Влияние дигидрокверцетина на антиоксидантный статус митохондрий печени крыс при гипотермии

Идрисова Патимат Абдурагимовна

Биологический факультет, кафедра биохимии, биофизики и молекулярной биологии

Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

Аннотация

Гипотермия — это состояние, развивающееся у гомойотермных животных при снижении температуры их тела. В зависимости от этиологии развития гипотермии различают несколько видов гипотермии - случайная, интраоперационная, искусственная [Халилов и др., 2019]. Случайная гипотермия может возникнуть у животных, обитающих в регионах со значительными колебаниями температуры или у людей, чья профессиональная деятельность связана с работой в условиях низких температур [Brown et al., 2012, p. 1935]. При проведении обширных операций с использованием анестезии человек может быть подвержен так называемой "интраоперационной" гипотермии [Sun et al., 2015, p. 280].

Искусственные гипотермические состояния широко используются при операциях на сердце и мозге, а также в терапевтических целях для предотвращения рисков ишемического и реперфузионного повреждения жизненно важных органов и защиты от последствий гипоксии, ишемии-реперфузии, инсульта и инфаркта, травм [Polderman, 2009, p. 192; Søreide, 2014, p. 650]. Защита вследствие снижения температуры тела является результатом снижения скорости метаболизма и уменьшения потребности тканей в кислороде и глюкозе [Alva at al, 2013, p. 253]. Чаще всего для этой цели используется умеренная длительная гипотермия [Usenko, Tsarev, 2009, p. 22].

Наряду с положительным терапевтическим эффектом умеренная гипотермия вызывает ряд нежелательных изменений в организме, что ограничивает потенциальные возможности ее применения.

Целью данной работы явилось исследование влияния дигидрокверцетина на антиоксидантный статус митохондрий печени крыс при гипотермии.

Опыты были проведены на беспородных крысах, массой 200-220 г. Животные содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Выполнены четыре серии экспериментов. В каждой серии было использовано по 6 крыс.

Мы исследовали ДГК на содержание компонентов АОС митохондрий в норме и при гипотермии. Дигидрокверцетин в последние годы часто используется в качестве терапевтического средства и обладает широким спектром биологической активности.

Наши эксперименты показали, что ДГК способствует прямой нейтрализации АФК в митохондриях, что приводит к снижению интенсивности окислительной деструкции белков и липидов митохондрий и позволяет сохранить их высокий антиоксидантный потенциал при воздействии низкотемпературного фактора на организм гомойотермных животных.

Ключевые слова: гипотермия, дигидрокверцетин, полифенол, свободнорадикальные процессы, антиоксидантная система, активные формы кислорода, митохондриальная ДНК

1. Введение

Актуальность темы.

Гипотермия является экстремальным состоянием для гомотермичного организма: она сопровождается стрессовой реакцией, которая провоцирует усиление свободнорадикальных процессов (СРП), связанных с образованием реактивных форм кислорода (АОС) [Alva et al., 2013, p. 258]. Известно, что АФК могут стимулировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) и способствовать окислительной модификации как растворимых, так и мембраносвязанных белков (БМК), что приводит к потере их функциональной активности. Продление умеренной гипотермии может изменить скорость образования и выведения АОС. Вопрос о том, как интенсивность антиоксидантных процессов зависит от продолжительности умеренной гипотермии, в настоящее время остается малоизученным. В то время как понимание основных механизмов деструктивных или компенсаторно-адаптивных изменений, лежащих в

основе терапевтической гипотермии, является жизненно важным для разработки соответствующего и эффективного лечения [Халилов и др, 2019, с. 5].

Методы лечения и профилактики окислительного стресса разнообразны. Препараты, связывающие свободные радикалы и предотвращающие реакции ПОЛ - антиоксиданты (витамин Е, аскорбиновая кислота и др.) - используются уже достаточно давно. Однако, несмотря на хорошие результаты применения антиоксидантов в экспериментальных условиях, результаты их использования в клинике пока далеки от идеала. Другая группа нейропротекторов направлена на нормализацию функции митохондрий и улучшение энергообеспечения клетки (коэнзим Q1O, янтарная кислота, рибофлавин и др.) [Иллариошкин, 2009, с. 2]. В связи с этим возникает необходимость поиска более эффективных и безопасных лекарственных средств с выраженными антиоксидантными свойствами и метаболическими эффектами. В качестве таковых можно предложить биофлавоноид, дигидрокверцетин (ДГК), обнаруженный в составе некоторых растений и обладающий рядом уникальных лечебных свойств, в том числе и антиоксидантных [Фомичев, 2021, с. 86].

Цель работы. Целью работы явилось исследование влияния дигидрокверцетина на антиоксидантный статус митохондрий печени крыс при гипотермии.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1) Исследовать эффекты ДГК на содержание неферментативных компонентов тиол-дисульфидной системы в митохондриях печени крыс при кратковременной умеренной (30°С) гипотермии
2) Исследовать эффекты ДГК на содержание витамина Е в митохондриях печени крыс при кратковременной умеренной (30°С) гипотермии
3) Оценить антиоксидантную активность ДГК in vitro, инкубируя митохондрии в среде Фентона, генерирующей АФК

2. Методы и методологии

2.1. Объекты исследования

Опыты проведены на беспородных крысах, массой 200-220 г. Животные содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. При выполнении настоящего исследования были соблюдены все нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199 н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Выполнены четыре серии экспериментов:

1. Контроль
2. Курсовое (5 дней) введение ДГК
3. Кратковременная (30 мин) умеренная (30°С) гипотермия
4. Кратковременная (30 мин) умеренная (30°С) гипотермия на фоне предварительного курсового введения (5 дней) ДГК

В каждой серии было использовано по 6 крыс.

2.2. Постановка эксперимента.

Контрольную группу представляли интактные животные. Для учета возможных эффектов ДГК крысам второй группы ежедневно в течение 5 дней однократно per os вводили раствор ДГК из расчета 100 мг сухого вещества на кг массы тела. Введение осуществлялось с помощью специального зонда. На 6 день животных декапитировали. У 3-й группы индуцировали кратковременную умеренную гипотермию. Для этого животных помещали в камеру, в рубашке которой циркулировала вода с температурой 4-6 ºС. В течение 30 мин температура тела снижалась до 30°С, после чего животное сразу подвергалось декапитации. Животные 4 группы подвергались умеренной кратковременной гипотермии на 6 день после предварительного курсового введения ДГК (100 мг/кг) в течение 5 дней.

