

Inhibitorno dejstvo flavonola na indukovanu slobodno-radikalisku hemolizu eritrocita pacova

U radu je ispitivano inhibitorno dejstvo miricetina, kvercetina i kempferola na indukovanu slobodno-radikalisku hemolizu eritrocita pacova u in vitro uslovima. Eritrociti izolovani iz krvi pacova su tretirani različitim koncentracijama rastvora miricetina, kvercetina i kempferola i 200 mM vodonik-peroksidom. Jačina inhibitorne aktivnosti flavonola je određena na osnovu apsorbance dobijene spektrofotometrijskim merenjima koncentracije oslobođenog hemoglobina. Pri višim koncentracijama sva tri ispitivana flavonola su u istoj meri inhibirala peroksidaciju membrane eritrocita. Razlike se javljaju pri nižim koncentracijama, odnosno postoji razlika u brzini delovanja različitih flavonola. Ta razlika ukazuje da broj hidroksilnih grupa povećava inhibitornu moć ispitivanih flavonola. Kod kvercetina se javlja odstupanje u očekivanom ponašanju. Na osnovu njegovih strukturnih odlika, pretpostavljeno je da će kvercetin imati bolja inhibitorna svojstva od kempferola. S obzirom da je kempferol pokazao bolja inhibitorna svojstva, potrebno je vršiti dalja istraživanja koja bi mogla da objasne otkriveno odstupanje.

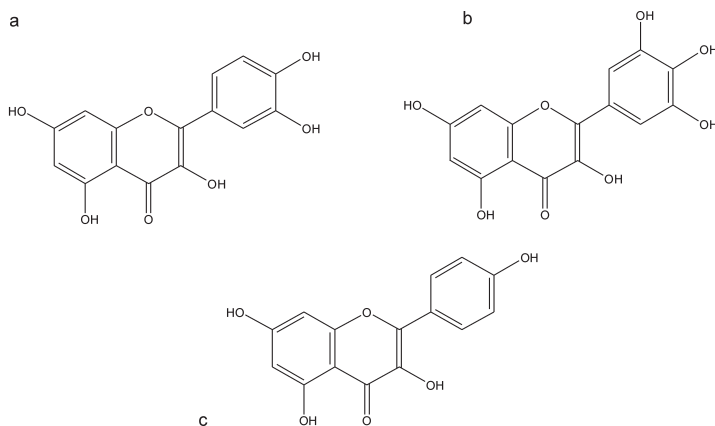
Uvod

Lipidna peroksidacija predstavlja posredovanu slobodno-radikalisku propagaciju oksidativnog napada na nezasićene masne kiseline. Ona uključuje nekoliko slobodno radikalskih intermedijera pri čemu se terminacija peroksidacije vrši enzimski ili slobodno-radikalški (Heim *et al.* 2002). Slobodni radikali koji se proizvode u *in vivo* sistemima mogu da izazovu oštećenja membrane oksidacijom lipida i proteina što kasnije može dovesti do ćelijske smrti. Prekomeran oksidativni stres, koji dovodi do destabilizacije membrana, oštećenja DNK i oksidacije LDL-a (*Low Density Lipoprotein*), doprinosi starenju ćelija (Sastre *et al.* 2000), mutagenezi (Takabe *et al.* 2001), kancerogenezi (Kawanishi *et al.* 2001) i pojavi koronarnih oboljenja (Khan *et al.* 2000).

Aleksandra Vančevska (1990), Svilajnac, Stevana Sindelića 47 a/15, učenica 3. razreda Srednje škole „Svilajnac“ u Svilajncu

MENTOR:
Goran Tomić, student 1. godine biohemije na Hemijskom fakultetu u Beogradu

