганда во внутреспиральную область ДНК - интеркаляция, взаимодействие в области большого и малого желобка и внешнее связывание [61].

Интеркаляторы. Интеркалирование планарных органических соединений к ДНК впервые исследовано Лерманом, чтобы объяснить сильное сродство некоторых гетероциклических ароматических красителей, таких как акридины, с ДНК [62]. Интеркаляторы встраиваются перпендикулярно остову ДНК без образования ковалентных связей и, не нарушая водородных связей между основаниями ДНК.

Силы, которые поддерживают стабильность комплекса ДНК-интеркалятор, обеспечивают водородные связи и взаимодействия Ван-дер-Ваальса [63,64]. При образовании комплекса ДНК - интеркалятор происходят различные структурные изменения ДНК. Интеркалирование стабилизирует, удлиняет и раскручивает двойную спираль ДНК. Эти структурные изменения могут привести к функциональным изменениям ДНК [65].

Желобковое связывание. Лиганды, связывающиеся в месте желобков ДНК как правило, имеют изогнутую форму, которая дополняет форму бороздки и связывается посредством сил Ван-дер-Ваальса. Кроме того, данные соединения образуют водородные связи с нуклеотидами в положении N-3 аденина и O-2 тимина рис1.5. Они обычно связываются в аденин-тимин (АТ) богатых последовательностях [66-68].

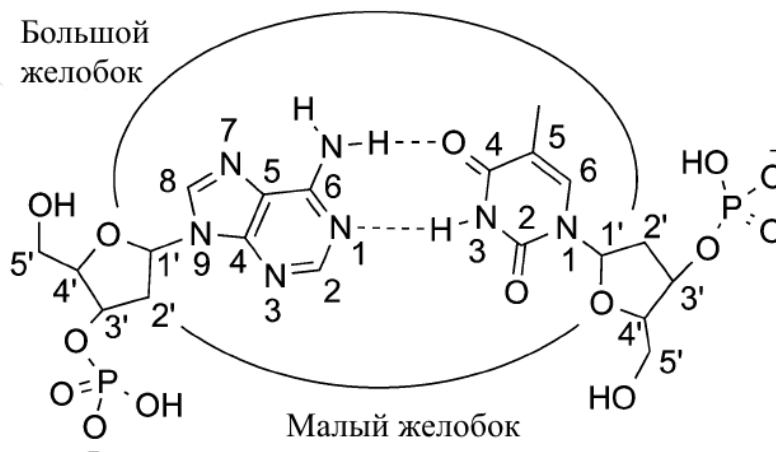


Рис.1.5 Большой и малый желобки, образованные вследствие взаимодействия аденина и тимина посредством водородных связей [66].

Наружное (внешнее) связывание. Наружное связывание лиганда с ДНК имеет электростатическую природу. Некоторые лиганды также способны привести к неспецифическим взаимодействиям с фосфатным остовом ДНК по принципу стеклинга внешних границ. Такой тип связывания обычно имеет место, когда лиганд самоассоциируется с образованием высокоупорядоченных агрегатов, которые могут накапливаться на анионном остове ДНК, чтобы уменьшить отталкивание заряд-заряд между молекулами лигандов. Некоторые комплексы металлов также взаимодействуют с ДНК посредством внешнего связывания, например, связывание комплексов Ru(II), имеющие положительные заряды $2+$, с сахарно-фосфатным остовом ДНК, который заряжен отрицательно. Подобный тип ассоциации был предложен для $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, так как увеличение люминесценции при связывании этого комплекса с ДНК сильно зависит от ионной силы. Катионы, подобные Mg^{2+} обычно взаимодействуют аналогичным путем [68].

§ 1.5 Методы исследования связывания лигандов с ДНК

Исследования особенностей связывания лигандов с ДНК очень важны в наше время из-за их биологической активности. Кроме того, эти соединения могут прямо или косвенно связываться с ДНК и изменять ее функциональную активность [69]. На сегодняшний день применяются различные биофизические методы и компьютерное моделирование для определения структурных (инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния, компьютерное моделирование, молекулярный докинг, метод молекулярной динамики) и термодинамических (УФ-видимая спектроскопия, микрокалориметрия, метод молекулярной динамики) параметров связывания ДНК с лигандом.

§ 1.5.1 УФ-видимая спектроскопия

УФ-видимая-спектроскопия является одним из наиболее распространенных экспериментальных методов, используемых в молекулярной биологии и биофизике для качественного и количественного исследования взаимодействия биологически активных лигандов с ДНК. Этот экспериментальный метод позволяет идентифицировать образование комплексов, определить их константы комплексообразования, определить различные типы лигандов в растворе на основе формы и положения максимумов поглощения в соответствующих спектрах, вычислить размер сайта связывания. [70-74]. Изменения в спектрах поглощения или смещения положения пика поглощения при добавлении лигандов к растворам ДНК могут быть использованы для идентификации различных типов связывания лигандов. ДНК имеет широкую область поглощения (200-350 нм) в УФ-области с максимумом поглощения при 260 нм.

Этот максимум поглощения является следствием наличия хромофорных групп пуринов (аденин и гуанин) и пиримидинов (цитозин и тимин). Метод спектрофотометрического титрования обычно используется для детального анализа видов связывания и структур молекулярных комплексов [75]. Концентрационные зависимости идентификационных характеристик системы ДНК-лиганд, полученные в ходе титрования, могут быть использованы для расчета параметров связывания.

Наиболее важным фактором в правильном определении этих параметров является выбор модели комплексообразования, в которой все возможные виды связывания должны быть учтены. Когда выбрана подходящая модель (или наиболее вероятные модели), уравнения, определяющие соотношения между равновесными концентрациями молекулярных компонентов и параметрами взаимодействия, могут быть использованы для количественного описания кривых титрования [76-78].

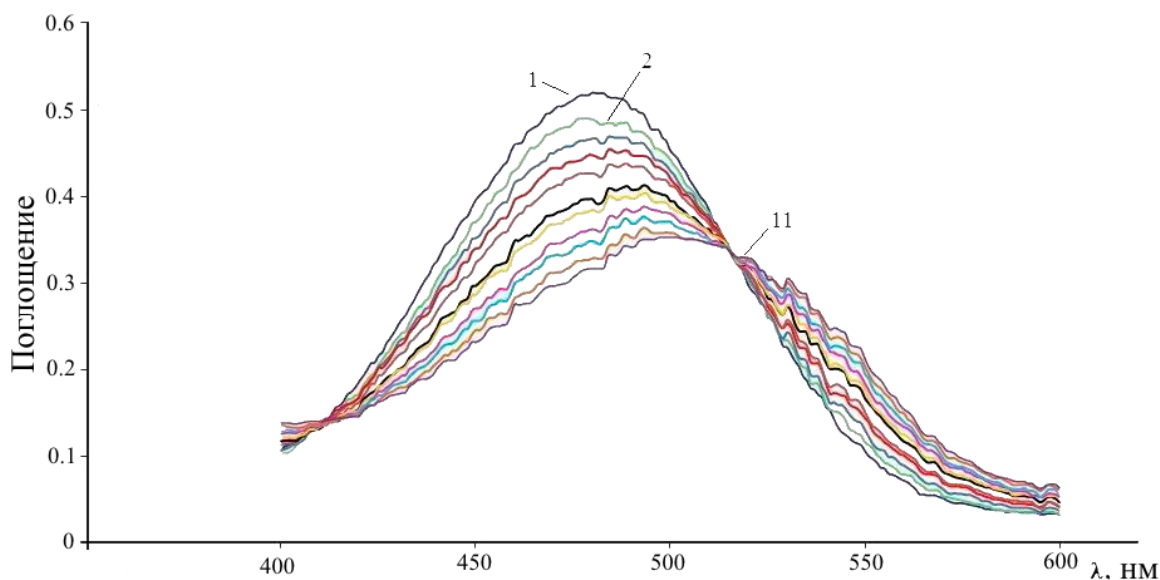


Рис.1.6. Спектры поглощения: EtBr (1) и его комплекса с ДНК (2–11); [69]

Взаимодействия между лигандом и ДНК выявляются путем сравнения спектров поглощения свободных лигандов с комплексом лиганд-ДНК, которые, как правило, различаются (рис.1.6). Вещества, связываемые с ДНК посредством интеркалирования (внедрения), обычно приводят к гипохромному и батохромному эффекту (красное смещение). Благодаря интеркаляционному связыванию, включающему стекинг-взаимодействие между ароматическим хромофором и парами оснований ДНК, степень гипохромного эффекта обычно совместима с прочностью интеркаляционного связывания [79].

§ 1.5.2 Флуоресцентная спектроскопия

Флуоресцентная спектроскопия является одним из методов, наиболее широко используемых для исследования взаимодействия между лигандами и ДНК. Преимуществами этого метода по сравнению с другими методами являются его высокая чувствительность, широкий диапазон используемых концентраций реагентов и селективность регистрации.

Наиболее интенсивную флуоресценцию обеспечивают соединения, содержащие ароматические функциональные группы с низким уровнем энергии $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода [80-82]. Взаимодействие лиганда с ДНК, как правило, приводит к значительному повышению интенсивности флуоресценции вследствие различных факторов. В случае интеркалирования лиганды встраиваются между нуклеотидами. Вращение свободных молекул способствует безизлучательной дезактивации возбужденных состояний, но когда лиганд связан с ДНК преобладает дезактивация через флуоресцентное излучение и, как правило, наблюдается существенный рост флуоресцентного излучения. Лиганды, которые взаимодействуют в области большого или малого желобка ДНК посредством электростатических, гидрофобных взаимодействий и водородных связей находятся в непосредственной близости к сахарно-фосфатному остову, причем можно наблюдать снижение интенсивности флуоресценции в присутствии ДНК [83,84]. В качестве примера можно привести этидиум бромид (EtBr) который является известным интеркалятором. При взаимодействии этидиум бромида с молекулой ДНК наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции вследствие интеркаляции лиганда между соседними парами оснований ДНК. При добавлении второй молекулы, лиганда другого типа, происходит тушение интенсивности флуоресценции EtBr. Вторая молекула встраивается в ДНК, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции комплекса EtBr-ДНК, поскольку она будет конкурировать с этидиум бромидом в связывании с ДНК.

Степень тушения флуоресценции бромидного этидия, связанного с ДНК, может быть использована для определения степени связывания между второй молекулой и ДНК. Спектры излучения бромидного этидия, связанного с ДНК в отсутствие и в присутствии Mn комплекса, представлены на рис.1.7, где интенсивность флуоресценции EtBr -ДНК уменьшается в присутствии второй молекулы Mn, которая интеркалирует между парами оснований ДНК [85-87].

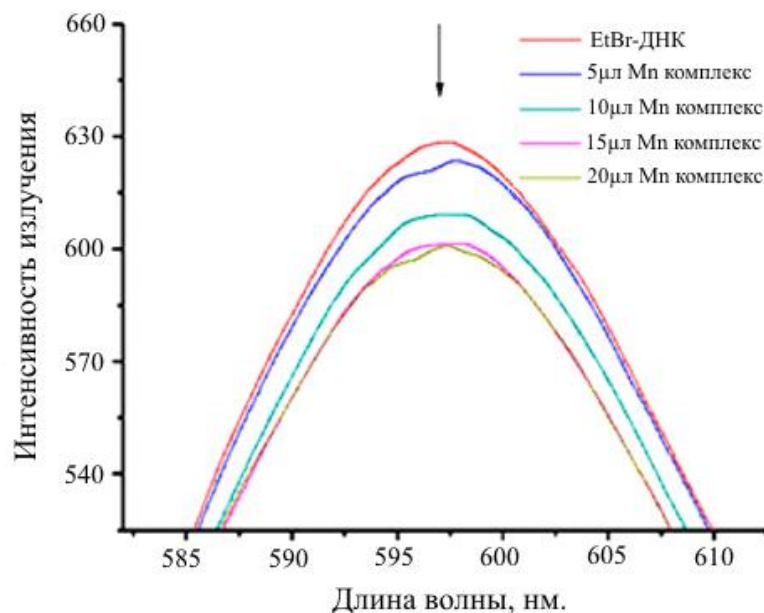


Рис.1.7 Спектры флуоресценции комплекса EtBr- ДНК в присутствии комплекса Mn [$C_{42}H_{40}Mn N_{14} O_{16}$] [88].

§ 1.5.3 Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния

Среди различных физических методов исследования структурных особенностей и межмолекулярных взаимодействий нуклеиновых кислот с лигандами, инфракрасная спектроскопия (ИК) и спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) занимают важное место. Оба этих метода результативно используются для определения способа связывания лиганда, аффинности связывания и структурных вариаций комплекса ДНК-лиганд [89-91].

Данные методы спектроскопии предоставляют информацию об образовании водородных связей в растворе. Известно, что при образовании водородных связей между донором протонов (НО, NH, NH₂, СН) и акцептором (С = О, С-О, С-N, С = N) наблюдается низкочастотный сдвиг, повышение интенсивности и увеличение полуширины спектра поглощения валентных колебаний в ИК-спектре [74]. В то же время спектры поглощения деформационных колебаний (например, NH₂- и OH-групп) испытывают высокочастотные сдвиги [92]. Эти спектральные особенности рассматриваются как прямое доказательство образования водородных связей между взаимодействующими в растворе молекулами [74]. Группы атомов, участвующих в стабилизации различных типов комплексов ДНК-лиганд, могут быть идентифицированы с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния

[93]. В частности, анализ спектров комбинационного рассеивания позволяет идентифицировать атомные группы лекарственных препаратов, образующих водородные связи с донором или акцептором атомных групп ДНК для всех возможных типов комплексов ДНК-лиганд [94] и определить, например, раскручивание двухцепочечной молекулы В-ДНК, индуцированное интеркаляцией лигандов или структурного перехода (изменение конформации) ДНК из формы В- в форму А-, сопровождающего ДНК-лиганд комплексообразование [95].

§ 1.5.4 Вольтамперометрия

Циклическая вольтамперометрия (CV) широко используется для выявления механизма и степени связывания лиганда с ДНК. Этот метод особенно эффективен для металорганических лигандов из-за их выраженной электрохимической активности. В присутствии ДНК наблюдается изменение пика потенциала и силы тока соединения, если соединение взаимодействует с ДНК. Изменение пикового потенциала и силы тока могут быть использованы для определения параметров связывания. Уменьшение высоты пика силы тока (I_p) лиганда, посредством добавления некоторого количества ДНК, используется для определения константы связывания и размера сайта связывания, в то время как сдвиг потенциала может быть использован для установления способа взаимодействия. Снижение силы тока обусловлено тем, что концентрация электроактивных частиц в реакционной смеси уменьшается. Константу связывания можно определить с помощью следующего уравнения (1.1) [88,96].

$$\log (1/[\text{ДНК}]) = \log K + \log(I/I_0 - I) \quad (1.1)$$

где K константа связывания, I_0 и I сила тока лиганда в отсутствие и в присутствии ДНК соответственно.

Константа связывания K рассчитывается из графика зависимости $\log(1/[\text{ДНК}])$ от $\log(I/I_0 - I)$. Кроме циклической вольтамперометрии также часто используются другие методы вольтамперометрии такие как дифференциально-импульсная и квадратно-волновая вольтамперометрии, которые имеют ряд преимуществ: более высокую чувствительность,

§ 1.6 Исследования связывания флавоноидов с ДНК

Взаимодействие лигандов с ДНК является актуальной областью исследований химии, молекулярной биологии и медицины. Это связано с тем, что ДНК, как известно, является основной мишенью как для АФК, включая свободные радикалы, так и для многих цитотоксических противоопухолевых агентов. В настоящее время используются различные инструментальные методы для изучения взаимодействия лигандов с ДНК [97]. В качестве лигандов используют различные соединения как органического, так и неорганического происхождения. Большой интерес вызывают антиоксиданты (лиганды) природного происхождения такие, как биофлавоноиды. Поскольку они препятствуют окислению липопротеидов низкой плотности плазмы крови и развитию атеросклеротических повреждений стенок кровеносных сосудов (артерий), подавляя процессы внутриклеточного пероксидного окисления липидов. Флавоноиды угнетают агрегацию тромбоцитов, что также является положительным фактором в профилактике лечения сердечно-сосудистых заболеваний [98,99]. В частности, флавоноиды предотвращают окислительное повреждение нуклеиновых кислот и препятствуют развитию процессов канцерогенеза. Интерес к флавоноидам обусловлен не только возможным положительным действием этих веществ, наблюдаемым при потреблении растительных продуктов, но также перспективой получения синтетических производных этих веществ, обладающих лекарственным действием. На основе флавоноидов возможно создание новых высокоактивных лекарственных препаратов, обладающих противовоспалительной, антиканцерогенной, противовирусной, антипаразитарной или бактерицидной активностью [100,101].

Исследование антиоксидантной активности полифенольных соединений, взаимодействие флавоноидов с ДНК и ионами металлов имеют важное биохимическое и биологическое значение. Показано, что флавоноиды могут хелатировать Fe (II) и Fe (III) и предотвращать генерацию свободных радикалов посредством реакции Фентона. Флавоноиды также могут интеркалировать с ДНК и реагировать со свободными радикалами, тем самым защищая ДНК от окислительного повреждения [101, 102]. Наиболее изученным флавоноидом является кверцетин [103]. ИК спектры полученные при связывании флавоноида с ДНК

приведены на рис.1.8. Кверцетин связывается с основаниями ДНК и с PO₂ группой остова.

Об образовании комплекса флавоноид-ДНК свидетельствуют смещение пика гуанина с 1.710 см⁻¹ до 1.706 – 1.699 см⁻¹ и изменение интенсивности пика фосфатной группы при 1.225 см⁻¹.

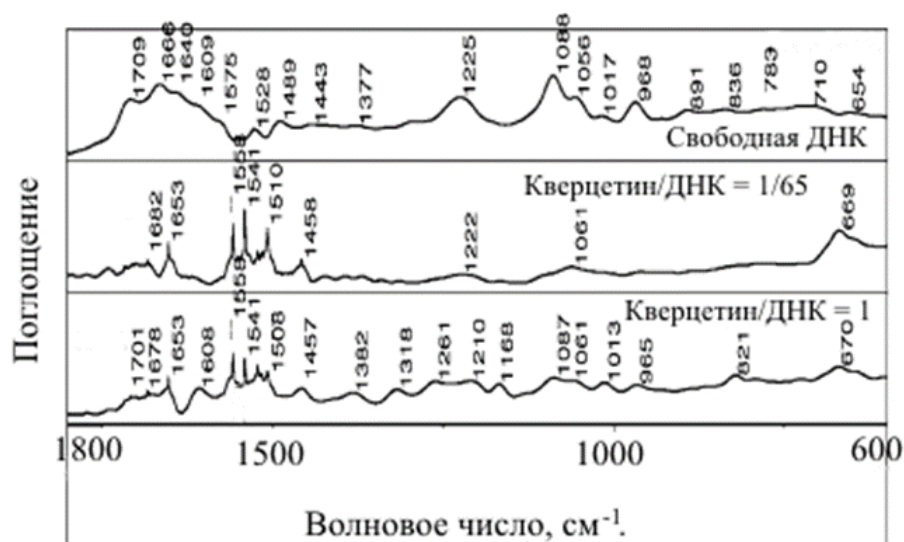


Рис.1.8 Инфракрасные спектры поглощения свободной ДНК (1) и спектры комплексов флавоноид-ДНК в водном растворе при рН 7 в диапазоне 1,800-600 см⁻¹ [103].

О наличии интеркаляции кверцетина в ДНК свидетельствует существенное сокращение интенсивности УФ-видимых характерных пиков флавоноидов при взаимодействии с ДНК (см. Рис.1.9) Снижение интенсивности характерного УФ-видимого пика при 375 нм (кверцетин), свидетельствует об интеркаляции кверцетина в ДНК [103].

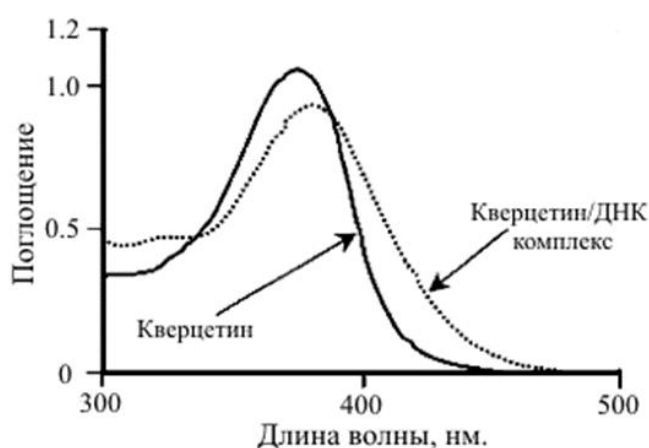


Рис.1.9 УФ-видимые спектры кверцетина и его комплекса с ДНК при 375 нм с конечной концентрацией ДНК 0,25 мМ и кверцетина 0,08 мМ [103].

Показано, что интеркаляция флавона в дуплекс ДНК вызывает значительное сокращение интенсивности УФ-видимого поглощения характерных зон флавонов. Этот гипохромный эффект указывает на спиралевидное упорядочивание флавона в спирали ДНК. Ограничение молекулярных движений флавона приводит к уменьшению его способности поглощать энергию света [104-105].

§ 1.7 Влияния антиоксидантов, включая флавоноиды, на процесс окислительной деструкции ДНК

Как отмечалось, в нормальной клетке существует оптимальный баланс между прооксидантами и антиоксидантами, но, когда уровень прооксидантов увеличивается по сравнению с антиоксидантами, это приводит к окислительному стрессу [106]. Это является причиной многих заболеваний. В частности, окислительный стресс приводит к преждевременному старению организма и развитию дегенеративных заболеваний, таких как болезни сердца и онкологические заболевания. Окислительный стресс может привести к окислительному повреждению ДНК, вызывая значительные повреждения нуклеотидов, разрыв цепи, может изменять экспрессию генов и, в конечном счете, привести к мутагенезу [107].

§ 1.7.1 Повреждение ДНК: Типы и причины

ДНК находится под постоянной атакой как внутренних агентов - кислородных метаболитов (активных форм кислорода, АФК), таких как супероксиданион радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2) и высокоактивный гидроксильный-радикал ($OH\cdot$) [108], так и внешних - радиация, ультрафиолетовое излучение, загрязняющие вещества в пище и в окружающей среде. Все это может привести к повреждению генетического материала, вследствие чего, как отмечалось, повышается вероятность образования и развития различных патологий, представленных на рис.1.10 [109].



Рис.1.10 Заболевания человека, где окислительный стресс играет прямую или косвенную роль в патофизиологии болезни [109].

На сегодняшний день выделено и охарактеризовано более чем 70 модифицированных нуклеозидов диастереомеров и относительно нестабильных исходных продуктов окисления. В результате имеются детальные механизмы для большинства реакций окисления пуриновых и пиримидиновых оснований ДНК [110, 111]. В качестве биомаркера окисления ДНК часто используется 8-оксо-7,8-дигидрогуанин. Из природных азотистых оснований гуанин обладает самым низким потенциалом окисления, поэтому наиболее подвержен окислительному повреждению [112, 113]. В результате реакции 2'-дез-оксигуанозина (dG) с гидроксилрадикалами образуется 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG) рис.1.11

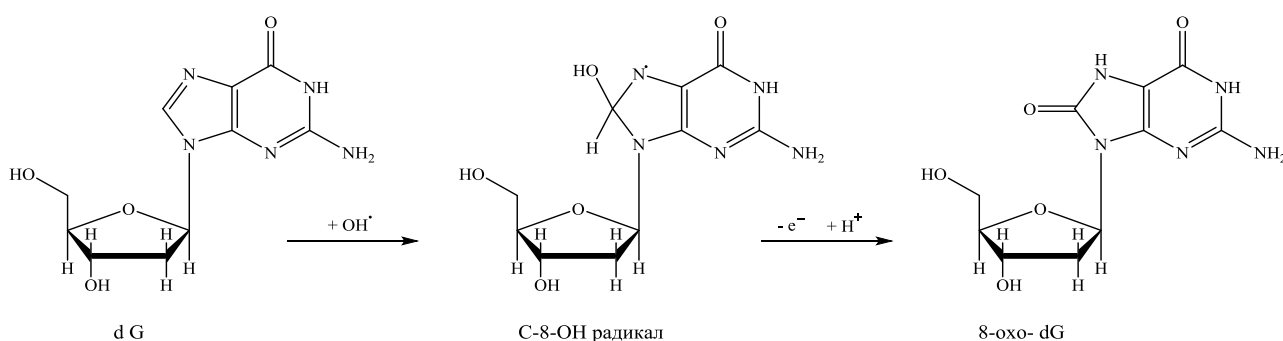


Рис.1.11. Схема образования 8-охо-dG [113].

Существуют множество методов определения 8-охо-dG в биологических объектах. К ним относятся хроматографические, ферментативные, иммунохимические и использующие метки (радиоактивные либо флуоресцентные). 8-охо-dG вовлечен в канцерогенез и считается

достоверным маркером окислительной деструкции ДНК. Повреждения ДНК накапливаются в мозге, мышцах, печени, почках, а также в долгоживущих стволовых клетках. Эти накопленные повреждения ДНК являются вероятной причиной снижения экспрессии генов и утраты функциональной способности, наблюдаемой с возрастом [114]. Данный биомаркер также играет важную роль в определении успешности используемого метода лечения.

Существует ряд причин, обосновывающих выбор 8-охо-dG в качестве такого биомаркера:

1. Образование посредством воздействия нескольких форм АФК, таких как синглетный кислород и гидроксильный радикал.
2. Мутагенное действие 8-охо-dG, вызываемое возможными трансверсиями GC-TA.
3. Доступность достаточно чувствительных методов для детекции. [115, 113].

§ 1.7.2 Роль антиоксидантов в защите ДНК от окислительных повреждений

Как было отмечено ранее, организм человека обладает множеством механизмов противодействия окислительному стрессу, синтезируя антиоксиданты естественным путем (эндогенные антиоксиданты) или получая их извне с пищей (экзогенные антиоксиданты). Роль антиоксидантов заключается в нейтрализации избытка свободных радикалов, защищая тем самым клетки от повреждений и препятствуя развитию радикал-опосредованных заболеваний. [27, 116]. Имеются работы, посвященные исследованию защитной способности флавоноидов против повреждения ДНК. Повреждение ДНК возникает из-за взаимодействия ДНК с АФК или АФА. Свободные радикалы, такие как OH^\bullet и H^\bullet реагируют с ДНК путем присоединения к основаниям или отрыва атомов водорода от сахарного фрагмента. Согласно данным [117, 118], клеточная ДНК может быть также легко повреждена вследствие воздействия относительно низких концентраций H_2O_2 . В данном исследовании использовались клетки Jurkat (лимфоциты Т-клеточной линии), которые подвергали предварительной инкубации в течение короткого периода (15 мин) с или без присутствия флавоноидов, с последующим добавлением в культуральную среду глюкозооксидазы способной генерировать около 1,2 нмоль H_2O_2 в минуту в расчете на 100 μl . Формирующиеся одонитевые разрывы в ядерной ДНК оценивали по тесту комет (рис.1.12).

