

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ФЛАВАНОИДОВ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ *Saccharomyces cerevisiae*

С. Е. Синютина, А. Г. Шубина, Л. В. Розенблюм

Кафедра биохимии и фармакологии, *sinjutina_s_e@mail.ru*;
ФБГОУ ВО «Тамбовский государственный
университет имени Г. Р. Державина», Тамбов, Россия

Ключевые слова: дрожжи; зимазная активность; марганец; медь; никель; флаванон; халкон.

Аннотация: Исследовано влияние 2',4'-дигидрохалкона, 2',4'-дигидрокси-5'-циклогексилхалкона, 7-гидроксифлаванона и солей марганца, никеля и меди на процесс спиртового брожения у дрожжей. Показано усиление ингибирования ферментации сахарозы при одновременном присутствии флаваноидов и солей тяжелых металлов. Сделано предположение об образовании комплексов халкон–металл, обладающих большей биодоступностью.

Введение

Изучение биологической активности флаваноидных соединений продолжает оставаться актуальным, несмотря на многочисленные исследования в данной области. Это обусловлено существованием многообразных флаваноидов (халконов, флаванонов, флаванолов, ауранов и других), различающихся природой, числом и расположением заместителей в молекулах. Эффекты, проявляемые флаваноидными соединениями, также разнообразны. Биологическое действие флаваноидов характеризуется широким спектром потенциальных мишеней в организме. Они выступают в роли антиоксидантов, могут влиять на активность ферментов, проявлять антибактериальную, противогрибковую, противоопухолевую активность. Представляет интерес изучение биологических эффектов флаваноидов в присутствии солей тяжелых металлов.

Тяжелые металлы, такие как никель, марганец, медь, железо и другие, являются важными микроэлементами, необходимыми для нормального функционирования биологических систем. Они входят в состав ряда ферментов, участвуют в их активации. Однако увеличение концентрации тяжелых металлов в организме приводит к развитию токсичных эффектов. Ионы тяжелых металлов способны связывать сульфгидрильные группы белков, вытеснять другие биогенные металлы из их комплексов [1]. В основе токсичности тяжелых металлов также лежит развитие окислительного стресса за счет генерации активных форм кислорода и индукции перекисного окисления липидов [2].

Экспериментально показано негативное влияние высоких концентраций ионов марганца, железа, цинка, ртути, меди, кадмия, кобальта, свинца на скорость процесса биосинтеза этанола при ферментации глюкозы дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, жизнеспособность и рост культуры дрожжей. Наиболее токсичными являются соли ртути и меди [3, 4].

Флаваноиды способны связывать ионы металлов с переменной валентностью, образуя стабильные хелатные комплексы [5]. В зависимости от строения флаваноида образующиеся комплексы могут иметь различную структуру. С наибольшей вероятностью в связывании катионов тяжелых металлов участвуют расположенные рядом гидроксильные и карбонильные группы. Возможность образования комплексных соединений флаваноидов с ионами меди, марганца, цинка с различным соотношением металл : флаваноидный лиганд показано в [6; 7, с. 123].

Металл-флаваноидные комплексы демонстрируют высокую биологическую активность, в частности, за счет снижения вероятности активирования катионами металлов перекисного окисления. При образовании комплексов флаваноидов с катионами металлов может существенно изменяться липофильность флаваноидов, что приводит к изменению их взаимодействия с липидным бислоем. Необходимо отметить, что проникновение флаваноидов через липидный бислой клеточной мембраны происходит либо непосредственно (гидрофобные агликоны), либо при участии переносчиков (водорастворимые гликозиды). Образование комплексов с металлами снижает полярность гидроксильных групп [7, с. 99–100], что в свою очередь приводит к увеличению биодоступности флаваноидов.

Образование комплексов хелатной структуры может существенно влиять на характер биологической активности флаваноидов. Так, комплексы меди с производными флаванона проявляют ингибирующую активность по отношению к ацетилхолинэстеразе [8]. Показана высокая антиоксидантная, антибактериальная и антиопухолевая активность комплексов флаваноидов с ионами редкоземельных металлов [7, с. 121]. Тем не менее механизмы комплексообразования флаваноидов с металлами, а также влияние комплексообразования на биологические эффекты исходных соединений изучены недостаточно.

