

ИНГИБИРУЮЩАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНИСТЕИНА В ПРИСУТСТВИИ СОЕВОГО ЛЕЦИТИНА

Смирнова А.Н., Мазалецкая Л.И., Шишкина Л.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина., 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. Эффективность ингибирования инициированного окисления этилбензола генистеином и его смесями с соевым лецитином исследовали волюмометрическим методом. Установлено, что генистеин взаимодействует с пероксирадикалами этилбензола. Рассчитан его параметр ингибирования $fk_7 = 4,2 \cdot 10^4$ л/(моль с) и проведена оценка величины стехиометрического коэффициента ингибирования f , нижняя граница которого превышает значение 3,5. Следовательно, в реакции с пероксирадикалами этилбензола участвуют не менее двух ОН-групп, входящих в состав молекулы генистеина. Лецитин, являющийся смесью природных липидов, ускоряет инициированное окисление этилбензола и существенно снижает эффективность ингибирования генистеина. При этом уменьшение эффективности ингибирования не является линейным в зависимости от концентрации лецитина в реакционной смеси. Этот эффект наиболее выражен при низкой концентрации лецитина (1 мг/мл), в то время как увеличение концентрации лецитина от 1 до 15 мг/мл практически не приводит к дальнейшему снижению эффективности ингибирования генистеина. Полученные данные свидетельствуют о необходимости детального изучения механизма антиоксидантных свойств флавоноидов в сложных системах.

Ключевые слова: инициированное окисление, антиоксидантные свойства, генистеин, природные фосфолипиды.

Флавоноиды, одни из наиболее распространённых соединений в растительной клетке, выполняют разнообразные важные функции в жизни растений и используются в качестве биологически активных веществ в различных системах [1]. Флавоноиды являются природными антиоксидантами (АО) класса замещенных фенолов. К наиболее изученным фенолам этого класса относятся кверцетин и дигидрокверцетин. Дигидрокверцетин, который оказался менее токсичным по сравнению с кверцетином, наряду с антиоксидантными (АО) свойствами характеризуется капилляропротекторным, дезинтоксикационным, противоотечным действием и используется в качестве биологически активной добавки [2].

К представителям биоантиоксидантов класса флавоноидов относится генистеин, который является основным изофлавоном сои, широко используемой в пищевой промышленности. Генистеин относится к растительным гормонам, отвечающим за процесс старения. В настоящее время выпускаются биологически активные добавки на основе генистеина [3], установлены его радиопротекторные свойства [4].

Если рассматривать АО свойства флавоноидов, то необходимо отметить изменение их эффективности в зависимости от их химической структуры, а также в присутствии некоторых компонентов сложных биологических систем. Во всех сложных системах наряду с АО содержатся фосфолипиды (ФЛ), которые, как было установлено в работах [5-8], влияют на АО активность фенольных антиоксидантов. Так, в присутствии лецитина эффективность антиоксидантного действия флавоноидов – кверцетина и дигидрокверцетина заметно снижается [5].

Целью настоящей работы было изучение антирадикальной активности генистеина в модельной системе и влияние лецитина на его ингибирующую эффективность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиокислительную активность генистеина и влияние на нее добавок лецитина изучали с использованием кинетического метода поглощения кислорода. Модельным углеводородом служил этилбензол, в качестве инициатора использовали АИБН. Скорость инициирования $I_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/(л с), температура 60 °С. Раствор генистеина в этилбензоле термостатировали при температуре опыта, затем добавляли раствор лецитина и инициатора и через 1,5 мин (мертвое время установки) осуществляли регистрацию объема поглощенного кислорода во времени. Из кинетических кривых определяли начальные скорости окисления.

Генистеин, синтезированный в НПЦ "Фармзащита" ФМБА России и любезно предоставленный нам для исследований, использовали без дополнительной очистки. Концентрацию генистеина варьировали в диапазоне концентраций от $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Исходный раствор генистеина готовили в смеси этилбензол: этиловый спирт = 3,5 : 1,5 (исходная концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л).

Влияние лецитина на ингибирующую эффективность генистеина определяли при постоянной концентрации генистеина ($C_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Концентрацию лецитина изменяли в пределах от 1 мг/мл до 15 мг/мл.

