

Table 2 – Classification of toxic chemicals according to the degree of toxicity and hazard based on the results of the study of their toxic properties on *Tetrahymena pyriformis*

Waste	Calculation method	According to the results of the study of acute toxicity with a single intravenous administration to white rats	On the <i>Tetrahymena pyriformis</i> test object
Waste from washing machines containing oils	V class	IV class	III class
Bottom sediment waste	V class	IV class	III class
Extract of dry sediment (subjected to thermal or other drying)	V class	IV class	III class

Thus, it is confirmed that the degree of toxicity of water systems is influenced by factors that are not loaded when calculating the method for determining the hazard class, for example, the mutual embedding of components of water systems on top of each other. Therefore, the preference for establishing the hazard class remains for experimental methods, and for a more reliable establishment of the hazard class of polluting water systems, we cannot assess their ecotoxicity.

REFERENCES

1. Tyurin VG, Dolgov VA, Lopata FF, Kochish OI. Role of environmental factors in obtaining safe product of animal husbandry / Food safety and sustainable development of the agro-industrial complex materials of the International scientific-practical conference. 2015;534–537.
2. Dolgov VA, Lavina SA, Kozak SS, Nikitchenko DV. Biotesting food, feed and environmental objects / Bulletin of RUDN. Series Agronomy and Livestock. 2014;3:69–78.
3. Guidelines for the use of ciliates of *Tetrahymena pyriformis* as a test culture in the device “Biotester2”. Moscow: Veterinary Department of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation. 2000;13-7-2:2157.
4. Automated method for determining the toxicity of animal products, feed and environmental objects (guidelines). Moscow, RAAS, 2006.
5. Maurya R. Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: A review / Maurya R, Pandeya AK // Science of The Total Environment. 2020;741(1):140058

РЕГУЛЯТОРНЫЕ, АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ И ИХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ КОМПЛЕКСОВ REGULATORY, ANTIOXIDATIVE AND HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF PLANT POLYPHENOLS AND THEIR NANOSTRUCTURED COMPLEXES

**И. Б. Заводник, Е. А. Лапшина, Т. В. Ильич, А. Г. Вейко, Т. А. Коваленя, В. У. Буко
I. B. Zavodnik, E. A. Lapshina, T. V. Ilyich, A. G. Veiko, T. A. Kovalenia, V. U. Buko**

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
Гродно, Беларусь, zavodnik_il@mail.ru
Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus*

Флавоноиды, вторичные метаболиты растений, обладают широким спектром биологической и фармакологической активности. В нашем эксперименте флавоноиды и их комплексы с циклодекстринами в концентрации 10-100 мкМ дозозависимо предотвращали перекисное окисление липидов мембран эритроцитов и митохондрий, ингибировали окисление восстановленного глутатиона, модулировали проапоптотический процесс формирования пор высокой проницаемости в митохондриях, что определяется липофильностью полифенола и его структурой. Генерирование карт распределения электронной плотности в молекуле кверцетина и семихинон-радикала кверцетина показывает, что активные электронные орбитали кверцетина и его семихинон-радикала делокализованы по фенольным кольцам, что в случае радикала, обеспечивает его стабилизацию. Комплекс кверцетин-гидроксипропил-β-циклодекстрин оказался более эффективным антиоксидантом.

Flavonoids, secondary plant metabolites, demonstrate a wide range of biological and pharmacological activities. In our experiment, flavonoids and their complexes with cyclodextrins (10-100 μM) dose-dependently prevented lipid peroxidation of erythrocyte and mitochondrial membranes, inhibited oxidation of reduced glutathione, and modulated the proapoptotic process of the mitochondrial permeability transition pores formation, that depends on flavonoid lipophilicity and structures. Generation of maps of the electron density distribution in the quercetin molecule and

the quercetin semiquinone radical shows that the active electronic orbitals of quercetin and its semiquinone radical are delocalized along the phenolic rings, which, in the case of a radical, increases radical stability. The quercetin-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex proved to be a more effective antioxidant.