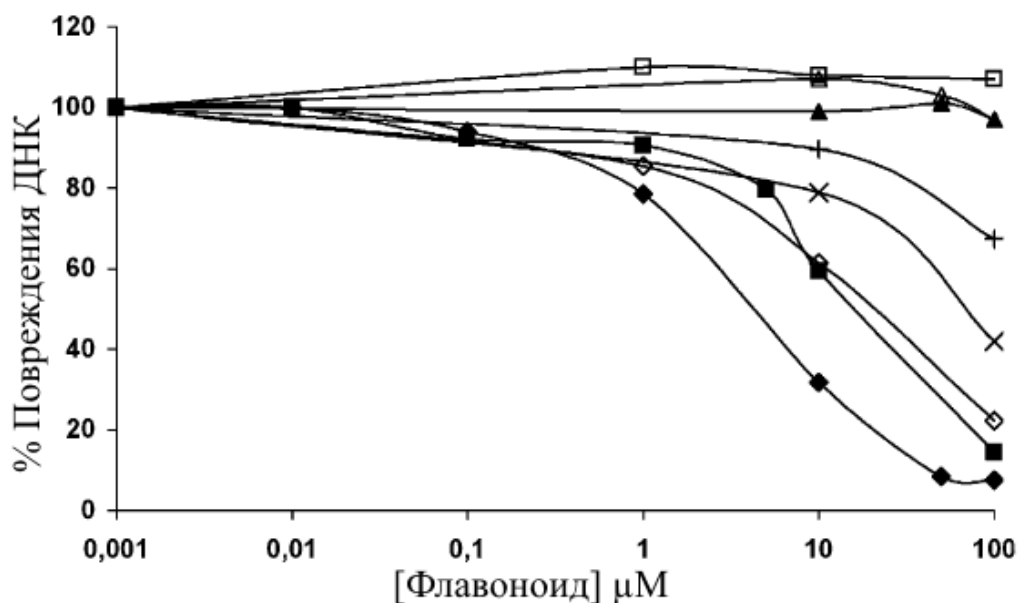


Рис. 1.12. Защитные эффекты флавоноидов по отношению к ДНК. Используемые флавоноиды: 7,8- дигидроксифлавоны (◆), галангин (■), эриодиктиол (+), 3-гидроксифлавоны (×), 5-гидроксифлавоны (Δ), 7-гидроксифлавоны (▲), апигенин (□), и лютеолин (◇) [118].

Данные флавоноиды показали значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) в диапазоне 1 и 100 μM: 7,8- дигидроксифлавоны (IC₅₀ 5.2 ± 0.8 μM), кверцетин (5.4 ± 1.2 μM), галангин (18.5 ± 1.5 μM), лютеолин (19.5 ± 2.1 μM), мирицетин (21.3 ± 0.5 μM), байкалеин (24.5 ± 0.8 μM), физетин (41 ± 1.2 μM), и 3-гидроксифлавоны (88.5 ± 5.5 μM). Среди других флавоноидов, некоторые проявляли защитную функцию при более высоких концентрациях (IC₅₀ от 100 до 500 μM): каемпферол (IC₅₀ 195.1 ± 5.9 μM), эриодиктиол (198 ± 3.1 μM), таксифолин (257 ± 4.4 μM), и морин (496.2 ± 5.2 μM); в то время как флавоны, 5-гидроксифлавоны, 7-гидроксифлавоны, хризин, апигенин, 6-гидроксифлавоны, нарингин и катехин были неэффективными также при концентрациях свыше 500 μM. Можно сделать следующие выводы из приведенных выше результатов: (а) все флавоноиды, содержащие дигидрокси группы в орто-положении (за исключением катехина), проявляют относительно сильную ДНК-защитную емкость (7,8-дигидроксифлавоны, байкалеин, лютеолин, физетин, кверцетин, мирицетин и таксифолин); (б) наличие гидроксильной группы в положении 3 кольца С в сочетании с оксо группой в положении 4 вносит положительный вклад в ДНК-защитную способность соответствующих соединений; (в) присутствие С2, С3 двойной связи увеличивает защитную способность соответствующих соединений более чем на 1 порядок [118]. Данные представлены в таблице 1.4.

Таблица 1.4, Положения ОН групп и значения IC₅₀ исследованных флавоноидов [118].

| Флавоноиды | Положение ОН группы (см таблицу 1.2) | IC ₅₀ (μM) |
|------------------------|---|-----------------------|
| <i>Флавоны</i> | | |
| флавоно | - | - |
| 5-гидроксифлавоно | 5 | - |
| 7-гидроксифлавоно | 7 | - |
| хризин | 5,7 | - |
| 7,8- дигидроксифлавоно | 7,8 | 5.2 ± 0.8 |
| байкалеин | 5,6,7 | 24.5 ± 0.8 |
| апигенин | 5,7,4` | Нет |
| лютеолин | 5,7,3`,4` | 19.5 ± 2.1 |
| <i>Флавонолы</i> | | |
| 3-гидроксифлавоно | 3 | 88.5 ± 5.5 |
| галангин | 3,5,7 | 18.5 ± 1.5 |
| кемпферол | 3,5,7,4` | 195.1 ± 5.9 |
| фисетин | 3,7,3`,4` | 41.0 ± 1.2 |
| морин | 3,5,7,2`,4` | 496.2 ± 5.2 |
| кверцетин | 3,5,7,3`,4` | 5.4 ± 1.2 |
| мирицетин | 3,5,7,2`,4`,5` | 21.3 ± 0.5 |
| <i>Флваноны</i> | | |
| 6-гидроксифлавонон | 6 | - |
| нарингин | 5,7,4` | - |
| эриодиктиол | 5,7,3`,4` | 198.0 ± 3.1 |
| таксифолин | 3,5,7,3`,4` | 257.0 ± 4.4 |
| <i>Флаван-3-олы</i> | | |
| катехин | 3,5,7,3`,4` | - |

Таким образом из всего вышесказанного можно заключить, что интерес к исследованиям неаддитивных эффектов смесей биоантиоксидантов, а также механизмов и способов связывания лигандов, обладающих биологической активностью, с ДНК постоянно растет. Кроме того, представленные выше данные широко используются при скрининге биологически активных соединений, содержащихся в растениях, а также для разработки и синтеза на их основе новых более эффективных лекарственных препаратов. Остается не выясненным вопрос об антиоксидантной способности флавоноидов в зависимости от типа связывания с ДНК. Поэтому исследование таких соединений, особенно флавоноидов имеет как теоретический, так и практический интерес.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

§ 2.1 Реактивы

2,2'-Азо-бис (2– амидинопропан) гидрохлорид (ААРН), 2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-тригидрокси-6-метилоксан-2-ил]оксиметил]оксан-2-ил]оксихромен-4-он; тригидрат (Рутин), 2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидроксихромен-4-он (Кверцетин), 2-(2,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидроксихромен-4-он (Морин), (2S)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-дигидрокси-6-(гидрокси-метил)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-тригидрокси-6-метилоксан-2-ил]оксиоксан-2-ил]окси-5-гидрокси-2-(4-гидроксифенил)-2,3-дигидрохромен-4-он (Нарингин), 6-гидрокси-2,5,7,8-тетра метилхромен-2-карбоновая кислота (Тролокс), динатриевая соль флуоресцеина - 3',6' дигидроксиспиро[изобензофуран-1(3Н),9'-[9Н]ксантен]-3-она динатриевая соль (FL), хлорид калия (KCl), хлорид натрия (NaCl), дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), 2,2-дифенил-1-(2,4,6-тринитрофенил) гидразил (ДФПГ), соединения а также растворители – этанол, деионизированная вода с электрическим сопротивлением 18 Мом×см при 25⁰С (H₂ Economy, LLC, Armenian - US VS), фосфатный буфер, метилсульфонилметан (ДМСО) приобретены в химической компании Sigma-Aldrich (США). Этанол дополнительно очищался согласно методике, описанной в [119]. В электрохимической ячейке растворы биофлавоноидов были разбавлены в 100 раз водным раствором NaCl. Растворы NaCl готовились с использованием в качестве растворителя деионизированной воды с удельным сопротивлением 18 МОм×см.

§ 2.2 Оборудование

Электрохимические исследования проводилась с использованием трехэлектродного биоаналитического комплекса (Bioanalytical system, BAS-100B/W, USA). Исследования кинетическим спектрофотометрическим методом ORAC проводились с использованием флуоресцентного спектрометра "Perkin-Elmer MPF-44B (USA)" с компьютерной регистрацией. Реакции переноса атома водорода от антиоксиданта к ДФПГ* исследовались с помощью УФ-Вид спектрофотометра (Specord 205).

Антиоксидантное действие флавоноидов на окисление ДНК, индуцированное ААРН, также регистрировались с использованием УФ-Вид спектрофотометра. Антиоксидантное действие флавоноидов на окисление ДНК, индуцированное ААРН, исследовались методом агарозного геля электрофореза с использованием горизонтального электрофореза (Bio-Rad MiniSub Cell electrophoresis apparatus, USA).

§ 2.3 Методы и ход выполнения экспериментов

§ 2.3.1 Антирадикальные свойства биофлавоноидов. Неаддитивные эффекты смесей биофлавоноидов с тролоксом и аскорбиновой кислотой

§ 2.3.1.1 Определение поглощающей емкости по отношению к кислородцентрированным радикалам (ORAC)

Метод определения поглощающей емкости по отношению к кислородцентрированным радикалам (ORAC) является эффективным методом количественного исследования антиоксидантной способности, в частности, антирадикальной емкости различных химических веществ и пищевых продуктов. Данный метод является одним из наиболее применяемых в настоящее время. Он был первоначально разработан на основе работ [120-122]. Метод основан на измерении изменения интенсивности флуоресценции определенного соединения в зависимости от времени протекания реакции. Антиоксиданты, вводимые в реакционную среду, взаимодействуя с радикалами, генерируемыми при термическом разложении азоинициатора, замедляют свободнорадикальное расхождение флуоресцеина. По этой характеристике в целом определяется антирадикальная емкость антиоксидантов. Количественное определение антирадикальной емкости осуществляется по площади ограниченной кинетическими кривыми реакции в отсутствие антиоксидантов и с добавлением антиоксидантов (рис. 2.1). Степень уменьшения флуоресценции есть мера степени деградации флуоресцирующего соединения под воздействием кислородных радикалов [123]. Первоначально в качестве флуоресцирующего вещества применялся белок В-фикоэритрин.

Однако оказалось, что он вступает в реакцию с фенольными соединениями, являющимися главными антиоксидантами растительного происхождения, что приводило к систематически заниженным результатам определения антирадикальной емкости. На сегодняшний день используют более стабильное флуоресцирующее соединение – флуоресцеин. Для генерации пероксильных радикалов при нагревании в присутствии достаточного количества кислорода используется соединение ААРН (2,2'-азо-бис-2-амидинопропан дигидрохлорид) Схема.2.1 [123-125].



Рис.2.1 ORAC антиоксидантная емкость исследуемого образца выражается как площадь между двумя кривыми. (1 и 2).

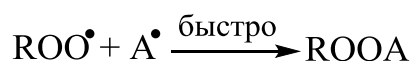
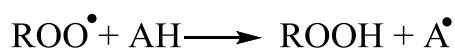
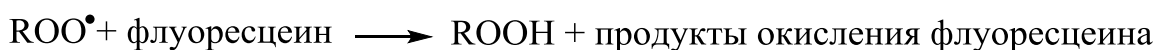
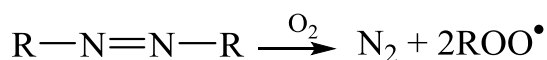


Схема.2.1 Генерирование пероксильных радикалов путем термического разложения водорастворимого азосоединения ААРН в присутствии кислорода и реакции взаимодействия пероксильных радикалов с флуоресцеином и антиоксидантом (АН) [125].

Определения антипероксирадикальных емкостей флавоноидов - рутина, кверцетина, морина и нарингина, а также их совместного антиоксидантного действия в паре с аскорбиновой кислотой и тролоксом в водной среде (фосфатный буфер pH=7.4, T=37⁰C), проводились методом ORAC с использованием флуоресцентного спектрометра "Perkin-Elmer MPF – 44B (USA)" (Схема 2.2) с компьютерной регистрацией кинетики изменения интенсивности флуоресценции флуоресцеина в результате реакции с пероксильными радикалами ROO[•].

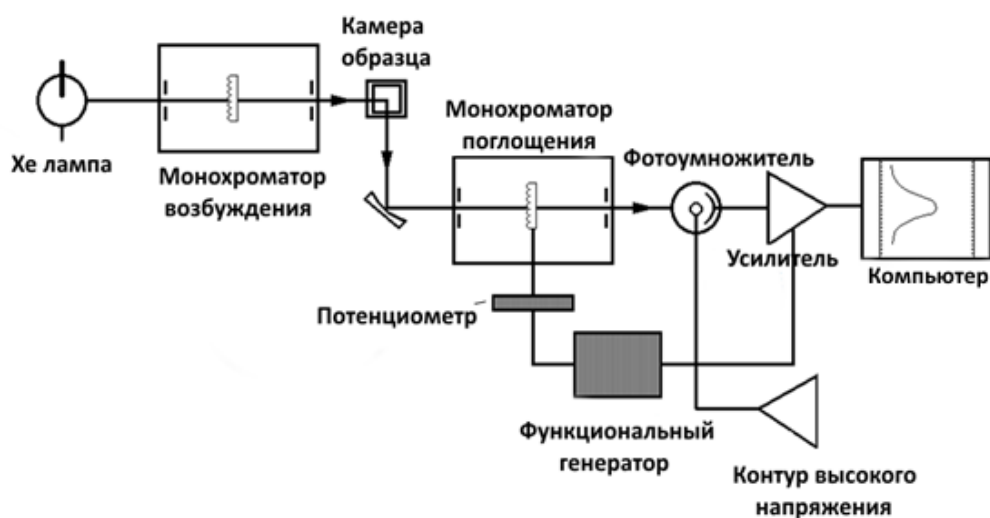


Схема 2.2. Схема флуоресцентного спектрометра.

Образцы антиоксидантов были приготовлены в очищенном этаноле. Концентрация антиоксидантов в маточном растворе составляла 4×10^{-4} М, для инициатора пероксирадикалов ААРН и флуоресцеина 1.53×10^{-1} М и $0,6 \times 10^{-4}$ М соответственно. Антиоксиданты добавлялись в реакционную смесь объемом 3 мл (2.7 мл флуоресцеин и 0.3 мл ААРН) в следующих количествах: рутин - 38 μл (5×10^{-6} М), кверцетин - 38 μл (5×10^{-6} М), морин - 38 μл (5×10^{-6} М), нарингин - 38 μл (5×10^{-6} М), аскорбиновая кислота - 38 μл (5×10^{-6} М), тролокс - 38 μл (5×10^{-6} М). Смеси антиоксидантов были приготовлены смешиванием индивидуальных растворов двух антиоксидантов по 38 μл (5×10^{-6} М). Концентрация ААРН в реакционной смеси составляла 1.53×10^{-2} М. Исследования проводились в водном растворе (фосфатный буфер 0.1 М, pH = 7.4) при длине волн возбуждающего и эмиссионного света равными 450 и 515 нм, соответственно. Количественное определение антипероксирадикальной емкости исследуемых соединений осуществлялось по площади заключенной между кинетическими

кривыми уменьшения интенсивности флуоресценции FL в отсутствие и с добавлением антиоксидантов в условиях полного расходования FL [122]. В качестве стандартного антиоксиданта использовался тролокс. Значение антипероксирадикальной емкости - f_{AO} определялось согласно следующему уравнению 2.1:

$$f_{AO} = \frac{(S_{AO} - S_o)M_{trolox}}{(S_{trolox} - S_o)M_{AO}} \times f_{trolox} \quad (2.1)$$

где S_o , S_{AO} и S_{trolox} – площади ограниченные кинетическими кривыми уменьшения интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии исследуемого антиоксиданта и стандартного антиоксиданта - тролокса соответственно; M_{trolox} , M_{AO} – молярные концентрации тролокса и исследуемого антиоксиданта соответственно; f_{AO} , f_{trolox} – антипероксирадикальная емкость исследуемого антиоксиданта и тролокса, указывающая на количество радикалов захватываемых молекулой антиоксидантов. Антипероксирадикальная емкость относительно тролоксоевого эквивалента ($f_{OTH,TE}$) равна $(f_{OTH,TE}) = f_{AO} / f_{trolox}$. Интегрирование соответствующих площадей осуществлялось по методу трапеции с помощью компьютерной вычислительной программы Microcal Origin 9.1. [126].

§ 2.3.1.2 Электрохимические измерения SWV

Общим для всех вольтамперметрических методов является наложение потенциала (E) на рабочий электрод и мониторинг результирующего тока (I), протекающего через электрохимическую ячейку. Во многих случаях, приложенный потенциал изменяется, а ток контролируется в течение определенного периода времени (t). Таким образом, все вольтамперные методы могут быть описаны как некоторая функция E, I, и t. [127,128]. Электрохимические измерения используют в основном для:

- Количественного определения органических и неорганических соединений в водных и неводных растворах
- Измерения кинетических констант и скоростей электрохимических процессов
- Определения адсорбции реагентов на поверхностях
- Определения механизмов реакции и передачи электронов
- Определения термодинамических свойств сольватированных частиц

- Фундаментальных исследования процессов окисления и восстановления в различных средах
- Определения количественных характеристик комплексообразования.

Аналитические преимущества различных методов вольтамперометрии заключаются в высокой чувствительности в широком линейном диапазоне концентраций как для неорганических, так и для органических соединений (10^{-12} до 10^{-1} М), большом ассортименте полезных растворителей и электролитов, широком диапазоне температур, быстром сканировании (в секундах), одновременном определении нескольких исследуемых веществ, возможности определения кинетических и электрохимических характеристик [128, 129]. Для вольтамперометрических измерений используют электрохимические ячейки. В электрохимической ячейке имеются электроды, которые могут представлять собой висящий ртутный капельный электрод (HMDE), тонкопленочный ртутный электрод (TMFE), стеклоуглеродный электрод (GCE) или угольный пастовый электрод (CPE). В последнее время часто используют модифицированные электроды и микроэлектроды. В качестве электрода сравнения, вместо ранее применявшейся донной ртути, сейчас используют электроды второго рода, например, каломельный или хлоридсеребрянный, а в качестве вспомогательного электрода используют платиновые или золотые электроды. В простейшем случае в вольтамперометрии регистрируют зависимость силы тока от величины приложенного напряжения, изменяющегося по линейному закону [130]. Схема классического устройства представлена на рис. 2.2

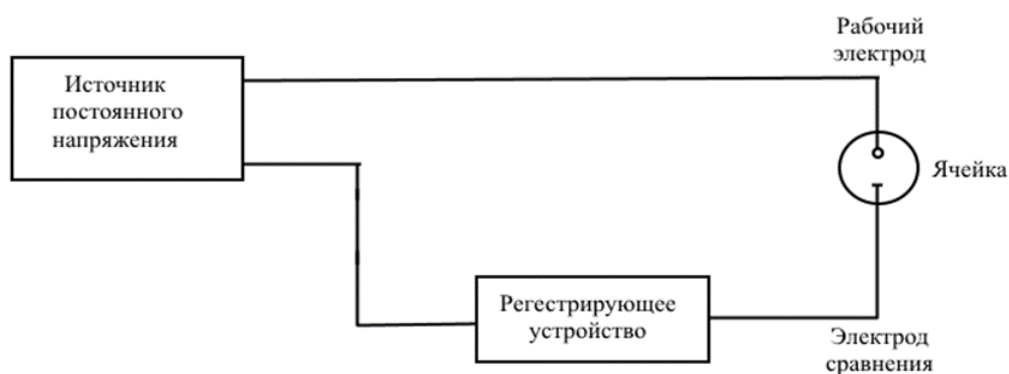


Рис 2.2 Схема двухэлектродного устройства для регистрации вольтамперограм [130].

Типичная электрохимическая ячейка представляет собой сосуд, в который помещаются образец, растворенный в растворителе - ионном электролите, и три (или иногда два) электрода. Ячейки (то есть держатели образцов) бывают различных размеров, форм и материалов. Тип используемой ячейки зависит от количества и типа образца, методики и от аналитических данных, которые должны быть получены. Материал ячейки (стекло, тефлон, полиэтилен) выбирают так, чтобы свести к минимуму реакции с образцом. На рис. 2.3 представлена схема трехэлектродной вольтамперометрической системы.

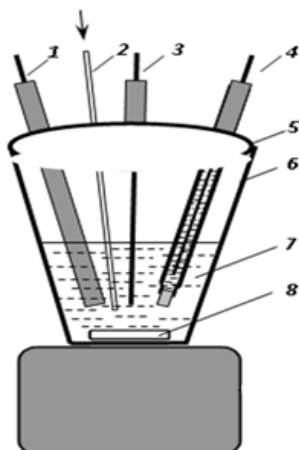


Рис. 2.3 Схема трехэлектродной вольтамперометрической системы (1) стеклоуглеродный электрод, (2) тефлоновая трубка, (3) платиновый электрод, (4) Ag/AgCl электрод, (5) фторопластовая крышка на которой фиксируются электроды, (6) стеклянный стакан, (7) исследуемый раствор, (8) покрытая фторопластом магнитная мешалка.

Для исследования антиоксидантного действия четырех структурно похожих флавоноидов - рутина, кверцетина, морина и нарингина в паре с аскорбиновой кислотой и тролоксом в водной среде (фосфатный буфер pH=7.4, T=37⁰C), кроме метода ORAC также использовался метод квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV). Данный метод использовался для исследований, поскольку обладает рядом преимуществ по сравнению с другими вольтамперометрическими методами. Квадратно-волновая вольтамперометрия обладает большей скоростью сканирования для выполнения экспериментов, чем нормальная и дифференциально-импульсная вольтамперометрии, которые обычно работают при скорости сканирования от 1 до 10 мВ/с. Квадратно-волновая вольтамперометрия обладает скоростью сканирования до 1 В/с или быстрее. Типичный эксперимент при использовании нормальной или дифференциально импульсной вольтамперометрии требует три минуты, а в случае квадратно-волновой вольтамперометрии сканирование может быть выполнено в течение нескольких секунд. Кроме того, данный метод обладает высокой чувствительностью порядка 10⁻⁸ М [128,131]. Измерения методом квадратно-волновой (SWV)

вольтамперометрии проводились посредством биоаналитической системы «Bioanalytical Systems» (BAS, США). Соответствующие SWV вольтамперограммы снимались с использованием трехэлектродной схемы, где в качестве рабочего электрода использовался стеклоуглеродный электрод сечением 0.09см^2 . Электрод перед измерениями очищался пудрой из Al_2O_3 , с размером частиц 0.5мкм , перед каждым измерением в течение 3 мин, электрод сравнения – насыщенный хлорсеребряный $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$, вспомогательный – платиновый электрод. При SWV вольтамперометрических измерениях исследуемых соединений в качестве фонового электролита использовался фосфатный буфер концентрации 0.1М . При калибровке электрохимической системы и измерениях окислительных потенциалов антиоксидантов, исследуемый раствор перед измерениями насыщался молекулярным азотом (99.99%) в течение 10 мин. Работу электрохимической анализирующей системы проверяли эталонным раствором $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, при калибровке которого значение коэффициента линейной корреляции составляло 0.9993. Объем исследуемого раствора составлял 3 мл (2.7 мл фосфатный буфер и 0.3 мл раствор ААРН), температура $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, частота сканирования 25 Гц, чувствительность $10\ \mu\text{A}/\text{V}$, квадратно-волновая амплитуда – 25 мВ. SWV вольтамперограммы снимались в диапазоне потенциалов от 0 до + 1600 мВ.

Кинетические исследования методом SWV расщепления компонентов или одного из компонентов со-антиоксидантной смеси проводились в условиях ORAC измерений за исключением флуоресцеина, при дополнительном наличии фонового электролита фосфатного буфера и при насыщении раствора воздухом. Все электроды, используемые в электрохимической ячейке, входили в комплект биоаналитического комплекса «BAS 100B/W». [132]

§ 2.3.2 Влияние среды-диметилсульфоксида на электрохимические и антирадикальные свойства флавоноидов и тролокса

§ 2.3.2.1 ДФПГ кинетический анализ

Этот метод был разработан Блоисом в 1958 [133] для определения антирадикальной активности и емкости с использованием стабильного свободного радикала 2,2-дифенил-1-(2,4,6-тринитрофенил) гидразила. Анализ основан на измерении поглотительной способности

антиоксидантов по отношению к ДФПГ. В видимой области спектра ДФПГ, растворенный в этаноле, имеет максимум поглощения при 520 нм. При взаимодействии ДФПГ с антиоксидантами (рис.2.4) наблюдается понижение интенсивности поглощения [133]. Взаимодействие ДФПГ с антиоксидантом происходит по следующему механизму. Молекула антиоксиданта передает атом водорода радикалу (реакция 2.1). Затем образовавшийся радикал антиоксиданта взаимодействует со второй молекулой ДФПГ в параположении фенильного заместителя (реакция 2.2). При этом происходит обесцвечивание раствора ДФПГ от темно фиолетового до светло желтого [134].

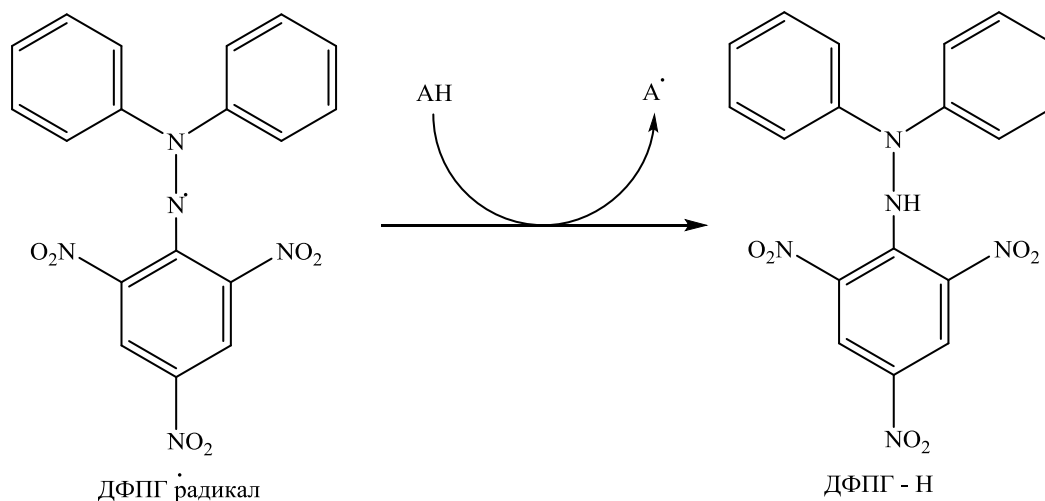
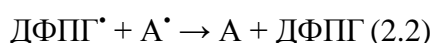
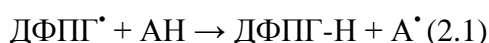


Рис. 2.4. Взаимодействие ДФПГ с антиоксидантом

Данный метод обладает рядом преимуществ: быстрота, простота выполнения, высокая чувствительность, высокая воспроизводимость и доступность.

§ 2.3.2.2 Электрохимические измерения DPV

При электрохимическом исследовании влияния среды-диметилсульфоксида на электрохимические и антирадикальные свойства аскорбиновой кислоты использовался метод дифференциально-импульсной вольтамперометрии (DPV). Дифференциально- импульсные измерения были проведены с помощью электрохимического биоаналитического комплекса «BAS 100B/W» с использованием трехэлектродной ячейки, которая состоит из рабочего стеклоуглеродного электрода (3мм в диаметре), платинового вспомогательного электрода и насыщенного хлорсеребрянного Ag/AgCl/KCl, в качестве электрода сравнения. Перед

каждым измерением стеклоуглеродный электрод очищался порошком оксида алюминия, размером частиц 0,5мм, затем промывался деионизированной водой. Измерения проводились в электрохимической ячейке при температуре $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, которая для удаления кислорода перед экспериментом продувалась азотом (99.99%) примерно 10 мин. Все электроды, используемые в электрохимической ячейке, входили в комплект биоаналитического комплекса «BAS 100B/W». Концентрация аскорбиновой кислоты составляла 1.2×10^{-4} М и держалась неизменной. К раствору аскорбиновой кислоты в малых количествах - 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 и 4.0 М добавлялся растворитель диметилсульфоксид. Измерения проводились в диапазоне от -400 до 1000 мВ в растворе фонового электролита NaCl с концентрацией 0.1 М при скорости сканирования $20 \text{ мВ} \times \text{с}^{-1}$, амплитуде импульса 50 мВ, длительности импульса 50 мс и периоде импульса 200мс. Работа электрохимической анализирующей системы проверялась эталонным раствором $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, при калибровке которого значение линейного коэффициента корреляции составляло 0.9991 [135].

