

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 577.352.42:577.352.54

ИЛЬИЧ
Татьяна Викторовна

**РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС КОМПЛЕКСАМИ ВКЛЮЧЕНИЯ
ПОЛИФЕНОЛОВ С β -ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Гродно, 2020

Работа выполнена в учреждении образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»

Научный руководитель: **Заводник Илья Борисович,**
доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биохимии учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»

Официальные оппоненты: **Канунникова Нина Павловна,**
доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры технологии, физиологии и гигиены питания учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»

Слобожанина Екатерина Ивановна,
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, заведующий лабораторией медицинской биофизики республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

Оппонирующая организация: Белорусский государственный университет

Защита состоится 15 мая 2020 года в 11.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.30.01 при республиканском научно-исследовательском унитарном предприятии «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 230030, г. Гродно, бульвар Ленинского комсомола, 50; e-mail: office@bioch.bas-net.by, тел/факс 8(0152) 55-90-75.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси»

Автореферат разослан «10» апреля 2020 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
кандидат биологических наук



И. П. Сутько

ВВЕДЕНИЕ

Растительные полифенолы, вторичные метаболиты растений, не синтезируемые в животных организмах и содержащиеся во фруктах, овощах, чае, кофе, обладают антиоксидантным, противовирусным, антимуtagenным и противоопухолевым [Костюк, 2016] действиями и привлекают пристальное внимание исследователей в качестве биокорректоров и биорегуляторов [Bulgakov, Vereshchagina, Veremeichik, 2018]. Полифенолы состоят из нескольких бензольных колец и содержат несколько (ОН)- и/или (С=О)-групп [Manach et al., 2004]. Существенный интерес представляют обнаруженные свойства полифенолов как регуляторов многочисленных клеточных сигнальных каскадов [Rahimifard et al., 2017]. В то же время полифенолы обладают 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 деструкции разрабатываются разнообразные транспортные системы: липосомы, мицеллы, наногели, дендримеры [Kim, Park, Na, 2018; Chen et al., 2019; Thompson, Barbero, Masson, 2019]. В качестве перспективных инкапсулирующих полисахаридов рассматриваются циклодекстрины [Derochette et al., 2014]. Структура циклодекстринов, обладающих внутренней гидрофобной полостью, обеспечивает их эффективное комплексообразование с разнообразными лекарственными соединениями, что позволяет создавать наноконъюгаты для эффективной доставки лекарств и биологически активных соединений в клетки-мишени в рамках разработки новых подходов для лечения заболеваний человека («персонализированная наномедицина»). Полифенолы и их комплексы включения с циклодекстринами оказывают благоприятные эффекты при дисфункции митохондрий благодаря их антиоксидантной и регуляторной активности. Относительная автономность митохондрий, их пластичность и определяющая роль в процессах клеточной жизнедеятельности позволяет изучать ряд метаболических функций и параметров на удобном для исследователя уровне клеточной подсистемы, делает привлекательным использование митохондрий для выяснения механизмов целенаправленного корректирующего воздействия природных субстанций на метаболически значимые процессы в клетке [Santos et al., 2018].

Несмотря на многочисленные исследования, многие закономерности и молекулярные механизмы взаимодействия полифенолов с клеточными компонентами, структура, физико-химические свойства, фармакологическая активность полифенолов и их комплексов с циклодекстринами, возможность использования комплексов для регуляции функциональной активности клеток, остаются невыясненными.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательских работ, проводимых на кафедре биохимии УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»: задания ГПНИ «Биотехнология»: «Регуляция активности митохондриальных транспортных белков суперсемейства ABC в норме и при патологии» (номер госрегистрации 20161460; 2016–2018 гг.); ГПНИ «Конвергенция 2020»: «Разработать молекулярно-информационные и физические методы функциональной диагностики и медицинской коррекции. Молекулярные механизмы нарушений энергетической функции митохондрий клеток печени при моделировании экспериментальной патологии и пути ее коррекции растительными полифенолами и их комплексами» (номер госрегистрации 20162037; 2016–2020 гг.); проекта БРФФИ М18КИ-030: «Регуляция редокс-активными соединениями процесса формирования митохондриальных пор высокой проницаемости с целью коррекции дисфункции митохондрий» (номер госрегистрации 20180244; 2018–2019 гг.), проекта БРФФИ М17М-092: «Разработка митохондриально-адресованных комплексов МУНТ/ДНК для адресной доставки противоопухолевых хинонов в клетки глиомы» (номер госрегистрации 20171119; 2017–2018 гг.); в рамках гранта Министерства образования Республики Беларусь для аспирантов на 2018 г. «Наноматериалы на основе β -циклодекстринов и биофлавоноидов: структура и биологическая активность наноккомплексов, механизмы терапевтического действия в коррекции метаболических нарушений и биоэнергетики клетки при воспалительно-дегенеративных заболеваниях печени» (номер госрегистрации 20180688; 2018 г.); в рамках программы сотрудничества Польского Национального Комитета ЮНЕСКО с Университетом в Лодзи с 09.04.2018 по 08.07.2018 (сертификат от 05.04.2018 № 126/2018).

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 гг.: п. 4 «Медицина, фармация, медицинская техника»: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний; фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы; п. 6 «Био- и nanoиндустрия»: нанотехнологии, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № 166.