Ключевые слова: кверцетин, семихинон радикал, эритроциты, митохондриальные мембраны, циклодекстрины, гепатопротекторные свойства, антиоксиданты.

Keywords: quercetin, semiquinone radical, erythrocytes, mitochondrial membranes, cyclodextrins, hepatoprotection, antioxidants.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-1-255-258>

Одной из задач современной медицины и фармакологии является поиск биологически активных соединений, предотвращающих развитие патологических процессов в организме, обладающих малой токсичностью, и высокой фармакологической и регуляторной эффективностью. Полифенолы, вторичные метаболиты растений, обладают широким спектром биологической и фармакологической активности. Антиоксидантная активность полифенолов обусловлена как прямым радикал-связывающим механизмом, так и модулирующим эффектом на ферменты системы антиоксидантной защиты, способностью хелатировать ионы металлов, регулировать многочисленные сигнальные каскады клетки, такие как АМРК, MAPK, NF- κ B, Nrf2-Keap1 [1]. К флавоноидам, широкому классу полифенолов, относятся природные соединения, представляющие собой различные производные бензо- γ -пирона (хромона). Молекулы полифенолов состоят из нескольких бензольных колец и содержат несколько (ОН) и/или (C=O)-групп [1-3]. Характерно, что химическое разнообразие природных соединений значительно превосходит разнообразие соединений в синтетических библиотеках. Растительные полифенолы – широко распространенный и многочисленный класс соединений, различающихся структурой, физико-химическими свойствами, биологическими эффектами. Возможности растительных полифенолов как протекторов и регуляторов митохондрий печени, активно исследуются в настоящее время [3]. Флавоноиды – необходимый компонент диеты человека, в различных растительных источниках обнаружено порядка 10 000 различных флавоноидов. Кверцетин – один из наиболее распространенных и изученных флавоноидов, обладает доказанной антиоксидантной активностью и демонстрирует выраженный терапевтический потенциал при целом ряде патологических состояний. Выявление механизмов одно- и двух-электронных окислительно-восстановительных реакций полифенолов, определение природы образующихся свободных радикалов, обеспечивающих антиоксидантную активность полифенолов, представляет значительный теоретический и практический интерес. В то же время полифенолы обладают чрезвычайно низкой растворимостью в воде, что обуславливает их низкую биодоступность, и значительно уменьшает положительные терапевтические эффекты. С целью специфической и безопасной доставки полифенолов к клеткам-мишеням, снижения токсичности, повышения биодоступности и стабильности, предотвращения деградации разрабатываются разнообразные транспортные системы: липосомы, мицеллы, квантовые точки, наногели, дендримеры. В качестве перспективных инкапсулирующих полисахаридов рассматриваются циклодекстрины, широко используемые при разработке способов направленной доставки лекарственных препаратов к органам и клеткам-мишеням [4]. Определенные нами значения констант ассоциации и высокие отрицательные значения изменений свободной энергии Гиббса ($\Delta G < 0$) и энтальпии ($\Delta H < 0$), и положительные значения изменения энтропии ($\Delta S > 0$) в процессе комплексообразования свидетельствуют о спонтанном и экзотермическом характере процесса и формировании стабильных комплексов полифенолов с циклодекстринами.

Несмотря на многочисленные исследования, многие закономерности и молекулярные механизмы взаимодействия полифенолов с клеточными компонентами, структура, физико-химические свойства, фармакологическая активность полифенолов и их наноструктурированных комплексов с циклодекстринами, возможность использования комплексов полифенолов для регуляции функциональной активности клеток, остаются невыясненными. Цель настоящей работы – разработка биомедицинских технологий восстановления клеток печени на основе комплекса физиологически активных полифенолов растительного происхождения, обладающих высокой антиоксидантной и противовоспалительной активностью. Мы оценили антиоксидантную и регуляторную эффективность ряда полифенолов и их комплексов включения с β -циклодекстринами, молекулярную структуру и электронные свойства флавоноидов, гепатопротекторные эффекты при токсическом поражении крыс.