§ 2.3.2.3 Спектрофотометрические измерения

При спектрофотометрическом исследовании влияния среды-диметилсульфоксида на электрохимические и антирадикальные свойства биофлавоноидов, тролокса и аскорбиновой кислоты использовался УФ-Вид спектрофотометр Specord-205 D. Вначале ДФПГ* растворялся в очищенном этаноле для приготовления маточного раствора с концентрацией 1.25×10^{-4} моль/л. Затем растворы ДФПГ* были приготовлены с использованием в качестве растворителей этанола и ДМСО в объемном соотношении 1/1 и 1/4. Образцы антиоксидантов также были приготовлены в соответствующих растворителях. Концентрация антиоксидантов в маточном растворе составляла 1.2×10^{-5} М, для стабильного радикала ДФПГ* 1.25×10^{-4} М соответственно. Антиоксиданты добавлялись в реакционную смесь объемом 1.5мл (1.5 мл (1.25×10^{-4} моль/л) раствора ДФПГ*) в следующих количествах: рутин - 1.5мл (1.2×10^{-5} М), кверцетин - 1.5мл (1.2×10^{-5} М), морин - 1.5мл (1.2×10^{-5} М), нарингин - 1.5мл (1.2×10^{-5} М), аскорбиновая кислота - 1.5мл (1.2×10^{-5} М), тролокс - 1.5мл (1.2×10^{-5} М). Конечные концентрации антиоксидантов и ДФПГ* равны (6×10^{-6} М) и (6.25×10^{-4} М), соответственно. Поглощение ДФПГ* измерялось при $\lambda=516, 520$ и 526 нм, соответственно спустя десять секунд после быстрого смешивания растворов [135].

Для вычисления антиоксидантной, в частности, антирадикальной емкости АК, использовалось уравнение 2.2:

$$f = \frac{[\text{ДФПГ}]_0 - [\text{ДФПГ}]_\infty}{[\text{АН}]_0} = \frac{(D_0 - D_\infty)}{D_0} \times \frac{[\text{ДФПГ}]_0}{[\text{АН}]_0} \quad (2.2)$$

где $[\text{ДФПГ}]_0$, $[\text{ДФПГ}]_\infty$, D_0 и D_∞ - концентрации ДФПГ и оптические плотности ($\lambda=520$ нм) в начальный момент времени и после завершения реакции соответственно $[\text{АН}]_0$ - концентрация антиоксиданта в начальный момент времени.

§ 2.3.3 Связывание ДНК с биофлавоноидами. Антирадикальная защита ДНК биофлавоноидами

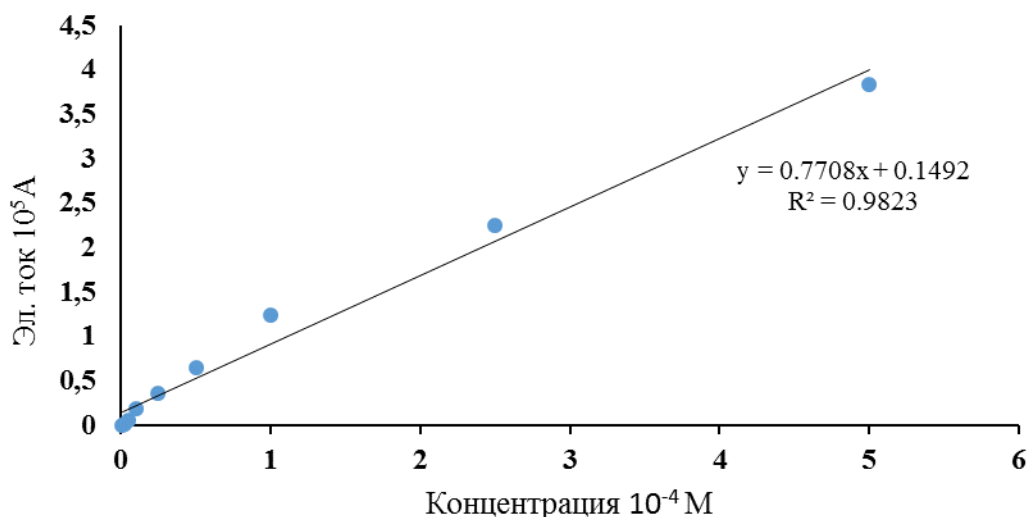
§ 2.3.3.1 Связывания ДНК с биофлавоноидами. Электрохимические измерения

Константы комплексообразования и число сайтов связывания биофлавоноидов - рутина, кверцетина и морина с ДНК тимуса теленка определялись методом прямого титрования, т.е. к раствору флавоноидов небольшими порциями добавлялся раствор ДНК тимуса теленка (рабочий раствор). Измерения проводились в растворах NaCl с ионными силами 0.002, 0.02 и 0.154М при температуре $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ с использованием электрохимического биоаналитического комплекса «BAS 100B/W» с трехэлектродной ячейкой (3C cell stand), которая состояла из рабочего стеклоуглеродного электрода (3мм в диаметре), платинового вспомогательного и насыщенного хлорсеребряного Ag/AgCl/KCl электрода, (в качестве электрода сравнения), используя метод SWV. Измерения проводились в диапазоне от 0 до 1600 мВ при следующих параметрах SWV - частота сканирования 25Гц, чувствительность 10μА/В, амплитуда 25мВ [136].

§ 2.3.3.2 Методика исследования комплексообразования в системе ДНК-флавоноид

Биофлавоноиды были растворены в очищенном этаноле 96%. Концентрация биофлавоноидов в маточном растворе составляла 2×10^{-4} М. Начальная концентрация флавоноидов в растворе составляла 2×10^{-6} М. а маточный водный раствор ДНК имел концентрацию 1.06×10^{-3} М. Раствор ДНК добавлялся в раствор с флавоноидом малыми объемами с использованием автопипеток (от 0.5 до 5 мкл и от 5 до 50 мкл Ependorf, USA) и одноразовых наконечников. Начальный объем раствора составлял 3мл, а конечный 3.6мл.

Понижение концентрации флавоноидов регистрировалось путем измерения силы тока анодного окислительного формального потенциала флавоноидов (рутин 330 ± 20 мВ, кверцетин 305 ± 20 мВ и морин 296 ± 20 мВ). Также были получены графики зависимости силы тока анодного окислительного формального потенциала флавоноида от его концентрации (значение линейного коэффициента корреляции составляло 0.98). На рис.2.5 приведен пример линейной зависимости силы тока от концентрации для рутина



[136].

Рис.2.5 Зависимость силы тока от концентрации рутина, при температуре 37⁰С и рН = 7.4.

§ 2.3.3.3 Определение параметров связывания флавоноидов с ДНК

Изотермы связывания флавоноидов с ДНК были построены в координатах Скэтчарда (r/C_f от r , $r = C_b/C_p$, где C_b – концентрация лиганда связанного с молекулой ДНК и $C_b = C_0 - C_f$, где C_0 - начальная концентрация лиганда, C_f - концентрация свободных молекул лиганда в растворе и C_p - концентрация фосфатных групп ДНК). Экспериментальные кривые связывания анализировали с помощью метода регрессионного анализа теоретических кривых, полученных из уравнения Crothers-a 2.2. [137, 138].

$$r / C_f = K (1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1} \quad (2.2)$$

Уравнение трансформировано Аракеляном и соавторами [139] для случая двух типов взаимодействия лиганд - ДНК.

$$r / C_f = K [1 - (2n-1)r] \quad (2.3)$$

Значения константы комплексообразования K и числа сайтов связывания n определялись из изотерм адсорбции согласно уравнению (2.3) [136].

§ 2.3.3.4 Антирадикальная защита ДНК от окислительных повреждений, индуцированных ААРН

ААРН-иницированное окисление ДНК в присутствии и отсутствии антиоксидантов проводилось в соответствии с известными методиками [140] с незначительными изменениями. ДНК и ААРН растворяли в фосфатном буфере pH=7.4. Концентрация ДНК выражалась в единицах миллиграмм ДНК на миллилитр фосфатного буфера. Маточные растворы антиоксидантов готовили растворением их в очищенном этаноле с концентрацией 1.1×10^{-3} М. Смешанные растворы готовились добавлением растворов антиоксидантов (флавоноиды, аскорбиновая кислота, витамин Е) в фосфатно-буферный раствор ДНК. Готовились две серии растворов с двумя различными концентрациями антиоксидантов: 1.1×10^{-4} и 1.1×10^{-5} М. Конечная концентрация ДНК составляла 1.1×10^{-3} М. Пробирки объемом 2 мл, содержащие исследуемые растворы инкубировались в термостате при 37°C в течение 60 мин. Затем в полученные растворы (антиоксидант, ДНК) добавлялся раствор ААРН. Конечная концентрация ААРН составляла 1.53×10^{-2} М. Объем конечных растворов (антиоксидант, ААРН, ДНК) составлял 1 мл. В качестве контрольных использовались два раствора: первый не содержал ААРН, а второй антиоксидант. Исследуемые растворы после добавления ААРН инкубировались при 37°C в течение 60 мин. После инкубирования проводился агарозный гель (0.4%) горизонтальный электрофорез по описанному методу [141-142].

Для обнаружения повреждений с помощью гель-электрофореза 25 мл образца наносили на гель агарозы. Фрагменты ДНК разделяли на 1% агарозном геле в TAE буферной среде с помощью электрофореза при 75 В в течении 1.5 часа. Возможное повреждение ДНК было обнаружено с помощью УФ-просвечивания после окрашивания бромистым этидием (0,5 мг / мл) в течение 30 мин. Денситометрический анализ фрагментированной ДНК проводился с использованием программного обеспечения Biocart (Vilber Lourmat, Франция).

ГЛАВА 3. АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БИОФЛАВОНОИДОВ. НЕАДДИТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ СМЕСЕЙ БИОФЛАВОНОИДОВ С ТРОЛОКСОМ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Материалы данной главы опубликованы в [126,143].

Химическое поведение флавоноидов в качестве антиоксидантов стало предметом интенсивных исследований. Флавоноиды широко представлены в растениях, в основном фруктах, овощах, чае и т.д. [144]. Они представляют собой обширный класс соединений, содержащих несколько фенольных гидроксильных групп, присоединенных к кольцевой структуре, придающих антиоксидантные свойства [145-149]. Было установлено, что эти соединения могут нейтрализовать свободные радикалы и другие активные формы кислорода в организме [150-152]. Этим обусловлены их полезные свойства предотвращать патологии окислительного стресса. В случае одновременного присутствия разных экзогенных и эндогенных антиоксидантов в окислительных системах часто наблюдаются эффекты синергизма и антагонизма (повышение и понижение антиоксидантных характеристик смесей антиоксидантов, соответственно) [126]. Эти явления играют важную роль в процессах предотвращения и регуляции пероксидного окисления разных субстратов организмов, растений и пищи [150-156]. При действии смеси нескольких антиоксидантов и проявляется их неаддитивное кооперативное антиоксидантное воздействие: синергизм или антагонизм. Это относится к случаю, когда смесь антиоксидантов проявляет соответственно большие (синергизм) или меньшие (антагонизм) антиоксидантные свойства, чем сумма антиоксидантных эффектов индивидуальных соединений взятых в тех же концентрациях, что и в смеси [153-162]. Флавоноиды главным образом водорастворимы и представлялось актуальным исследование их антиоксидантных свойств в смеси с важными водорастворимыми антиоксидантами – аскорбиновой кислотой и тролоксом. Действие тролокса имитирует возможное синергическое антиоксидантное воздействие жирорастворимого антиоксиданта α -токоферола, действующего в комбинации с водорастворимыми антиоксидантами в полярной части мембран клеток [31].

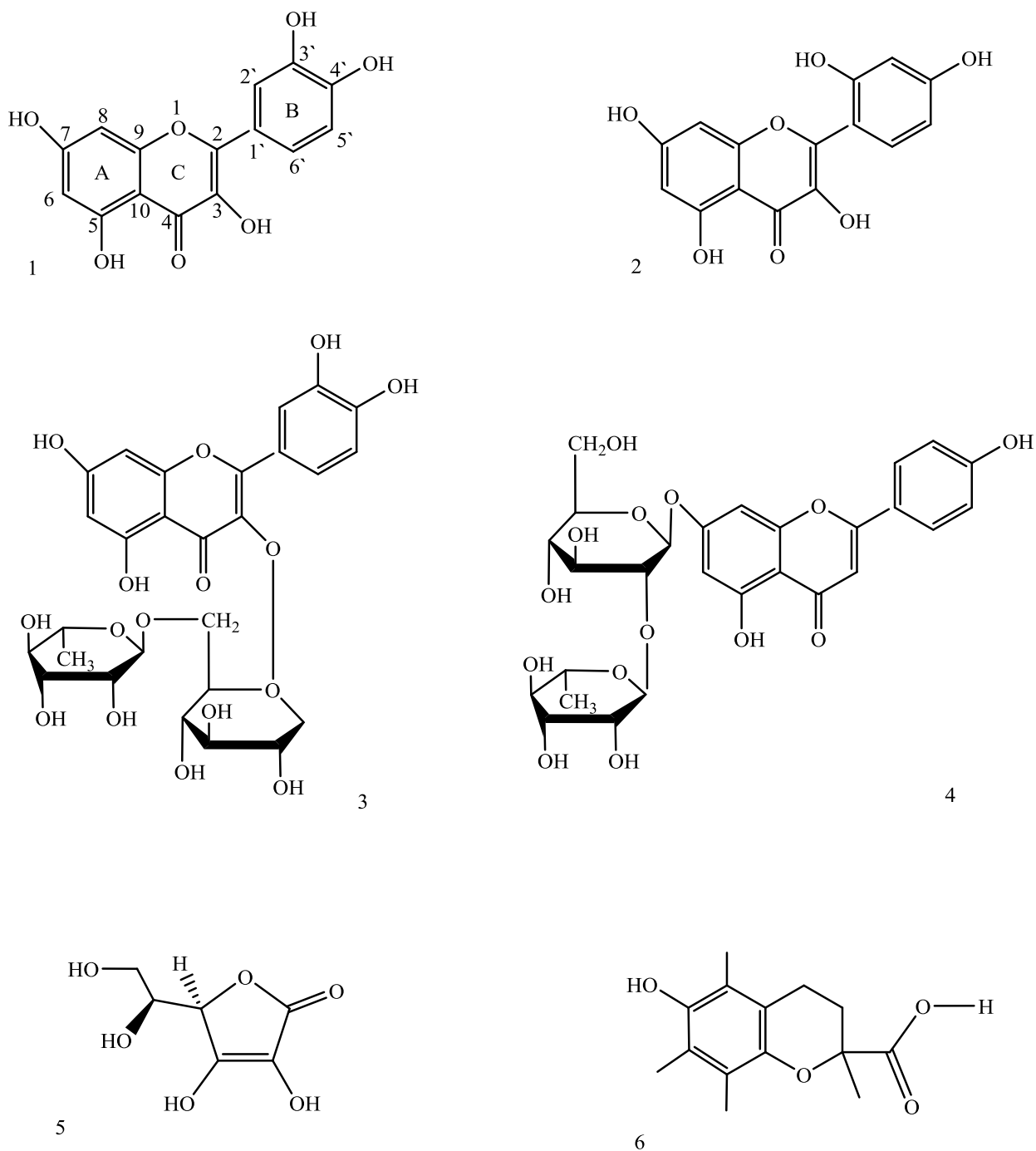


Рис. 3.1. Молекулярные структуры используемых антиоксидантов: кверцетин (1), морин (2), рутин (3), нарингин (4), аскорбиновая кислота (5), тролокс (6).

Явлению синергизма в смеси биоантиоксидантов, включая флавоноиды, посвящено множество исследований [153-162,165,166]. Главным образом явление синергизма объясняется регенерацией активного антиоксиданта арилоксильным радикалом более пассивного со-антиоксиданта, по аналогии с хорошо известным синергическим эффектом между α -токоферолом и аскорбиновой кислотой [164]. Как нам представляется, такое

объяснение в большей степени относится к антиоксидантной активности, характеризующей степень ингибирующего воздействия антиоксидантов на скорость окисления субстратов. Зачастую в качестве параметра антиоксидантной способности выступает антирадикальная емкость. Антипероксирадикальная емкость характеризует количество пероксирадикалов, захватываемых молекулой антиоксиданта. В этом случае при описании неаддитивного действия со-антиоксидантов следует более детально учитывать прооксидантные реакции с участием антиоксидантов и их интермедиатов, а также их кинетическое поведение в периоде индукции цепной реакции окисления липидов. В настоящей работе в качестве основной характеристики антиоксидантных способностей исследуемых соединений и их бинарных систем взята антипероксирадикальная емкость (*f*).

Пероксильные радикалы являются основными носителями цепи цепной реакции пероксидного окисления липидов мембран клеток. Как отмечалось, неконтролируемая интенсификация процессов пероксидного окисления липидов мембран клеток приводит к патологиям окислительного стресса. Исследуемые соединения являются регуляторами пероксидного окисления липидов, выступая как антиоксиданты обрыва цепи, захватывая носители цепи – пероксильные радикалы [144].

В качестве основного метода определения антипероксирадикальной емкости выбран кинетический метод определения поглощающей емкости по отношению к кислород-центрированным радикалам (ORAC) [122]. Его выбор обусловлен следующим обстоятельством. В целом неаддитивное действие смеси антиоксидантов обусловлено их совместным системным поведением в реакционной смеси. Эффект неаддитивности (синергизм, антагонизм) действия антиоксидантов во многом зависит от природы самой реакционной смеси. Нам представляется, что следует различать два типа неаддитивного действия смеси антиоксидантов, которые проявляются:

1. при наличии прооксидантных реакций, способствующих окислению с участием исходных антиоксидантов и их интермедиатов;
2. в отсутствие прооксидантных реакций с участием антиоксидантов и их интермедиатов.

Метод ORAC позволяет исследовать неаддитивные антирадикальные свойства смеси антиоксидантов, в целом, при отсутствии реакций прооксидантного характера. Это дает возможность поэтапно вникнуть в сложный механизм неаддитивного действия смеси антиоксидантов.

В работе наряду с методом ORAC использовался также электроаналитический метод квадратно-волновой вольтамперометрии, и в идентичных условиях отслеживалась кинетика расходования, по крайней мере, одного из компонентов смеси антиоксидантов. Эти исследования проводились для облегчения интерпретации данных, полученных методом ORAC.

В данной главе ставилась цель исследовать совместное антиоксидантное действие четырех структурно родственных биофлавоноидов: рутина, кверцетина, морина и нарингина в паре с аскорбиновой кислотой и тролоксом в водной среде (фосфатный буфер, $T=37^{\circ}\text{C}$), методами ORAC и SWV. Одновременно преследовалась цель предложить химический механизм неаддитивных эффектов в исследуемых смесях антиоксидантов. Структура флавоноидов имеет общую черту - она представлена тремя кольцами, которые обозначены А, В и С. Присутствие двойной связи, карбонильной и гидроксильной групп или группы сахара в пиранильном кольце С, а также замещение в кольцах А и В гидроксильными группами также, отличает индивидуальные соединения [148,163,164]. Структурные формулы исследуемых антиоксидантов представлены на рис. 3.1.

На рис. 3.2 (а и б) приведены экспериментальные данные, полученные методом ORAC - типичные кинетические кривые расходования флуоресцеина в реакции с пероксильными радикалами, генерируемыми термическим распадом водорастворимого термоазоинициатора ААРН в отсутствие и в присутствии антиоксидантов.

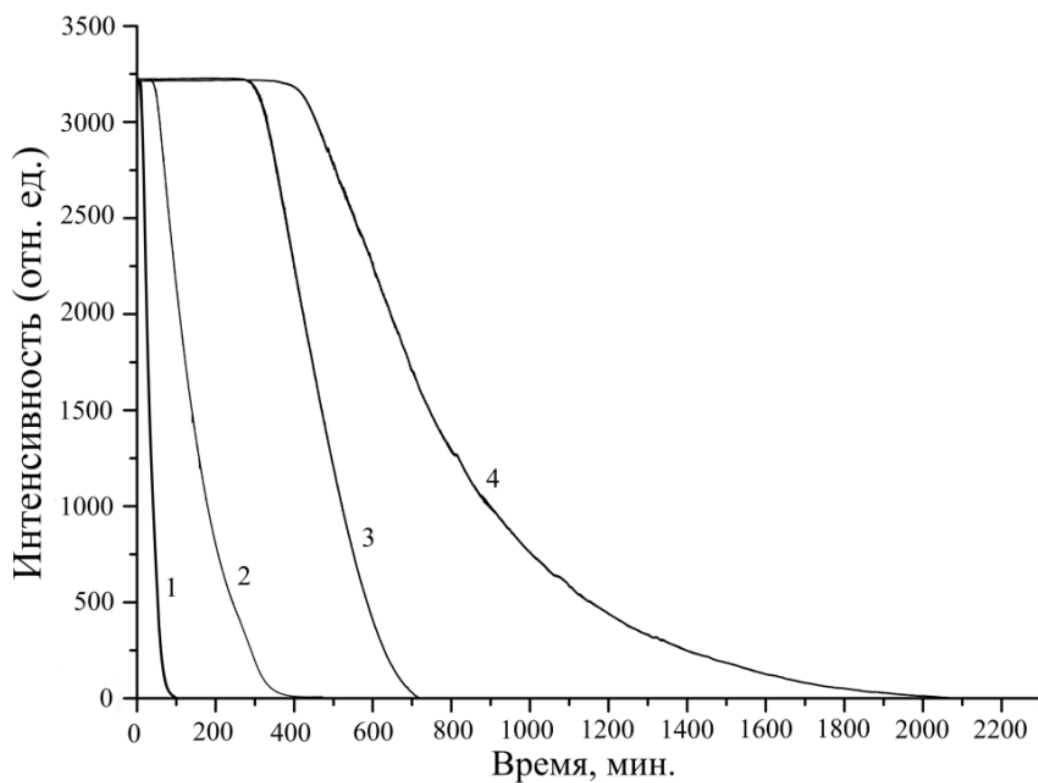


Рис. 3.2а. Кинетические кривые уменьшения интенсивности флуоресценции FL при 515нм в результате реакции с пероксильными радикалами в отсутствие (1) и в присутствии антиоксидантов: тролокс (2), рутин (3), смеси рутин – тролокс (4) при температуре 37⁰С. [AAPH]₀ = 1.53 × 10⁻²М, (суммарная скорость образования 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.

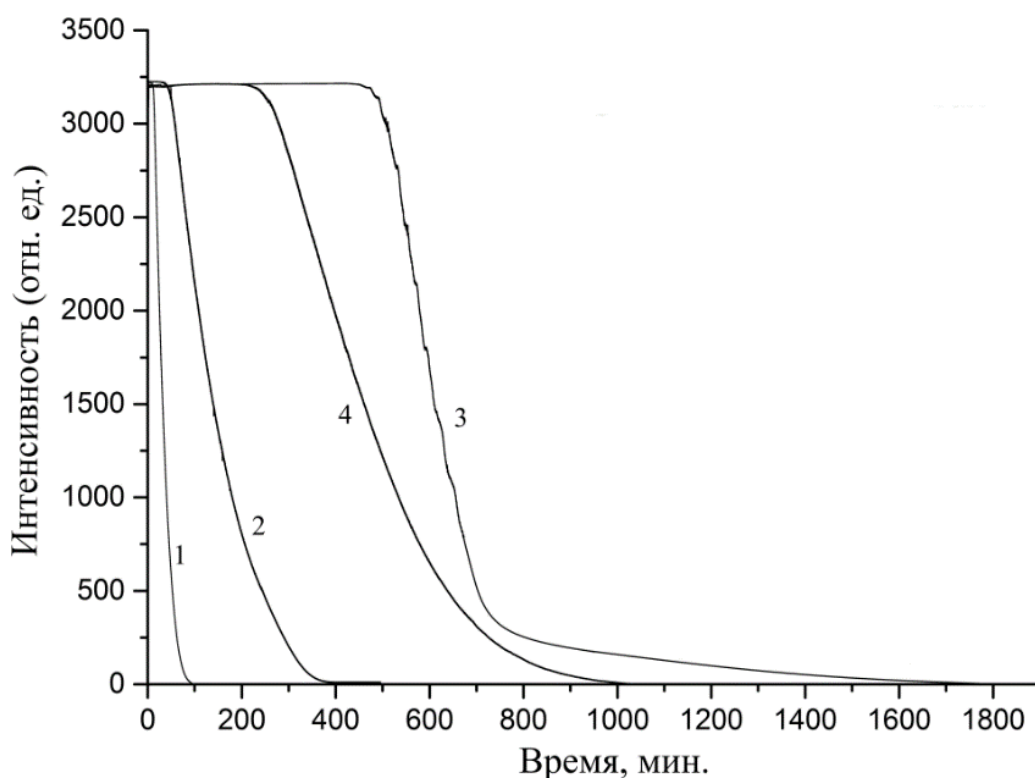


Рис. 3.2б. Кинетические кривые уменьшения интенсивности флуоресценции F1 при 515 нм в результате реакции с пероксильными радикалами в отсутствие (1) и в присутствии антиоксидантов: тролокс (2), кверцетин (3), смесь кверцетин – тролокс (4). Условия эксперимента те же, что и в подписи к рис. 3.2а.

На основании кинетических данных расходования FL, инициированного ААРН в отсутствие и в присутствии антиоксидантов, вычислены антипероксирадикальные емкости как индивидуальных антиоксидантов, так и их смесей. В таблице 3.1 приведены величины антипероксирадикальных емкостей в тролоксовом эквиваленте. Величина неаддитивного действия (НАД) бинарной смеси антиоксидантов рассчитывалась по формуле:

$$\text{НАД} = \frac{f_{\text{mix}} - (f_{\text{FIOH}} + f_{\text{A}})}{f_{\text{FIOH}} + f_{\text{A}}} \times 100\%, \quad (3.1)$$

где f_{mix} , f_{FIOH} и f_{A} – антипероксирадикальные емкости смеси антиоксидантов - флавоноида и со-антиоксиданта и отдельных антиоксидантов, соответственно.

Табл. 3.1. Значения антипероксирадикальных емкостей антиоксидантов и их бинарных смесей в тролоксовом эквиваленте, а также степень со-антиоксидантного (синергического,

| Антиоксидант | f_A | $f_{(\text{antioxidant} + \text{Trolox})}$ | $f_{(\text{antioxidant} + \text{AA})}$ | %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 |

антагонического) эффекта, определенные методом ORAC. Концентрации антиоксидантов, взятые в отдельности и в смесях, равны 5×10^{-6} М. Температура 37°C .

*В скобках приведена сумма f_A со-антиоксидантов.