Из раствора 10 %-ного соевого лецитина (Харьков, Украина) отгоняли спирт, в полученный лецитин добавляли этилбензол: исходная концентрация составляла 300 мг/мл. Качественный и количественный состав ФЛ, содержащихся в лецитине, определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [9], поскольку лецитин представляет собой смесь природных липидов. Использовали силикагель типа Н "Sigma" (USA), стеклянные пластинки размером 100•120 мм. Разделение ФЛ на фракции проводили в предварительно насыщенной хроматографической камере в системе растворителей: хлороформ - метанол - ледяная уксусная кислота - дистиллированная вода в соотношениях 12,5 : 7,5 : 2 : 1. Пластины проявляли в парах йода. Количественный анализ фракций ФЛ проводили на спектрофотометре "ПЭ-5400 ВИ" при длине волны 815 нм по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Подробности разделения ФЛ на фракции методом ТСХ описаны в работе [10].

Статистическую обработку результатов проводили общепринятым методом вариационной статистики. Экспериментальные данные обрабатывали, используя пакет программ Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены начальные участки кинетических кривых поглощения кислорода при окислении этилбензола в отсутствие (кривая 1) и в присутствии трех различных концентраций генистеина (кривые 2-4). Видно, что по сравнению с неингибированной реакцией добавки генистеина приводят к снижению скорости поглощения кислорода, что свидетельствует о взаимодействии генистеина с пероксирадикалами. Для расчета параметра ингибирования, т.е. произведения fk_7 , где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, k_7 – константа скорости взаимодействия АО с пероксирадикалами, начальные скорости представляли в координатах уравнения:

$$W_0/W - W/W_0 = fk_7[\ln H]_0 / (k_6 W_i)^{0,5}, \quad (I)$$

где W_0 и W – скорости инициированного окисления этилбензола в отсутствие и в присутствии добавок; W_i – скорость инициирования; k_6 – константа скорости квадратичной рекомбинации пероксирадикалов.

Как видно из данных, представленных на рисунке 2, наблюдается прямолинейная зависимость отношения скоростей от концентрации введенного генистеина в координатах уравнения (I), из тангенса угла наклона которой рассчитали параметр $fk_7 = 4,2 \cdot 10^4$ л/(моль с). При расчете принимали $k_6 = 1,9 \cdot 10^7$ л/(моль с) [11].

Для оценки величины f был проведен опыт с начальной концентрацией генистеина, равной $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, в течение 157 мин. Как видно из рисунка 3, в течение этого времени скорость окисления (рис. 3, кривая 2) не достигает скорости неингибированной реакции (рис. 3, кривая 1). Поэтому из полученных данных представлялось возможным лишь сделать оценку нижней границы величины $f > 3,5$. Расчет проводили с использованием метода [12].

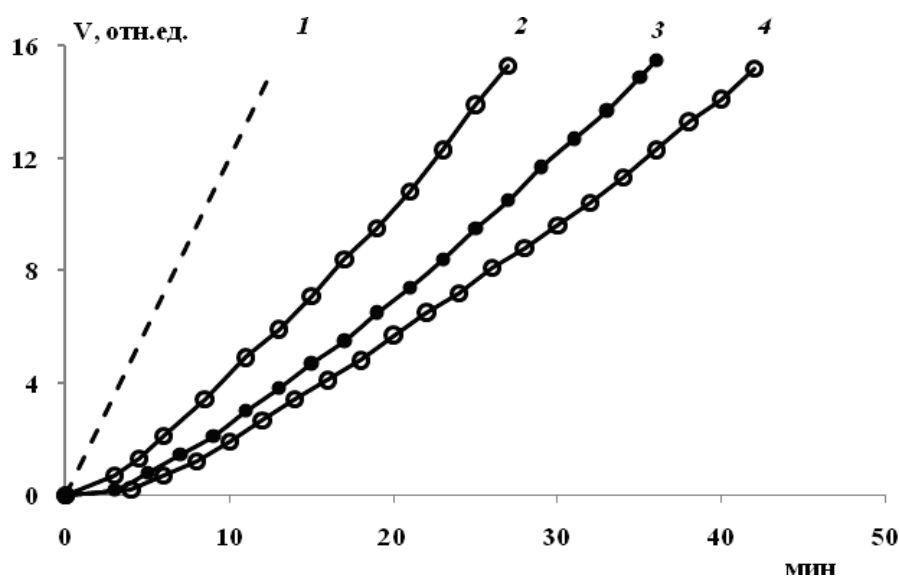


Рисунок 1. Кинетические кривые поглощения кислорода при окислении этилбензола без добавок (1) и в присутствии генистеина: (2) - $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, (3) - $7,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, (4) - $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. $W_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/(л с)

