



Mavjuda XOLIQOVA,
O'zbekiston Milliy universiteti magistranti
Zafarjon ERNAZAROV,
O'zbekiston Milliy universiteti huzuridagi
Biofizika va biokimyo instituti tayanch doktoranti
Ma'murjon POZILOV,
O'zbekiston Milliy universiteti Biofizika kafedrası professori, b.f.d.

KVERSETIN VA DIGIDROKVERSETIN FLAVONOIDLARINING ANTIOKSIDANT FERMENTLAR FAOLLIGIGA TA'SIRI

Annotatsiya

Ushbu maqolada *in vitro* tajribalarda kversetin va digidrokversetin flavonoidini kalamush jigar mitoxondriyasida antioksidant fermentlar faolligiga ta'siri ko'rib chiqilgan. Tajribalar 180-200 g. oq erkak kalamushlarda o'tkazilgan. Kalamush jigar mitoxondriyasida katalaza, superoksiddismutaza (SOD) fermentlari faolligiga va malon daldegid (MDA) miqdoriga digidrokversetinning ta'sirini kversetin flavonoidi bilan qiyosiy o'rganilgan.

Kalit so'zlar: mitoxondriya, katalaza, superoksiddismutaza, malon daldegid, digidrokversetin, kversetin.

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА ФЛАВОНОИДОВ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Абстракт

В данной статье исследовано влияние флавоноидов кверцетина и ди-гидрокверцетина на активность антиоксидантных ферментов в митохондриях печени крысы в экспериментах *in vitro*. Эксперименты 180-200 г. проводили на белых крысах-самцах. Влияние ди-гидрокверцетина на активность ферментов каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и содержание малонового альдегида (МДА) в митохондриях печени крыс сравнивали с действием флавоноида кверцетина.

Ключевые слова: Митохондрии, каталаза, супероксиддисмутазы, малоновый альдегид, ди-гидрокверцетин, кверцетин.

EFFECT OF QUERTSETINE AND DIGIDROQUERTSETINE FLAVONOIDS ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES

Abstract

In this article, the effects of the flavonoids quercetin and dihydroquercetin on the activity of antioxidant enzymes in rat liver mitochondria were examined *in vitro* experiments. Experiments 180-200 g. conducted in white male rats. The effect of dihydroquercetin on catalase, superoxide dismutase (SOD) enzyme activity and malon aldehyde (MDA) content in rat liver mitochondria was compared with quercetin flavonoid.

Key words: Mitochondria, catalase, superoxide dismutase, malon aldehyde, dihydroquercetin, quercetin.

Kislorod tirik hujayralar metabolizmi uchun muhim molekuladir. Biroq, bu foydali molekula hujayralar uchun ham zararli bo'lishi mumkin. Hujayra metabolizmi va oksidlovchi o'rtasidagi disblans natijasida kelib chiqadigan stressni tozalash jarayoni turli xil erkin radikal molekularini ishlab chiqarishga olib kelishi mumkin. Erkin radikal molekularlar, ayniqsa kislorodning faol shakllari molekulyar kislorodning biotransformatsiyasidan kelib chiqadi. Kislorodning faol shakllarini bir necha turlari mavjud, jumladan, superoksid anion radikali (O_2^-), singlet kislorod (O_2), vodorod peroksid (H_2O_2) va yuqori reaktiv gidroksil radikali (OH). Turli stress omillar ta'sirida erkin radikallar miqdorini ortishi kuzatiladi va barcha tirik hujayralarda ushbu radikallarni neytrallovchi endogen va ekzogen antioksidantlar mavjud. Kislorodning faol shakllarini asosiy generatsiyasi vodorod peroksid va superoksid anionidir, ular tabiiy ravishda mitoxondriya tomonidan ishlab chiqariladi.