Табл. 3.2. Потенциалы окисления антиоксидантов относительно Ag/AgCl, определенные методом SWV и рассчитанные квантохимическим PM6 методом значения BDE [167] наиболее активных для нейтрализации радикалов фенольных ОН групп. E_{p1} и E_{p2} – первый и второй пики окисления, соответственно.

| Антиоксиданты | Потенциалы окисления | | BDE | Наиболее активные группы для захвата радикалов |
|-------------------------|------------------------|-----|----------|--|
| | мВ E_{p1} и E_{p2} | | кДж/моль | |
| рутин | 230 | - | 311.39 | 4'-ОН |
| кверцетин | 115 | 235 | 295.69 | 4'-ОН |
| морин | 160 | - | 322 | 3-ОН |
| нарингин | 680 | 930 | 337.91 | 4'-ОН |
| аскорбиновая кислота | 220 | - | - | - |
| тролокс | 124 | - | 312.1 | ОН |

Из приведенных в таблицах 3.1 и 3.2 данных следуют следующие закономерности:

1. В смесях флавоноидов имеющих в структуре гликозиды (рутин, нарингин) с тролоксом и аскорбиновой кислотой наблюдается положительное неаддитивное со-антиоксидантное действие – синергизм.
2. В смесях кверцетина и морины, в молекулах которых отсутствуют гликозиды с тролоксом и аскорбиновой кислотой наблюдается отрицательное неаддитивное антипероксирадикальное действие – антагонизм.
3. Значение потенциала окисления флавоноидов и BDE наиболее реакционно способной ОН связи, в структуре которых присутствует гликозид, относительно высокое.
4. В смеси тролокса и аскорбиновой кислоты наблюдается синергизм, что созвучно с известными результатами антирадикального действия смеси аскорбиновой кислоты с α -токоферолом - структурным жирорастворимым аналогом тролокса [31].

Как нам представляется, более высокое значение потенциала окисления и BDE при наличии в структуре гликозида обусловлено наличием внутримолекулярных водородных связей между атомами водорода фенольных ОН групп, ответственных за реакции с радикалами, с параэлектродонорными атомами кислорода дисахаридного остатка. Известно, что образование водородных связей с участием атома водорода фенольной ОН группы снижает как их реакционную способность по отношению к свободным радикалам, так и повышает величину потенциала окисления [168-170]. В работе [173], согласно квантохимическим данным, увеличение BDE, что часто коррелирует со значением окислительного потенциала катехольных ОН групп, связывают со стерическими затруднениями создаваемыми рамногликозидом для этих дигидроксильных групп. Из таблицы 3.1 следует также, что при идентичных структурах флавоноидов (кверцетин, рутин) наличие 3-О- гликозида у рутина снижает также величину антипероксирадикальной емкости. В целом известно, что гликозилирование группы 3-ОН значительно снижает антиоксидантную активность 3-гидроксифлавона [171-174].

Были проведены также кинетические исследования методом SWV расходования компонентов или одного из компонентов со-антиоксидантной смеси в условиях ORAC измерений при отсутствии флуоресцеина и получены следующие данные. Аналитические пики окисления антиоксидантов, регистрируемые методом SWV приведены на рис. 3.3.

Наиболее интенсивный аналитический сигнал SWV кверцетина и рутина связан с обратимым двухэлектронным окислением катехольных дигидроксильных групп кольца В рис.3.4 [175,176]:

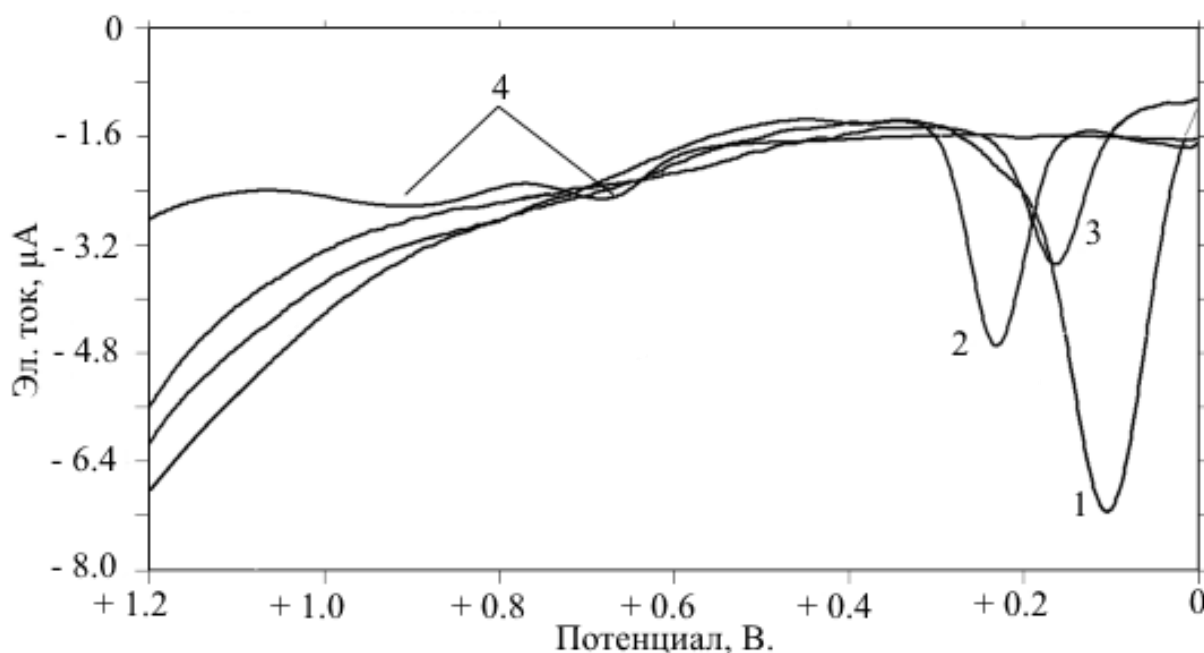


Рис. 3.3. SWV вольтамперограммы кверцетина (1), рутина (2), морины (3) и нарингина (4) при частоте сканирования 25Гц. Концентрация флавоноидов 5×10^{-6} М, фосфатный буфер 0.1М, рН = 7.4.

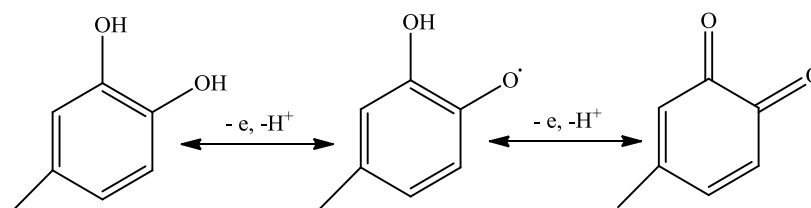


Рис.3.4 Механизм окислительно-восстановительных процессов кольца В кверцетина и рутина.

В условиях исследований при исходных концентрациях антиоксидантов 5×10^{-6} М только в смеси рутина с тролоксом удалось одновременно следить за кинетикой расходования обоих антиоксидантов (рис.3.5). В остальных случаях определялась кинетика расходования флавоноидов: кверцетина, морины. Это было обусловлено различной вольтамперометрической чувствительностью к антиоксидантам, а в некоторых случаях наложением пиков окисления при различной интенсивности тока.

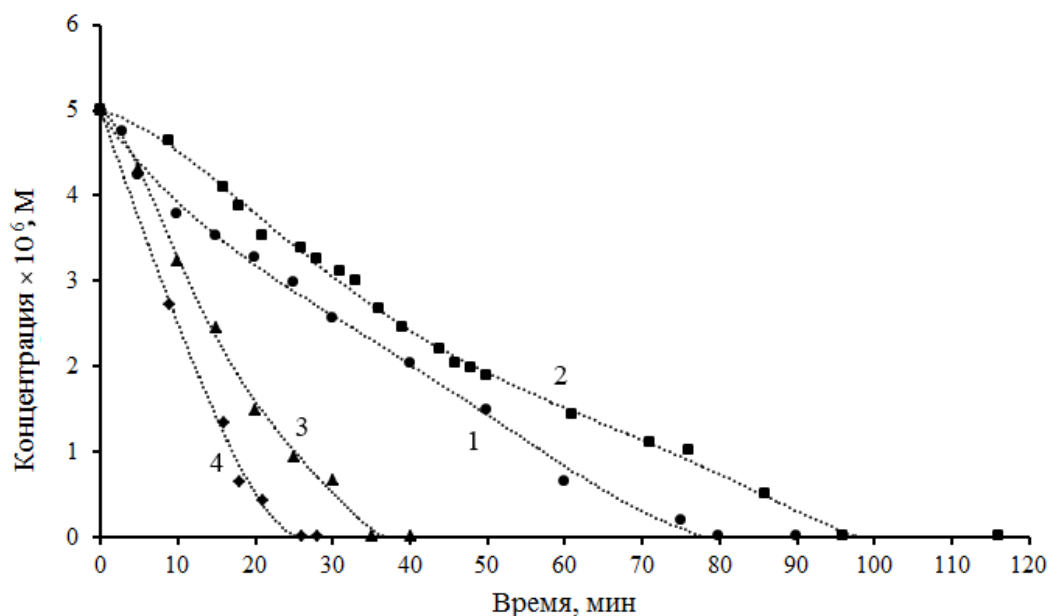


Рис. 3.5. Кинетические кривые расходования антиоксидантов – рутина в отсутствие тролокса (1), в присутствии тролокса (2), расходования тролокса в отсутствие (3) и в присутствии (4) рутина. $[AAPH]_0 = 1.53 \times 10^{-2}M$, фосфатный буфер 0.1M, pH = 7.4.

Как следует из данных рис. 3.5 время практически полного расходования тролокса в отсутствие рутина ~38мин совпадает с периодом индукции реакции расходования флуоресцеина в присутствии тролокса ~40мин (рис. 3.2), определенным методом ORAC. Это свидетельствует о соответствии данных полученных методами ORAC и кинетическими исследованиями с использованием SWV.

Из рис. 3.5 также видно, что введение в реакцию смесь, содержащую рутин, тролокса - приводит к замедлению расхода рутина. Аналогичная картина наблюдалась для смеси рутин – аскорбиновая кислота. При этом удалось выявить ускорение расхода тролокса. По-видимому, увеличение скорости расхода тролокса и соответствующее замедление уменьшения концентрации рутина является причиной синергизма смеси антиоксидантов.

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 (рис. 3.6) ускоряют расход кверцетина. Видимо этим и вызван антагонистический эффект в смесях кверцетина с тролоксом и аскорбиновой кислотой.

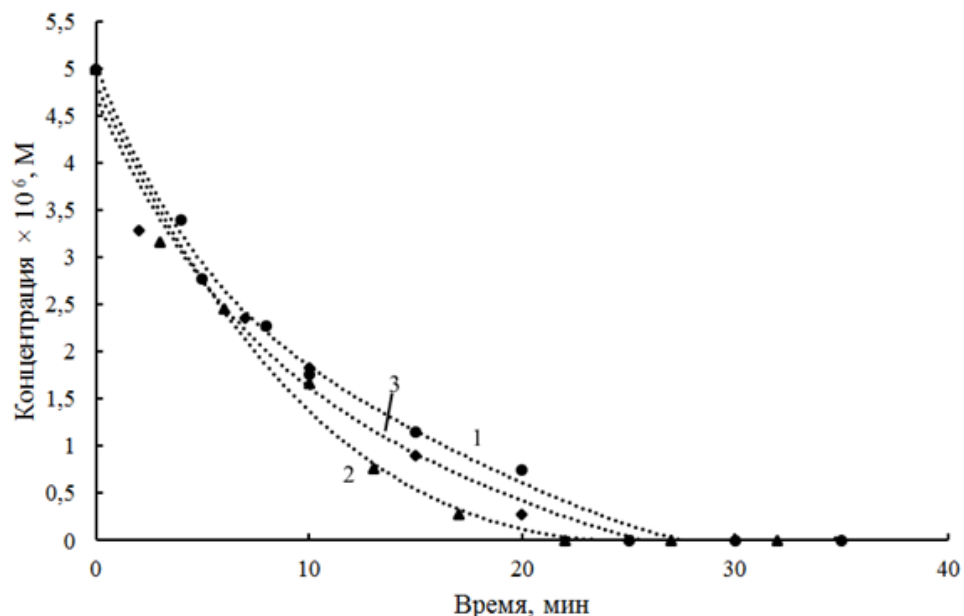


Рис. 3.6. Кинетические кривые расходования кверцетина в отсутствие (1) и присутствии тролокса (2) и аскорбиновой кислоты (3). Условия те же, что для рис. 3.5.

Таким образом, при наличии в структуре флавоноидов дисахарида (рутин, нарингин), в их смесях с со-антиоксидантами тролоксом и аскорбиновой кислотой наблюдается синергический эффект. Одновременно, как следует из таблицы 3.2, в этих соединениях выше величины энергии связи (BDE) наиболее реакционноспособных фенольных ОН групп и потенциала окисления относительно Ag/AgCl. Это приводит к уменьшению антирадикальных и соответственно антиоксидантных способностей флавоноидов. На примере рутина реакция идущая по механизму переноса атома водорода (Hydrogen Atom Transfer (HAT)) с носителем цепи процессов пероксидного окисления липидов с пероксильными радикалами ($LOO^{\bullet} \equiv ROO^{\bullet}$), представлена в схеме 3.1.

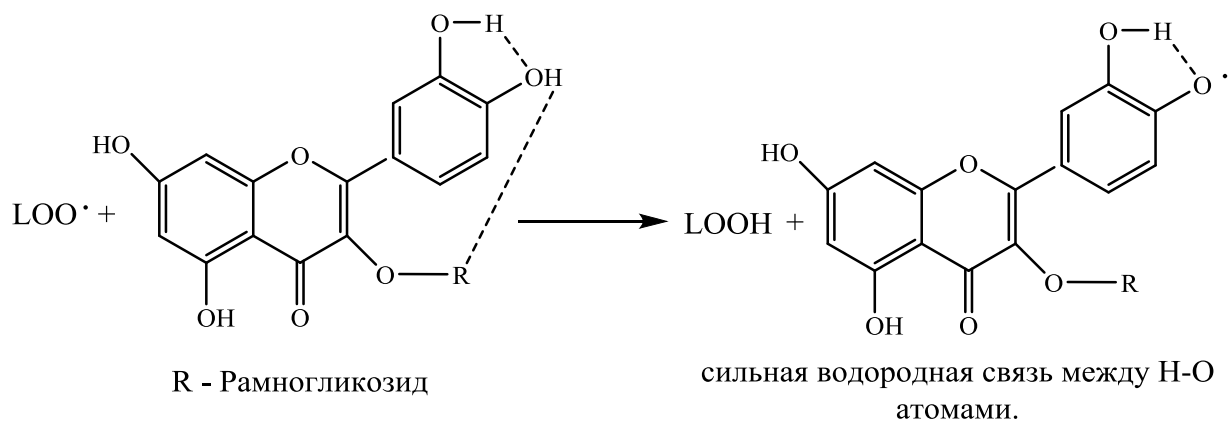
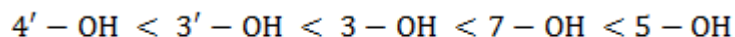


Схема. 3.1 Реакция рутина с ROO^\bullet , идущая по механизму переноса атома водорода.

Механизм НАТ предполагает, что фенол передает атом водорода непосредственно радикалу, образуя связанный с ним феноксильный радикал. Причем, согласно [177], при наличии НАТ механизма происходит упрочнение внутримолекулярной водородной связи, образованной между атомом кислорода гидроксильной группы и кислородом обладающего неподеленными парами электронов на 21.8кДж/моль в феноксильном радикале флавоноида, содержащего в В кольце катехольную дигидроксильную группу. Эта величина является количественной мерой ортогидроксильного электронного эффекта, приводящего к повышению реакционной способности катехольных ОН групп.

Первичная антирадикальная активность флавоноидов контролируемая механизмом НАТ и обусловлена значениями BDE гидроксильных групп. То есть, вначале вступают в реакцию с пероксильными радикалами гидроксильные группы с низким значением BDE. Согласно данным, полученных DFT (Density Functional Theory) [178], BDE ОН групп кверцетина изменяется в следующей последовательности:



Примечательно также, что скорость расходования рутина существенно меньше чем у его молекулярного аналога кверцетина, в составе которого отсутствует гликозид (рис. 3.5 и 3.6). Это не связано с неполным захватом рутином генерируемых пероксильных радикалов из-за относительно низкого значения BDE - фенольных ОН групп. Как показали эксперименты скорость расходования рутина практически не изменяется с увеличением исходной концентрации рутина (рис.3.7). Полученный результат свидетельствует о том, что все генерируемые пероксильные радикалы полностью захватываются рутином (рис. 3.7).

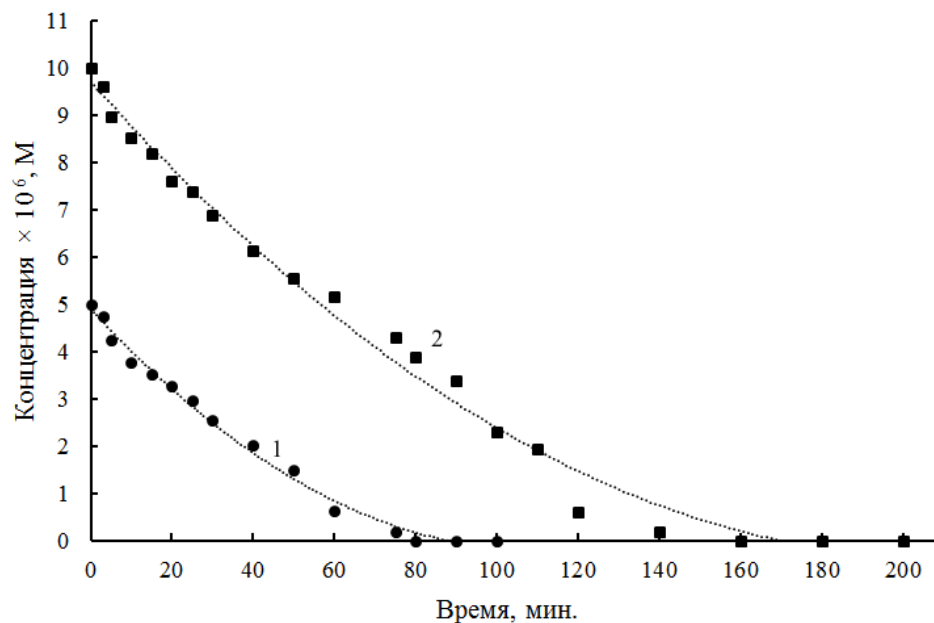


Рис. 3.7. Кинетические кривые расщедования – рутина при различных концентрациях (1) 5×10^{-6} М и (2) 1×10^{-5} М в отсутствии со-антиоксиданта. Условия те же, что для рис. 3.5.

Согласно данным работы [173], 3-О-гликозид в молекуле рутина может участвовать во внутримолекулярной реакции НАТ, приводя к восстановлению электрохимически активных – аналитически регистрируемых катехольных дигидроксильных групп. Это приводит к замедлению скорости уменьшения регистрируемого SWV пика окисления рутина.

Рассмотрим кинетические модели реакции, объясняющие явления синергизма и антагонизма смеси тролокса (ТН) с флавоноидами (FIOH). При этом предполагается, что в реакции участвует ОН группа флавоноида с наименьшим BDE.

Схема 3.2. 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. $FIO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow \text{нерадик. продукты}$

Схема 3.3. Антагонизм (кверцетин, морин)

1. $\text{ROO}^\bullet + \text{TH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{T}^\bullet$
2. $\text{T}^\bullet + \text{ROO}^\bullet \rightarrow \text{ROOT}$
3. $\text{ROO}^\bullet + \text{FIOH} \rightarrow \text{FIO}^\bullet + \text{ROOH}$
4. $\text{T}^\bullet + \text{FIO} \rightarrow \text{TH} + \text{FIO}^\bullet$
5. $\text{T}^\bullet + \text{FIO}^\bullet \rightarrow \text{нерадик. продукты}$

Кинетическая модель 3.2, относящаяся к синергизму совместного действия антиоксидантов, объясняет более быстрый расход тролокса в смеси. Из-за более прочной гидроксильной ОН связи флавоноида, в реакции в начале расходуется тролокс (см. рис. 3.5). Одновременно пероксильный радикал взаимодействует по реакции (3) с флавоноидом, образуя феноксильный радикал FIO^\bullet . Реакция (4) феноксильного радикала (FIO^\bullet) с тролоксом, приводящая к воспроизводству исходного флавоноида, объясняет ускорение расхода тролокса и замедление расхода флавоноида. Протеканию этой реакции способствует более высокая в реакции НАТ реакционная способность FIO^\bullet для этих флавоноидов.

Сказанное выше находится в соответствии с результатами исследований, в которых электрохимическими методами в сочетании с ЭПР показана способность α -токоферола регенерировать флавоноиды из соответствующих ароксильных радикалов [179].

Синергизм смеси со-антиоксидантов выражается в следующем: после 20мин, когда в реакционной смеси отсутствует тролокс, а сам процесс расходования аналитических катехольных ОН групп кольца В флавоноидов длится согласно кинетическим данным (рис. 3.5) примерно 120мин. Таким образом, в процессе, когда тролокс израсходован, исходная концентрация флавоноида оказывается выше, чем в тот же момент времени, при отсутствии тролокса в исходной смеси. Последнее обеспечивает более длительное торможение расхода флуоресцеина в опытах ORAC, что приводит к наблюдаемому явлению синергизма. В опытах ORAC время расходования исходного флавоноида существенно выше вследствие участия в дальнейшем, после израсходования катехольных ОН групп кольца В аналитически регистрируемых методом SWV, гидроксильных групп колец А и С.

В кинетической модели 3.3, объясняется антагонизм действия антиоксидантов, токофероксильный радикал (T^\bullet) вследствие наличия более реакционноспособных катехольных дигидроксильных групп в цикле В с более низким значением BDE у кверцетина (табл. 3.2), активно участвует в реакции НАТ (4) с кверцетином ускоряя его расход (рис. 3.6). Антагонизм, наблюдаемый в опытах проводимых методом ORAC, связан, по всей видимости, со следующими причинами:

1. После расхода тролокса регистрируется меньшая концентрация флавоноида, чем в тот же момент времени в отсутствие тролокса в исходной смеси (рис. 3.6).
2. На начальном этапе, при присутствии в реакционной смеси тролокса, образующийся токофероксильный радикал активно участвует в реакции (4) с флавоноидом и в перекрестной реакции (5) с FIO^\bullet радикалом. Эти реакции конкурируют с реакцией (2), в которой радикал T^\bullet нейтрализует генерируемый пероксильный радикал. Одновременно, в результате реакции (4), расходуется антиоксидант FIOH с большим значением антирадикальной емкости. Между тем регенерация тролокса в этой реакции, значение антирадикальной емкости которого существенно ниже, чем у флавоноидов, не компенсирует ускорение расхода флавоноидов.

В целом, неаддитивное действие бинарной смеси антиоксидантов обусловлено, главным образом, возможностью смещения квазиравновесия с участием ароксильных радикалов в сторону регенерации антиоксиданта с большей (синергизм) или меньшей (антагонизм) антиоксидантной емкостью соответственно (Схема 3.4).

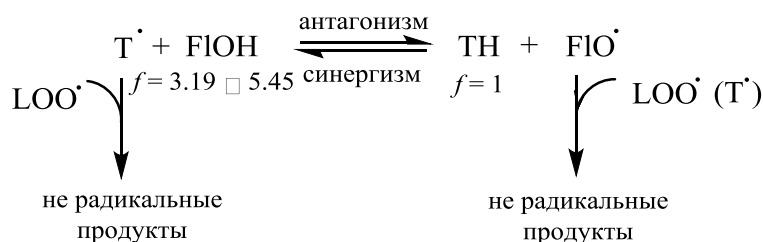


Схема 3.4 Схема превращений тролокса, со-антиоксиданта флавоноида и их ароксильных радикалов.

Заключительное замечание

Исследование неаддитивного действия флавоноидов в смесях с аскорбиновой кислотой и водорастворимым аналогом α - токоферола – тролоксом актуально для понимания их роли в предотвращении патологий окислительного стресса в организме. Неаддитивное действие характеризовалось величинами антипероксирадикальных емкостей антиоксидантов и их смесей, определяемых в тролоксовом эквиваленте методом ORAC. Одновременно в идентичных условиях методом SWV исследовали кинетику расходования со-антиоксидантов или одного компонента - флавоноида. Установлено что, в соответствии с литературными данными, при наличии гликозидной группы у флавоноидов (рутин, нарингин) имеет место повышение их потенциала окисления, что соответствует увеличению величины BDE наиболее реакционноспособной ОН группы.

В смесях с тролоксом и аскорбиновой кислотой ярко выраженный синергический эффект наблюдается с флавоноидами (рутин, нарингин) имеющими гликозид, у которых

сравнительно высокие значения окислительного потенциала и BDE наиболее реакционноспособной ОН группы. В предложенной кинетической модели в смесях с тролоксом пероксильный радикал атакует ОН группу флавоноида с образованием ароксильного радикала. Далее ароксильный радикал взаимодействует по реакции (4) с тролоксом, регенерируя исходный флавоноид с большим значением антирадикальной емкости, а также интенсивно реагирует с генерируемым пероксильным радикалом.

После расхода тролокса, вследствие протекания реакции (4), концентрация флавоноида выше, чем в отсутствие тролокса, что и определяет синергический эффект.

Антагонический эффект наблюдается, когда в бинарной смеси присутствуют флавоноиды с меньшими значениями потенциала окисления и BDE наиболее реакционноспособной ОН связи, в частности, флавоноиды, в структуре которых отсутствует О-гликозидная группа. В случае присутствия в смеси тролокса, образующийся токофероксильный радикал Т^{*}, вследствие более реакционноспособной фенольной ОН группы, вступает в реакцию (4) по механизму НАТ с флавоноидом, тем самым конкурируя с основной реакцией (2) захвата пероксильных радикалов. Одновременно реакция (4) усиливает расход флавоноида, тем самым, после относительно быстрого расходования тролокса концентрация флавоноида оказывается ниже, чем в тот же момент времени при отсутствии в исходной смеси тролокса. Тем самым, антиоксидантный эффект реакционной смеси после расходования тролокса ниже.

В целом, синергический и антагонистический эффекты обусловлены, в основном, конкуренцией реакций отрыва атома водорода радикалов ароксильных антиоксидантов с молекулой со-антиоксиданта. При доминировании реакции регенерации антиоксиданта с большей антирадикальной емкостью наблюдается явление синергизма, а с меньшей – антагонизм.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОНОДОНОРНОГО РАСТВОРИТЕЛЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА БИОФЛАВНОИДОВ, ТРОЛОКСА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

§ 4.1 Влияние электронодонорного растворителя ДМСО на антиоксидантные свойства аскорбиновой кислоты

Материалы данной главы опубликованы в [135].

Аскорбиновая кислота (АК, витамин С) является природным органическим соединением с антиоксидантными свойствами. Электрохимические свойства аскорбиновой кислоты и ее способность захватывать свободные радикалы находятся в центре внимания многих исследователей [180-185]. Структура витамина С напоминает глюкозу, которая в то же время является субстратом для его синтеза (из D-глюкуроновой кислоты). Большинство видов животных способны синтезировать витамин С. Неспособность синтезировать является довольно редким признаком - она включает в себя приматов и несколько других видов животных. Аскорбиновая кислота необходима для нормального обмена веществ, формирования коллагена, заживления ран и восстановления тканей. Дефицит витамина С вызывает известную болезнь под названием цинга. Он представляет собой нарушение синтеза коллагена (из-за недостатка гидроксирования пролина и лизина), что приводит к уменьшению сопротивляемости кожи и слизистых оболочек, повреждению стенок капилляров (что приводит к частым кровоизлияниям), потере зубов (из-за ослабленных коллагеновых фибрилл, удерживающих зубы) и нарушению образования костного вещества [186]. Также аскорбиновая кислота образует антиоксидантную систему, защищая клетки от окислительного стресса и в то же время регенерируя другие антиоксиданты, например, витамин Е. Диметилсульфоксид (ДМСО) представляет собой сероорганическое соединение с формулой $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Эта бесцветная жидкость является важным полярным апротонным растворителем, который растворяет как полярные, так и неполярные соединения и смешивается в широком диапазоне с органическими растворителями, а также с водой. ДМСО является ярко выраженным электронодонорным соединением и, как отмечалось выше, моделирует электронодонорные группы присутствующие в биологических системах.