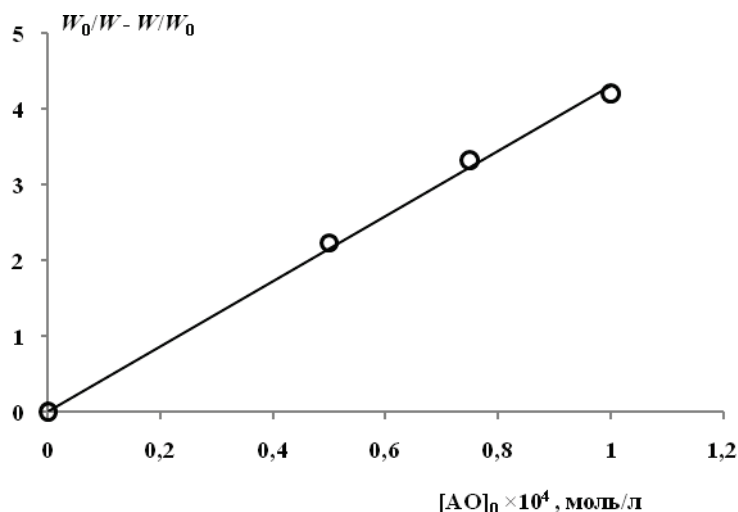


Рисунок 2. Зависимость начальной скорости окисления от концентрации генистеина в координатах уравнения I. Этилбензол, 333 К, $W_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/(л с)

Полученный результат свидетельствует о том, что в реакции со свободными радикалами участвует не менее двух ОН-групп, входящих в состав молекулы генистеина.

Таким образом, генистеин является ингибитором свободнорадикальных реакций, при этом на одной молекуле гибнет более трех радикалов. Для сравнения в случае кверцетина и дигидрокверцетина в реакции инициированного окисления метилолеата на одной молекуле гибнет 2 и 2,6 радикалов соответственно [5].

Ранее для флавоноидов – кверцетина и дигидрокверцетина было обнаружено снижение эффективности ингибирования в присутствии добавок лецитина [5]. В настоящей работе аналогичный результат был получен для генистеина.

Как известно, лецитин представляет собой смесь природных липидов, что подтверждают данные ТСХ. Использованный в работе лецитин в составе общих липидов содержал 40% ФЛ, среди которых основной фракцией является фосфатидилхолин ($85,7 \pm 1,3$ %). Среди минорных фракций преобладали сфингомиелин ($4,4 \pm 0,6$ %) и фосфатидилэтаноламин ($3,4 \pm 0,4$ %). Остальные минорные фракции представлены в существенно меньших количествах: фосфатидная кислота – $1,9 \pm 0,4$ %, фосфатидинозит и фосфатидилсерин – $1,9 \pm 0,1$ %, лизоформы ФЛ – $1,8 \pm 0,4$ %, кардиолипин – $0,9 \pm 0,1$ %.

Введение лецитина в окисляющийся этилбензол приводит к увеличению скорости реакции, которая возрастает по мере увеличения количества введенного лецитина (рис. 4, кривая 1). Ускорение окисления этилбензола в присутствии лецитина позволяет рассматривать лецитин как более активный субстрат окисления по сравнению с этилбензолом. При концентрации 15 мг/мл скорость возрастает ~ в 1,5 раза.

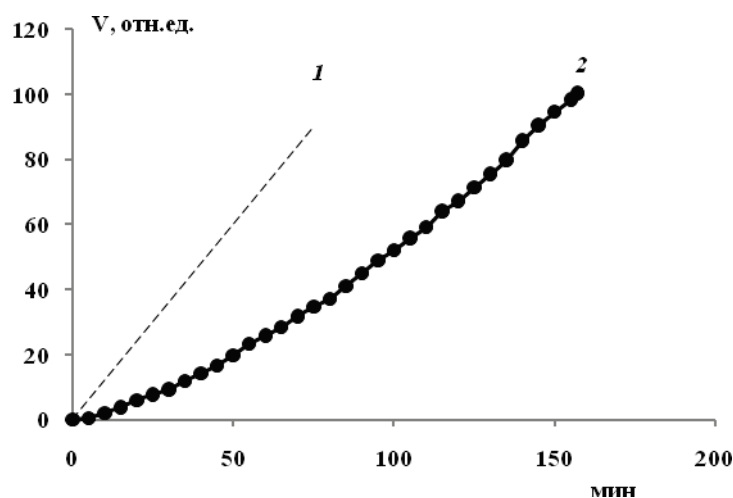


Рисунок 3. Кинетические кривые поглощения кислорода при окислении этилбензола без добавок (1) и в присутствии $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л генистеина (2). Температура 333 К, $W_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/(л с)