Flavonoli miricetin, kvercetin i kempferol su sekundarni biljni metaboliti koji se karakterišu prisustvom fenolnih i piranoznih prstenova. Ova jedinjenja se nalaze u crnom i zelenom čaju (*Camelia sinensis*), crnom vinu (Hertog *et al.* 1993), zelenoj salati (*Lactuca sativa*), crnom luku (*Allium cepa*) i celeru (*Apium graveolens*) (Croizer *et al.* 2000). Pokazano je da miricetin, kvercetin i kempferol mogu da se ponašaju kao helatni agensi i da neutrališu slobodne radikale (Cook *et al.* 1996). U biljkama, ove komponente pružaju zaštitu od ultravioletnog zračenja, patogena i herbivora (Harborn *et al.* 2000). Kao deo ljudske ishrane imaju značajnu ulogu u protekciji od degenerativnih bolesti, različitih tipova kancera i kardiovaskularnih bolesti (Hensley *et al.* 2000, Morton *et al.* 2000, Halliwell *et al.* 1992). Antioksidativna aktivnost kvercetina, miricetina i kempferola i njihovih metabolita zavisi od rasporeda funkcionalnih grupa na prstenu (slika 1). Raspored i broj hidroksilnih grupa utiče na mehanizam antioksidativnog dejstva kod različitih polifenola. Druge strukturne karakteristike koje utiču na antioksidativnu aktivnost su: dvostruka veza između ugljenika 2 i 3 na C - prstenu, prisustvo šećerne komponente, prisustvo metoksi grupe (Heim *et al.* 2002).



Slika 1.
Strukture flavonola
a – kvercetin
b – miricetin
c – kempferol

Figure 1.
Flavonol structures
a – Quercetin
b – Myricetin
c – Kaempferol

In vitro oksidativna hemoliza eritrocita predstavlja model-sistem za istraživanje oštećenja bioloških membrana izazvanih slobodnim radikalima. Eritrociti su podložni lipidnoj peroksidaciji zbog prisustva velike količine nezasićenih viših masnih kiselina, kiseonika i prelaznih metala kao što su gvožđe i bakar (Zhu *et al.* 2005). Reaktivne kiseonične vrste koje se stvaraju u plazmi, citosolu ili ćelijskoj membrani mogu da napadnu membrane eritrocita, naruše njihov integritet i izazovu oksidaciju lipida i proteina što dovodi do hemolize (Zhu *et al.* 2001). Pomoću ovog model-sistema ispitani su protektivni uticaji sastojaka zelenog čaja (Rizvi *et al.* 2005) i flavanola i procijanidina iz kakaoa (Zhu *et al.* 2005). Načini interakcije kvercetina, kempferola i miricetina sa ćelijskom membranom

su ispitani pomoću lipozoma kao model-sistema (Oteiza *et al.* 2005), ali nisu ispitana njihova protektivna dejstva.

Cilj ovog istraživanja je bio da se *in vitro* ispitaju inhibitorna dejstva flavonola, miricetina, kvercetina i kampferola na indukovanu slobodno-radikalisku hemolizu eritrocita.

Materijal i metode

Eritrociti korišćeni u eksperimentu izolovani su iz krvi pacova soja Vistar. Flavonoli miricetin, kvercetin i kempferol i vodonik peroksid su nabavljeni od Sigma Chemical Co. Merenja su sprovedena pomoću spektrofotometra Cintra 10 UV/VIS Spectrophotometer, GBC Spectral, Melbourne.

Priprema eritrocita

Eritrociti su iz krvi pacova izdvojeni centrifugiranjem na 3000 obrtaja po minuti, 10 minuta, a zatim su ispirani četiri puta sa 5 zapremina fiziološkog rastvora sa fosfatnim puferom pH = 7.4 (PBS). Za vreme poslednjeg ispiranja centrifugirani su 20 minuta. Nakon ispiranja napravljen je rastvor eritrocita u PBS-u koji je kasnije korišćen za eksperiment (Miki *et al.* 1987). Hematokrit tog rastvora bio je 10%.

Inhibicija hemolize eritrocita

Jačina inhibitorne aktivnosti flavonola je određena spektrofotometrijski na osnovu koncentracije oslobođenog hemoglobina. U zavisnosti od stepena oštećenja membrane hemoglobin koji se nalazi unutar eritrocita se oslobađa u reakcionu smešu usled hemolize ćelije. U 100 μ L suspenzije eritrocita je dodato 50 μ L rastvora flavonola kvercetina, miricetina ili kempferola koncentracija 6.25, 12.5, 25, 50 i 100 μ M. Reakcija je započeta dodavanjem 100 μ L 200 mM vodonik peroksida. Uzorci su nakon započete reakcije inkubirani 3 h na 37°C uz blago mešanje. Nakon inkubacije, uzorci su razblaženi sa 1.2 mL PBS (pH 7.4) i centrifugirani 10 minuta na 4000 obr/min. Apsorbance supernatanta dobijenih nakon centrifugiranja izmerene su na talasnoj dužini od 540 nm. Procenat inhibicije hemolize računat je po formuli (Zhu *et al.* 2002):

$$\text{Inhibicija (\%)} = \left(1 - \frac{A_u}{A_k} \right) \times 100$$

gde je A_u apsorbance uzorka koji sadrži flavonole, a A_k – apsorbance pozitivne kontrole.