Возрастание биомедицинского значения исследований системы АК/ДМСО обусловлено ее важными свойствами. ДМСО является общепринятым эндоцеллюлярным криопротектором для стволовых клеток, который способен легко проникать через мембрану клеток и образовывать большое количество водородных связей с молекулами жидкой фазы клетки. Это приводит к снижению кристаллообразования внутри клетки, а также к снижению концентрации внутриклеточных солей при сверхнизких температурах, что уменьшает степень криповреждения клетки. АК также является криопротектором, и было установлено, что сочетание АК с ДМСО повышает эффективность криозащиты клеток [187,188]. Как уже было отмечено ранее ДМСО может проникать внутрь живых тканей без какого-либо значительного вреда [189], при этом АК помогает сохранить эластичность кожи. Таким образом ДМСО увеличивает скорость переноса некоторых соединений через органические ткани, в том числе и через кожу, и используется в системах доставки лекарственных препаратов [190,191], что позволяет предположить, что наличие ДМСО в растворах АК может усилить транспорт АК. Ранее различными физико-химическими методами были исследованы молекулярные взаимодействия, имеющие место в данной системе [192-195].

Целью исследований, представленных в данной главе является исследование влияния диметилсульфоксида (ДМСО) как растворителя на электрохимические и антирадикальные свойства аскорбиновой кислоты. Структурные формулы исследуемых соединений представлены на рис. 4.1

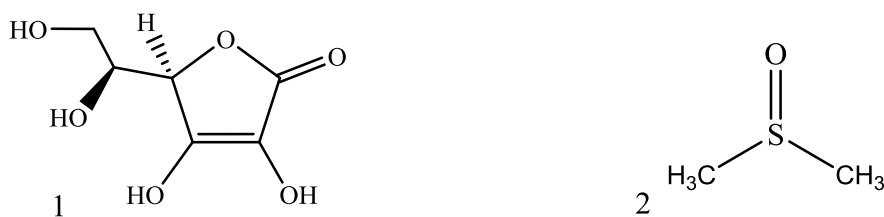


Рис. 4.1. Структурные формулы исследуемых соединений: (1) аскорбиновая кислота, (2) диметилсульфоксид.

Электрохимическое окисление аскорбиновой кислоты исследовано методом ДИВ в диапазоне сканирования от -400 до 100 мВ при наличии фонового электролита (NaCl) с постоянной концентрацией 0.1М. Метод ДИВ использовался поскольку пик окислительного формального анодного потенциала АК проявляется четко и в случае низких концентраций аскорбиновой кислоты (рис. 4.2).

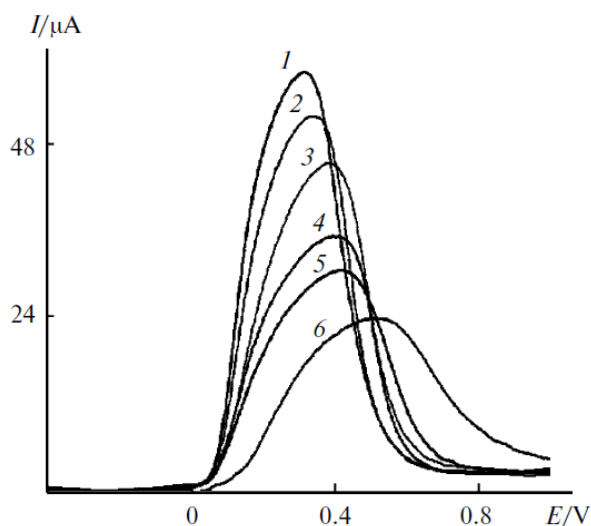


Рис.4.2. Вольтамперограммы ДИВ аскорбиновой кислоты с концентрацией 1.2×10^{-4} моль/л в водном растворе на фоне 0.1 М NaCl в отсутствие ДМСО (1) и в присутствии 0.5 (2), 1.0 (3), 2.0 (4), 3.0 (5) и 4.0 М ДМСО (6), при скорости сканирования 20мВ/с, амплитуде импульса 50 мВ, длительности импульса 50мс и периоде импульса 200мс.

Как следует из вольтамперограммы, приведённой на рисунке 4.2, с повышением концентрации ДМСО пик формального анодного потенциала аскорбиновой кислоты (312 мВ) смещается в сторону положительных значений (522 мВ), а также при постепенном введении в раствор аскорбиновой кислоты растворителя ДМСО наблюдается понижение интенсивности пика окисления аскорбиновой кислоты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие растворителя ДМСО в растворе препятствует электрохимическому окислению нейтральной формы АК.

Электрохимические исследования показали, что аскорбиновая кислота и дегидроаскорбиновая кислота образуют обратимую окислительно-восстановительную пару.

Таким образом, электрохимическое окисление первичной формы аскорбиновой кислоты представляет собой сопряженный процесс с участием двух электронов и двух протонов с конечным образованием дегидроаскорбиновой кислоты [186]. Реакция окисления АК с образованием дегидроаскорбиновой кислоты представлена на схеме 4.1. Следует отметить, что в водных растворах при физиологическом рН=7.4 преобладающей формой АК ($\text{AK} = \text{AscH}_2$) является монодегидроаскорбат анион (AscH^-). В тоже время, аскорбат анион легко окисляется, обратимо, радикалами в две стадии. Первая стадия приводит к образованию аскорбильного радикал аниона ($\text{AscH}^{\bullet-}$), а вторая – к образованию дегидроаскорбата [197,198].

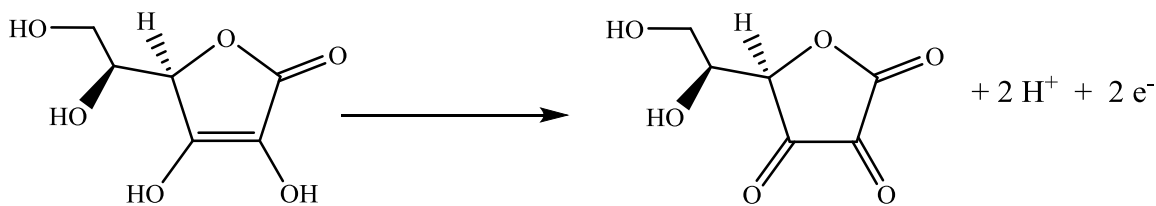


Схема 4.1. Суммарная схема окисления аскорбиновой кислоты

С целью объяснения наблюдаемых явлений было учтено, что в среде ДМСО ионизация АК подавляется [199], и образуется комплекс ДМСО с АК за счет более высокого значения относительного параметра основности (β_2^H) ДМСО - акцептора водородной связи по сравнению с водой [200]. Существование молекулярных комплексов с различными типами водородной связи между аскорбиновой кислотой и ДМСО доказано с помощью ИК и КР спектроскопий [192]. Одновременно, результаты диэлектрической релаксации также подтверждают существование разных типов таких молекулярных ассоциатов [195]. Вместе с этим, УФ-Вид измерения показали, что в водных растворах АК, содержащих ДМСО, доминирует нейтральная форма АК, что обусловлено формированием комплексов между ДМСО и нейтральной формой АК посредством межмолекулярных водородных связей [193].

Таким образом, изменение наблюдаемых вольтамперметрических характеристик АК, при введении в раствор ДМСО, 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.

В дополнение к полученным данным, влияние ДМСО на окислительно-восстановительные свойства АК можно обнаружить на основе УФ-Вид спектроскопических измерений антирадикальной активности АК по отношению к ДФПГ^{*} в этанольных растворах [183-185]. ДФПГ^{*} в этанольных растворах характеризуется полосой поглощения при 520 нм. Следует также отметить что спектры ДФПГ^{*} в этаноле и смесях этанол-ДМСО (рис 4.3) идентичны, т.е. наличие ДМСО в растворе не влияет на аналитические параметры поглощения ДФПГ^{*}.

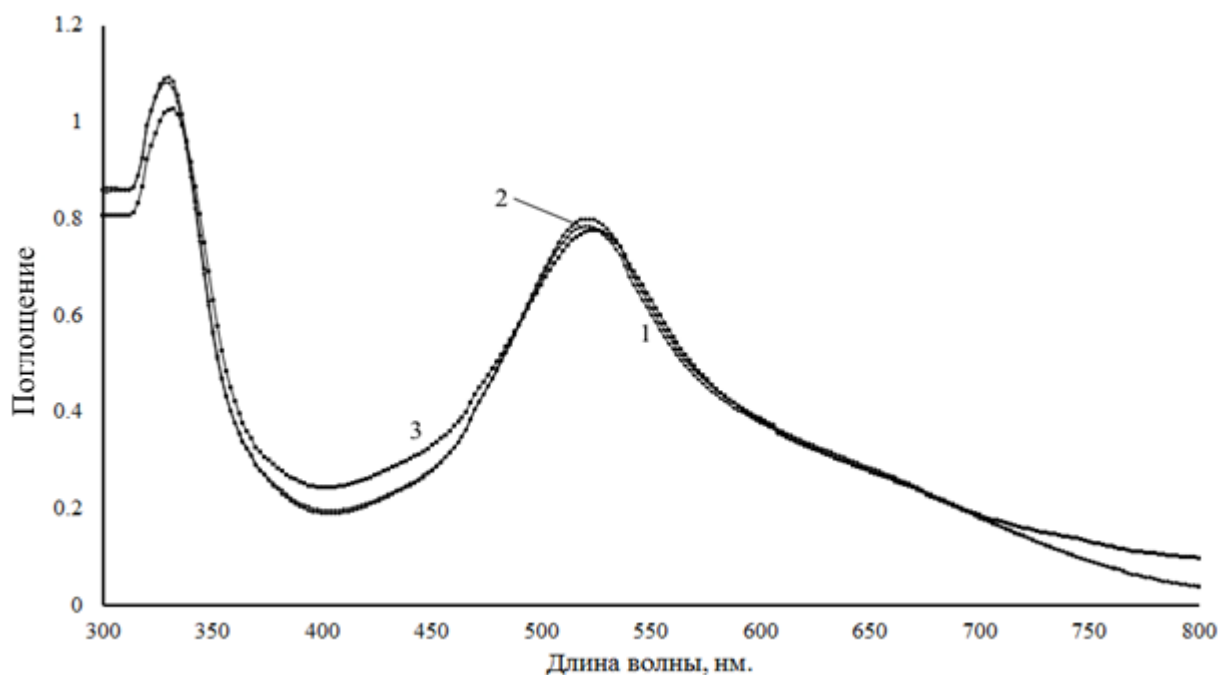


Рис.4.3. Спектры поглощения ДФПГ* в этаноле (1) и в растворах этанол-ДМСО в соотношениях 1:1 (2) и 1:4 (3); $[ДФПГ] = 6.25 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Уменьшение концентрации ДФПГ* во времени определялось с помощью регистрации снижения поглощения при 520 нм, которое вызвано реакцией ДФПГ* с антиоксидантом.

Согласно результатам работы [196], кинетическое поведение ДФПГ* в реакции с аскорбиновой кислотой характеризуется резким снижением его концентрации сразу после смешивания компонентов в спиртовых растворах, что согласуется с полученными в данной главе результатами (рис. 4.4).

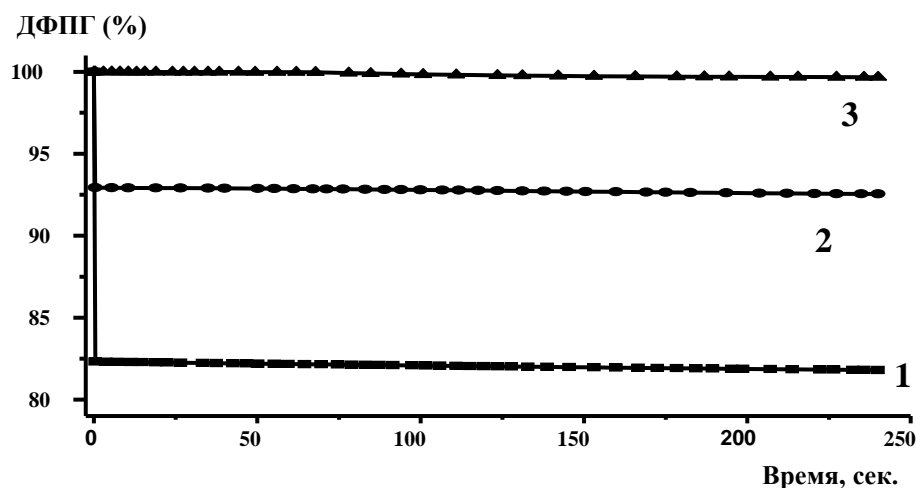


Рис. 4.4. Временная зависимость процентного содержания остаточного ДФПГ* при разных содержаниях ДМСО в растворах этанола в отсутствие ДМСО (1) и в присутствии EtOH – ДМСО в соотношениях 1:1 (2) и 1:4 (3). Во всех случаях концентрация аскорбиновой кислоты и ДФПГ* составляла 6×10^{-6} и 6.25×10^{-5} моль/л соответственно, температура: $T = 22 \pm 1$ °С.

Представляется интересным то, что введение ДМСО в раствор АК приводит к уменьшению суммарного расхода ДФПГ* в конце реакции. На рисунке 4.4 приведена временная зависимость оптической плотности этанольных растворов при 520 нм при различных содержаниях ДМСО в растворе, в условиях неизменности исходных концентраций АК и ДФПГ*. Как следует из данного рисунка, с повышением содержания ДМСО в растворе общее потребление ДФПГ* уменьшается. Эти результаты хорошо согласуются со стабилизирующим эффектом ДМСО на нейтральную АК.

На схеме 4.2 представлен предлагаемый детальный механизм окисления АК до дегидроаскорбиновой кислоты (ДГА) радикалом ДФПГ*. Согласно этой схеме, как нейтральная АК, так и монодегидроаскорбат анион (АскН⁻) участвуют в реакции с ДФПГ*. Окисление АК в водных растворах при pH=7.4 в отсутствие ДМСО определяется реакциями АскН⁻, которые доминируют при данных условиях. Участие в реакции с ДФПГ* в качестве реагентов обеих форм аскорбиновой кислоты АК и АскН⁻, представленных на схеме 4.2, связано с тем, что в растворах АК в присутствии ДМСО равновесие существенно сдвигается в сторону образования нейтральной АК [199].

Влияние ДМСО на антирадикальную способность АК представляет теоретический интерес также тем, что исходная молекула представлена одновременно в двух формах: нейтральной АК и анионной АскН⁻.

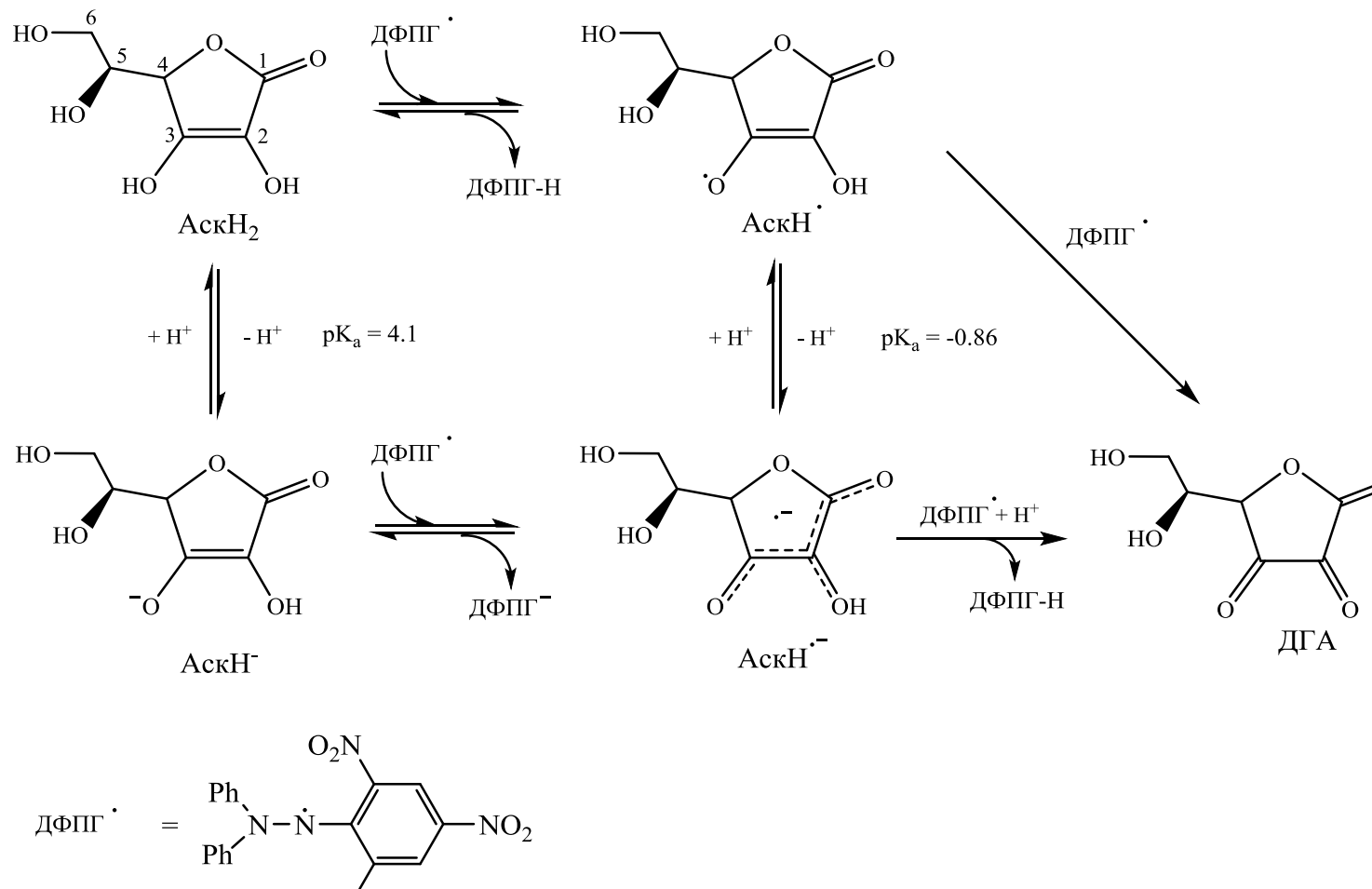


Схема 4.2. Механизм окисления АК радикалом ДФПГ·.

Окисление монодегидроаскорбат аниона AscH^- происходит через стадию образования резонансно-стабилизированного дидегидроаскорбатного ($\text{Asc}^{\bullet-}$) свободного радикала, в то время, как окисление нейтральной АК происходит последовательно через стадию образования нейтрального свободного монодегидроаскорбильного радикала (AscH^\bullet). В реакцию переноса атома водорода вступает в первую очередь енольная гидроксильная группа АК в позиции С3. Этот вывод основан на результатах теоретических DFT расчётов, согласно которым энергия диссоциации связи (BDE) енольной гидроксильной группы в позиции С3 составляет: $\text{BDE}(\text{OH}, \text{C3}) = 69.94$ ккал/моль, что значительно меньше, чем BDE енольной гидроксильной группы в позиции С2, $\text{BDE}(\text{OH}, \text{C2}) = 80.53$ ккал/моль [202].

Отмеченные выше две причины влияния ДМСО на реакционную способность АК, согласно схеме 4.2, детально представляются следующим образом.

1. Равновесие ионизации АК (схема 4.2) сдвигается от монодегидроаскорбат аниона AscH^- в сторону нейтральной АК, тогда как реакционная способность нейтральной АК в реакциях переноса атома водорода ниже по сравнению с AscH^- . Это подтверждается также результатами электрохимического окисления аскорбиновой кислоты, которые были получены методом ДИВ в водных растворах в широком диапазоне рН среды (от 0.64 до 11.5) [182, 203]. С повышением рН среды пик формального анодного потенциала аскорбиновой кислоты смещается в сторону положительных значений. Это свидетельствует о том, что способность к окислению нейтральной формы АК ниже, доля последней растёт с уменьшением рН среды.

2. В растворе между атомами водорода енольных гидроксильных групп нейтральной формы АК и молекулами сильного Льюисового основания - ДМСО образуются межмолекулярные водородные связи. В результате блокируются реакционные центры, АК-енольные гидроксильные группы, которые участвуют в реакции переноса атома водорода со свободными радикалами. С добавлением в водный раствор ДМСО разумно предположить, что равновесие сдвигается от дидегидроаскорбатного радикала (AscH^\bullet) в сторону нейтрального монодегидроаскорбильного радикала (Asc^\bullet). Одновременное образование межмолекулярной водородной связи между атомом водорода гидроксильной группы монодегидроаскорбильного радикала и ДМСО снижает реакционную способность Asc^\bullet по отношению к ДФПГ $^\bullet$.

В свою очередь, стабилизация исходной нейтральной формы АК-АскН₂ диметилсульфоксидом приводит к сдвигу равновесия влево от АскН[•] к АскН₂. Последнее является причиной наличия остаточного (не участвующего в реакции) количества АК при добавлении ДМСО в водные растворы (рисунок 4.4).

Здесь имеет место известный кинетический эффект растворителя, проявляющийся в реакциях переноса атома водорода с участием фенольных гидроксильных групп антиоксидантов [204-206]. При этом установлено, что комплексы водородной связи между фенольными соединениями и молекулами Льюисовских оснований не обладают измеримой антирадикальной активностью. Образование комплексов водородной связи между АК и ДМСО приводит к снижению антирадикальной способности АК (f_{ac}) от 2 до 0 при постепенном добавлении ДМСО в водные растворы АК. f_{ac} представляет собой число прореагировавших радикалов с участием одной молекулы антиоксиданта (формула 4.1).

$$f_{ac} = ([\text{ДФПГ}^{\bullet}]_0 - [\text{ДФПГ}^{\bullet}]_{\text{ост}}) / [\text{АК}]_0, \quad (4.1)$$

где $[\text{ДФПГ}]_0$ и $[\text{АК}]_0$ - начальные концентрации ДФПГ[•] и АК соответственно, $[\text{ДФПГ}]_{\text{ост}}$ - остаточная концентрация ДФПГ[•] после окончания химического превращения АК.

Следует отметить, что влияние среды-ДМСО на реакцию АК с ДФПГ обусловлено межмолекулярным взаимодействием только с одним из реагентов: АК. Известно, что молекулы растворителя, являющиеся донором пары электронов, подобно ДМСО, не влияют на реакционную способность второго участника реакции переноса атома водорода, т.е. на свободный радикал, в частности, на ДФПГ [204].

Заключительное замечание

Используя трёхэлектродную конфигурацию электрохимической ячейки в водных растворах при температуре 37°C, методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВ) выявлено влияние ДМСО на окислительно-восстановительные свойства аскорбиновой кислоты. Установлено, что электрохимическое окисление АК подавляется при наличии в растворе ДМСО.

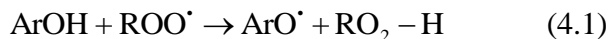
Вместе с этим, УФ-Вид спектрофотометрические кинетические измерения этанольных растворов стабильного свободного радикала ДФПГ[•] подтверждают стабилизирующее влияние ДМСО на нейтральную форму АК, которое связано с образованием межмолекулярных

водородных связей между атомами водорода енольных гидроксильных групп АК и её интермедиатов с молекулами Льюисовского основания - ДМСО, приводящих к существенному снижению антирадикальной активности АК.

§ 4.2 Влияние электронодонорного растворителя ДМСО на антиоксидантные свойства биофлавоноидов и тролокса

§ 4.2.1 Антиоксидантные показатели исследуемых антиоксидантов в реакции с ДФПГ

Реакции антиоксидантов с ДФПГ[•] широко используются как метод выявления их антирадикальной способности. Данные реакции рассматриваются в качестве модельной реакции с участием пероксильных радикалов (ROO[•]), являющихся носителями цепей цепной реакции пероксидного окисления липидов клеток мембран [207]. Авторами работ [207-209] установлена линейная корреляция между константами скоростей реакций отрыва атома водорода между радикалами ДФПГ[•] и ROO[•] с различными фенольными антиоксидантами (рекации 4.1 и 4.2).



В таблице 4.1 приведены значения антирадикальных емкостей (n) исследуемых флавоноидов, тролокса, а также аскорбиновой кислоты, определенных в реакции с ДФПГ[•], согласно формуле (4.2):

$$n = \frac{[\text{ДФПГ}]_0 - [\text{ДФПГ}]_{\infty}}{[\text{Антиоксидант}]_0} \quad (4.2)$$

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. 4.5.

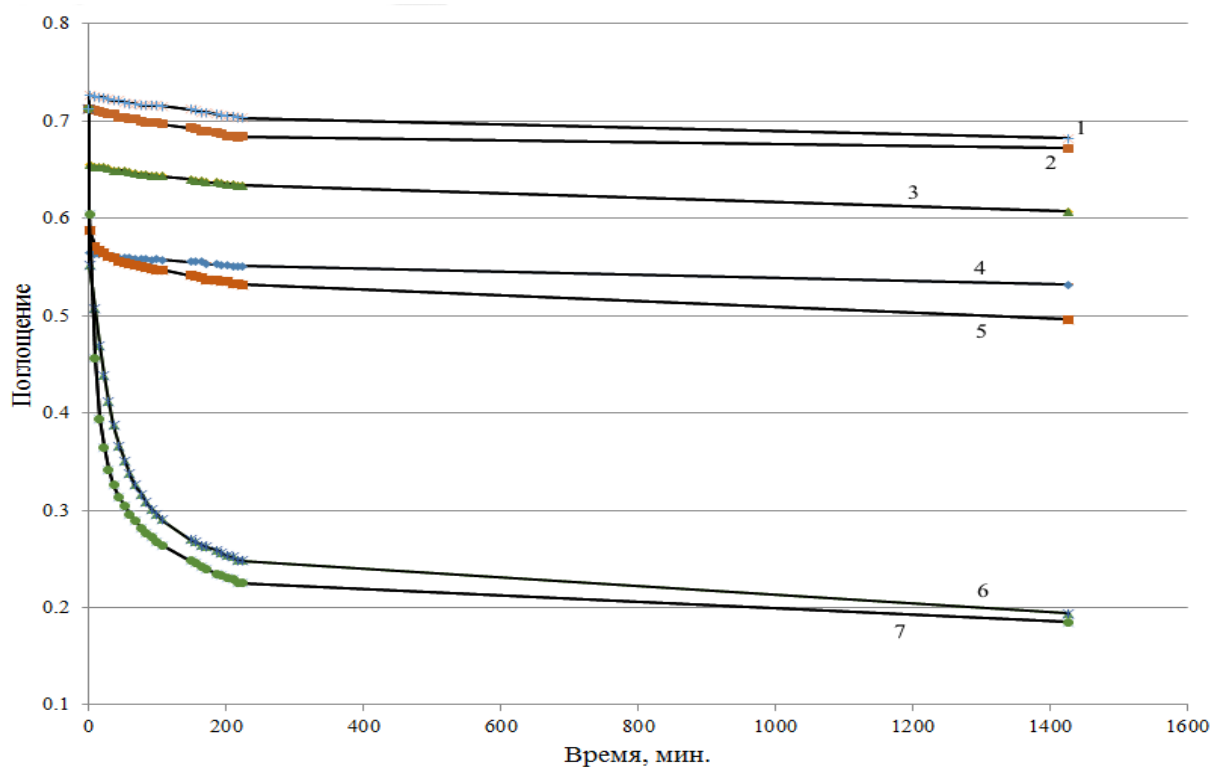


Рис.4.5. Кинетические кривые расщедования ДФПГ в реакции в отсутствие (1) и присутствии исследуемых антиоксидантов – нарингина (2), троллокса (3), аскорбиновой кислоты (4), морина (5), рутина (6) и кверцетина (7). $T = 22 \pm 1^\circ\text{C}$, $[\text{ДФПГ}]_0 = 6.25 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Антиоксидант}]_0 = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$, растворитель – этанол.