В наших экспериментах флавоноиды эффективно предотвращали перекисное окисление липидов мембран эритроцитов и митохондрий, ингибировали окисление восстановленного глутатиона, что определяется липофильностью полифенола и его структурой. Генерирование карт распределения электронной плотности в молекуле кверцетина и семихинон-радикала кверцетина показывает, что активные электронные орбитали (НОМО и LUMO) кверцетина и его семихинон-радикала делокализованы по всем фенольным кольцам, что в случае радикала, обеспечивает его стабилизацию. В нашем эксперименте флавоноиды предотвращали лизис эритроцитов гипохлорной кислотой, модулировали проапоптотический процесс формирования пор высокой проницаемости в митохондриях, регулировали структуру, динамику, гидратацию липидного бислоя мембран.

Механизмы функционирования флавоноидов исследованы недостаточно. В настоящей работе мы исследовали взаимодействие флавоноидов (кверцетина, нарингенина и катехина) с клеточными и искусственными мембранами. Флавоноиды и их комплексы с циклодекстринами в концентрации 10-100 мкМ дозозависимо ингибировали

перекисное окисление мембранных липидов эритроцитов крыс, экспонированных трет-бутилгидропероксиду (700 мкМ), и несколько уменьшали процесс окисления внутриклеточного и внутримитохондриального восстановленного глутатиона (IC₅₀ для предотвращения процесса перекисного окисления липидов составляла $9,7 \pm 0,8$ мкМ; $8,8 \pm 0,7$ мкМ; и $46,8 \pm 4,4$ мкМ в случае кверцетина, катехина и нарингенина, соответственно). Комплекс кверцетин-гидроксипропил-β-циклодекстрин оказался более эффективен в качестве ингибитора процессов перекисного окисления мембранных липидов и окисления глутатиона. В изолированных митохондриях печени крысы кверцетин, катехин и нарингенин (10-50 мкМ) дозозависимо повышали чувствительность митохондрий к переходу в состояние высокой проницаемости мембран, индуцированному ионами Ca²⁺. Антиоксидантный эффект флавоноидов в цитоплазме клетки был намного ниже по сравнению с мембранными компартментами. Таким образом, флавоноиды действуют как мощные скэвджеры свободных радикалов в клеточной мембране, и в меньшей степени в цитоплазме, кверцетин, катехин и нарингенин обладают высокой растворимостью в липидной фазе мембраны и взаимодействуют с липофильными свободными радикалами. Количество свободных групп ОН влияет на способность молекул флавоноидов делокализовать электроны, определяя активность флавоноидов как акцепторов радикалов и хелатирующие свойства полифенолов. Кверцетин является одним из наиболее эффективных восстановителей активных форм кислорода, азота и хлора.