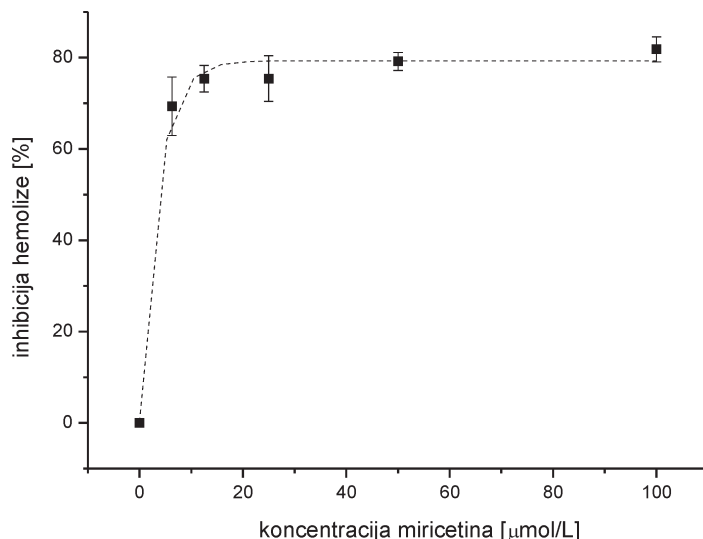
Spontana hemoliza eritrocita eliminisana je pripremom probe kojoj nisu dodati rastvori flavonola i vodonik peroksida. Reakciona smeša u koju nije dodat rastvor flavonola korišćena je kao pozitivna kontrola. Za svaku reakcionu smešu urađeno je 4 ponavljanja.

Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SD četiri merenja za različite koncentracije flavonola.

Rezultati i diskusija

Rastvori miricetina, kvercetina i kempferola su pri najvišoj koncentraciji (100 μ M) pokazali izraženu inhibiciju hemolize. Miricetin je inhibirao procese hemolize 82%, kvercetin 82%, a kempferol 84%. Pri višim primenjenim koncentracijama rastvora ne postoje značajne razlike između miricetina, kvercetina i kempferola u inhibiciji peroksidacije membrane eritrocita.

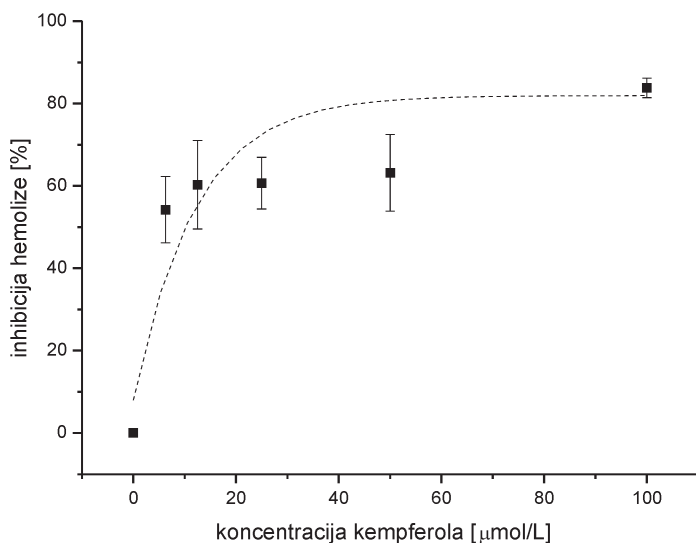
Rastvori miricetina su ispoljili najizraženiji stepen inhibicije peroksidacije membrane eritrocita i najmanje izraženu zavisnost sposobnosti inhibicije od koncentracije primenjenog rastvora. Već pri najnižoj koncentraciji od 6.25 μ M dolazi do inhibicije lipidne peroksidacije od 69%, a taj procenat se kreće do 82% pri najvišoj koncentraciji od 100 μ M (slika 2).