Представлялось интересным сравнить величины антирадикальных емкостей исследуемых антиоксидантов, определенных по отношению к ДФПГ \cdot (таблица 4.1) и ROO \cdot (таблица 4.2) радикалов. Следует отметить, что в таблице 4.2 величины антирадикальных емкостей приведены в троллоксеном эквиваленте. Поскольку величина n для троллокса близка к двум, то соблюдается следующее примерное соотношение:

$$n \approx 2f_A$$

Таблица 4.1. Величины антирадикальной емкости n исследуемых антиоксидантов. $T=22\pm 1^\circ\text{C}$, $[\text{ДФПГ}]_0 = 6.25 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Антиоксидант}]_0 = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$ и $1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ (*).

| 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 |

Как следует из данных приведенных в таблицах 4.1 и 3.1 значения антирадикальной емкости по отношению к ДФПГ^{*} и ROO^{*} радикалам для кверцетина, рутина, тролокса и аскорбиновой кислоты в целом близки между собой. Между тем в случае морина и нарингина антипероксирадикальная емкость существенно превышает антирадикальную емкость по отношению к ДФПГ^{*}. Это обусловлено сравнительно высокими значениями BDE фенольных OH групп этих флавоноидов, что приводит к тому, что реакция (4.2) является эндотермичной. Это приводит к смещению равновесия влево, т.е. к меньшему расходованию фенольного соединения. К тому же в этом случае не все фенольные OH группы вступают в ощутимую реакцию с ДФПГ^{*}.

К подобному выводу можно прийти, анализируя величины BDE разрывающихся и образующихся в реакциях (4.1) и (4.2) переноса атома водорода. $BDE_{\text{RO}_2-\text{H}} = 86-88 \text{ ккал/моль}$, BDE_{OH} значения фенольных OH групп находятся в пределах 78-86 ккал/моль. $BDE(\text{N}-\text{H})$ в ДФПГ–Н равна 78.9 ккал/моль [207,209]. Из этих данных легко прийти к выводу, что реакция (4.1) с участием пероксильных радикалов экзотермична и необратима. Реакция (4.2) эндотермична и равновесие сдвинуто влево. Этому также способствуют стерические затруднения, создаваемые $o-\text{NO}_2$ группами в молекуле ДФПГ [207-210].

Как отмечалось выше, фенольные OH группы с высоким значением BDE могут практически не вступать в реакцию с ДФПГ^{*} радикалами. Это и является причиной того, что

у соединений с высоким значением BDE_{OH} наблюдаются низкие значения антирадикальной емкости по отношению к ДФПГ*.

§ 4.2.2 Влияние электронодонорного растворителя ДМСО на величину антирадикальной емкости флавоноидов

Данные о влиянии различного содержания ДМСО в растворе на величину антирадикальной емкости антиоксидантов по отношению к ДФПГ* радикалу приведены в таблице 4.1 на основании данных рис. 4.6 и 4.7.

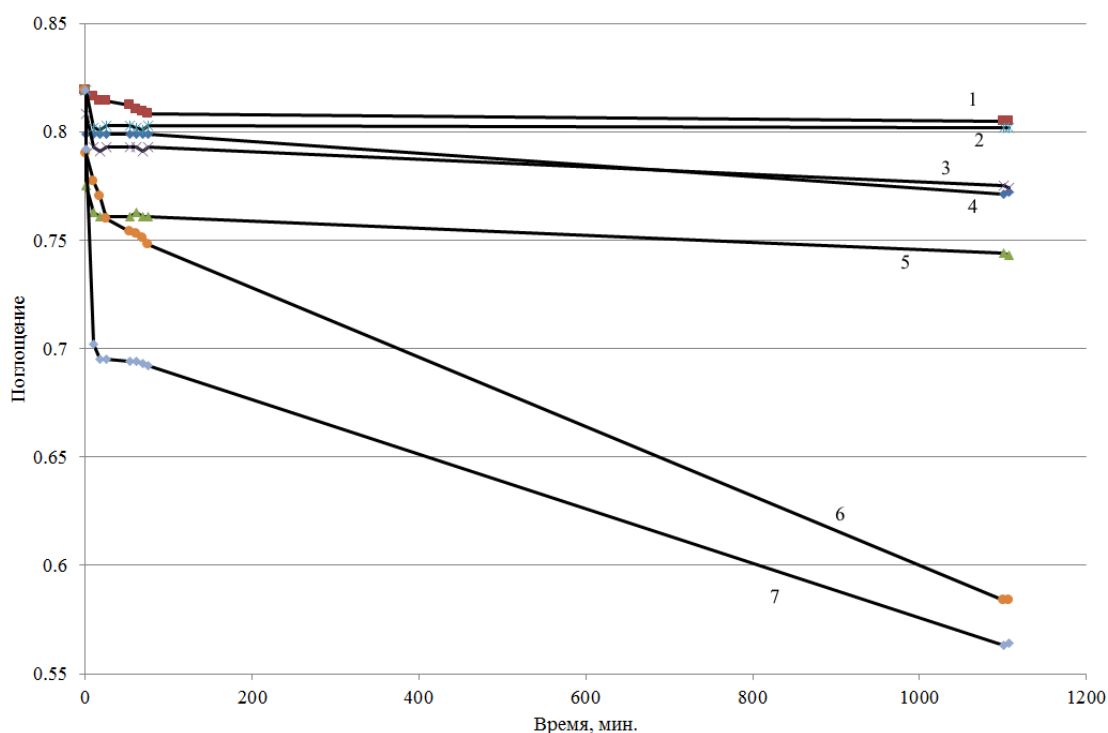


Рис. 4.6. Влияние растворителя (ДМСО) на кинетику расходования ДФПГ* в реакции в отсутствие (1) и в присутствии исследуемых антиоксидантов – нарингина (2), морина (3), аскорбиновой кислоты (4), тролокса (5), рутина (6) и кверцетина (7), $T = 22 \pm 1^\circ\text{C}$ $[\text{ДФПГ}]_0 = 6.25 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Антиоксидант}]_0 = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$, растворитель – этанол : ДМСО (v/v) 1:1.

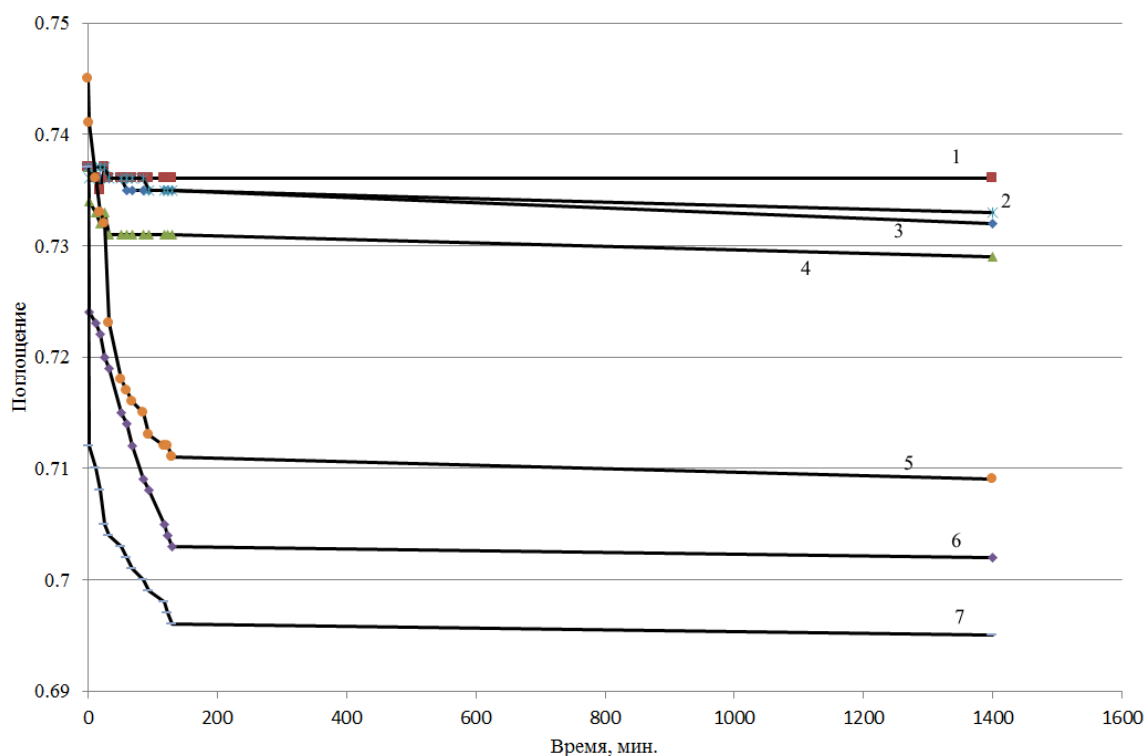


Рис. 4.7. Влияние растворителя (ДМСО) на кинетику расходования ДФПГ в реакции в отсутствие (1) и в присутствии исследуемых антиоксидантов – нарингина (2), аскорбиновой кислоты (3), тролокс (4), морин (5), рутина (6) и кверцетина (7), $T = 22 \pm 1^\circ\text{C}$ $[\text{ДФПГ}]_0 = 6.25 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Антиоксидант}]_0 = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$, растворитель – этанол : ДМСО (v/v) 1:4.

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 Н фенольных ОН (схема 4.1) и ОН групп АА с ДМСО (см. § 4.1), приводящие к блокированию антирадикальных групп.

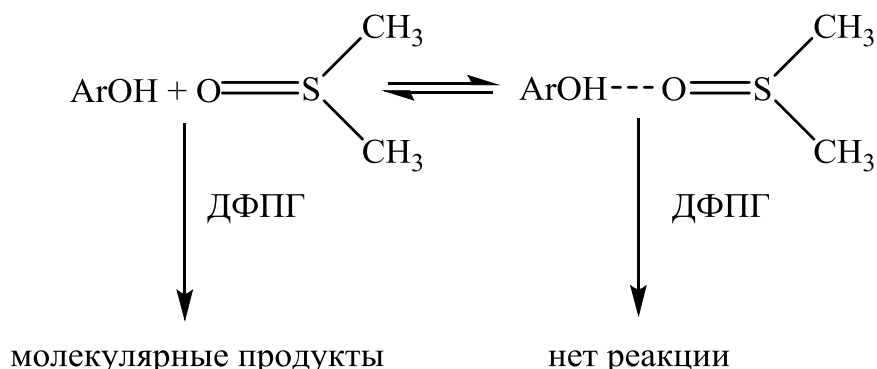


Схема 4.1 Иллюстрирующая влияние ДМСО на реакцию фенольных соединений с ДФПГ.

Сравнительно слабое влияние ДМСО на антирадикальную емкость рутина и кверцетина, по-видимому, обусловлено наличием внутримолекулярной водородной связи

между катехольными ОН группами [209]. Это затрудняет образование межмолекулярных водородных связей между реакционными центрами и электронодонорной молекулой ДМСО, приводящих к блокированию этих центров.

ГЛАВА 5. СВЯЗЫВАНИЕ ДНК С БИОФЛАВОНОИДАМИ, АНТИРАДИКАЛЬНАЯ ЗАЩИТА ДНК БИОФЛАВОНОИДАМИ

Материалы данной главы опубликованы в [136].

ДНК является одной из главных мишеней для многочисленных низкомолекулярных веществ – лигандов, биологическая активность которых осуществляется влиянием на ее структуру и функциональные свойства [211-213]. С этой точки зрения, исследование связывания лигандов с ДНК является одним из актуальных вопросов скрининга конструирования веществ, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение. Как отмечалось выше по основному механизму связывания с ДНК лиганды делятся на интеркаляторы, желобково, а также внешне связывающиеся соединения [212-214].

Как обсуждалось в литературном обзоре, ДНК является одной из клеточных мишеней для окружающих ее различных как эндогенных, так и экзогенных натуральных или синтетических соединений. Эти соединения, имеющие значительно меньший молекулярный вес, могут непосредственно связываться с ней и влиять на ее функции, в том числе на репликацию, или экспрессию генов (на уровне транскрипции). Такие вещества могут проявить антивирусную, антибиотическую, антиканцерогенную, или канцерогенную, а также мутагенную активность. С этой точки зрения, взаимодействие биологически активных низкомолекулярных веществ с ДНК важно для дизайна и синтеза новых препаратов, имеющих фармакологическое значение [212,213]. Низкомолекулярные вещества с ДНК могут взаимодействовать ковалентно или нековалентно. В последнем случае эти вещества называются лигандами, которые могут связываться интеркаляционным механизмом, встраиваясь в плоскость между парами оснований ДНК, в малом или большом желобке (желобковое связывание) или с внешней стороны спирали ДНК [213].

В последние годы выделены многочисленные растительные метаболиты и в их числе растительные полифенолы - флавоноиды, которые могут проявить биологическую активность в клетках млекопитающих [212-214]. Флавоноиды кверцетин, морин и рутин (рис.5.1) являются сильными гидроксил-антиоксидантами, поскольку они либо непосредственно нейтрализуют свободные радикалы, либо ингибируют образование свободных радикалов путем хелатирования переходных металлов, обладающих каталитическими свойствами. [163,218-222].

В настоящее время одной из важных проблем является протекание окислительного стресса у людей, что связано с нарушением баланса антиоксидантных соединений, приводящего к накоплению свободных радикалов в клетке и последующему повреждению биологически важных молекул [215-217]. С этой точки зрения, эти вещества также могут связываться с окисляемыми субстратами, такими как ДНК, белки, клеточные мембраны, тем самым предохраняя их от прямого губительного воздействия свободных радикалов. Таким образом, антиоксиданты защищают организм от свободных радикалов, активных форм кислорода (АФК), таких как синглетный кислород, супероксид, пероксильный и гидроксильный радикалы и активных формы азота (АФА), таких как пероксинитриты [217,223,224].

С другой стороны, литературные данные указывают на то, что кверцетин может действовать как прооксидантное вещество и проявить мутагенную активность [214,215]. Также показано, что этот флавоноид связывается с двухцепочечной ДНК интеркаляционным способом, проявляя предпочтительность к пиримидиновым основаниям, однако возможно также связывание с одноцепочечной ДНК [216–222].

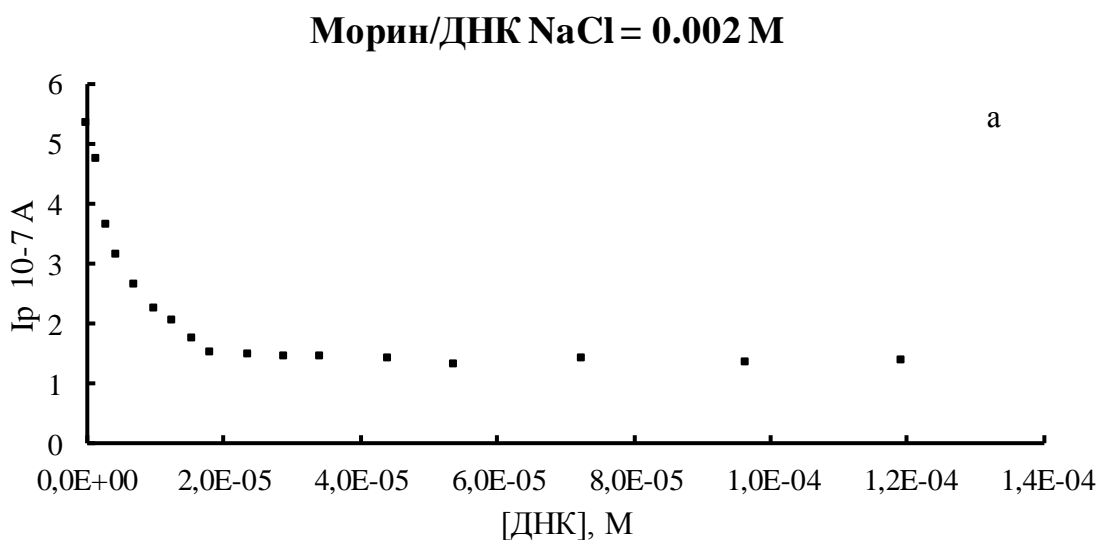
Флавоноиды также оказывают влияние на деятельность многих ферментов, таких как кальций фосфолипидно-зависимая протеинкиназа, тирозин протеинкиназы, киназа фосфорилазы, фосфатидилинозитол 3-киназы и ДНК-топоизомеразы, а также на экспрессию цитохрома 1A1 и общий уровень клеточного глутатиона. [225-227].

Связывание биофлавоноидов с ДНК исследовалось многими авторами различными электрохимическими и вольтамперометрическими методами [217,218,226]. Электрохимические исследования связывания ДНК лигандами могут служить полезным дополнением к спектроскопическим методам исследования (для непоглощающих соединений). Как отмечалось электрохимические методы отличаются по своей чувствительности, простоте выполнения и универсальности, а также представляют информацию о механизме связывания. Метод квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV) обладает одной из самых высоких чувствительностей среди электрохимических методов. Данный метод позволяет проводить исследования по взаимодействию лиганда с ДНК при значительно низких концентрациях исходного вещества (лиганда) так и в растворах со слабой ионной силой.

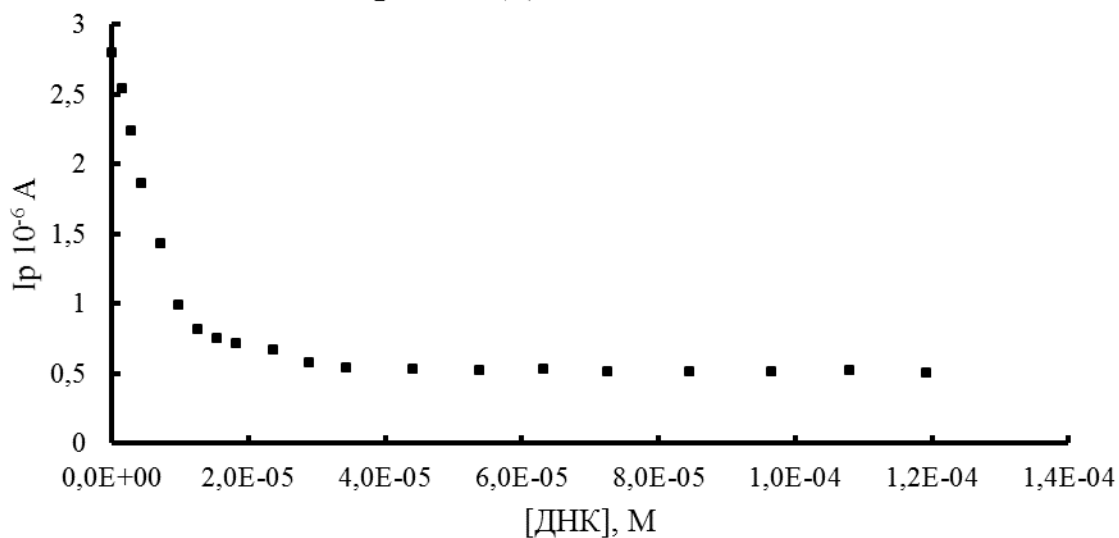
Целью настоящих исследований, представленных в данной главе, является изучение различных способов связывания биофлавоноидов - кверцетина, рутина и морина с ДНК методом квадратно-волновой вольтамперометрии, а также определение K и n (K - константа связывания, n - число пар оснований ДНК, приходящихся на одну связанную молекулу биофлавоноида) при различных ионных силах раствора.

§ 5.1 Связывание ДНК с биофлавоноидами

На рис. 5.1 представлены данные, полученные при изучении связывания флавоноидов с ДНК. Как видно из рис. 5.1 при добавлении раствора ДНК к раствору флавоноида наблюдается понижение силы тока окислительного потенциала флавоноида. На основе кривых титрования получены нелинейные кривые связывания в координатах Скетчарда [139], из которых определены значения константы связывания (K) и числа пар оснований ДНК (n), приходящихся на одну связанную молекулу флавоноида.



Кверцетин/ДНК NaCl 0.002 М б



Рутин/ДНК NaCl 0.002 М

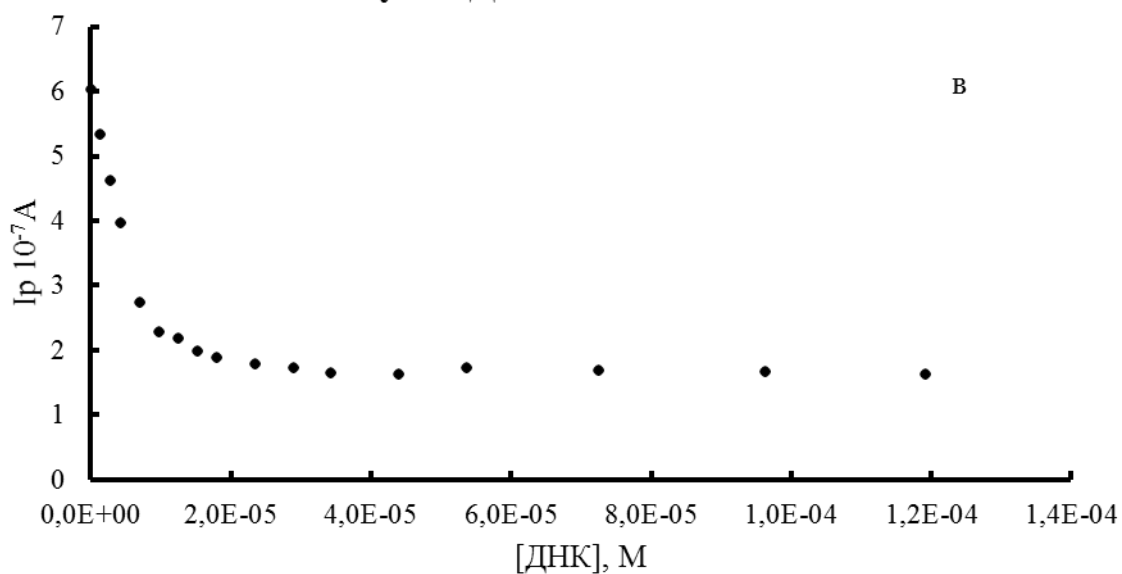


Рис. 5.1. Графики зависимости понижения силы тока от концентрации ДНК, полученные при прямом титровании; к раствору флавоноида $C_{AO} = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (титруемому веществу, а) морин; б) кверцетин; в) рутин) добавлялся небольшими порциями раствор титранта (ДНК, $C_{DNA} = 1.06 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Квадратно-волновые вольтамперограммы комплексов кверцетина, морина и рутина с двухцепочечной ДНК получены при ионных силах раствора NaCl 0.002; 0.02 и 0.154 М. На рис 5.2. приведены SW вольтамперограммы кверцетина и его комплексов с ДНК при ионной силе, соответствующей физиологическому раствору (0.154 М). Аналогичные вольтамперограммы получены как для комплексов Кверцетин –ДНК при двух других флавоноидов, так и для комплексов Морин-ДНК и Рутин-ДНК при указанных трех ионных силах раствора. Из приведенного рисунка видно, что по мере возрастания концентрации ДНК в растворе, пики потенциалов претерпевают небольшое смещение в сторону низких значений, а сила тока потенциала окисления соответствующих пиков понижается. При концентрациях флавоноида намного меньших ДНК концентрации, значения силы тока практически больше не меняются, что указывает на прекращение комплексообразования флавоноидов с ДНК. Для определения сродства флавоноидов строится зависимость силы тока от концентрации ДНК, что дает прямую линию, из тангенса угла которой определяется константа связывания флавоноидов с ДНК. Несмотря на точность определения этого параметра, тем не менее некоторые особенности взаимодействия лигандов с ДНК остаются не обсужденными. В частности, эта прямая не дает возможности обнаружить существование других способов связывания лиганда с ДНК. Более того, константа связывания лиганда с ДНК зачастую не позволяет полностью описать истинную картину взаимодействия. С этой точки зрения, более информативным является преобразование кривой связывания лигандов с макромолекулами методом Скетчарда [139], что позволяет одновременно определить значения K , а также n (число пар оснований ДНК, соответствующих одному месту связывания молекул лиганда). Более того, если кривая связывания, полученная по методу Скетчарда, отклоняется от прямолинейности, то это является или следствием антикооперативного способа связывания, или для лиганда существуют два (или больше) типа связывания с ДНК.

Используя изменения пиков силы тока, были рассчитаны r/C_f и r и построены кривые связывания этих флавоноидов с ДНК, которые представляются как непрямолинейные. Согласно уравнению 2.3 (Глава 2).

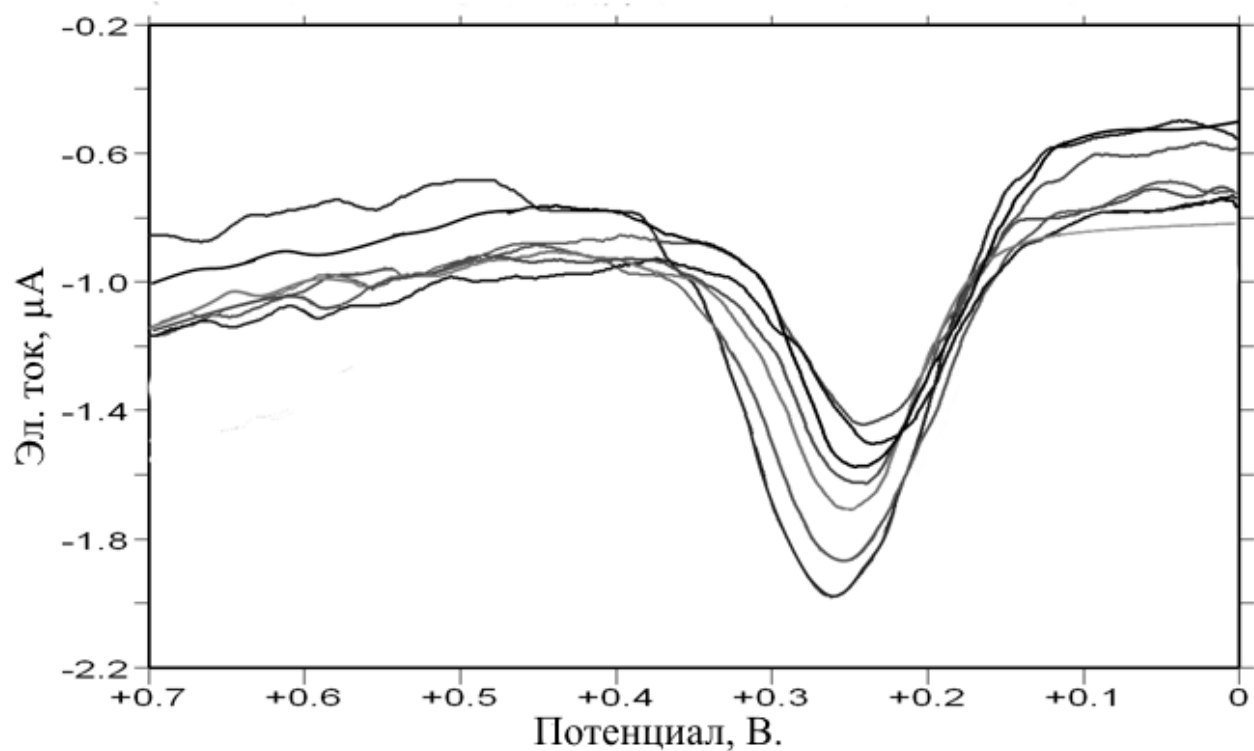


Рис. 5.2. Вольтамперограммы связывания лиганда (кверцетина) с ДНК, свидетельствующие об образовании комплекса кверцетин-ДНК посредством снижения силы тока анодного окислительного формального потенциала кверцетина.