Для введения использовали особо чистый (99%) препарат ДГК фирмы «Аметис» (Россия). Доза ДГК для введения экспериментальным животным рассчитывалась исходя из рекомендованных терапевтических концентраций.

2.3. Препаративные методы исследования

Выделение митохондрий производили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Состав среды выделения: 0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА (pH 7.4). [Рыбальченко, Коганов, 1998]. Концентрацию белка в суспензии митохондрий печени определяли методом Лоури

2.4. Биохимические методы исследования

Определение содержания глутатиона в митохондриях печени крыс

Содержание восстановленного глутатиона (GSH) в митохондриях определяли по методу Эллмана [Арутюнян и др., 2000]. Белки осаждали сульфосалициловой кислотой и затем центрифугировали. К супернатанту добавляли буфер трис-HCl с ЭДТА и добавляли раствор ДТНБ. Оптическую плотность образцов измеряли против дистиллированной воды при 412 нм. Концентрацию выражали в нмоль на мг белка, используя молярный коэффициент поглощения 13600 $(М/л)^{-1}см^{-1}$.

Определение содержания сульфгидрильных групп в белках митохондрий.

Содержание SH-групп в митохондриальных белках измеряли колориметрическим методом путем их реакции с 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой [Habeeb, 1972]. Концентрацию выражали в нмоль на мг белка, используя молярный коэффициент поглощения 13600 (M/L)-1 см-1.

Определение содержания витамина Е в митохондриях печени крыс

Для определения содержания витамина Е предварительная обработка образцов включала омыление и экстракцию. Оптическая плотность полученного образца измерялась в диапазоне длин волн 250-350 нм. Максимум поглощения α-токоферола соответствует λ=292. Концентрацию рассчитывали с использованием молярного коэффициента поглощения 75,8 моль-1/см-1 и выражали в мкг на мг белка.

Определение содержания карбонильных групп в белках мембранах синаптосом

Степень окислительной модификации белков мембран синаптосом оценивали по содержанию в них карбонильных групп [Venditti et al., 2004, p. 12].

2.5. Статистическую обработку результатов исследования

Обработка данных произведена с использованием пакета прикладных программ SPSS. Однородность дисперсии экспериментальных данных оценивали с помощью критериев Ливиня и Уэлча. Поскольку данные критерии указывали на то, что дисперсии большинства экспериментальных данных неоднородны, то для сравнения экспериментальных данных использовались непараметрические критерии - *Краскела-Уоллиса* и Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p<0,05$. Для оценки корреляции между нормально распределенными переменными использовался коэффициент корреляции Спирмана. Экспериментальные данные представлены в виде блочных диаграмм.

3. Результаты

В данной работе мы исследовали ДГК на содержание компонентов АОС митохондрий в норме и при гипотермии. Дигидрокверцетин в последние годы часто используется в качестве терапевтического средства и обладает широким спектром биологической активности.

Все экспериментальные данные были проверены на однородность дисперсии с помощью критерий Ливиня и Уэлча. В большинстве случаев оказалось, что дисперсии не однородны в разных группах, в связи с чем мы применили непараметрические тесты. Результаты представили в виде блочных диаграмм, на которых указаны медианы и квартили.

В качестве критерия для сравнения различий между группами животных применили критерий Манна – Уитни.

Важнейшими антиоксидантной системой клетки является тиол-дисульфидная система. Она может быть представлена как ферментативными – глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, так и неферментативными компонентами – тиоредоксин, тиоловые (сульфгидрильные группы

белков), глутатион. Центральным компонентов тиол-дисульфидной системы является глутатион.

Исследование показало, что курсовый прием ДГК у интактных крыс существенно увеличивает уровень глутатиона (медиана ДГК - 11,5 [8,9:12,6], медиана контроль - 5,5 [5,2:6,9]). Умеренная гипотермия существенно - на 47,3% снижает уровень глутатиона (медиана гипотермия - 2,9 [2,4:3,2]). Курсовое пероральное введение ДГК способствует повышению уровня глутатиона на 82,7% (медиана гипотермии+ДГК - 5,3 [4,7:6]). Однако уровни глутатиона при этом значительно ниже, чем у интактных крыс, получивших ДГК и неподверженный воздействию низких температур.

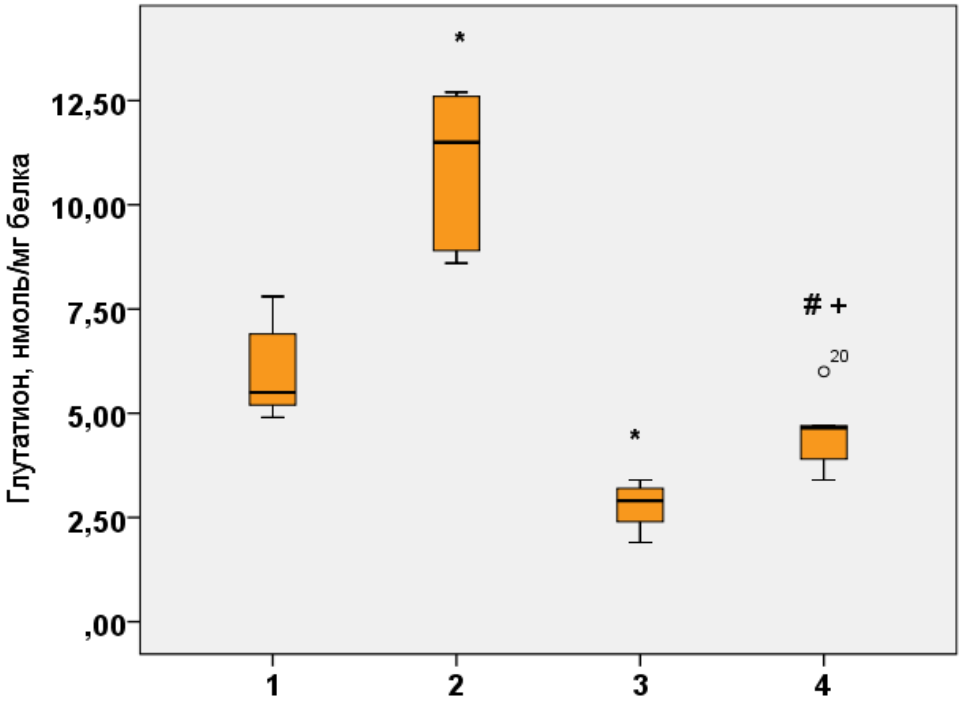

Рис. 1. Влияние ДГК на содержание глутатиона в митохондриях печени крыс в норме и при гипотермии. 1 – контроль, 2 – ДГК, 3 – гипотермия, 4 – гипотермия + ДГК. P≤0,05 * - относительно контроля, # - относительно гипотермии, + - относительно ДГК (○- негрубые выбросы)