Kislorodning faol shakli ishlab chiqarish va endogen antioksidant himoya mexanizmi o'rtasidagi muvozanat o'zgarganda oksidlanish stressi yuzaga keladi. Oksidlovchi ta'sirlarni kamaytirish va oksidlanish-qaytarilish muvozanatini tiklash uchun hujayralar muhim gomeostatik ko'rsatkichlarni o'zgartirishi lozim. Erkin radikallarni neytrash uchun tabiiy antioksidant birikmalardan tadqiqotlarda keng foydalanilmoqda. Shunday birikmalar guruhiga flavonoidlar kirib, ular yuqori antioksidant va antiradikal xususiyatlari bilan boshqa biofaol moddalardan farq qiladi [Sofna D.S., 2016]. Flavonoid birikmalarni hozirda 10 mingdan ortiq turlari aniqlangan bo'lib, ularning ayrimlarini biologik faolliklari qayd etilgan. Mana shunday biofaol birikmalardan biri kversetin bo'lib, ularning ko'plab fiziologik ta'sir mexanizmlari o'rganilgan. Ammo, digidrokversetin flavonoidining hujayra va organella darajasidagi ta'sir mexanizmlari to'liq o'rganilmagan.

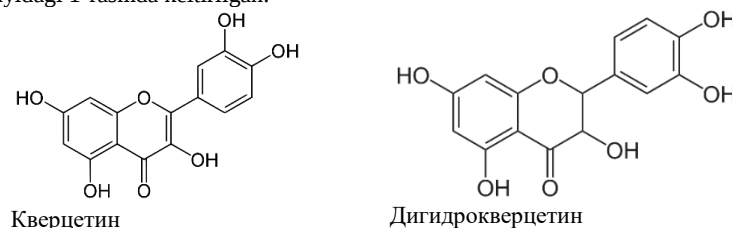
Kversetin va digidrokversetinning strukturasi farq faqat ikkita vodorod atomida yoki protonda. Digidrokversetin molekulasida ikkita "qo'shimcha" proton va 2 elektronga ega va uning nomi "digidrokversetin", ya'ni "ikkita vodorod" bilan kversetin deb tarjima qilinadi. Oddiy kversetin, shunga ko'ra, biroz pastroq molekulyar og'irlikka ega hisoblanadi. Taksifolin deb ataladigan digidrokversetin ham, kversetin ham o'simliklar tarkibida ko'p uchraydi. Bu moddalarning ikkalasi ham tabiiy flavonoidlardir.

Hozirgi vaqtda kversetinning ko'plab farmakologik funksiyalari, jumladan, yallig'lanishga, diabetga qarshi, neyroprotektiv, saratonga qarshi faolliklari haqida ma'lumotlar berilgan. Uning sitoproteksiyasi uchun mas'ul bo'lgan asosiy molekulyar mexanizm uning kislorodning faol shakllarini ingibirlash qobiliyatidir va shuning uchun turli kasalliklarning rivojlanishi uchun javobgar bo'lgan oksidlovchi zararni kamaytiradi [Costa L.G., et al., 2016; Mukai R., et al., 2012].

Kversetinning antioksidant xususiyati ko'plab tadqiqotlarda standart sifatida qiyosiy o'rganiladi. Shuning uchun ushbu tadqiqotimizda jigar mitoxondriyasida digidrokversetin flavonoidining antioksidant xususiyati kversetin bilan qiyosiy o'rganildi.

Ishning maqsadi. Kalamush jigar mitoxondriyasi katalaza, superoksiddismutaza (SOD) faolligiga va malon daldegid (MDA) miqdoriga digidrokversetin ta'sirini kversetin flavonoidi bilan qiyosiy o'rganishdan iborat.

Tadqiqot materiallari va usullari. Tajribalarda *Larix sibirica* o'simligidan ajratib olingan digidrokversetin flavonoididan foydalanildi. Mavjud antioksidant sifatida kversetin flavonoidi tanlab olindi. Kversetin va digidrokversetinning struktura formulasi quyidagi 1-rasmida keltirilgan.