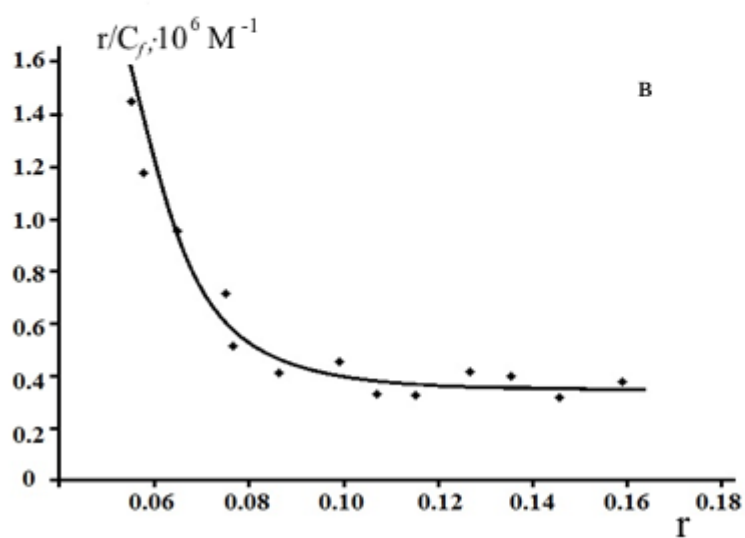
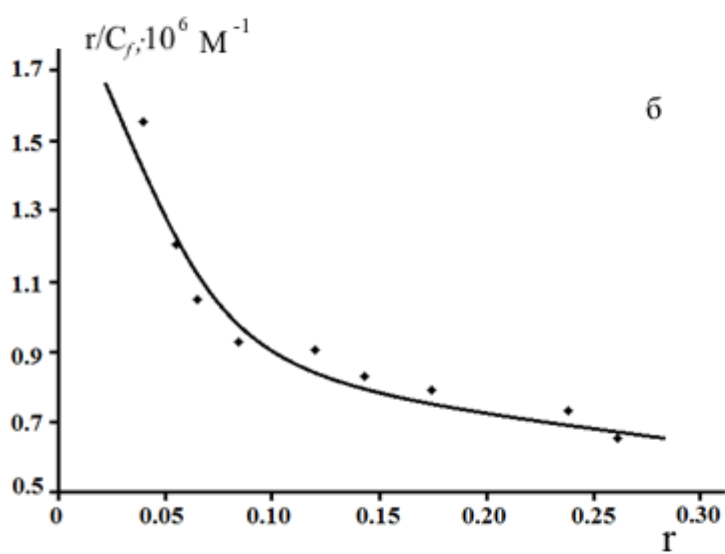
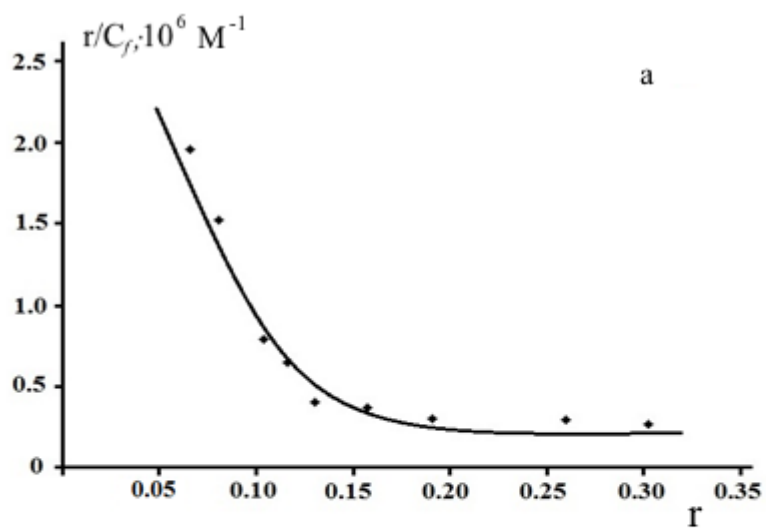


Рис. 5.3. Кривые связывания морина (а), рутина (б) и кверцетина (в) с ДНК при ионной силе раствора 0.002 М в координатах Скетчарда.

На рис.5.3. (а, б и в) представлены кривые связывания флавоноидов с ДНК при ионной силе раствора 0.002 М (аналогичные кривые получены также при ионных силах раствора 0.02 и 0.154 М). Полученные результаты указывают на то, что с помощью метода SWV можно провести количественный анализ и определение параметров взаимодействия - K и n .

Ранее было показано, что классические интеркаляторы - бромистый этидий (БЭ), актиномицин Д (АМД), а также метиленовый синий (МС) с ДНК связываются несколькими способами (мультимодалные лиганды), вследствие чего кривые связывания этих лигандов с ДНК нелинейны при построении уравнением (2.2) и состоят из двух прямолинейных участков при их построении с помощью (2.3) [138,139,228]. Применяя тот же подход для анализа полученных кривых при связывании флавоноидов с ДНК, нами выявлено, что эти соединения также могут связываться по крайней мере двумя способами. На основании изотерм адсорбции, с помощью уравнения (2.3) определены значения констант связывания (K) и числа нуклеотидов (n), приходящихся на одну связанную молекулу флавоноида для двух способов. Значения K обобщены в таблице 5.1. Как видно из табличных данных, в случае каждого флавоноида получены два, различающихся примерно на порядок, значения K . При этом, при увеличении ионной силы раствора от 0.002 до 0.02 М значения K_1 и K_2 уменьшаются, что указывает на то, что ионное окружение ДНК влияет на сродство флавоноидов с ДНК. Полученные данные при ионных силах раствора 0.002 и 0.02 М указывают на то, что значения K обусловлены структурным состоянием ДНК, которая более раскручена при низких ионных силах раствора, а с увеличением концентрации соли она закручивается и становится более плотно упакованной [229,230]. При этом, значения n , соответствующие двум способам связывания ($n_1 \approx 4-6$, $n_2 \approx 1-2$), практически не меняются. Табличные данные также выявляют, что при ионных силах раствора 0.002 и 0.02 М наибольшее сродство с ДНК имеет кверцетин, наименьшее – рутин. Однако, при ионной силе раствора 0.154 М получены неожиданные результаты: значения K_1 в случае рутина и морина увеличивались, в то время как в случае кверцетина значение K_1 почти не менялось, а значения K_2 уменьшались. С другой стороны, значения n , соответствующие двум способам связывания, оставались постоянными.

Обобщенные в таблице 5.1 данные указывают на то, что один из способов связывания указанных выше флавоноидов с ДНК является сильным, по сравнению с другим и соответствует интеркаляционному способу [217,223].

Этот факт подтверждается и большим значением n_1 , поскольку указывает на ограниченность центров связывания данным способом. Известно, что при интеркаляции, примерно 2-3 пары оснований, находящиеся по соседству над и под интеркаляционным местом, становятся заблокированными [138,139,228]. В то же время, в случае слабого способа связывания, число пар оснований, приходящихся на одну связанную молекулу лиганда меньше и, можно констатировать, что стехиометрия насыщения приближается к соотношению 1:1 (одна молекула лиганда на одну пару оснований). Этот результат, по всей вероятности, указывает на то, что при слабом способе молекулы флавоноидов связываются с внешней стороны ДНК.

Таблица 5.1. Константы связывания (K_1 , K_2) и число пар оснований ДНК (n_1 , n_2), приходящихся на одну связанную молекулу лиганда.

| Флавоноиды | Ионная сила I, М | | | | | |
|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | 0.002 | | 0.02 | | 0.154 | |
| | $K_1 \cdot 10^5$; М ⁻¹ | $K_2 \cdot 10^5$; М ⁻¹ | $K_1 \cdot 10^5$; М ⁻¹ | $K_2 \cdot 10^5$; М ⁻¹ | $K_1 \cdot 10^5$; М ⁻¹ | $K_2 \cdot 10^5$; М ⁻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 |
| | $n_1 \approx 4-6$ | $n_2 \approx 1-2$ | $n_1 \approx 4-6$ | $n_2 \approx 1-2$ | $n_1 \approx 4-6$ | $n_2 \approx 1-2$ |

K_1 – константа связывания в случае интеркаляции; K_2 - константа связывания при внешнем связывании лиганда.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что флавоноиды кверцетин, морин и рутин могут связываться с ДНК двумя способами (интеркаляция, внешнее связывание). При этом, проявление этих способов не зависит от ионной силы раствора. С другой стороны, от ионной силы раствора зависит сродство этих флавоноидов к ДНК. В частности, при увеличении ионной силы от 0.002 до 0.02 М, значения констант связывания этих флавоноидов с ДНК интеркаляционным способом уменьшаются: в случае кверцетина примерно в 4 раза, в случае морина и рутина – примерно на порядок. 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 постоянным.

При слабом способе связывания значения K_2 проявляют небольшую тенденцию к уменьшению, в зависимости от ионной силы раствора, что может быть следствием связывания молекул этих флавоноидов с сахаро-фосфатным остовом ДНК.

Полученные в данной работе данные могут быть полезными при скрининге биологически активных соединений, содержащихся в растительных организмах, а также для разработки и синтеза на их основе новых, более эффективных лекарственных средств. Эти данные могут быть основой и для исследований влияния различных факторов среды на взаимодействие ДНК с биоактивными соединениями.

§ 5.2 Антирадикальная защита ДНК связанными с ней биофлавоноидами

ААРН-иницированное окисление ДНК в присутствии антиоксидантов проводилось с целью показать способность флавоноидов защищать ДНК от пероксирадикалов. Антипероксирадикальная способность флавоноидов изучена в трех концентрациях при постоянной концентрации ДНК, т.е. при трех разных соотношениях антиоксидант/ДНК.

При соотношении флавоноид/ДНК-1:100 все молекулы флавоноидов находятся в интеркалированном с ДНК состоянии. Как показано на рисунке 5.4 флавоноиды в интеркалированном с ДНК состоянии не проявляют антипероксирадикальную активность и не защищают ДНК от пероксильных радикалов и окислительного повреждения. Это объясняется тем, что в интеркалированном состоянии все активные антирадикальные центры этих молекул блокируются межмолекулярными связями.

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 состоянии с ДНК, т.е. образует своеобразную «шубу» на ДНК. При таком соотношении флавоноид/ДНК, как видно из рисунка 5.5, степень окислительного повреждения ДНК очень низка. Флавоноиды во внешне (электростатически) слабосвязанном состоянии с ДНК проявляют антипероксирадикальную активность и защищают ДНК от окислительного повреждения пероксильными радикалами.

Этого следовало ожидать, так как в слабосвязанных молекулах флавоноидов фенольные ОН группы относительно свободны по сравнению с интеркалированными молекулами. Поэтому и антипероксирадикальная активность у слабосвязанных молекул флавоноидов выше по

сравнению с интеркалированными молекулами, у которых практически полностью заблокированы все антирадикальные активные центры.

Как видно из рисунка 5.4, антиоксидантная активность флавоноидов проявляется и при соотношении флавоноид/ДНК 1:20, когда часть молекул флавоноидов интеркалирована с ДНК, а часть молекул электростатически внешне связана с ДНК. Однако, концентрация внешне (электростатически) слабосвязанных с ДНК молекул флавоноидов относительно низка и как следствие низок и уровень не окисленной доли ДНК.

В целом антирадикальная активность и способность защищать ДНК от пероксильных радикалов является одной из прямых причин и доказательств биологической и биоантиоксидантной активности биофлавоноидов.

Как видно из рисунка 5.4, тролокс (водорастворимый аналог α -токоферола) и аскорбиновая кислота антипероксирадикальную активность не проявляют. Это объясняется тем, что в молекулах этих соединений два антирадикальных центра, при связывании с ДНК блокируются межмолекулярными связями.

Так как примененный метод электрофореза выявления антипероксирадикальной способности и активности изученных антиоксидантов не является количественным, а скорее полукачественным, то количественная интерпретация результатов и более строгие выводы на основе полученных данных не представляются возможными. Более детальное количественное изучение взаимодействия флавоноидов с ДНК является вопросом дальнейших исследований и выходит за рамки представленной диссертации. На основе полученных данных показано, что флавоноиды проявляют способность защищать ДНК от прямых атак пероксильных радикалов в модельных условиях. Полученные данные показывают, что флавоноиды в реальных биологических условиях и системах, включая биологические организмы, могут проявлять антипероксирадикальную активность и защищать ДНК от окислительного повреждения.

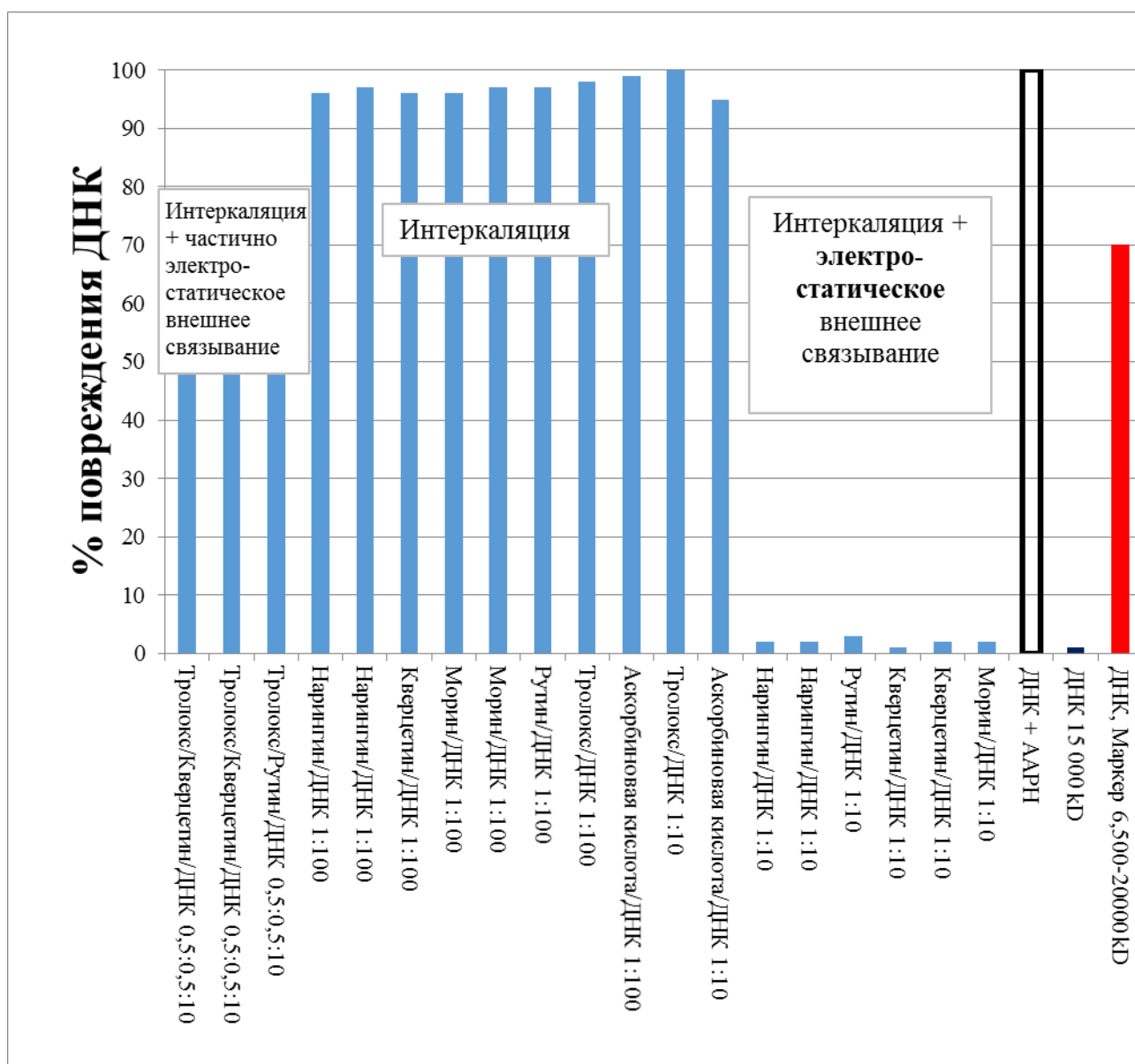


Рис. 5.4. Диаграмма уровней повреждения ДНК в присутствии флавоноидов, аскорбиновой кислоты и тролокса, при различных соотношениях антиоксидант/ДНК. Концентрация ДНК постоянна и $[ДНК] = 1.1 \times 10^{-3}$ М, $[ААРН] = 1.53 \times 10^{-2}$ М, $T = 37^{\circ}\text{C}$, водная среда, фосф. буфер (рН=7.4).

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 (ДИБ, 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.

ЛИТЕРАТУРА

- [1]. <http://www.who.int/en/>
- [2]. <http://www.who.int/ru/>
- [3]. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, 2014, 1-19.
- [4]. Persson, T., Popescu, B.O., & Cedazo-Minguez, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-11.
- [5]. López-Alarcón, C., & Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 763, 1-10.
- [6]. Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1-11.
- [7]. Пристром, А.М., & Бенхамед, М. Оксидативный стресс и сердечно-сосудистые заболевания. *Лечебное дело*, 2012, (2), 19-24.
- [8]. Sohal, R.S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33(1), 37-44.
- [9]. Dayem, A. A., Choi, H. Y., Kim, J. H., & Cho, S. G. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. *Cancers*, 2010, 2(2), 859-884.
- [10]. Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., & Oteiza, P.I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 2010, 31(6), 435–445.
- [11]. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, M.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(11), 4846–4851.
- [12]. Mahomoodally, M.F., Gurib-Fakim, A., & Subratty, A.H. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharmaceutical Biology*. 2008, 43(3), 237-242.

- [13]. Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18(7), 427-442.
- [14]. Cohen, M.F., Sakihama, Y., & Yamasaki, H. Roles of plant flavonoids in interactions with microbes: From protection against pathogens to the mediation of mutualism. *Recent Research Developments in Plant Physiology*. 2001, 2, 157-173.
- [15]. Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 2007, 105(3), 940-949.
- [16]. Groot, H.D., & Rauen, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 1998, 12(3), 249-255.
- [17]. Wiczowski, W., & Piskula, M.K. Food flavonoids. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 2004, 13(54), 101-114.
- [18]. Dangles, O. Antioxidant activity of plant phenols: Chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*, 2012, 16(6), 692-714.
- [19]. Kumar, S., Mishra, A., & Pandey, A.K. Antioxidant mediated protective effect of Parthenium hysterophorus against oxidative damage using in vitro models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 13(1), 1-9.
- [20]. Cao, G., Sofic, E., & Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 22(5), 749-760.
- [21]. Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M., & Jennings, K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, 2002, 36(11), 1199-1208.
- [22]. Hajji, H.E., Nkhili, E., Tomao, V., & Dangles, O. Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research*, 2006, 40(3), 303-320.
- [23]. Kasprzak, M.M., Erxleben, A., & Ochocki, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *Royal Society of Chemistry Advances*, 2015, 5(57), 45853-45877.
- [24]. Kumar, S., & Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16.
- [25]. Husale, S., Grange, W. and Hegner, M., DNA mechanics affected by small DNA interacting ligands. *Single Molecules*, 2002, 3(2-3), 91-96.

- [26]. Avior, Y., Bomze, D., Ramon, O., & Nahmias, Y. Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity. *Food & Function*, 2013, 4(6), 831-844.
- [27]. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA. 2015.
- [28]. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., & Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20(7), 933-956.
- [29]. <http://www.kornienko-ev.ru/BCYD/page232/page384/index.html>
- [30]. Decker E.A. *Antioxidant mechanisms*. In: AkohCC, MinDB, ed: Food lipids, 2nd ed, New York: Marcel Dekker, Inc. 2002, 517–542.
- [31]. Fabre, G., Bayach, I., Berka, K., Paloncýová, M., Starok, M., Rossi, C., ... & Trouillas, P. Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chemical Communications*, 2015, 51(36), 7713-7716.
- [32]. Liebler, D.C., Baker, P.F., & Kaysen, K.L. Oxidation of vitamin E: Evidence for competing autoxidation and peroxy radical trapping reactions of the tocopheroxyl radical. *Journal of the American Chemical Society*, 1990, 112(19), 6995-7000.
- [33]. Choe, E. and Min, D.B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, 8(4), 345-358.
- [34]. Pedrielli, P., & Skibsted, L.H. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(24), 7138-7144.
- [35]. Koo, B.S., & Kim, J.S. Effect of individual phospholipid components treating on storing and frying stability in soybean oil. *Journal of the Korean Society of Food Culture*, 2005, 20(4), 451-458.
- [36]. Choe, E., & Min, D.B. Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, 2007, 72(5), R77-R86.
- [37]. Servili, M., & Montedoro, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2002, 104(9-10), 602-613.

- [38]. Hudson, B.J., & Lewis, J.I. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chemistry*, 1983, 10(1), 47-55.
- [39]. Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., & Berset, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) - induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 2003, 80(10), 1007-1012.
- [40]. Samotyja, U., & Małecka, M. Effects of blackcurrant seeds and rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substrates. *Food Chemistry*, 2007, 104(1), 317-323.
- [41]. Baniyas, C., Oreopoulou, V., & Thomopoulos, C.D. The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 1992, 69(6), 520-524.
- [42]. Hraš, A.R., Hadolin, M., Knez, Ž., & Bauman, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 2000, 71(2), 229-233.
- [43]. Brewer, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2011, 10(4), 221-247.
- [44]. Feala, J.D., Cortes, J., Duxbury, P.M., Piermarocchi, C., McCulloch, A.D., & Paternostro, G. *Systems approaches and algorithms for discovery of combinatorial therapies*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 2010, 2(2), 181-193.
- [45]. Lehar J, Krueger AS, Avery W, Heilbut A.M., Johansen L.M., et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nature Biotechnology*, 2009, 27, 659–666.
- [46]. Yin, N., Ma, W., Pei, J., Ouyang, Q., Tang, C., & Lai, L. Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. *PLoS One*, 2014, 9(4), e93960-e93967.
- [47]. Raff, M., Alberts, B., Lewis, J., Johnson, A., & Roberts, K. *Molecular Biology of the Cell 4th edition*. 2002.
- [48]. Butler, J.M. *Forensic DNA Typing «Elsevier»*, 2001, 14-15.

- [49]. Watson, J.D., & Crick, F.H.C. THE CLASSIC: Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2007, 462, 3-5.
- [50]. Dickerson, R. E. Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature*, 1980, 287, 755-758.
- [51]. Ramos, M.J., & Fernandes, P.A. Atomic-level rational drug design. *Current Computer-Aided Drug Design*. 2006, 2(1), 57-81.
- [52]. Nelson, S.M., Ferguson, L.R., & Denny, W.A. DNA and the chromosome – varied targets for chemotherapy. *Cell and Chromosome*, 2004, 3(1), 2-27.
- [53]. Metzstein, M.M., Stanfield, G.M., & Horvitz, H.R. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: Past, present and future. *Trends in Genetics*, 1998, 14(10), 410-416.
- [54]. Au, J.L.S., Panchal, N., Li, D., & Gan, Y. Apoptosis: A new pharmacodynamic endpoint. *Pharmaceutical Research*, 1997, 14(12), 1659-1671.
- [55]. Li, H.H., Aubrecht, J., & Fornace, A.J. Toxicogenomics: Overview and potential applications for the study of non-covalent DNA interacting chemicals. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2007, 623(1), 98-108.
- [56]. Liu, H.K., & Sadler, P.J. Metal complexes as DNA intercalators. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44(5), 349-359.
- [57]. Wang, D. and Lippard, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 2005, 4(4), 307-320.
- [58]. Rajski, S.R., & Williams, R.M. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chemical Reviews*, 1998, 98(8), 2723-2796.
- [59]. Palchoudhuri, R., Hergenrother, P.J. DNA as a target for anticancer compounds: Methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18, 497–503.
- [60]. Silvestri, C., & Brodbelt, J.S. Tandem Mass spectrometry for characterization of covalent adducts of DNA with anticancer therapeutics. *Mass Spectrometry Reviews*, 2013, 32(4), 247-266.

- [61]. Ni, Y., Lin, D., & Kokot, S. Synchronous fluorescence, UV-visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of bis (1, 10-phenanthroline) copper (II) complex and neutral red with DNA. *Analytical Biochemistry*, 2006, 352(2), 231-242.
- [62]. Lerman, L.S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3(1), 18-30.
- [63]. Martinez, R., & Chacon-Garcia, L. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: What it worked and what did not work. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12(2), 127-151.
- [64]. Shui, X., Peek, M.E., Lipscomb, L.A., Gao, Q., Ogata, C., Roques, B.P., ... & Williams, L. D. Effects of cationic charge on three-dimensional structures of intercalative complexes structure of a bis-intercalated DNA complex solved by MAD phasing. *Current Medicinal Chemistry*, 2000, 7(1), 59-71.
- [65]. Wu, L. *Unveiling biomacromolecule interactions-NMR and optical spectroscopy studies on ligand binding to DNA and lysozyme*, Chalmers University of Technology, 2013, 1-78.
- [66]. Deligkaris, C., Ascone, A.T., Sweeney, K.J., & Greene, A.J.Q. Validation of a computational docking methodology to identify the non-covalent binding site of ligands to DNA. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(8), 2106-2125.
- [67]. Dervan, P.B., & Edelson, B.S. Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, 13(3), 284-299.
- [68]. Shaikh, S.A., & Jayaram, B. *DNA drug interaction*. Department of Chemistry and Supercomputing Facility for Bioinformatics and Computational Biology, Indian Institute of Technology.
- [69]. Minasyants, M.V. Investigation of differential absorption of DNA complexes with ligands. *Chemistry and Biology*, 2014, (1), 51-57.
- [70]. Wei, C., Wang, J., & Zhang, M. Spectroscopic study on the binding of porphyrins to (G4T4G4) 4 parallel G-quadruplex. *Biophysical Chemistry*, 2010, 148(1), 51-55.
- [71]. Jaumot, J., & Gargallo, R. Experimental methods for studying the interactions between G-quadruplex structures and ligands. *Current Pharmaceutical Design*, 2012, 18(14), 1900-1916.