Сульфгидрильные (тиоловые) группы белков является важнейшими компонентами неферментативной антиоксидантной системы, так как они способны быстро окисляться, образуя дисульфидные мостики, однако, это окисление является обратимым, если в клетке или органеллах содержатся восстановительные эквиваленты пиридиновых нуклеотидов (НАДН, НАДФН, ФАДН) или антиоксидантов, в частности глутатиона.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что ДГК повышает уровень тиоловых групп на 51,3% (медиана ДГК - 115 [98:120], а медиана контроля - 76 [66:80]). Умеренная кратковременная гипотермия снижает уровень тиоловых групп в белках на 48,4% (медиана - [30:54]).

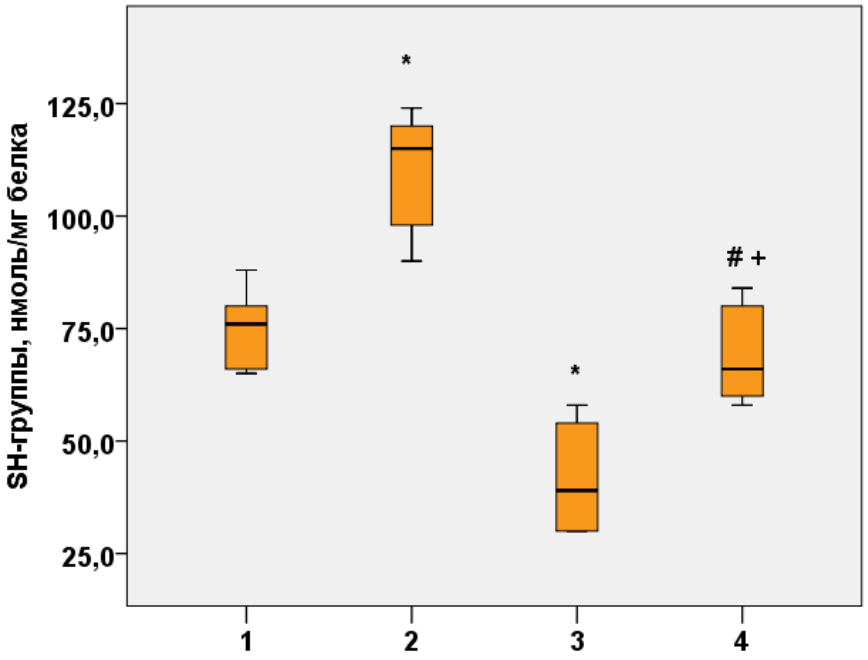

Рис. 2. Влияние ДГК на содержание сульфгидрильных групп в митохондриях печени крыс в норме и при гипотермии. 1 – контроль, 2 – ДГК, 3 – гипотермия, 4 – гипотермия + ДГК. P≤0,05 * - относительно контроля, # - относительно гипотермии, + - относительно ДГК (○- негрубые выбросы)

Предварительный курс ДГК нивелирует отрицательные эффекты гипотермии на содержание тиоловых групп. Уровень их повышается относительно гипотермии на 69,2%, однако он остается ниже контрольных значений на 12%. Интересно, что гипотермия снижает антиоксидантные эффекты ДГК, обнаруженные у животных второй группы. Медианы у животных, подвергших гипотермии на фоне введения ДГК – (66 [60:80]).

Корреляционный анализ по Спирману показал, что между глутатионом и тиоловыми группами белков имеется высокая степень положительной корреляции (рис. 3) (r= 0,88, p≤0,05).