1-rasm. Kversetin va digidrokversetin flavnoidlarining struktura formulasi

Kalamush jigari mitoxondriyasi differensial sentrifugalash usuli yordamida ajratildi. Saxarozali muhitda ajratilgan jigar mitoxondriyalarini saxarozadan holi qilish uchun 175 mM KCl, 25 mM tris-HCl, rN 7,4 tarkibli bufer eritmasidan foydalanildi. Bunda 1:10 nisbatda jigar mitoxondriyalari suspenziyasi hosil qilindi va qayta sentrifugalandi. Membranalarda LPO mahsulotlarini aniqlash TBK ishtirokida amalga oshirildi. Jigar mitoxondriyasidagi MDA miqdori 532 nm to'liq uzunligida optik zichlikning o'zgarishi asosida aniqlandi. MDA miqdorini aniqlashda, formuladagi molyar koeffitsiyentli ekstinksiya ($\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) qo'llanildi: $\text{nmol MDA/mg oqsil} = D/1,56 \times 30$. [Ramonova L.A., 1977].

Katalaza faolligini aniqlash. Katalaza organizmni to'qimalaridagi biologik oksidlanish natijasida hosil bo'ladigan vodorod peroksidining zaharli ta'siridan himoya qiladi. Jigar mitoxondriyalarida katalaza fermenti juda yuqori katalitik faollikka ega. Rang intensivligi spektrofotometrda N_2O_2 o'rniga 2 ml N_2O tutgan namunaga nisbatan 410 nm to'liq uzunligida o'lchandi.

Jigar mitoxondriyasida katalaza faolligi mKat/mg oqsilda ifodalanadi [Korolyuk M.A., 1988].

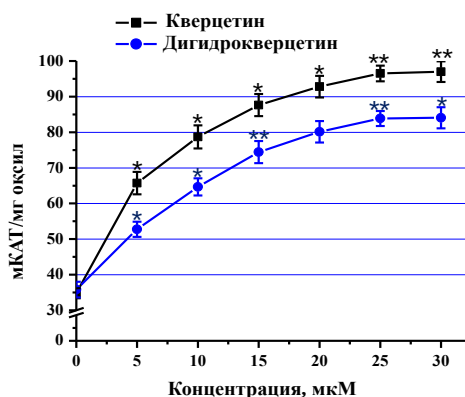
SOD fermentining faolligini aniqlash. SOD fermentining faolligini aniqlash (KF 1.15.1.1) Misra va J. Fridovich (1972). usuli bo'yicha olib boriladi [Matyushin B.N., 1991].

Usulning mohiyati, nitrotetrazol ko'ki va ishqoriy muhitning qaytarilishiga asoslangan. Ferment faolligi yed/min.mg oqsilda ifodalanadi.

Olingan natijalarni statistik qayta ishlash va rasmlarni chizish Origin 6.1 (Microsoft, USA) kompyuter dasturi yordamida amalga oshirildi. Olingan qiymatlar o'rtasidagi farq t-test bo'yicha hisoblab chiqildi. Bunda $*P<0,05$ va $**P<0,01$ qiymatlar statistik ishonchlilikni ifodalaydi.

Olingan natijalar va ularning tahlili. Mitoxondriya membranasini lipidlarning peroksidlanish (LPO) mahsulotlaridan himoya qilishda uning antioksidant tizimi faollashadi. Eng muhim himoya fermentlariga SOD va katalaza bo'lib, LPO ning asosiy va oraliq mahsulotlarini zararsizlantiradi Mitoxondriya antioksidant tizimini o'simlik moddalar ta'sirida faollash mumkin.