Методика эксперимента

Исследовано влияние 2',4'-дигидроксиалкхалкона, 2',4'-дигидрокси-5'-циклогексилалкхалкона, 7-гидроксифлаванона и солей никеля (II), марганца (II), меди (II) на метаболическую активность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Субстратом спиртового брожения являлся раствор сахарозы, в который вводили флаваноиды в концентрации 50 мкмоль/л и соли тяжелых металлов (концентрация в рабочем растворе 3 ПДК). Активность синтеза этанола дрожжевыми клетками определяли газометрическим методом [9]. Моделирование молекул алкхалконов и квантово-химические расчеты проводили с использованием программы HyperChem.

Экспериментальные результаты и обсуждение

Флаваноиды в концентрации 50 мкмоль/л замедляют метаболизм дрожжей, что проявляется снижением синтеза этанола и скорости выделения диоксида углерода (рис. 1). Наибольший ингибиторный эффект проявляет 2',4'-дигидроксиалкхалкон, наименьший – 2',4'-дигидрокси-5'-циклогексилалкхалкон (рис. 1). В присутствии солей тяжелых металлов наблюдается существенное уменьшение скорости спиртового брожения и выделения углекислого газа (рис. 2). Добавление солей меди приводит к практически полному подавлению активности дрожжей.

Для оценки совместного влияния флаваноидов и солей тяжелых металлов на метаболическую активность дрожжей введен коэффициент ингибирования, представляющий отношение объемов углекислого газа, выделившихся за 60 мин при сбраживании реакционной смеси без добавок и с добавками флаваноидов и/или солей тяжелых металлов соответственно. Согласно полученным результатам, при одновременном добавлении флаваноидов и солей никеля ингибирование усиливается, наблюдается суммирование эффектов (рис. 3). В то же время в присутствии солей марганца и алкхалконов торможение спиртового брожения в дрожжевых клетках резко возрастает. Для 7-гидроксифлаванона подобный эффект менее выражен.

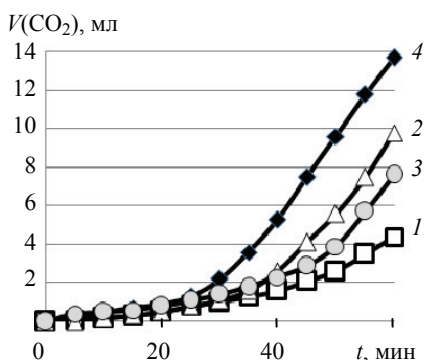


Рис. 1. Зависимость скорости выделения диоксида углерода от присутствия флавоноидов в концентрации 50 мкмоль/л:
 1 – 2',4'-дигидроксиалкон;
 2 – 2',4'-дигидрокси-5'-циклогексилалкон;
 3 – 7-гидроксифлаванон; 4 – контроль

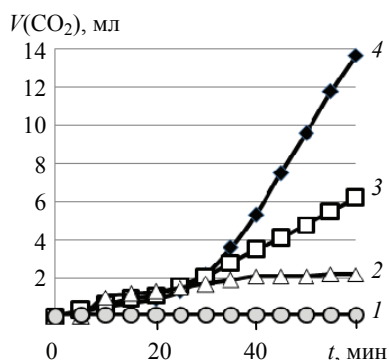


Рис. 2. Зависимость скорости выделения диоксида углерода от присутствия солей тяжелых металлов в концентрации 3 ПДК:
 1 – Cu; 2 – Mn; 3 – Ni; 4 – контроль

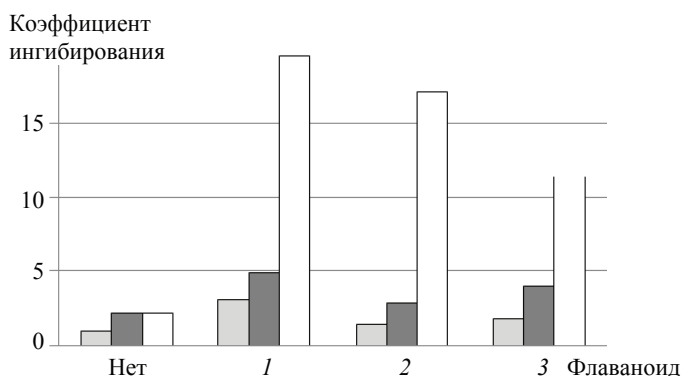


Рис. 3. Зависимость скорости выделения диоксида углерода от присутствия солей тяжелых металлов в концентрации 3 ПДК и 50 мкмоль/л флавоноидов:
 1 – 2',4'-дигидроксиалкон; 2 – 2',4'-дигидрокси-5'-циклогексилалкон;
 3 – 7-гидроксифлаванон; □ – нет; ■ – Ni; ◻ – Mn

Данный эффект можно объяснить образованием комплексов ионов марганца (II) и халконов. Если образование комплексных соединений 7-гидроксифлаваноном маловероятно, то наличие гидроксильной и карбонильной групп в молекулах халконов делает возможным их участие в комплексобразовании. Комплексобразование увеличивает липофильность и биодоступность флавоноидов и может усиливать их эффекты [10].