Полифенолы способны эффективно модулировать митохондриальные процессы: митохондриальный биогенез (индуцировать активность белков сиртуинов), генерацию энергии, митохондриальный мембранный потенциал, формирование пор высокой проницаемости, регулировать митохондриальную цепь переноса электронов и синтез АТФ, внутримитохондриальный редокс-статус. Распределение полифенолов в мембране приводит к изменению биофизических характеристик мембраны и играет определяющую роль в биологической активности флавоноидов. Показано, что флавоноиды взаимодействуют с поверхностью модельных липидных мембран преимущественно за счет формирования водородных связей, и эффект полифенолов зависит от количества Н-связей и площади полярной поверхности. Наши измерения анизотропии флуоресценции зондов ТМА-DPH и DPH показали, что более липофильный флавоноид кверцетин и в гораздо меньшей степени более полярные катехин и нарингенин взаимодействуют с липосомальными мембранами и дозозависимо уменьшают микротекучесть (повышают жесткость) липидного бислоя на различной глубине, эффект флавоноидов на подвижность гидрофобной зоны мембраны более выражен по сравнению с эффектом на поверхности раздела вода / мембрана. Кверцетин/комплекс кверцетин-β-циклодекстрин эффективно препятствуют инактивации сукцинатдегидрогеназы, α-кетоглутаратдегидрогеназы, ингибируют процессы перекисного окисления липидов, частично восстанавливают уровень глутатиона при окислительном воздействии *in vitro* в изолированных митохондриях печени крыс. Включение кверцетина в супрамолекулярный комплекс с циклодекстринами повышает его антиоксидантную активность, более выражено в матриксе митохондрий. В наших экспериментах экспонирование митохондрий хлорноватистой кислотой (НОСl) *in vitro* существенно нарушает их функциональную активность. Предварительное внесение кверцетина и его комплекса с β-циклодекстринами (10–50 мкМ) предотвращают ингибирование дыхательной активности митохондрий, диссипацию мембранного потенциала при НОСl-индуцированном повреждении.

Включение молекул флавоноидов в липидный бислой приводит к увеличению отрицательного заряда мембраны, а также к снижению температуры и энтальпии фазового перехода в мембране и возрастанию гетерогенности мембраны. Заряд поверхности мембраны определяет функциональную активность мембраны, поскольку заряд мембраны влияет на электростатическое отталкивание между заряженными молекулами и поверхностью мембраны. Полифенолы и их комплексы с циклодекстринами оказывают благоприятные эффекты при дисфункции митохондрий благодаря их антиоксидантной и регуляторной активности. Уникальная структура циклодекстринов, обладающих внутренней гидрофобной полостью, обеспечивает их эффективное комплексобразование с разнообразными лекарственными соединениями, что позволяет создавать многофункциональные наноконъюгаты для эффективной и избирательной доставки лекарств и биологически активных соединений в клетки-мишени в рамках разработки новых подходов для лечения заболеваний человека («персонализированной наномедицины»). Нами определены термодинамические параметры формирования супрамолекулярных комплексов β-циклодекстринов и полифенолов (кверцетин, нарингенин, сезамин), константы ассоциации и стехиометрия.

Впервые показано, что терпеноид ферутинин действует как электрогенный Ca²⁺-транспортер в изолированных митохондриях печени крыс. Ферутинин/комплекс ферутинин-β-циклодекстрин дозозависимо (10–60 мкМ) индуцируют диссипацию мембранного потенциала митохондрий в отсутствие и присутствии ионов кальция и формирование митохондриальных пор высокой проницаемости.

В экспериментах *in vivo* нами исследованы механизмы защитных и регуляторных эффектов полифенолов, полученных из растений, произрастающих на территории Беларуси (полифенолы плодов клюквы, бетулин из коры березы) в экспериментальной модели хронического токсического поражения печени у крыс. Мы оценили качественный и количественный состав и возможность использования полифенолов / комплексов полифенолов с гидроксипропил-β-циклодекстрином для направленной коррекции функциональных нарушений митохондрий печени крыс при токсическом поражении. Антиоксидантная и регуляторная эффективность полифенолов капусты краснокочанной подтверждена многочисленными исследованиями, которые объясняют этот эффект высоким содержанием антоцианинов. Нами была показана высокая эффективность комплекса антоцианов капусты краснокочанной у крыс с экспериментальным диабетом 1 типа. Нами идентифицировано 22 соединения, содержащиеся в капусте краснокочанной, преимущественно антоцианины, гидроксibenзойные и гидроксикиннамовые кислоты.