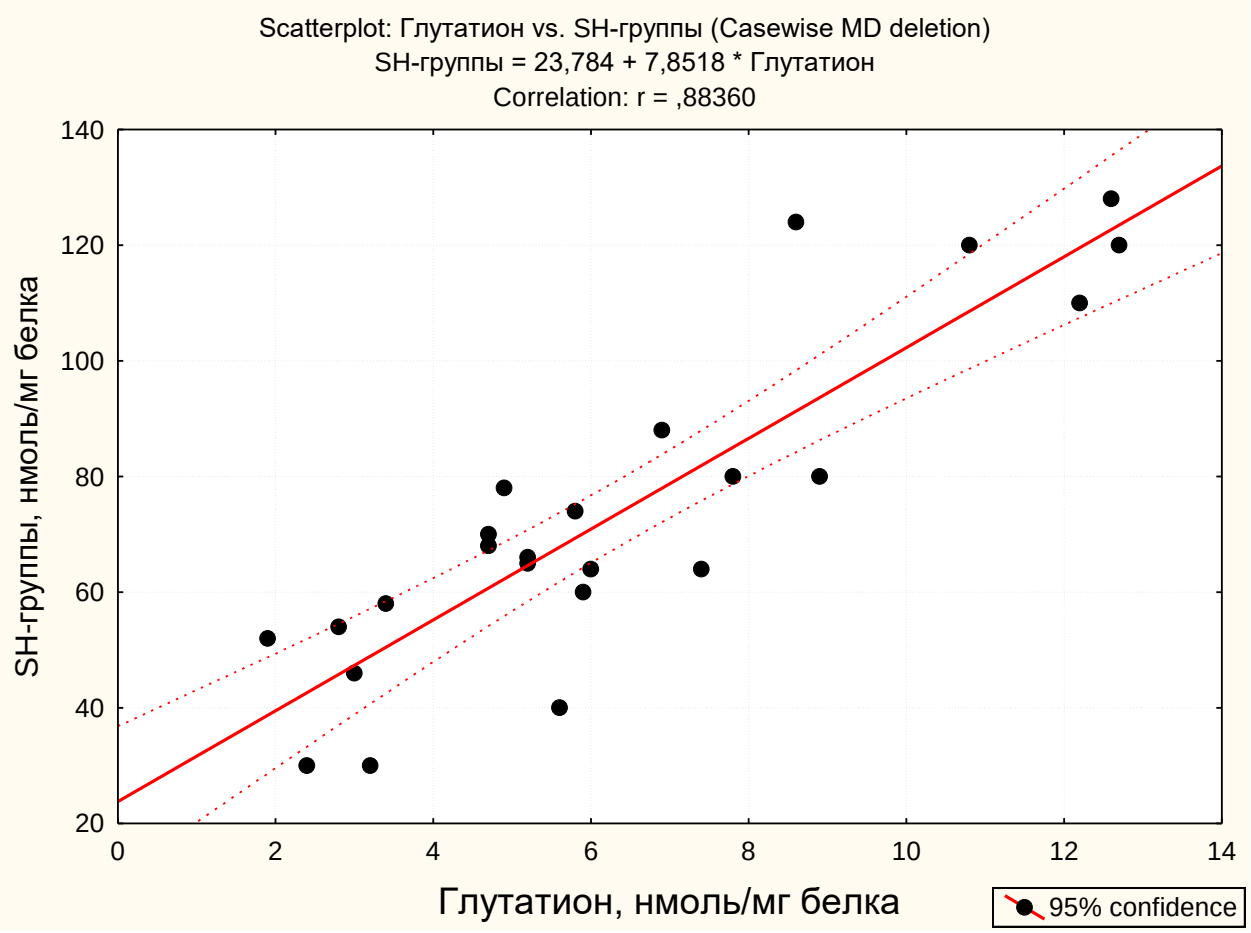

Рис. 3. Корреляционные связи между уровнем глутатиона и содержанием сульфгидрильных групп в белках митохондрий печени крыс при различных физиологических состояниях (контроль, курсовое ДГК, кратковременная гипотермия, умеренная гипотермия на фоне курсового введения ДГК). r=0.88, P≤0,05

Исследование содержания витамина Е в митохондриях, получивших курс ДГК практически не изменяется (медиана ДГК - 4,1 [3,8:4,8], медиана контроля - 3,8 [3,5:4,1]). Умеренная гипотермия снижает уровень витамина Е на 36,5% (медиана составляет 2,3 [1,8:2,7]).

ДГК способствует повышению уровня витамина Е, однако они не достигает контрольных значений. Медиана для четвертой группы животных равна (3,2 [2,9:3,7]).

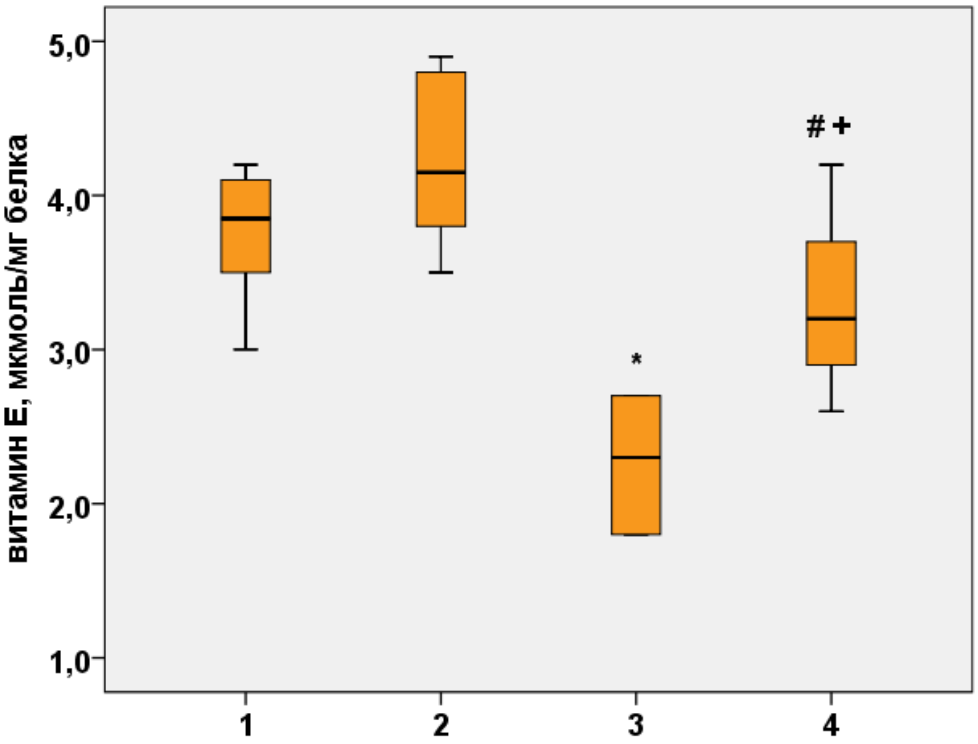

Рис. 4. Влияние ДГК на содержание витамина Е в митохондриях печени крыс в норме и при гипотермии. 1 – контроль, 2 – ДГК, 3 – гипотермия, 4 – гипотермия + ДГК. P≤0,05 * - относительно контроля, # - относительно гипотермии, + - относительно ДГК (○- негрубые выбросы)

Таким образом, ДГК оказывает выраженный эффект на тиол-дисульфидные системы митохондрий, при этом уровень витамина Е меняется не существенно, однако при гипотермии его курсовое введение оказывает протекторный эффект и предотвращает окисление витамина Е с помощью АФК.

Известно, что витамин Е в мембранах митохондрий может восстанавливаться с помощью витамина С, причем в восстановление может принимать участие также глутатион, кроме того, глутатион действует опосредованно, нейтрализуя АФК снижает их уровень, вследствие чего сохраняет уровни восполнимости витамина Е. Между содержанием витамина Е и глутатионом была обнаружена положительная корреляция (рис.5) r (по Смирману) = 0,63, p≤0,05.