Проведена оптимизация геометрии и рассчитаны некоторые молекулярно-динамические характеристики (энергия молекулы E , энергии высшей занятой молекулярной орбитали E (ВЗМО) и низшей вакантной молекулярной орбитали E (НВМО), дипольный момент D , заряды на атомах) молекул 2',4'-дигидроксиалкона и 2',4'-дигидрокси-5'-циклогексилалкона методом MNDO (программа HyperChem). С учетом конформации молекул, полученных данным методом (рис. 4), можно предположить образование комплексов халкон–марганец, в которых лигандами будут выступать халконы, анионы соли, а также молекулы растворителя (рис. 5).

Халкон, имеющий большие отрицательные заряды на атомах кислорода гидроксильной и карбонильной групп (табл. 1), меньший дипольный момент, а также характеризующийся более отрицательным значением E (ВЗМО) (табл. 2), по всей видимости, более склонен к комплексобразованию.

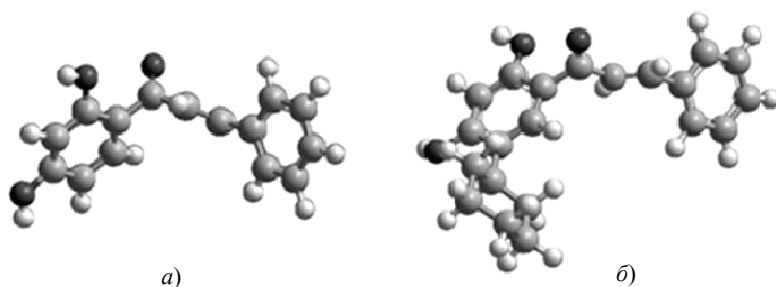


Рис. 4. Модели молекул 2',4'-дигидроксихалкона (а) и 2',4'-дигидрокси-5'-циклогексилхалкона (б)

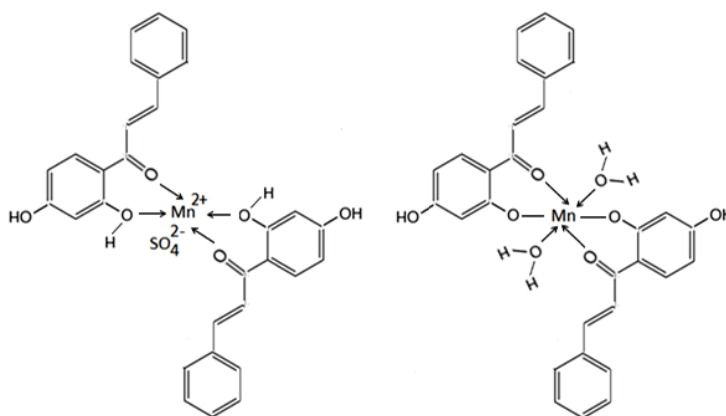


Рис. 5. Возможные структуры комплексов 2',4'-дигидроксихалкон–марганец

Таблица 1

Заряды на атомах молекул халконов

| Соединение | Заряд на атомах групп, eV | | | |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------|
| | –ОН | | | =C=O |
| | О | Н | Z(H) – Z(O) | О |
| 2',4'-диоксихалкон | <u>–0,254</u> | <u>0,231</u> | <u>0,485</u> | <u>–0,364</u> |
| | –0,268 | 0,204 | 0,472 | –0,299 |
| 5'-циклогексил- 2',4'-диоксихалкон | <u>–0,248</u> | <u>0,210</u> | <u>0,458</u> | <u>–0,305</u> |
| | –0,238 | 0,197 | 0,435 | –0,291 |

Примечание. Числитель – оптимизация геометрии, знаменатель – молекулярная динамика.