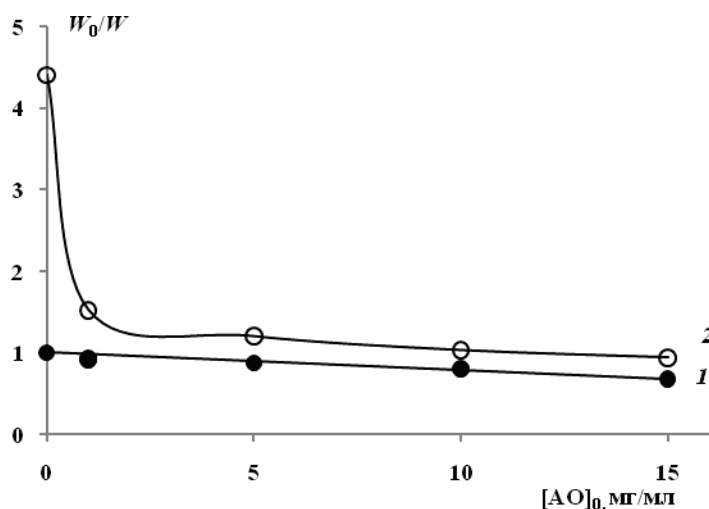


Рисунок 4. Зависимость отношения скорости окисления в отсутствие добавок к скорости в присутствии лецитина (1) или его смеси с $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л генистеина (2) от начальной концентрации лецитина.

В присутствии лецитина наблюдается снижение ингибирующей активности генистеина (рис. 4, кривая 2). Зависимость изменения эффективности ингибирующего действия представляет собой кривую, на начальном участке которой влияние лецитина наиболее существенно, в то время как последующее увеличение концентрации от 1 до 15 мг/мл приводит к слабому изменению величины W_0/W (здесь W_0 – скорость окисления в присутствии одного генистеина, W – скорость окисления в присутствии смеси генистеина с лецитином). Наблюдаемая закономерность не согласуется с аналогичным параметром, полученным для одного лецитина и, следовательно, не может быть объяснена увеличением скорости окисления за счет наличия в системе более реакционноспособного лецитина. Возможно, что снижение антирадикальной активности генистеина в присутствии лецитина может быть обусловлено их взаимодействием, в результате которого образуется частица с меньшей реакционной способностью. Отсутствие изменений ингибирующей активности генистеина, начиная с концентрации лецитина 5 мг/мл, может быть обусловлено тем, что лецитин образует ассоциаты, которые в меньшей степени влияют на реакционную способность АО.

Таким образом, генистеин тормозит процесс свободнорадикального окисления, реагируя с пероксильными радикалами, активность которого заметно снижается в присутствии добавок лецитина. Однако сложный характер изменения эффективности ингибирования генистеина в зависимости от концентрации лецитина в реакционной смеси свидетельствует о необходимости детального изучения механизма антиоксидантных свойств флавоноидов в сложных системах.

Список литературы / References:

1. *Фенольные соединения: свойства, активность, инновации*. Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». М.: ИФР РАН, ред. Н.В. Загоскина, 2018, 625 с. [*Phenolic Compounds: properties, activity, innovations*. Collected scientific articles on materials of X International Symposium “Phenolic Compounds: fundamental and applied aspects”. М: IPP RAS, ed. N.V. Zagoskina, 2018, 625 p. (in Russ.)]
2. *Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты*. М.: Научный мир, ред. Н.В. Загоскина, Е.Б. Бурлакова, 2010, 400 с. [*Phenolic Compounds: fundamental and applied aspects*. М: Scientific World, ed. N.V. Zagoskina, E.B. Burlakova, 2010, 400 p. (in Russ.)]
3. Тарумов Р.А., Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Ковтун В.Ю. Биологические свойства фитоэстрогена генистеина. *Медицина экстремальных ситуаций*, 2014, № 2(48), с. 55-68. [Tarumov R.A., Grebenyuk A.N., Basharin V.A., Kovtun V.Yu. Biological properties of phytoestrogen genistein. *Medicine of emergency situations*, 2014, no. 2(48), pp 55-68 (in Russ.)]
4. Тарумов Р.А., Башарин В.А., Гребенюк А.Н. Противолучевые свойства современных антиоксидантов. *Рентгенология и радиология*, 2012, т. 13, с. 682-700. [Tarumov R.A., Basharin V.A., Grebenyuk A.N. Radioprotective properties of modern antioxidants. *Rentgenology and radiology*, 2012. vol. 13, pp. 682-700 (in Russ.)]
5. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. Влияние лецитина на эффективность антиоксидантного действия флавоноидов и α -токоферола. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2010, т. 46(2), с. 148-152. [Mazaletskaya L.I., Sheludcheko N.I., Shishkina L.N. Lecithin influence on the effectiveness on the antioxidant effect of flavonoids and α -tocopherol. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, vol. 46(2), pp. 135-139. (In Russ.)]
6. Бурлакова Е.Б., Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. Ингибирующее действие смесей