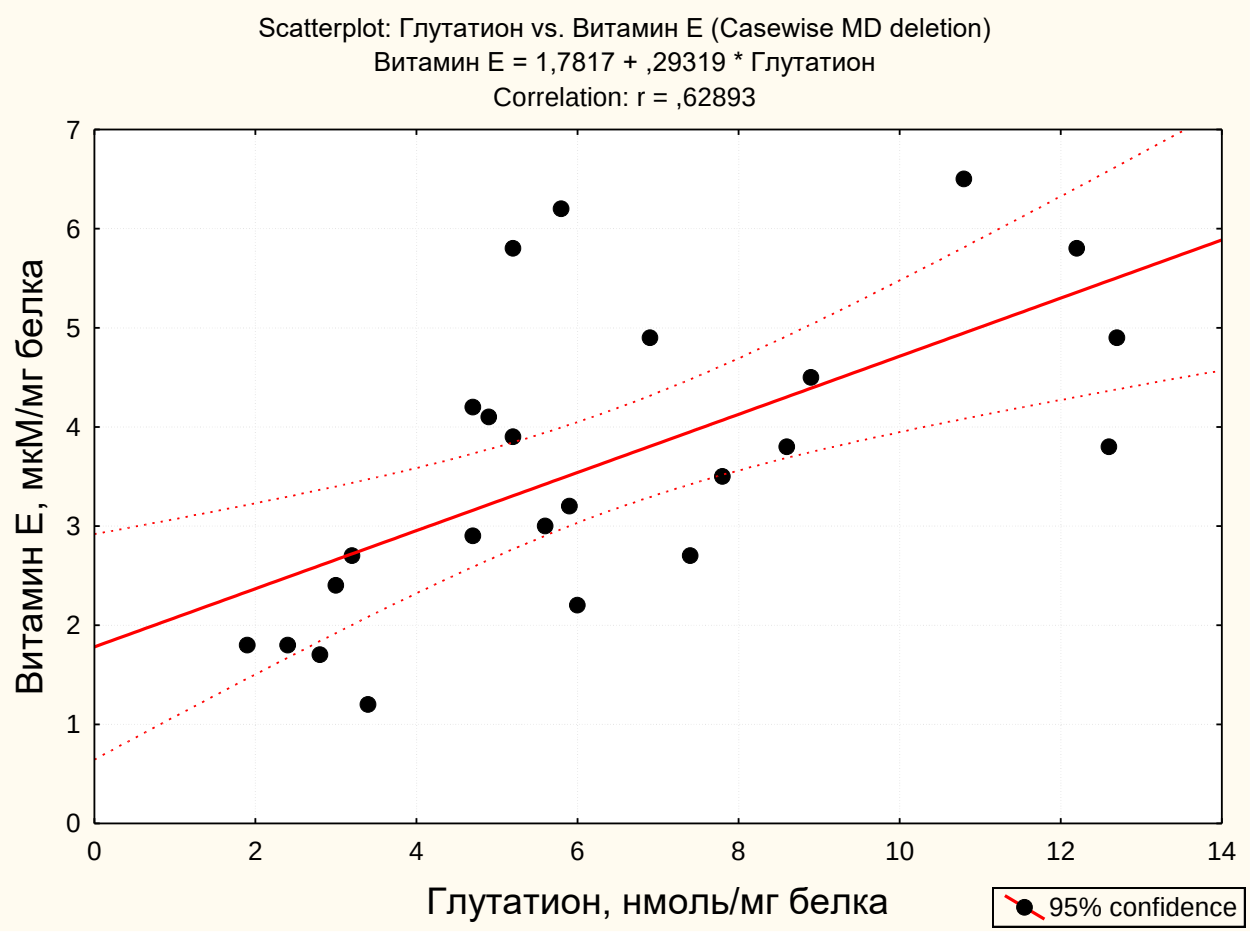

Рис. 5. Корреляционные связи между уровнем глутатиона и содержанием витамина Е митохондрий печени крыс при различных физиологических состояниях (контроль, курсовое ДГК, кратковременная гипотермия, умеренная гипотермия на фоне курсового введения ДГК). r=0.63, P≤0,05

Для того, чтобы увидеть собственные антиоксидантные эффекты ДГК, мы предварительно (в течение 15 минут) инкубировали при 30°С изолированные интактные митохондрии в 1 мл среды инкубации, содержащей различные концентрации ДГК (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2, 0,4, 0,8 мг/мл). Для контроля митохондрии инкубировали 15 мин в 1 мл среды инкубации без добавления ДГК. Для генерации АФК мы добавляли в каждую пробирку, содержащую митохондрии и ДГК, аскорбиновую кислоту (конечная концентрация 4 мМ), сульфат железа (5 мкМ) и перекись водорота (4 мМ). Через 15 минут из каждой пробирки отбирали аликвоту и определяли в ней содержание продуктов окислительной модификации белков – карбонильных групп. Результаты исследования представлены в виде кинетической кривой зависимости C_i/C_o (%) от концентрации ДГК (где C_i – это концентрация карбонильных групп при данной концентрации ДГК, а C_o – это концентрация карбонильных групп в среде без ДГК (контроль).

Из рисунка 6 видно, что ДГК дозозависимо подавляет образование карбонильных производных в аминокислотных остатках митохондриальных белков. Причем с повышением концентрации ДГК доля карбонильных групп в белках митохондрий печени крыс значительно снижается. Мы определили значение IC_{50}**.** Величина IC_{50} – это параметр, часто применяемый в ингибиторном анализе и указывающий ту концентрацию вещества, при которой происходит 50% ингибирование какого-либо физиологического или биологического процесса. В нашем случае IC_{50} равна 0,160 мг/мл. То есть при концентрации ДГК, равной 0,160 мМ происходят 50% ингибирование процессов окислительной модификации белков митохондрий, инкубированных в среде Фентона.

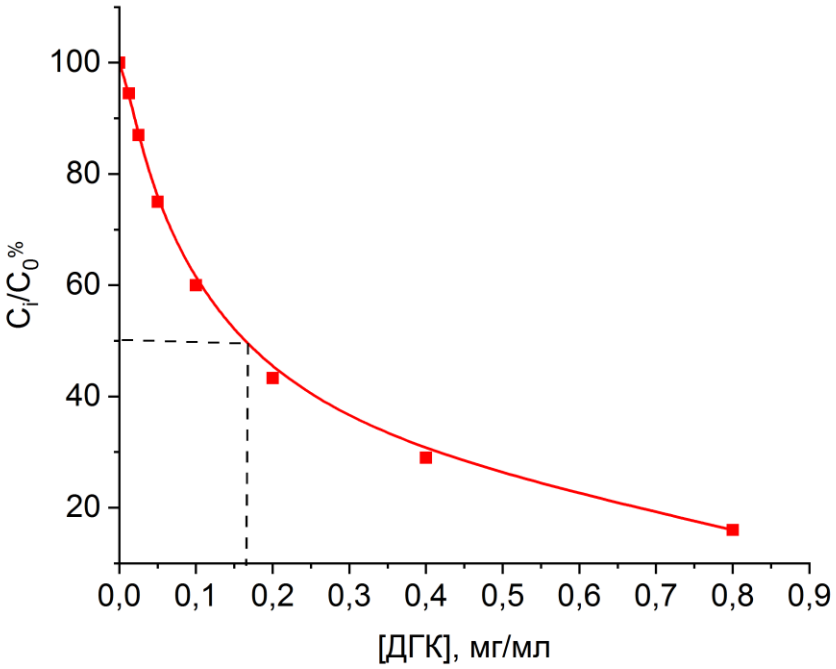

Рис. 6. Кинетическая кривая зависимости C_i/C_o (%) от концентрации ДГК (C_i – это концентрация карбонильных групп при данной концентрации ДГК, C_o – это концентрация карбонильных групп в среде без ДГК). Пунктиром показана концентрация ДГК, вызывающая 50% подавление (**IC_{50}**) интенсивности ОМБ при инкубации изолированных митохондрий в среде Фентона