Таблица 2

Молекулярно-динамические характеристики молекул халконов

| Соединение | Энергия, ккал/моль | Дипольный момент D | E (HВМО), eV | E (ВЗМО), eV |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|
| 2',4'-диоксихалкон | –3378,4 | 2,308 | –0,4156196 | –9,129087 |
| 5'-циклогексил- 2',4'-диоксихалкон | –4914,8 | 3,925 | –0,5541747 | –8,780964 |

Выводы

Флаваноиды 2',4'-дигидроксиалкхалкон, 2',4'-дигидрокси-5'-циклогексилалкхалкон, 7-гидроксиалкхалкон подавляют метаболическую активность дрожжей. Ингибирующее влияние флаваноидов усиливается в присутствии солей тяжелых металлов. Наиболее эффективна комбинация 2',4'-дигидроксиалкхалкона с солями марганца (II). Высказано предположение, что данный эффект объясняется образованием комплекса алкхалкон–марганец, что увеличивает биодоступность как алкхалкона, так и тяжелого металла.

Список литературы

1. Химические основы токсического действия тяжелых металлов (обзор) / С. Г. Скугорева, Т. Я. Ашихмина, А. И. Фокина, Е. И. Лялина // Теоретическая и прикладная экология. – 2016. – № 1. – С. 4 – 13.
2. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae / Т. С. S. Sigaud-Kutner, М. А. S. Leitao, О. К. Okamoto [et al.] // Journal of Phycology. – 2003. – Vol. 39, No. 6. – P. 1008 – 1018. doi: 10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
3. Энкениколай, П. В. Влияние катионов некоторых металлов на динамику ферментации глюкозы дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* W-95 / П. В. Энкениколай, Т. М. Панова, Ю. Л. Юрьев // Вестн. Казанского технологического ун-та. – 2014. – Т. 17, № 6. – С. 213 – 215.
4. Вятчина, О. Ф. Сравнительная оценка чувствительности разных тест-функций *Saccharomyces cerevisiae* к солям тяжелых металлов / О. Ф. Вятчина, Г. О. Жданова, Д. И. Стом // Вестн. Российского ун-та дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2017. – Т. 25, № 2. – С. 206 – 216. doi: 10.22363/2313-2310-2017-25-2-206-216
5. Биологическая активность полифенолов растительного происхождения. Перспектива использования антоцианов в медицинской практике / Д. И. Писарев, О. О. Новиков, О. А. Селютин, Н. А. Писарева // Научные ведомости Белгородского гос. ун-та. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – № 10-2 (129). – С. 17 – 24.
6. Трофимова, Н. Н. Исследование методов синтеза, строения и свойств комплексов флаваноидов с ионами металлов. Сообщение 3. Изучение кинетики реакции комплексообразования меди (II) с дигидрохверцетином в водной среде / Н. Н. Трофимова, Е. В. Столповская, В. А. Бабкин // Химия растительного сырья. – 2013. – № 4. – С. 37 – 43. doi: 10.14258/jcrpm.1304037.
7. Флаваноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов, Е. Н. Музафаров. – Пушино : Synchrobook, 2013. – 310 с.
8. Copper (II) and Zinc (II) Complexes with Flavanone Derivatives: Identification of Potential Cholinesterase Inhibitors by On-Flow Assays / A. L. F. Sarria, A. F. L. Vilela, B. M. Frugeri [et al.] // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2016. – Vol. 164. – P. 141 – 149. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.09.010.
9. Справочник по производству хлебопекарных дрожжей / Под ред. С. С. Новиковской, Ю. И. Шишацкого. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М. : Пищевая промышленность, 1980. – 375 с.
10. Ягольник, Е. А. Мембранотропные и антиоксидантные свойства флаваноидов и их комплексов с катионами железа : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 / Е. А. Ягольник. – Пушино, 2013. – 25 с.

The Effect of Heavy Metals and Flavanoids on the Metabolic Activity of *Saccharomyces Cerevisiae*

S. E. Sinyutina, A. G. Shubina, L. V. Rosenblum

*Department of Biochemistry and Pharmacology, sinjutina_s_e@mail.ru;
Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia*

Keywords: yeast; zymase activity; manganese; copper; nickel; flavanone; chalcon.

Abstract: The effect of 2',4'-dihydroxychalcone, 2',4'-dihydroxy-5'-cyclohexylchalcone, 7-hydroxyflavanone and salts of manganese, nickel and copper on the process of alcoholic fermentation in yeast was studied. An increase in the inhibition of sucrose fermentation was shown with the simultaneous presence of flavonoids and salts of heavy metals. An assumption was made about the formation of chalcone-metal complexes with greater bioavailability.