Dastlabki tajribamizda, biologik oksidlanish natijasida mitoxondriyada hosil bo'ladigan vodorod peroksidning zararli ta'sirini neytrallovchi katalaza faolligiga digidrokversetin va kversetin flavonoidlarining ta'siri o'rganildi. Katalaza fermenti biologik oksidlanish jarayonida hosil bo'lgan vodorod peroksidning suv va molekulyar kislorodga parchalanishini katalizlaydi. Shuningdek, vodorod periks borligida past molekulyar og'irlikdagi spirtlar va nitritlarni oksidlaydi. To'qimalarning nafas olishida ishtirok etadi. Olingan natijalarga ko'ra, kalamush jigaridan ajratib olingan mitoxondriyaning katalaza fermenti faolligiga kversetin 5-30 mkM konsentratsiyalari ishonchli faollovchi ta'sir etishi aniqlandi. Bunda, 5 mkM kversetin jigar mitoxondriyasi katalaza faolligini nazoratga nisbatan 1,8 marta oshirgan bo'lsa, 30 mkM konsentratsiyasi esa 2,8 marta oshirishi aniqlandi (2-rasm).

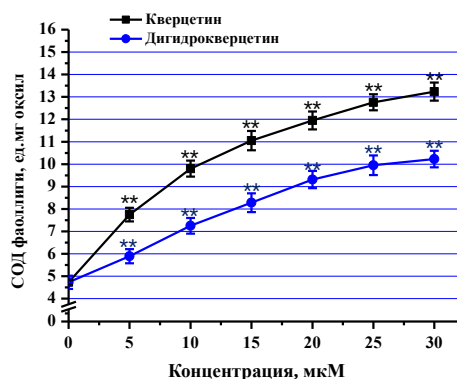


2-rasm. Kalamush jigar mitoxondriyasi katalaza fermenti faolligiga digidrokversetin ta'sirini kversetin bilan qiyosiy baholash (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; n=5-6).

Digidrokversetin jigar mitoxondriyasi katalaza faolligiga ta'siri 5-30 mkM konsentratsiyalarda namoyon bo'lishi aniqlandi. Digidrokversetin 5 mkM konsentratsiyasi mitoxondriya katalaza faolligini nazoratga nisbatan 1,4 marta, 30 mkM da esa 2,3 marta oshirganligi aniqlandi (2-rasm). Demak, jigar mitoxondriyasi katalaza faolligiga digidrokversetining nisbatan kversetin flavonoidi samarali ta'sir etdi.

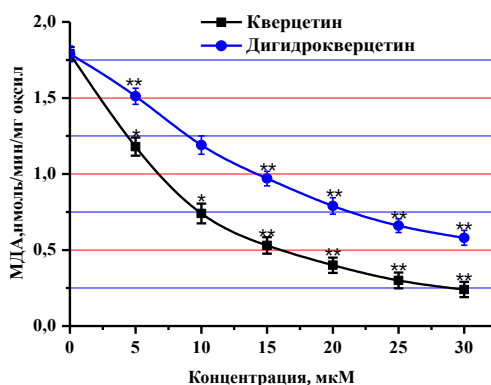
Proksoxidant omillar ta'sirida jigar mitoxondriyasidagi katalaza fermenti faolligi o'zgarishi bilan bir qatorda SOD faolligi ham o'zgaradi. SOD hujayra va to'qimalarni salbiy omillar ta'sirida oksidlovchi zararlanishdan himoya qilishda muhim rol o'ynaydi. Ammo, SOD faollashganda, fermentning ingibitori bo'lgan H_2O_2 hosil bo'ladi. Shuning uchun SOD ning samarali funksional faolligi asosan himoya tizimining boshqa tarkibiy qismlari, xususan, katalaza, glutation reduktaza va glutationperoksidaza kabi fermentlar bilan bog'liqdir. SOD hujayrani superoksid toksikligidan himoya qilish orqali superoksidning zararli reaksiyalarini ingibirlaydi [Güven C., et al., 2018].