4. Обсуждение

Митохондрии являются одним из самых основных форм источников кислорода. Известны, что электрон-транспортная цепь митохондрий, а именно комплексы I и III генерируют супероксидный радикал путем одноэлектронного восстановления кислорода. Однако, в митохондриях может иметь место и другие источники. К последнему году к ним относят такие ферментные системы как α-кетоглутарат, пируватдегидрогеназный комплекс с, ферменты ацил-КоА-дегидрогеназа и аконитаза. При изменении физиологических состояний организма скорость генерации АФК может значительно увеличиваться. Нейтрализация образовавшихся АФК происходит с помощью антиоксидантной системы, важнейшими компонентами которой являются тиол-дисульфидная система, а также витамин Е, концентрация которой высока во внутренней мембране митохондрий.

Ранее в работе Халилова Р. А. и сотр. [Халилов и др., 2019, с. 9] было обнаружено, что умеренная гипотермия увеличивает интенсивность свободнорадикальных процессов, при этом угнетает активность антиоксидантной системы. Это свидетельствует о необходимости поиска различных терапевтических средств, обладающих антиоксидантными свойствами и сохраняющих нормальное функционирование митохондрий при экстремальных воздействиях.

Глутатион (GSH), основное внутриклеточное тиоловое соединение, является вездесущим трипептидом, вырабатываемым большинством клеток млекопитающих, и представляет собой основной механизм антиоксидантной защиты. Хотя GSH синтезируется исключительно в цитозоле из входящих в его состав аминокислот, он распределен в различных компартментах, включая митохондрии, где его концентрация в матриксе равна концентрации в цитозоле [Ribas et al, 2014, p. 1].

Эта особенность и его отрицательный заряд при физиологическом pH предполагают существование специфических переносчиков для импорта GSH из цитозоля в матрикс митохондрий, где он играет ключевую роль в защите от вызванных дыханием реактивных форм кислорода и в детоксикации гидроперекисей липидов и электрофилов. Антиоксидантная функция GSH определяется редокс-активным тиолом (-SH) цистеина, который становится окисленным, когда GSH восстанавливает молекулы-мишени

[Pompella et al., 2003, p. 1503].

При реакции с ROS или электрофилами GSH окисляется до GSSG, который может быть восстановлен до GSH редуктазой GSSG (GR). Таким образом, соотношение GSH/GSSG отражает окислительное состояние и может взаимодействовать с окислительно-восстановительными парами для поддержания соответствующего окислительно-восстановительного баланса в клетке. На первом этапе цистеин и глутамат соединяются в реакции, катализируемой γ-глутамилцистеин синтазой (γ-GCS), с образованием γ-глутамилцистеина. Эта первая реакция является лимитирующим шагом в синтезе GSH и регулируется доступностью цистеина. Завершение синтеза GSH катализируется глутатионсинтетазой (GS) в реакции, в которой γ-глутамилцистеин ковалентно связан с глицином [Ribas et al, 2014, p. 2].

Витамин Е имеет 4 формы с АО активностью: α, β, γ, δ [Jiang, 2014, p. 80]. Токоферол является антиоксидантом, разрывающим цепи, поскольку он взаимодействует с перекисными радикалами гораздо быстрее, чем полиненасыщенные жирные кислоты, тем самым предотвращая перекисное окисление липидов. В экспериментах на крысах с сахарным диабетом 2 типа было показано, что NO-опосредованное расслабление артерий улучшается после приема токоферола [Jones, 2002, p. 110]. Также была продемонстрирована способность токоферола останавливать адгезию лейкоцитов, тромбоцитов [Турпаев, 2002, с. 288].

Известно, что витамин Е в митохондриях может восстанавливаться аскорбатом или убихинолом. Показано, что содержание витамина С в митохондриях печени крысы достаточно высокое и составляет примерно 0.5-1 мМ. Было предположено, что аскорбиновая кислота может транспортироваться в межмембранное пространство митохондрии с помощью натрий-зависимого транспортера витамина С [sodium-dependent vitamin C transporter - SVCT2], где непосредственно окисляться суперокидным анионом, генерируемым комплексом III или восстанавливая витамин Е, превращаться в окисленную форму. Окисленная форма витамина С, в свою очередь, может восстанавливаться убихинолом или транспортироваться в матрикс митохондрии, где восстанавливается с помощью глутатиона [Cantoni et al., 2017, с. 42]. Таким образом, витамин Е опосредованно (через витамин С) связан с системой глутатиона.

Митохондрии играют важную роль в регуляции апоптоза и некроза [Dave, Byfield, et al., 2008, p. 321]. Такие параметры, как mPTP, окислительное фосфорилирование, системы антиоксидантной защиты и другие, регулируют функциональность митохондрий [Пожилова, 2014, с. 16]. Набухшие митохондрии инициируют открытие mPTP, что приводит к разрыву внешней мембраны митохондрий, а также утечке межмембранных компонентов в цитозоль, провоцируя процесс апоптоза клеток. Накопление ионов Ca2+ в матриксе митохондрий также является прямым регуляторным механизмом для открытия митохондриальной поры - ключевого звена в запуске программы апоптоза клетки [Dave et.al, 2008, p. 322], и открытие mPTP является не единственным механизмом утечки межмембранных компонентов митохондрий в цитозоль. Однако поиск лекарственных веществ, мишенью которых будет митохондриальная мегапора, может стать перспективным направлением в коррекции многих патологических состояний [Новиков и др, 2013, с. 45].