В нашем эксперименте хроническое потребление этанола существенно повышает в сыворотке крови крыс содержание провоспалительных цитокинов, TNF α , интерлейкина-6, а также адипокина, лептина, что свидетельствует о воспалительных процессах в печени. Полученные нами результаты свидетельствуют, что гепатопротекторная эффективность антоцианов капусты краснокочанной была дозозависимой и введение этой субстанции в высокой дозе (22 мг/кг) уверенно снижало аккумуляцию нейтральных липидов в печени животных с токсическим поражением печени, о чём свидетельствуют данные по оценке площади суданофильной окраски и содержанию триглицеридов в печени, а также проявляло выраженное противовоспалительное действие, оцениваемое по снижению уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, уменьшению активности ферментов – маркеров поражения печени, и подтвержденное результатами гистологических исследований. Введение животным антоцианов снижало дозозависимо содержание факторов TNF α и IL-6, концентрацию лептина и TGF β в сыворотке крови. Полученные результаты позволяют рекомендовать для дальнейших доклинических исследований комплекс антоцианов капусты краснокочанной в качестве эффективного гепатопротектора. Подобным образом, мы оценили гепатопротекторный потенциал экстракта полифенолов кожуры плодов клюквы (экстракт полифенолов экзокарпия плодов *Vaccinium macrocarpon*) и их комплексов с циклодекстрином при токсическом поражении печени у крыс [5].

Мы предполагаем, что благоприятные гепатопротекторные эффекты исследуемых биологически активных соединений растительного происхождения и их наноструктурированных комплексов опосредованы предотвращением нарушений структуры и функции печени, в первую очередь, митохондрий печени при токсическом поражении, что, в свою очередь, можно объяснить антиоксидантной, противовоспалительной, регуляторной активностью соединений, их мембраностабилизирующим потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nna, V.U. Quercetin exerts preventive, ameliorative and prophylactic effects on cadmium chloride-induced oxidative stress in the uterus and ovaries of female Wistar rats / V.U. Nna, U.Z. Usman, E.O. Ofutet, D.U. Owu // Food Chem. Toxicol. – 2017. – Vol. 102. – P. 143 – 155.
2. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder / I. O. Vedenskaya [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. – Vol. 52. – P. 188–195.
3. Moskaug, J. Polyphenols and glutathione synthesis regulation / J. Moskaug, H. Carlsen, M.C. Myhrstad, R. Blomhoff // Am. J. Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 81. – P. 277 – 283.
4. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study / C. Jullian [et al.] // Spectrochimica Acta. Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2007. – Vol. 67. – P. 230–234.
5. Cheshchevik, V.T. Rat liver mitochondrial damage under acute or chronic carbon tetrachloride-induced intoxication: Protection by melatonin and cranberry flavonoids / V.T. Cheshchevik, E.A. Lapshina, I.K. Dremza, S.V. Zabrodskaya, R.J. Reiter, N.I. Prokopchik, I.B. Zavodnik // Toxicol. Appl. Pharm. – 2012. – Vol. 261. – P. 271–279.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ

INFLUENCE OF SUCCINIC ACID DERIVATIVES ON LYMPHOCYTE MEMBRANES

Ю. А. Изепченко, И. В. Пухтеева, М. Л. Левин, Н. В. Герасимович
U. Izerchenko, I. Puhteeva, M. Levin, N. Gerasimovich

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь
julia7521104@gmail.com
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

В работе установлено, что после применения препарата янтарной кислоты отмечается уменьшение величины полярности липидного бислоя, в области аннулярного липида между аналогичными показателями не было установлено достоверных различий. При этом отмечалось значительное уменьшение показателей микровязкости аннулярного липида, а показатели микровязкости липидного бислоя выросли в 2,7 раза по сравнению с контрольным значением.

It was found that after the use of the preparation of succinic acid, a decrease in the polarity of the lipid bilayer was noted, but in the region of the annular lipid, no significant differences were found between similar indicators. At the same time, a significant decrease in the microviscosity of the annular lipid was noted, and the microviscosity of the lipid bilayer increased 2.7 times compared with the control value.

Ключевые слова: янтарная кислота, мембраны лимфоцитов, аннулярный липид, липидный бислой, микровязкость мембран, полярность мембран.