Navbatdagi tajribamizda, kalamush jigar mitoxondriyasi SOD faolligiga digidrokversetin flavonoidining antioksidant ta'sirini kversetin bilan qiyosiy o'rganildi (3-rasm). Tajribada, kversetin va digidrokversetin mitoxondriya SOD faolligiga ta'siri 5-30 mkM konsentratsiyalari o'rganildi. Olingan natijalarga ko'ra, inkubatsiya muhitida kversetin 5 va 10 mkM konsentratsiyasi mitoxondriya SOD faolligini nazoratga nisbatan mos ravishda 1,6 va 2,0 marta oshirganligi aniqlandi. Inkubatsiya muhitida kversetin 25 va 30 mkM konsentratsiyasi mavjud bo'lganda mitoxondriya SOD faolligi 2,7 va 2,8 marta ortganligi aniqlandi. Demak, kversetin mitoxondriya SOD faolligini kuchli oshirganligi ma'lum bo'ldi. Digidrokversetin bilan olib borilgan tajribalarda uning konsentratsiyasi 25 va 30 mkM bo'lganda mitoxondriya SOD faolligi nazoratga nisbatan 2,1 va 2,2 marta ortganligi aniqlandi (3-rasm). Demak, digidrokversetin mitoxondriya SOD faolligiga ta'siri kversetining nisbatan biroz kuchsiz ekanligi aniqlandi.



3-rasm. Jigar mitoxondriyasi SOD faolligiga digidrokversetin va kversetin flavonoidining qiyosiy ta'sirini baholash (** $P < 0,01$; $n = 5-6$).

Hujayralarda uning organellarida antioksidant fermentlar faolligi kamayishi sharoitida oksidlanish biomarkerlar ya'ni MDA va karbonil oqsillari ortib boradi. LPO mahsuloti sifatida MDA ni aniqlash orqali asosiy sitozol va mitoxondriyadagi antioksidant fermentlar (SOD, glutation peroksidaza) faolligi va jigarda kislorodning faol shakllarini to'planish darajasini baholash imkonini beradi [Migliaccio V., et al., 2019]. Navbatdagi tajribamizda, Fe^{2+} yordamida chaqirilgan mitoxondriya LPO mahsuloti MDA miqdoriga digidrokversetin ta'siri kversetin flavonoidi bilan qiyosiy o'rganildi (4-rasm). Olingan natijalarga ko'ra, mitoxondriya membranasining LPO mahsuloti MDA hosil bo'lishiga kversetin 5-30 mkM konsentratsiyalari ingibirlaydigan ta'sir etishi aniqlandi. Nazorat sifatida olingan mitoxondriyada MDA hosil bo'lishi 1,79 nmol/min/mg oqsilni tashkil etdi. Kversetin 5 va 30 mkM konsentratsiyasi mavjud sharoitda mitoxondriyada MDA miqdori mos ravishda 1,18 va 0,24 nmol/min/mg oqsilni tashkil etdi. Bu esa kversetin ta'sirida mitoxondriyada MDA hosil bo'lishi kamayganligidan dalolat beradi. Digidrokversetin 5-30 mkM konsentratsiyasi bilan olib borilgan tajribalarda mitoxondriyada MDA hosil bo'lishi mos ravishda 1,51 va 0,58 nmol/min/mg oqsilni tashkil etib, nazoratga nisbatan ingibirlandi, ammo, kversetining qaraganda biroz kuchsiz ta'sir etganligi aniqlandi (4-rasm).



4-rasm. Kalamush jigar mitoxondriyasi LPO mahsuloti MDA miqdoriga digidrokversetin ta'sirini kversetin bilan qiyosiy baholash (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n = 5-6$).

Reaktiv molekular oksidlanish jarayoni orqali DNK, oqsillar, uglevodlar va lipidlar kabi makromolekulalarga ta'sir qilishi mumkin. Shunday qilib, erkin radikallarning shikastlanishi oqsillarning denaturatsiyasiga, DNK mutatsiyasiga va to'yinmagan lipid membranasiga bog'lanishiga olib kelishi mumkin. Flavonoidlarning antioksidant sifatidagi ta'sir mexanizmlari va oksidlovchi stress bilan bog'liq kasalliklarda yaqqol namoyon bo'ladi. Asosan, antioksidantlarning nishon molekulaga ta'siri oksidlovchi zararni kechiktirish, oldini olish yoki yo'q qilish orqali amalga oshiriladi. Flavonoidlarning keng qamrovli ta'sir

qilish usuli erkin radikal elementlarni ingibirlash, metallni xelatlash, erkin radikal hosil bo'lishi bilan bog'liq fermentlarni bostirish va ichki antioksidant fermentlarni stimullanishini o'z ichiga oladi.