Также в последнее время возрос интерес к изучению митохондриального АТФ-чувствительного калиевого канала (mitoKATP-канала), поскольку установлено, что его активация играет ключевую роль в защите органов и тканей от последствий ишемии/реперфузии и, помимо своей важной роли, mitoKATP-канал играет огромную роль в адаптации организма к различным стрессовым факторам [Danilenko et al, 2012, p. 286]. Известно, что открытие mitoKATP-канала приводит к деполяризации мембранного потенциала митохондрий и вызывает обратимое окисление флавопротеинов дыхательной цепи, тем самым увеличивая продукцию реактивных форм кислорода (ROS) в митохондриях [Samavati et.al, 2002, p. 280]. Однако в обзоре Пожиловой и др. показывают, что природные метаболические активаторы митоКАТП-канала, уридин и его нуклеотиды в микромолярных концентрациях, значительно уменьшают площадь инфаркта миокарда, нормализуют уровень АТФ, креатинфосфата и антиоксидантных защитных систем, снижая образование ROS, и нормализуют сердечный ритм на моделях инфаркта миокарда крыс [Пожилова, 2014, с. 18].Также отмечается, что открытие митоКАТП-канала приводит к снижению ROS в клетках ткани, тем самым регулируя ее.

Таким образом, активация калиевого цикла приводит к снижению образования ROS в клетках. При адаптации к стрессовому фактору и последующем снижении образования ROS можно объяснить известную защитную роль митоКАТП-канала при ишемии/реперфузии [Garlid, 2012, p. 580]. Активация перекисного

окисления липидов (ПОЛ) часто является одним из триггеров многих заболеваний, а также отягощающим фактором многих патологических состояний [Lobo et.al, 2010, p. 123]

Более того, использование антиоксидантов при лечении различных патологических состояний организма замедляет течение патологических состояний, вызванных избытком свободных радикалов, так как антиоксиданты способны предотвратить активацию индуцированных свободно-радикальных реакций [Brewer, 2011, p. 245].

Таким образом, из вышеизложенного материала можно сделать вывод, что соединения с антиоксидантной активностью могут рассматриваться как перспективные универсальные средства, способствующие профилактике и лечению заболеваний, вызванных окислительным стрессом. Учитывая вышесказанное, исследования молекулярных и клеточных механизмов действия растительных соединений в настоящее время считаются актуальными для выявления потенциальных фармакологических агентов, оказывающих влияние на организм.

Одним из потенциальных фармакологических агентов являются полифенольные соединения растений. Полифенольные соединения имеют очень широкий спектр действия на биологические объекты, проявляя антиоксидантный, гепатопротекторный, антигипоксический, мембранотропный и многие другие эффекты [Asrarov et al, 2015, p. 11]. Проявляющиеся физиологические реакции клеток, подвергшихся воздействию полифенолов, обусловлены способностью полифенолов изменять проницаемость мембраны митохондрий в отношении особых фракций, что имеет решающее значение в предотвращении различных патологических состояний организма.

Широко известно, что кверцетин, типичный компонент лука, гречихи и цитрусовых, используется в традиционной медицине как профилактическое средство против различных заболеваний, таких как рак [Zheng et al. 2011, p. 1120], сердечно-сосудистые и нервные расстройства [Shankar, 2007, p. 2870], ожирение [Yang et al. 2008, p. 63] и хроническое воспаление, а также обладает терапевтическим эффектом благодаря огромной антиоксидантной активности. Хотя основные механизмы биологического действия в значительной степени являются предметом дискуссий, структура кверцетина предполагает многофункциональный и опосредованный митохондриями механизм [Karbarz, 2008, p. 1889]. Будучи важным представителем подкласса флавонолов, кверцетин привлек к себе значительное внимание. Более того, кверцетин и его глюкозилированные формы составляют 60-75% потребляемых флавоноидов [Bouktaib et al, 2002, p. 6263].

По своим химическим свойствам дигидрокверцетин является активным антиоксидантом, способным ингибировать окислительный стресс, а уровень антиоксидантной активности позволяет ему занимать первые позиции среди веществ аналогичного спектра действия. Являясь веществом с высокой степенью биологической активности, дигидрокверцетин обладает широким спектром положительного влияния на метаболические реакции и динамику различных патологических процессов. Кроме того, ДГК обладает капилляропротекторными, противовоспалительными, гепатопротекторными свойствами.

Антиоксидантные свойства полифенольных соединений в значительной степени зависят от количества гидроксильных групп в бензольном кольце, их положения, степени экранирования, а также от природы других заместителей, влияющих на электронную плотность бензольного кольца [Yashin, 2014, P. 870].

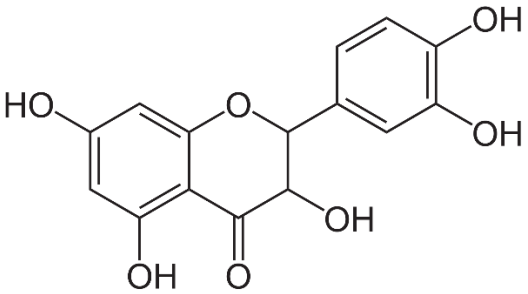

Рис. 7. Формула дигидрокверцетина

В литературе также приводятся данные о том, что расположение гидроксильных групп в бензольном кольце играет большую роль в проявлении АОА, чем их количество [Amič, 2003, P. 60].

Наличие нескольких гидроксильных групп в ядре, особенно в орто- и пара-положениях друг к другу, обуславливает особую чувствительность к действию окислителей. Такие фенолы чрезвычайно легко окисляются и являются хорошими восстановителями. Например, замещенные в орто-положении гидроксильные группы испытывают внутримолекулярное отталкивание, поэтому их антиоксидантная активность увеличивается по сравнению с изомерами, в которых ОН-группы занимают мета-положение. Возможно, более высокая антиоксидантная активность кверцетина зависит от электронной плотности бензольного кольца [Gayibov, 2021, P. 2924].

Скорее всего, ДГК способствует прямой нейтрализации АФК в митохондриях, что снижает интенсивность окислительной деструкции белков и липидов митохондрий и позволяет сохранить их высокий антиоксидантный потенциал при воздействии низкотемпературного фактора на организм гомойотермных животных.

5. Заключение

Впервые исследовано влияние ДГК на ссостояние тиол-дисульфидной системы митохондрий печени крыс при кратковременной умеренной гипотермии. Показано, что снижение температуры тела крыс до 30°С снижает уровень тиоловых групп в белках митохондрий печени крыс. При этом значительно падает уровень глутатиона и витамина Е. Курсовый прием ДГК способствует относительной нормализации данных показателей. Добавление ДГК к митохондриям, инкубированным в среде Фентона, дозозависимо снижает содержание карбонильных групп, что свидетельствует о существенном антиоксидантном эффекте, оказываемом данным полифенолом.