- [72]. Barcelo, F., Capo, D., & Portugal, J. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(20), 4567-4573.
- [73]. Kumar, S., Pandya, P., Pandav, K., Gupta, S.P., & Chopra, A. Structural studies on ligand–DNA systems: A robust approach in drug design. *Journal of Biosciences*, 2012, 37(3), 553-561.
- [74]. Evstigneev, M.P. *DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles*, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2010.
- [75]. Kruglova, E.B., Gladkovskaia, N.A., & Maleev, V. The use of the spectrophotometric analysis for the calculation of the thermodynamic parameters in actinocin derivative-DNA systems. *Biofizika*, 2004, 50(2), 253-264.
- [76]. Kruglova, E.B., & Gladkovskaya, N.A. Comparison of the binding of the therapeutically active nucleosides to DNA molecules with different level of lesions. In *XV International School on Spectroscopy of Molecules and Crystals. International Society for Optics and Photonics*, 2002, 241-245.
- [77]. Iermak, I., Woziwodzka, A., Gwizdek-Wisniewska, A., & Piosik, J. Light-absorption spectroscopy of mutagen-DNA complex in presence of competing biologically active compounds. In *General Assembly and Scientific Symposium, XXXth URSI*, 2011, 1-4.
- [78]. Sinha, R., Islam, M.M., Bhadra, K., Kumar, G.S., Banerjee, A., & Maiti, M. The binding of DNA intercalating and non-intercalating compounds to A-form and protonated form of poly (rC)· poly (rG): Spectroscopic and viscometric study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006, 14(3), 800-814.
- [79]. Zhao, Y., Zhu, J., He, W., Yang, Z., Zhu, Y., Li, Y., Guo, Z. Oxidative DNA cleavage promoted by multinuclear copper complexes: Activity dependence on the complex structure. *Chemistry*, 2006, 25, 6621-6629.
- [80]. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed., Springer, 2006.
- [81]. Bondarev S.L., Кnyukshto V.N. Fluorescence and phosphorescence of rutin. *Journal of Luminescence*, 2013, 142, 236-240.
- [82]. Тавадян Л.А., Саакян А.Д., Арутюнян Л.А., Тоникян А.К., Манукян З.О. Антирадикальная активность диметилселеноксида и селенита натрия. *Известия Академии Наук РФ, Серия Химическая*, 2013, 7, 1586-1589.

- [83]. Li, N., Ma, Y., Yang, C., Guo, L., & Yang, X. Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biophysical Chemistry*, 2005, 116(3), 199-205.
- [84]. Alzeer, J., & Luedtke, N.W. pH-mediated fluorescence and G-quadruplex binding of amido phthalocyanines. *Biochemistry*, 2010, 49(20), 4339-4348.
- [85]. Tran, P.L.T., Largy, E., Hamon, F., Teulade-Fichou, M.P., & Mergny, J.L. Fluorescence intercalator displacement assay for screening G4 ligands towards a variety of G-quadruplex structures. *Biochimie*, 2011, 93(8), 1288-1296.
- [86]. De Cian A, Guittat L, Kaiser M, et al. Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods*, 2007, 42, 183-195.
- [87]. Wu, H., Jia, F., Kou, F., Liu, B., Yuan, J., & Bai, Y. A Schiff base ligand N-(2-hydroxyacetophenone)-3-oxapentane-1, 5-diamine and its nickel (II) complex: Synthesis, crystal structure, antioxidation, and DNA-binding properties. *Transition Metal Chemistry*, 2011, 36(8), 847-853.
- [88]. Sirajuddin, M., Ali, S., & Badshah, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, 124, 1-19.
- [89]. Neault, J.-F. & Tajmir-Riahi, H.A. DNA-chlorophyllin interaction. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998, 102(4), 1610–1614.
- [90]. Deng, H., Bloomfield, V.A., Benevides, J.M., & Thomas, G.J. Dependence of the Raman signature of genomic B-DNA on nucleotide base sequence. *Biopolymers*, 1999, 50(6), 656-666.
- [91]. Benevides, J.M., & Thomas, G.J. Local conformational changes induced in B-DNA by ethidium intercalation. *Biochemistry*, 2005, 44(8), 2993-2999.
- [92]. Hartman, K.A., Lord, R.C., & Thomas Jr, G.J. Structural studies of nucleic acids and polynucleotides by infrared and Raman spectroscopy. *Physicochemical Properties of Nucleic Acids*, 1973, 1, 1-89.
- [93]. Barton, T.F., Cooney, R.P., & Denny, W.A. Surface-enhanced Raman spectroscopic study of amsacrine and amsacrine-DNA interactions. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1992, 23(6), 341-345.

- [94]. Bliznyuk, J.N., Kruglova, E.B., Bolbukh, T.V., & Ovchinnikov, D.V. Influence of solution acidity on structure of actinocin derivatives and their affinity to DNA studied as a function of pH by Raman spectroscopy. *Spectroscopy Letters*, 2009, 42(8), 498-505.
- [95]. Blyzniuk, I.N., Bolbukh, T.V., Kruglova, O.B., Semenov, M.A., & Maleev, V.Y. Investigation of complexation of ethidium bromide with DNA by the method of Raman spectroscopy. *Biopolymers and Cell*, 2009, 25(2), 126-132.
- [96]. Ghica, M.E. and Brett, A.M.O. Electrochemical oxidation of rutin. *Electroanalysis*, 2005, 17(4), 313-318.
- [97]. Chen, Q.Y., Li, D.H., Yang, H.H., Zhu, Q.Z., Xu, J.G., & Zhao, Y. Interaction of a novel red-region fluorescent probe, Nile Blue, with DNA and its application to nucleic acids assay. *Analyst*, 1999, 124(6), 901-906.
- [98]. Ghica, M.E., & Brett, A.M.O. Electrochemical oxidation of rutin. *Electroanalysis*, 2005, 17(4), 313-318.
- [99]. Nijveldt, R.J., Van Nood, E.L.S., Van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., Van Norren, K. and Van Leeuwen, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 2001, 74(4), 418-425.
- [100]. Aaby, K., Hvattum, E., & Skrede, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(15), 4595-4603.
- [101]. Janjua, N.K., Siddiqa, A., Yaqub, A., Sabahat, S., Qureshi, R., & ul Haque, S. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA binding interactions at physiological conditions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 74(5), 1135-1137.
- [102]. Engelmann, M.D., Hutcheson, R., & Cheng, I.F. Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5, 7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3', 4'-dihydroxyflavone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(8), 2953-2960.
- [103]. Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Diamantoglou, S., & Tajmir-Riahi, H.A. An overview of DNA and RNA bindings to antioxidant flavonoids. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2007, 49(1), 29-36.

- [104]. Freifelder, D. *Physical Biochemistry*, Freeman W.H. and Company, New York, 1976, 15.
- [105]. Lambert, J.B., Shurvell, H.F., Lightner, D.A., & Cooks, R.G. *Organic Structural Spectroscopy*, Prentice- Hall, Inc., New Jersey, 1998, 10-11.
- [106]. Collins, A.R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: Applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 81(1), 261S-267S.
- [107]. Gutteridge, J.M. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 1994, 91(2-3), 133-140.
- [108]. Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 2001, 40(8), 959-975.
- [109]. Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 2002, 18(10), 872-879.
- [110]. Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., & Ravanat, J.L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003, 531(1), 5-23.
- [111]. Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J.L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: Mechanistic aspects and formation in cells. *Accounts of Chemical Research*, 2008, 41(8), 1075-1083.
- [112]. Verhagen, H., Poulsen, H.E., Loft, S., van Poppel, G., Willems, M.I., & van Bladeren, P.J. Reduction of oxidative DNA-damage in humans by Brussels sprouts. *Carcinogenesis*, 1995, 16(4), 969-970.
- [113]. Невредимова Т.С., Мармий Н.В., Есипов Д.С., Есипова О.В., Швец В.И. 8-оксо-2'-дезоксигуанозин - биомаркер окислительного стресса. *Вестник МИТХТ*, 2014, 5, 3-10.
- [114]. Nisha, K., & Deshwal, R.K. Antioxidants and their protective action against DNA damage. *DNA*, 2011, 27(28), 28-32.
- [115]. Gimisis, T., & Cismaş, C. Isolation, characterization, and independent synthesis of guanine oxidation products. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, (6), 1351-1378.

- [116]. Pham-Huy, L.A., He, H., & Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 2008, 4(2), 89-96.
- [117]. Doulias, P.T., Nouis, L., Zhu, B.Z., Frei, B., & Galaris, D. Protection by tropolones against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells. *Free Radical Research*, 2005, 39(2), 125-135.
- [118]. Melidou, M., Riganakos, K., & Galaris, D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 39(12), 1591-1600.
- [119]. Gordon A.J., Ford R.A. *The Chemist's Companion. A Handbook of Practical Data, Techniques, and References*. Wiley & Sons, New York, 1972, 431.
- [120]. Glazer, A.N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods in enzymology*, 1989, 186, 161-168.
- [121]. Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 18(1), 29-36.
- [122]. Cao, G., Alessio, H.M., & Cutler, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 1993, 14(3), 303-311.
- [123]. Хасанов, В.В., Рыжова, Г.Л., & Мальцева, Е.В. Методы исследования антиоксидантов. *Химия Растительного Сырья*, 2004, (3), 63-75.
- [124]. Alam, M.N., Bristi, N.J., & Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2013, 21(2), 143-152.
- [125]. Prior, R.L., Wu, X., & Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(10), 4290-4302.
- [126]. 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, 69(1-2), 22-32.
- [127]. Zuman, P., Adams, R.N. *Electrochemistry at solid electrodes*, M. Dekker, New York, 1970, 1969, 402.

- [128]. Kounaves, S.P. Voltammetric techniques. In *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, F.A. Settle Ed., Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, 1997, 709, 717.
- [129]. Bard, A.J., & Faulkner, L.R. *Introduction and overview of electrode processes. Electrochemical Methods—Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1980, 32-34.
- [130]. Хенце, Г. *Полярография и вольтамперометрия. Теоретические основы и аналитическая практика*. Лаборатория знаний, 2014, 1-283.
- [131]. Christie, J.H., Turner, J.A., Oysteryoung, R.A. Square Wave Voltammetry at the Dropping Mercury Electrode: Theory. *Analytical Chemistry*, 1977, 49(13), 1899-1903.
- [132]. Манукян З.О., Арутюнян Л.А., Мусаелян М.В., Мкрян Г.Г., Тавадян Л.А. Антирадикальная способность селенофена, тиофена и их аминокарбонитрил производных. *Химический Журнал Армении*, 2015, 68(2), 183-195.
- [133]. Kedare, S.B., & Singh, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 2011, 48(4), 412-422.
- [134]. Волков, В.А., Дорофеева, Н.А., & Пахомов, П.М. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений. *Химико - Фармацевтический Журнал*, 2007, 43(6), 27-31.
- [135]. Маркарян Ш.А., Тавадян Л.А., Кочарян Г.Г., Шагинян Г.А. Влияние диметилсульфоксида на электрохимические и антирадикальные свойства аскорбиновой кислоты. *Известия Академии Наук РФ, Серия Химическая*, 2013, 7, 1625-1629.
- [136]. 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, 1, 49-54.
- [137]. Crothers D. Calculation of binding isotherms for heterogenous polymers. *Biopolymers*, 1968, 6(4), 575– 584.

- [138]. Minasyan, S.H., Tavadyan, L.A., Antonyan, A.P., Davtyan, H.G., Parsadanyan, M.A., & Vardevanyan, P.O. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. *Bioelectrochemistry*, 2006, 68(1), 48-55.
- [139]. Arakelyan, V., Babayan, Y., & Potikyan, G. Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA: Analysis of correlation functions. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2000, 18(2), 231-235.
- [140]. Zhao, F., Liu, Z.Q. and Wu, D. Antioxidative effect of melatonin on DNA and erythrocytes against free-radical-induced oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2008, 151(2), 77-84.
- [141]. Sutherland, B.M., Bennett, P.V. and Sutherland, J.C. DNA damage quantitation by alkaline gel electrophoresis. *DNA Repair Protocols: Mammalian Systems*, 2006, 251-273.
- [142]. Mateos R, Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *Journal of separation science*. 2007, 30(2), 175-91.
- [143]. Քոչարյան Գ.Հ. Ֆլավանոլիդների և ասկորբինաթթվի խառնուրդների հակապերօքսիռադիկալային ակտիվության սիներգիստական և անտագոնիստական էֆեկտները. *Հայաստանի Ճարտարագիտական Ակադեմիայի Լրաբեր*, 2015, 12(4), 762-767.
- [144]. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 1997, 2, 152-159.
- [145]. Larson, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 1988, 27, 969-978.
- [146]. Hotta, H., Nagano, S., Ueda, M., Tsujino, Y., Koyama, J., Osakai, T. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochemica and Biophysica Acta*, 2002, 1572, 123-132.
- [147]. Masuoka, N., Matsuda, M., Kubo, I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. *Food Chemistry*, 2012, 131(2), 541-545.
- [148]. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, M., Simic, M.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116, 4846-4851.

- [149]. Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 1990, 186, 343-355.
- [150]. Rice-Evans, C.A., Packer, L. *Flavonoids in health and disease*, Marcel Dekker, New-York, USA. 2003.
- [151]. Xiao, Z.-P., Peng, Z.-Y., Peng, M.-J., Yan, W.-B., Ouyang, Y.-Z., Zhu, H.-L. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011, 11, 169-177.
- [152]. Chen, A.Y., Chen, Y.C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 2013, 138, 2099-2107.
- [153]. Wang, S., Meckling, K.A., Marcone, M.F., Kakuda, Y., Tsao, R. Synergistic, additive and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 960-968.
- [154]. Niki, E., Saito, T., Kawakami, A., Kamiya, Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259, 4177-4182.
- [155]. Jia, Z.-S., Zhou, B., Yang, L., Wu, L.-M., Liu, Z.-L. Antioxidant synergism of tea polyphenols and α -tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transaction*, 1998, 2(4), 911-915.
- [156]. Karpukhina, G.V., Emanuel, N.M. Classification of synergistic mixtures of antioxidants and the mechanisms of synergy. *Dokladi Akademii Nauk SSSR*, 1984, 276(5), 1163-1167. [in Russian]
- [157]. Ohkatsu, Y., Suzuki F. Synergism between phenolic antioxidants in autoxidation. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 2011, 54(1), 22-29.
- [158]. Denisov, E.T., Azatyan, V.V. *Inhibition of chain reactions*, London: Gordon and Breach, 2000, 337.
- [159]. Pedrielli, P., Skibsted, L.H. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-) epicatechin, and (+) catechin on α -tocopherol in homogenous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(24), 7138-7144.

- [160]. Amorati, R., Ferroni, F., Lucarini, M., Pedulli, G.F., Valgimigli, L. A quantitative approach to the recycling of α -tocopherol by coantioxidants. *The Journal of Organic Chemistry*, 2002, 67, 9295-9303.
- [161]. Marteau, C., Favier, D., Nardello-Rataj, V., Aubry, J.-M. Dramatic solvent effect on the synergy between α -tocopherol and BHT antioxidants. *Food Chemistry*, 2014, 160, 190-195.
- [162]. Colon, M., Nerin, C. Synergistic, antagonistic and additive interactions of green tea polyphenols. *European Food Research and Technology*, 2015, 1-10.
- [163]. Pietta P.-G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 2000, 63, 1035-1042.
- [164]. van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20, 331-342.
- [165]. Marinova, E., Toneva, A., Yanishlieva, N. Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry*, 2008, 106, 628-633.
- [166]. Niki, E. Interaction of ascorbate and α -tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1987, 498, 186-199.
- [167]. Amic, D., Stepanic, V., Lucic, B., Markovic, Z., Dimitric Markovic, J.M. PM6 study of free radical scavenging mechanisms of flavonoids. Why does O-H bond dissociation enthalpy effectively represent free radical scavenging activity. *Journal of Molecular Modeling*, 2013, 19, 2593-2603.
- [168]. Snelgrove, D.W., Lusztyk, J., Banks, J.T., Mulder, P., Ingold, K.U. Kinetic solvent effects on hydrogen-atom abstractions: Reliable, quantitative predictions via a single empirical equation 1. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(3), 469-477.
- [169]. Tavadyan, L.A., Mardoyan, V.A., Nalbandyan, A.B. The reactivity of tertiary alkyl peroxy radicals in liquid phase. The solvent effect on tertiary butyl peroxy radical reaction with benzaldehyde and phenol. *Chemical Physics*, 1986, 5(10), 1377-1383.
- [170]. Tavadyan, L.A., Tonikyan, A.K., Minasyan, S.H., Harutyunyan, L.A., Greenaway, F.T., Skip, W., Gray-Kaufman, R.A., Sorenson, J.R.J. Anti-tert-butylperoxy radical reactivities of copper (II), manganese (II) and iron (III) 3,5-di-iso-propylsalicylate chelates. *Inorganica Chimica Acta*, 2002, 328, 1-12.

- [171]. Cai, W., Chen, Y., Xie, L., Zhang, H., Hou, C. Characterization and density functional theory study of the antioxidant activity of quercetin and its sugar-containing analogues. *European Food Research and Technology*, 2014, 238, 121-128.
- [172]. Panat, N.A., Amrute, B.K., Bhattu, S., Haram, S.K., Sharma, G.K., Ghaskadbi S.S. Antioxidant profiling of C3 quercetin glycosides: Quercitrin, Quercetin 3- β -D-glucoside and Quercetin 3-O-(6"-O-malonyl)- β -D-glucoside in cell free environment. *Free Radicals and Antioxidants*, 2015, 5(2), 90-100.
- [173]. Kasaikina, O.T., Kartasheva, Z.S., Kancheva, V.D., Yanishlieva, N.V., Totseva, I.R. Consumption of quercetin and rutin in reactions with free radicals. *Bulgarian Chemical Communications*, 2010, 42(2), 153-160.
- [174]. Jin, Y., Lu, Y., Han, G.-Z., Li, W.-P., Zhou, Q., Jin, F.-X., Yu, H.-S. Structure-effect study of quercetin and its sugar-containing analogues as antioxidants in in vitro H₂O₂-induced cell injury model. *Asian Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 2007, 7(4), 295-301.
- [175]. Brett A.M.O., Ghica, M.-E. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis*, 2003, 15(22), 1745-1750.
- [176]. Janeiro, P., Brett, A.M.O. Solid state electrochemical oxidation mechanisms of morin in aqueous media. *Electroanalysis*, 2005, 17(9), 733-738.
- [177]. Correia, C.F., Guedes, R.C., dos Santos, R.M.B., Cabral, B.J.C., Simoes, J.A.M. OH bond dissociation enthalpies in hydroxyphenols. A time-resolved photoacoustic calorimetry and quantum chemistry study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, 6(9), 2109-2118.
- [178]. Rajendran, M., Ravichandran, R., Devapiriam, D. Electronic description of few selected flavonoids by theoretical study. *International Journal of Computer Applications*, 2013, 77(4), 18-25.
- [179]. Jorgensen, L.V., Madsen, H.L., Thomsen, M.K., Dragsted, L.O., Skibsted, L.H. Regeneration of phenolic antioxidants from phenoxyl radicals: An ESR and electrochemical study of antioxidant hierarchy. *Free Radical Research*, 1999, 30(2), 207-220.
- [180]. Sheng, Q., Yu, H., & Zheng, J. Sol-gel derived terbium hexacyanoferrate modified carbon ceramic electrode: Electrochemical behavior and its electrocatalytical oxidation of ascorbic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2007, 606(1), 39-46.

- [181]. Jin, G.P., Chen, Q.Z., Ding, Y.F., & He, J.B. Electrochemistry behavior of adrenalin, serotonin and ascorbic acid at novel poly rutin modified paraffin-impregnated graphite electrode. *Electrochimica Acta*, 2007, 52(7), 2535-2541.
- [182]. Yilmaz S., Sadikoglu M., Saglikoglu G., Yagmur S., Askin G. Determination of ascorbic acid in tablet dosage forms and some fruit juices by DPV. *International Journal of Electrochemical Science*, 2008, 1(3), 1534-1542.
- [183]. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 2004, 26(2), 211-219.
- [184]. Hristeac, E.N., Caproiu, M.T., Pencu, G., Hillebrand, M., Constantinescu, T. and Balaban, A.T. Reaction of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl with HO•, O₂•⁻, HO⁻, and HOO⁻ Radicals and Anions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2006, 7(5), 130-143.
- [185]. Yen, G.C., Duh, P.D. and Tsai, H.L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 2002, 79(3), 307-313.
- [186]. Arrigoni, O. and de Tullio, M.C. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2002, 1569(1), 1-9.
- [187]. <http://www.findpatent.ru/patent/256/2563117.html>
- [188]. Limaye, L.S. Bone marrow cryopreservation: Improved recovery due to bioantioxidant additives in the freezing solution. *Stem Cells*, 1997, 15(5), 353-358.
- [189]. Markarian, S.A., Bonora, S., Bagramyan, K.A. and Arakelyan, V.B. Glass-forming property of the system diethyl sulphoxide/water and its cryoprotective action on Escherichia coli survival. *Cryobiology*, 2004, 49(1), 1-9.
- [190]. Jacob, S.W. and Herschler, R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*, 1986, 23(1), 14-27.
- [191]. Yu, Z.W. and Quinn, P.J. Dimethyl sulphoxide: A review of its applications in cell biology. *Bioscience Reports*, 1994, 14(6), 259-281.
- [192]. Zatikyan, A.I., Kazoyan, E.A., Bonora, S. and Markaryan, S.A. Ascorbic acid vibrational spectra in sulfoxide solvents. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2008, 75(5), 664-668.
- [193]. Markarian, S.A. and Sargsyan, H.R. Electronic absorption spectra of ascorbic acid in water and water-dialkylsulfoxide mixtures. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2011, 78(1), pp.6-10.

- [194]. Казоян Е.А., Терзян А.М., Маркарян Ш.А. Термодинамические свойства растворов L-аскорбиновой кислоты в диметилсульфоксиде и водно-диметилсульфоксидных смесях. *Журнал Физической Химии*, 2011, 85(4), 689-693.
- [195]. Markarian, S.A. and Gabrielyan, L.S. Dielectric relaxation study of ascorbic acid solutions in pure dimethylsulfoxide (or diethylsulfoxide) and in dimethylsulfoxide (or diethylsulfoxide)/water mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 2011, 164(3), 207-211.
- [196]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28(1), 25-30.
- [197]. Buettner, G.R. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: Ascorbate as a test for catalytic metals. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1988, 16(1), 27-40.
- [198]. Bors, W., Buettner, G.R. The vitamin C radical and its reactions. In: Packer L., Fuchs J., eds. *Vitamin C in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, 4, 75-94.
- [199]. http://en.wikipedia.org/wiki/Acid_dissociation_constant#cite_not-23
- [200]. Abraham, M.H., Grellier, P.L., Prior, D.V., Morris, J.J. and Taylor, P.J. Hydrogen bonding. Part 10. A scale of solute hydrogen-bond basicity using log K values for complexation in tetrachloromethane. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions* 1990, 2, (4), 521-529.
- [201]. Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(6), 1841-1856.
- [202]. Mohajeri, A. and Asemani, S.S. Theoretical investigation on antioxidant activity of vitamins and phenolic acids for designing a novel antioxidant. *Journal of Molecular Structure*, 2009, 930(1), 15-20.
- [203]. Pournaghi-Azar, M.H. and Ojani, R. Catalytic oxidation of ascorbic acid by some ferrocene derivative mediators at the glassy carbon electrode. Application to the voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine in the same sample. *Talanta*, 1995, 42(12), 1839-1848.
- [204]. Valgimigli, L., Banks, J.T., Ingold, K.U. and Luszyk, J. Kinetic solvent effects on hydroxylic hydrogen atom abstractions are independent of the nature of the abstracting

- radical. Two extreme tests using vitamin E and phenol. *Journal of the American Chemical Society*, 1995, 117(40), 9966-9971.
- [205]. Тавадян Л.А., Мардоян В.А., Налбандян А.Б. Реакционная способность третпероксильных радикалов в жидкой фазе. Влияние растворителя на реакции трет-бутилпероксильного радикала с бензальдегидом и фенолом. *Химическая физика*, 1986, 5(10), 1377.
- [206]. Gaikwad, P., Barik, A., Priyadarsini, K.I. and Rao, B.S.M. Antioxidant activities of phenols in different solvents using DPPH assay. *Research on Chemical Intermediates*, 2010, 36(9), 1065-1072.
- [207]. Foti, M.C. and Daquino, C. Kinetic and thermodynamic parameters for the equilibrium reactions of phenols with the DPPH• radical. *Chemical Communications*, 2006, (30), 3252-3254.
- [208]. Foti, M., Ingold, K.U. and Luszyk, J. The surprisingly high reactivity of phenoxy radicals. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(21), 9440-9447.
- [209]. Foti, M.C., Daquino, C., Mackie, I.D., DiLabio, G.A. and Ingold, K.U. Reaction of phenols with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. Kinetics and DFT calculations applied to determine ArO-H bond dissociation enthalpies and reaction mechanism. *The Journal of Organic Chemistry*, 2008, 73(23), 9270-9282.
- [210]. Foti, M.C. Use and abuse of the DPPH• radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(40), 8765-8776.
- [211]. Travers, A. and Muskhelishvili, G. DNA structure and function. *FEBS Journal*, 2015, 282(12), 2279-2295.
- [212]. Ahmadi, S.M., Dehghan, G., Feizi, M.A.H. and Dolatabadi, J.E.N. In vitro studies on calf thymus DNA interaction with Quercetin-Palladium (II) complex. In *International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2011, 5, 110-114.
- [213]. Zuber, G., Quada, J.C. and Hecht, S.M. Sequence selective cleavage of a DNA octanucleotide by chlorinated bithiazoles and bleomycins. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(36), 9368-9369.
- [214]. Kikandi, S.N., Musah, S., Lee, K., Hassani, J., Rajan, S., Zhou, A. and Sadik, O. Comparative studies of quercetin interactions with monophosphate nucleotides using

- UV-Vis spectroscopy and electrochemical techniques. *Electroanalysis*, 2007, 19(19-20), 2131-2140.
- [215]. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002, 127(1), 183-198.
- [216]. Dimitrios, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17(9), 505-512.
- [217]. Kanakis, C.D., Nafisi, S., Rajabi, M., Shadaloi, A., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Bariyanga, J. and Tajmir-Riahi, H.A. Structural analysis of DNA and RNA interactions with antioxidant flavonoids. *Journal of Spectroscopy*, 2009, 23(1), 29-43.
- [218]. Bukhari, S.B., Memon, S., Mahroof-Tahir, M. and Bhangar, M.I. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 71(5), 1901-1906.
- [219]. Shi, S., Liu, J., Li, J., Zheng, K.C., Huang, X.M., Tan, C.P., Chen, L.M. and Ji, L.N. Synthesis, characterization and DNA-binding of novel chiral complexes Δ - and Λ -[Ru(bpy)₂L]²⁺ (L= o-mopip and p-mopip). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100(3), 385-395.
- [220]. Hussain, S.T. and Siddiqa, A. Voltammetric and viscometric studies of flavonoids interactions with DNA at physiological conditions. *European Journal of Chemistry*, 2011, 2(1), 109-112.
- [221]. Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. and Zhang, L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 2003, 23(4), 519-534.
- [222]. Middleton, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 2000, 52(4), 673-751.
- [223]. Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Diamantoglou, S. and Tajmir-Riahi, H.A. DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2005, 22(6), 719-724.
- [224]. Zhu, Z., Li, C. and Li, N.Q. Electrochemical studies of quercetin interacting with DNA. *Microchemical Journal*, 2002, 71(1), 57-63.

- [225]. Chowdhury, A.R., Sharma, S., Mandal, S., Goswami, A., Mukhopadhyay, S. and Majumder, H.K. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochemical Journal*, 2002, 366(2), 653-661.
- [226]. Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Diamantoglou, S. and Tajmir-Riahi, H.A. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 2006, 798(1), 69-74.
- [227]. Durgo, K., Vuković, L., Rusak, G., Osmak, M. and Franekić Čolić, J. Effect of flavonoids on glutathione level, lipid peroxidation and cytochrome P450 CYP1A1 expression in human laryngeal carcinoma cell lines. *Food Technology and Biotechnology*, 2007, 45(1), 69-79.
- [228]. Vardevanyan, P.O., Antonyan, A.P., Parsadanyan, M.A., Davtyan, H.G. and Karapetyan, A.T. The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. *Experimental and Molecular Medicine*, 2003, 35(6), 527-533.
- [229]. Lane, A.N. and Jenkins, T.C. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2000, 33(03), 255-306.
- [230]. Chaires, J.B. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, 453(1), 26-31.