фенольных антиоксидантов и фосфатидилхолина. *Изв. РАН. Серия химическая*, 1995, № 6, с. 1053-1059. [Burlakova E.B., Mazaletskaia L.I., Sheludcheko N.I., Shishkina L.N. Inhibitory Effect of the Mixtures of Phenol Antioxidants and Phosphatidylcholine. *Russian Chemical Bulletin*, 1995, no. 6, pp. 1014-1020. (In Russ.)]

7. Mazaletskaia, L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N. Inhibitory efficiency of antioxidant and phospholipid mixtures under the different oxidation extent of methyl oleate. *Chemistry & Chemical technology*, 2012, vol. 6, no. 1, pp. 35-41.

8. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н., Кучин А.В., Федорова И.В., Чукичева И.Ю. Влияние лецитина на ингибирующую эффективность изоборнилфенолов, *ЖФХ*, 2012, т. 86, № 9, с. 1532-1538. [Mazaletskaia L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N., Kutchin A.V., Fedorova I.V., Chukicheva I.Yu. Influence of Lecithin on the Inhibitory Efficiency of Isobornylphenols. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2012, vol. 86, no. 9, pp. 1532-1538 (in Russ.)]

9. Барсукова Л.И. *Биологические мембраны: Методы*. М.: Мир, 1990, 423 с. [Barsukova L.I. *Biological Membranes: Methods*. M.: Mir, 1990, 423 p. (In Russ.)]

10. Shishkina L.N., Kushnireva Ye.V., Smotryaeva M.A. The combined effect of surfactant and acute irradiation at low dose on lipid peroxidation processes in tissues and DNA content in blood plasma of mice. *Oxidation Communications*, 2001, vol. 24(2), pp. 276-286.

11. Цепалов В.Ф., Шляпинтох В.Я. Константы скоростей элементарных реакций процесса окисления этилбензола молекулярным кислородом. *Кинетика и катализ*, 1962, т. 3, № с. 870-876. [Tsepalov V.F., Shlyapintokh V.Ya. Rate constants of elementary reactions of ethylbenzene oxidation process by molecular oxygen. *Kinetic Catal.*, 1962, vol. 3, pp. 870-876 (in Russ.)]

12. Цепалов В.Ф., Харитонов А.А., Гладышев Т.П., Эмануэль Н.М. Определение констант скорости и коэффициентов ингибирования фенолов-антиоксидантов с помощью модельной цепной реакции. *Кинетика и катализ*, 1977, т. 18, № 5, с. 1261-1267. [Tsepalov V.F., Kharitonova A.A., Gladyshev T.P., Emanuel N.M. Definition of rate constants and inhibition factors of phenols-antioxidants using model chain reaction. *Kinetic Catal.*, 1977, vol. 18, no. 5, pp. 1261-1267 (in Russ.)]

INHIBITORY EFFICIENCY OF GENISTEIN IN THE PRESENCE OF THE SOY BEAN LECITHIN

Smirnova A.N., Mazaletskaia L.I., Shishkina L.N.

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Abstract. Efficiency of the inhibition of the ethylbenzene initiated oxidation by genistein and its mixtures with the soy bean lecithin is investigated by the volumetric method. Genistein is established to interact with peroxy radicals of ethylbenzene, its inhibitory parameter is calculated ($fk_7 = 4,2 \cdot 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and the estimation of the stoichiometric inhibition coefficient f value is performed, the low limit of which is more 3,5. Hence, two OH-groups or more among the genistein molecule composition take part in the reaction with peroxy radicals of ethylbenzene. Lecithin being a mixture of natural lipids accelerates the initiated oxidation of ethylbenzene and substantially reduces the inhibitory efficiency of genistein. Besides, the reduction of the inhibitory efficiency is not linear in the dependence on the lecithin concentration in reaction mixture. This effect is the most pronounced at the low concentration of lecithin, while the increase of the lecithin concentration from 1 to 15 mg/ml does not practically result to further diminution of the inhibitory efficiency of genistein. Data obtained allow us to conclude about a necessity of the detail studying of the antioxidative properties of flavonoids in the complex systems.

Key words: initiated oxidation, antioxidative properties, genistein, natural phospholipids.