Slika 2.
Kriva inhibicije hemolize različitim koncentracijama rastvora miricetina

Figure 2.
Erythrocyte hemolysis inhibition curve for different myricetin solutions

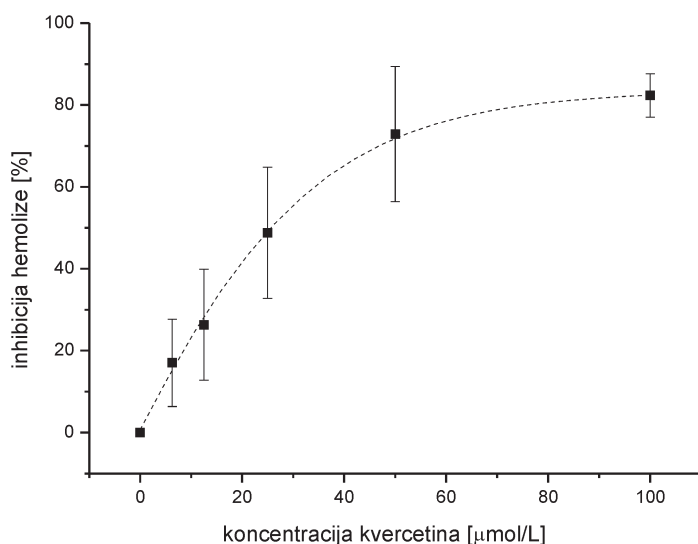
Rastvori kempferola su pri nižim koncentracijama pokazali manji stepen inhibicije peroksidacije membrane eritrocita u odnosu na rastvor miricetina. Procenat inhibicije hemolize pri najnižoj koncentraciji (od 6.25 μ M) iznosi 54%, a pri najvišoj (100 μ M) 84% (slika 3).



Slika 3.
Kriva inhibicije hemolize
razliĉitim koncentracijama
rastvora kempferola

Figure 3.
Erythrocyte hemolysis
inhibition curve for
different kaempferol
solutions

Rastvori kvercetina su pokazali najniži stepen inhibicije peroksidacije membrane eritrocita pri nižim koncentracijama. Pri koncentraciji od 6.25 μM procenat inhibicije hemolize iznosi 26%, a pri najvišoj koncentraciji procenat inhibicije od 82%. Kriva inhibicije hemolize rastvorom kvercetina pokazuje da procenat inhibicije postepeno raste sa povećanjem koncentracije kvercetina u rastvoru, za razliku od miricetina i kempferola koji već pri nižim koncentracijama dovode do visokog stepena inhibicije (videti sliku 4).



Slika 4.
Kriva inhibicije hemolize
razliĉitim koncentracijama
rastvora kvercetina

Figure 4.
Erythrocyte hemolysis
inhibition curve for
different quercetin
solutions

Inhibicija peroksidacije membrane eritrocita zavisi od strukturnih odlika ispitanih jedinjenja. Zbog prisustva hidroksilnih grupa, dvostruke veze između drugog i trećeg ugljenikovog atoma C prstena svi ispitani flavonoli pokazali su sposobnost da u velikoj meri inhibiraju peroksidaciju membrane eritrocita (Heim *et al.* 2002).

Pri višim koncentracijama rastvor miricetina, kvercetina i kempferola pokazuju isti stepen inhibicije, dok se razlike među njima javljaju pri nižim koncentracijama. To ukazuje na postojanje razlike u kinetici delovanja različitih flavonola. Jedina razlika u strukturi ispitivanih flavonola je broj hidroksilnih grupa u B prstenu molekula. Miricetin ima najviše hidroksilnih grupa, tri, na B-3, B-4 i B-5 položaju u prstenu. Kvercetin ima dve na B-3 i B-4 položaju u prstenu, a kempferol jednu na B-4 položaju u prstenu. Na osnovu toga može se zaključiti da broj hidroksilnih grupa može uticati na inhibitornu moć flavonola, što je u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja (Ratty *et al.* 1988). Time se može objasniti činjenica da je pri nižim koncentracijama miricetin veoma jak inhibitor u odnosu na kvercetin i kempferol.

Zaključak

Ispitani rastvori flavonola pokazali su visok stepen inhibicije. Pri najvišim koncentracijama sva tri ispitana flavonola su u istoj meri inhibirala peroksidaciju membrane eritrocita. Razlike se javljaju pri nižim koncentracijama, odnosno postoji razlika u kinetici inhibicije peroksidacije membrane eritrocita različitim flavonolima. Broj hidroksilnih grupa povećava inhibitornu moć ispitivanih flavonola. Krive inhibicije pokazuju da stepen peroksidacije membrane eritrocita opada sa povećanjem koncentracije primenjenih rastvora flavonola.