References

1. Skugoreva S.G., Ashikhmina T.Ya., Fokina A.I., Lyalina Ye.I. [Chemical bases of the toxic action of heavy metals (review)], *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya* [Theoretical and applied ecology], 2016, no. 1, pp. 4-13. (In Russ., abstract in Eng.)
2. Sigaud-Kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D., Colepicolo P. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae, *Journal of Phycology*, 2003, vol. 39, no. 6, pp. 1008-1018, doi: 10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
3. Enkenikolay P.V., Panova T.M., Yur'yev Yu.L. [Influence of cations of some metals on the dynamics of glucose fermentation by yeast *Saccharomyces cerevisiae* W-95], *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of the Kazan Technological University], 2014, vol. 17, no. 6, pp. 213-215. (In Russ., abstract in Eng.)
4. Vyatchina O.F., Zhdanova G.O., Stom D.I. [Comparative assessment of the sensitivity of different test functions of *Saccharomyces cerevisiae* to salts of heavy metals], *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti* [Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Series: Ecology and life safety], 2017, vol. 25, no. 2, pp. 206-216, doi: 10.22363/2313-2310-2017-25-2-206-216 (In Russ., abstract in Eng.)
5. Pisarev D.I., Novikov O.O., Selyutin O.A., Pisareva N.A. [Biological activity of polyphenols of plant origin. The prospect of using anthocyanins in medical practice], *Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya* [Scientific Bulletin of the Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy], 2012, no. 10-2 (129), pp. 17-24. (In Russ.)
6. Trofimova N.N., Stolpovskaya Ye.V., Babkin V.A. [Investigation of methods of synthesis, structure and properties of complexes of flavanoids with metal ions. Communication 3. Study of the kinetics of the reaction of complex formation of copper (II) with dihydroquercetin in an aqueous medium], *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of vegetable raw materials], 2013, no. 4, pp. 37-43, doi: 10.14258/jcprm.1304037. (In Russ.)
7. Tarakhovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov Ye.N. *Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina* [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine], Pushchino: Sunchrobook, 2013, 310 p. (In Russ.)

8. Sarria A.L.F., Vilela A.F.L., Frugeri B.M. [et al.] Copper (II) and Zinc (II) Complexes with Flavanone Derivatives: Identification of Potential Cholinesterase Inhibitors by On-Flow Assays, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2016, vol. 164, pp. 141-149, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.09.010.

9. Novakovskaya S.S., Shishatskiy Yu.I. [Eds.] *Spravochnik po proizvodstvu khlebopekarnykh drozhdzey* [Handbook for the production of baker's yeast], Moscow: Pishchevaya promyshlennost', 1980, 375 p. (In Russ.)

10. Yagol'nik Ye.A. *Extended abstract of candidate's of biological thesis*, Pushchino, 2013, 25 p. (In Russ.)

Auswirkungen von Schwermetallen und Flavonoiden auf die metabolische Aktivität von *Saccharomyces cerevisiae*

Zusammenfassung: Es ist die Wirkung von 2',4'-Dihydroxychalcon, 2',4'-Dihydroxy-5'-cyclohexylchalcon, 7-Hydroxyflavanon und Mangan-, Nickel- und Kupfersalzen auf den Prozess der alkoholischen Gärung in Hefe untersucht. Es ist gezeigt, dass die Fermentation von Saccharose bei gleichzeitiger Anwesenheit von Flavonoiden und Schwermetallsalzen verstärkt wird. Es ist eine Annahme über die Bildung von Chalcon-Metall-Komplexen mit größerer Bioverfügbarkeit gemacht.

Influence des métaux lourds et des flavonoïdes sur l'activité métabolique de *Saccharomyces cerevisiae*

Résumé: Est étudiée l'influence de la 2',4'-dihydroxychalcone, 2',4'-dihydroxy-5'-cyclohexylchalcone, 7-hydroxyflavanone et des sels de manganèse, de nickel et le cuivre sur le processus de la fermentation alcoolique dans la levure. Est montrée une inhibition accrue de la fermentation du saccharose avec la présence simultanée des flavonoïdes et des sels de métaux lourds. Est faite une hypothèse sur la formation des complexes chalcone-métal métal, ayant la plus grande biodisponibilité.

Авторы: *Синютина Светлана Евгеньевна* – кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии и фармакологии; *Шубина Анна Геннадиевна* – кандидат химических наук, доцент кафедры биохимии и фармакологии; *Розенблюм Людмила Васильевна* – старший преподаватель кафедры биохимии и фармакологии, ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный университет имени Г. Р. Державина», Тамбов, Россия.