Flavonoidlarning eng yaxshi tavsiflangan antioksidant xususiyati uning reaktiv kislorod turlarini to'g'ridan-to'g'ri tozalash qobiliyatidan kelib chiqadi. Flavonoidlar vodorod atomini berish yoki bitta elektron uzatish yo'li bilan darhol erkin radikallarni xelatlashga qodir. Ba'zi flavonoidlar kislorod almashinuvi va erkin radikal shakllanishida muhim rol o'ynaydigan Fe^{2+} va Cu^{2+} kabi metal ionlarini xelatlash qobiliyatiga ega.

Erkin radikallarni to'g'ridan-to'g'ri tozalash va metall elementlarini xelatlashdan tashqari, flavonoidlar ksantin oksidaza, lipoksigenaza, protein kinaza C, siklooksigenaza, mikrosomal va monooksigenaza kabi erkin radikal hosil qiluvchi fermentlarni ingibirlash orqali hujayra ichida antioksidant sifatida namoyon bo'ladi.

Yuqoridagi 1-rasmda digidrokversetin va kversetin birikmalarning qiyosiy struktura formulasi keltirilgan, ikkalasi ham pentagidroksiflavonlar sinfiga kiradi, ya'ni ularning har birida 5 ta gidroksil radikali -OH, shuning uchun "pentagidroksi" prefiksi mavjud. Kversetinning jigar mitoxondriyasidagi antioksidant faolligini digidrokversetina nisbatan faol bo'lishi digidrokversetinda ikki benzol halqasi orasidagi oraliq halqada barcha bog'lar to'yingan bo'lishi, kversetinda esa ikkita proton yo'qligi sababli qo'shimcha pi bog'i paydo bo'lishi bilan izohlash mumkin. Kelgusida ushbu flavonoid birikmalarni strukturaga bog'liq faolliklari ion kanallari darajasida tadqiq etish rejalashtirilgan.

ADABIYOTLAR

1. Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Методы определения активности каталазы // Москва, Медицина – 1988. – С. 16-18.
2. Матюшин Б.Н. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении // Лаб. дело. – 1991. – №7. – С. 16-19.
3. Рамонова Л.А., Стальная И.Д. Метод определения гидроперекмсей липидов с помощью тиоцианата аммония. В кн. «Современные методы в биохимии». – Москва, 1977. – С. 64-66.
4. Sofna D.S., Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids // Med J Indones – 2014 – V.23 (№4) – P. 239-244.
5. Costa L.G., Garrick J.M., Roquè P.J., Pellacani C. Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more // Oxid Med Cell Longev. – 2016 – V13(8) – P. 11738-11751.
6. Mukai R., Kawabata K., Otsuka S., Ishisaka A., Kawai Y., Ji Z.S., Tsuboi H., Terao J. Effect of quercetin and its glucuronide metabolite upon 6-hydroxydopamineinduced oxidative damage in Neuro-2a cells // Free Radic Res – 2012 – V.46: – P. 1019–1028.
7. Guven C., Sevgiler Y., Taskin E. Pyrethroid insecticides as the mitochondrial dysfunction inducers // Mitochondrial Diseases – 2018. – P. 293-322.
8. Migliaccio V., Scudiero R., Sica R., Lionetti L., Putti R. Oxidative stress and mitochondrial uncoupling protein 2 expression in hepatic steatosis induced by exposure to xenobiotic DDE and high fat diet in male Wistar rats // Plos One – 2019. – V.25. – P. 1-24.