Međutim, kod kvercetina se javlja odstupanje u očekivanom ponašanju. Njegova inhibitorna svojstva pri nižim koncentracijama su manja nego kod kempferola što nije u skladu sa pretpostavkom koja je izvedena na osnovu strukturnih upoređivanja kvercetina i kempferola. Ovo odstupanje u očekivanom ponašanju potrebno je objasniti daljim istraživanjima. Takođe je potrebno dalje nastaviti sa istraživanjima u *in vivo* sistemima zbog mogućnosti metaboličkih izmena na molekulima u živim sistemima.

Literatura

Cook N. C., Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **7**: 66.

Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE, 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.*, **119**: 598.

- Harborne J. B., Williams C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **55**: 481.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA, 2000. Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Rad Biol Med.*, **28**: 1456.
- Hertog M. L., Hollman P. H. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of agricultural and food chemistry*, **41**: 1242.
- Kawanishi S, Hiraku, Oikawa S. 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res.*, **488**: 65.
- Khan M. A, Baseer A, 2000. Increased malondialdehyde levels in coronary heart disease, *J Pak Med Assoc.*, **50**: 261.
- Miki M., Tamai H., Mino M., Yamamoto Y., Niki E. 1987. Free-Radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -Tocopherol. *Archives of biochemistry and biophysics*, **258**: 373.
- Morton L. W., Caccetta R. A-A, Puddey I. B., Croft K. D. 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**: 152.
- Oteiza P. I., Erelejman A. G., Verstraeten S. V., Keen C. L., Fraga C. G., 2005. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical & Developmental Immunology*, **12** (1): 19.
- Ratty, A. K. and Das, N. P. 1988. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol.*, **39**: 69.
- Rizvi S. I., Zaid M. A., Mishra R. A. 2005. Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **32**: 70
- Sastre J, Pallardo F. V, Vina J. 2000. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis, *IUBMB Life*, **49**: 427.
- Takabe W, Niki E, Uchida K, Yamada S, Satoh K, Noguchi N, 2001. Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. *Carcinogenesis*, **22**: 935.
- Zhu Q. Y., Schramm D., Gross H. B., Holt R. R., Kim S. H., Yamaguchi T., Kwik-Urbe C., Keen K. L. 2005. Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clinical & Developmental Immunology*, **12** (1): 27.
- Zhu Q. Z., Holt R. R., Lazarus S. A., Orozoco T. J., Keen K. L. 2002. Inhibitory Effects of Cocoa Flavanols and Procyanidin Oligomers on Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis, *Clinical & Developmental Immunology*, **227** (5): 321.

Inhibitory Effects of Flavonols on Free-Radical Induced Rat Erythrocyte Hemolysis

Polyphenols are a diverse group of secondary plant metabolites which have more than one phenol functional group per molecule. They are known as very good lipid peroxidation inhibitors. The lipid peroxidation causes damage to many vital parts of the cell, especially to its membrane, which leads to cell death or mutation. *In vitro* oxidative hemolysis of erythrocytes is used as a model-system for studying the damage of biological membranes caused by free radicals and protective effects of different compounds. The aim of this study was to examine inhibitory effects of different flavonols (quercetin, myricetin, kaempferol) on free-radical induced rat erythrocyte hemolysis, *in vitro*. The intensity of flavonols' inhibitory activity is measured spectrophotometrically by measuring the amounts of hemoglobin in the reaction mixture which corresponds to hemoglobin concentration in the extracellular space. Results show that all of the examined flavonols (quercetin, myricetin, kaempferol) are good inhibitors of free-radical induced rat erythrocyte hemolysis. Curves of the inhibition showed that erythrocyte hemolysis inhibition of flavonols is dose-dependent. In the highest concentration there are no significant differences between quercetin, myricetin and kaempferol in the inhibition of the processes of erythrocyte hemolysis. The differences appeared in the lower concentrations, in other words there is a difference in speed of actions of different flavonols. With quercetin there is a deviation in the expected behavior. On the basis of its structural characteristics it was assumed that quercetin would have better inhibitory effects than kaempferol. Considering that kaempferol showed better inhibitory effects than quercetin it is necessary to continue investigating the causes that lead to this behavior. Also, it is required to continue with investigating lipid peroxidation of erythrocytes in *in vivo* systems considering the possibility of metabolic changes of the molecules in the living systems, which could lead to changes of inhibitory effect of different compounds.