В ходе исследования получены фундаментальные данные о влиянии популярного антиоксиданта ДГК на содержание ключевых компонентов антиоксидантной системы митохондрий в норме и при умеренной гипотермии. Они позволят расширить имеющиеся представления о патогенетических механизмах повреждения клеток в период воздействия низкотемпературного фактора с последующей возможностью поиска новых способов протекции и коррекции гипотермических повреждений.

Благодарности

Огромную благодарность хочу выразить своему научному руководителю Джафаровой Альбине Мехьядиновне за оказанную помощь и поддержку при проделывании экспериментов и написании работы

Литература

1. Иллариошкин, С.Н. Нервные кдетки и окислительный стресс / С. Н. Иллариошкин // Научный центр неврологии. - 2009. - С. 2
2. Новиков, В. Е. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013. - Т. 76, № 5. - С. 37-47.
3. Пожилова, Е.В. Регуляторная роль митохондриальной поры и возможности её фармакологической модуляции / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. - 2014. - Т. 12, №3. - С. 13-19.
4. Турпаев, К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К.Т. Турпаев // Биохимия. - 2002. Т. 67. - № 3. - С. 281-292.
5. Халилов, Р. А. Интенсивность свободно-радикальных процессов в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности / Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, С. И. Хизриева, В. Р. Абдуллаев //. Цитология. - 2019. - Т.91, №7. - С. 1-12.
6. Alva N., Palomeque, J., and Teresa, C. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2013. – Vol. 23. - № 5. – P. 258.
7. Amic D., Beslo D., Trinajstic N. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids // Croatica Chemica Acta. – 2003. – Vol. 76. – № 1. – P. 55-61.
8. Asrarov M.I., Gaiibov U.G., Komilov E.D., Ergashev N.A., Rakhimov R.N., Abdullazhanova N.G., Aripov T.F. Antioxidant and membrane-active properties of 1,4,6 tri-o-galloy l-2,3-valoneyl-β-d-glucose // European Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 5. – №1. – P. 3-15.

9. Bouktaib M. Regio- and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-O-b-D-glucuronide. Tetrahedron Letters 43. // Journal of Young Investigators. – 2002. – P. 6263-6266.
10. Brewer M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2011. – Vol. 10. – P. 221-247.
11. sunBrown D., Brugger H., Boyd J., Accidental hypothermia // The New England Journal of Medicine. – 2012. – Vol. 367. – P. 1930-1938.
12. Cantoni O., Guidarelli A., Fiorani Cantoni M., Mitochondrial uptake and accumulation of Vitamin C: What can we learn from cell cultures studies? // Antioxidants and Redox Signaling. – 2017. – Vol. 29. – P. 41-45.
13. Danilenko K.V., Levitan R.D. Seasonal affective disorder // *The* Handbook *of* Clinical Neurology. – 2012. – Vol. 106. – P. 279-289.
14. Dave Z., Byfield M., Bossy-Wetzel E. Assessing mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis // Methods. – 2008. – Vol. 46. – № 4. – P. 319-323.
15. Garlid K.D., Halestrap A.P. The mitochondrial K(ATP) channel--fact or fiction? // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2012. – Vol. 52. – № 3. – P. 578-583.
16. Gayibov U., Gayibova S., Pozilov M., Tuxtaeva F. Influence of quercetin and dihydroquercetin on some functional parameters of rat liver mitochondria // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Scienes. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 2924.
17. Jiang Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy / Q. Jiang // Free Radical Biology and Medicine. – 2014. – №72. – P.76-90.
18. Jones D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance // Methods in enzymology. Academic Press. – 2002. – Vol. 348. – P. 93-112.
19. Karbarz M., Malyszko J. Voltammetric Behavior of Trolox in Methanol and Ethanol Solutions // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2008. – Vol. 20. – P. 1884-1890.
20. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. // Pharmacognosy Reviews. – 2010. – Vol. 8. – № 8. – P. 118-126.
21. Polderman K. Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist // Biochemical Pharmacology. – 2003. – Vol. 66. – P. 1499-1503.
22. H. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia // Critical Care Medicine. – 2009. – Vol. 37. – P. 186-202.
23. Ribas V., Garcia-Ruiz C., Fernandez-Checa J. Glutathione and mitochondria // Journal of frontiers in pharmacology. – 2014. – Vol.5. – № 2. – P. 1-2.
24. Samavati L., Monick M. M., Sanlioglu S., Buetther G.R. Mitochondrial K(ATP) channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. – 2002. – Vol. 283. – № 1. – P. 273-281.
25. Shankar M., Bloodgood L., Walsh. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway // The Journal of Neuroscience. – 2007. – Vol. 27. – №. 11. – P.2866-2875.
26. Søreide K. Clinical and translational aspects of hypothermia in major trauma patients: from pathophysiology to prevention, prognosis and potential preservation // Injury. – 2014. – Vol.45. – P. 647-654.
27. Sun Z., Honar H., Sessler D.I., Dalton J.E., Yang D., Panjasawatwong, K., Deroee, A.F., Salmasi, V., Saager, L., and Kurz, A., Intraoperative core temperature patterns, transfusion requirement, and hospital duration in patients warmed with forced air // Anesthesiology. – 2015. – Vol. 122. – P. 276-285.
28. Usenko, L.V. and Tsarev, A.V. Artificial hypothermia in modern reanimatology // General Reanimation. – 2009. – Vol. 5. – №. 1. – P. 21-23.
29. Yang J.Q., Chen J.H, Liu, J.J. A new genus and a new species of Braconinae (Hymenoptera, Braconidae) from China // Acta Zootaxonomica Sinica. – 2008. – Vol. 33. – №1. – P. 61-64.

30. Yashin A. Influence of the structure of polyphenol antioxidant molecules on the sensitivity of amperometric detection in HPLC and injection-flow systems // Sorption and chromatographic processes. – 2014. – Vol. 5. – P. 869-878.
31. Zheng J., Ramirez V., Br J. Inhibition of mitochondrial proton fof1-atpase/atp synthase by polyphenolic phytochemicals // British Journal of Pharmacology. – 2000. – Vol. 130. – P. 1115-1123.