Цель и задачи исследования

Цель работы: выявить физико-химические свойства, регуляторную и антиоксидантную активности полифенолов и их комплексов с

β -циклодекстринами и механизмы коррекции ими функциональной активности митохондрий печени крыс в моделях *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1) определить термодинамические параметры формирования супрамолекулярных комплексов β -циклодекстринов и полифенолов (кверцетин, нарингенин, сезамин), константы ассоциации и стехиометрию;

2) оценить эффекты кверцетина и супрамолекулярного комплекса кверцетин-гидроксипропил- β -циклодекстрин на мембранный потенциал и процесс формирования пор высокой проницаемости в изолированных митохондриях печени крыс *in vitro*;

3) определить протекторные эффекты кверцетина и супрамолекулярного комплекса кверцетин-гидроксипропил- β -циклодекстрин на респираторную активность, уровень глутатиона, активность ферментов ЦТК, перекисное окисление мембранных липидов митохондрий печени крыс при моделировании окислительных повреждений *in vitro*;

4) выявить эффекты терпеноида ферутина и его супрамолекулярного комплекса с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином на процесс формирования пор высокой проницаемости и мембранный потенциал изолированных митохондрий печени крыс;

5) оценить качественный и количественный состав и возможность использования полифенолов кожуры плодов клюквы/комплекса полифенолов кожуры плодов клюквы с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином для направленной коррекции функциональных нарушений митохондрий печени крыс при токсическом поражении.

Объект исследования: митохондрии печени крыс, полученные от крыс-самцов и самок линии Wistar; растительные полифенолы, комплексы полифенолов с β -циклодекстринами.

Предмет исследования: параметры формирования супрамолекулярных комплексов полифенолов с β -циклодекстринами, респираторная активность, мембранный потенциал митохондрий печени крыс, процессы формирования митохондриальных пор высокой проницаемости (МРТР), система антиоксидантной защиты, ультраструктура митохондрий клеток печени.

Выбор объекта и предмета исследования обусловлен следующими факторами: общеизвестно, что печень играет центральную роль в поддержании системного гомеостаза у млекопитающих, а относительная автономность митохондрий, высокая чувствительность к регуляторным и повреждающим патологическим факторам требует детального выяснения митохондриальной физиологии.

Научная новизна

Определены стехиометрия и термодинамические параметры процесса комплексообразования ряда полифенолов (кверцетин, нарингенин, сезамин) с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином (HP- β -CD). 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. Оценены регуляторные эффекты полифенолов и их комплексов включения с циклодекстринами на функциональную активность митохондрий: кверцетин и комплекс кверцетин-HP- β -CD стимулируют процесс формирования МРТР и демонстрируют мягкий разобщающий эффект на процессы дыхания и фосфорилирования. Доказано, что кверцетин и комплекс кверцетин-HP- β -CD препятствуют инактивации ферментов цикла Кребса, ингибируют процесс перекисного окисления мембранных липидов, восстанавливают редокс-баланс митохондрий при моделировании окислительного воздействия *in vitro*. Установлено, что экстракт полифенолов кожуры плодов клюквы и его комплекс с циклодекстрином обладают выраженными антиоксидантными и гепатопротекторными свойствами, заключающимися в восстановлении структуры и функционирования митохондрий печени при хроническом алкогольном повреждении печени. Включение полифенолов в комплекс повышает их гепатопротекторный и антиоксидантный потенциал.

Положения, выносимые на защиту

1. Полифенолы кверцетин, нарингенин, сезамин образуют комплексы включения с β -циклодекстринами по типу «гость-хозяин». Значения констант ассоциации указывают на высокую стабильность комплексов включения. 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. Энтропийный и энтальпийный факторы вносят вклад в стабилизацию комплекса включения, при этом энтальпийный эффект более значителен.

2. Флавоноид кверцетин ингибирует респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс, стимулирует Ca^{2+} -зависимый процесс формирования МРТР и диссипацию мембранного потенциала. Повышение растворимости кверцетина в водной среде в результате образования комплекса включения с HP- β -CD ослабляет его эффекты в митохондриальной мембране.

3. Кверцетин/комплекс кверцетин-НР-β-CD 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 НР-β-CD повышает его антиоксидантную активность более выражено в матриксе митохондрий.

4. Терпеноид ферутинин/комплекс ферутинин-НР-β-CD значительно повышают проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени крыс для ионов кальция, дозозависимо стимулируя формирование МРТР и диссипацию митохондриального мембранного потенциала. Эффекты ферутинина и комплекса ферутинин-НР-β-CD на Ca^{2+} -индуцированные процессы не опосредуются митохондриальным Ca^{2+} -унипортером (MCU) и частично связаны с транспортом одновалентных катионов.

5. Полифенолы кожуры плодов клюквы и их комплекс с НР-β-CD обладают гепатопротекторным эффектом при алкогольном поражении печени у крыс, который обусловлен предотвращением окислительного повреждения митохондрий и уменьшением чувствительности к Ca^{2+} -индуцированному процессу формирования МРТР. Включение полифенолов в комплекс повышает гепатопротекторный и антиоксидантный потенциал. Полифенолы кожуры плодов клюквы эффективно предотвращают повреждения ультраструктуры митохондрий при окислительном воздействии *in vitro*.

Личный вклад соискателя ученой степени

Постановка цели и задач исследования, выбор методов исследования, анализ полученных результатов, формулирование выводов и практических рекомендаций осуществлены совместно с научным руководителем. Измерение параметров функционального состояния, антиоксидантной системы и Ca^{2+} -индуцируемого набухания митохондрий (эксперименты *in vitro*), статистическая обработка и интерпретация результатов исследований осуществлены соискателем самостоятельно. Определение термодинамических параметров комплексообразования полифенолов с циклодекстринами проведено совместно с сотрудниками кафедры биофизической химии химического факультета Университета г. Лодзь (Республика Польша) (профессор Б. Палеч (B. Pałecz)). Определение состава экстракта полифенолов кожуры плодов клюквы проводили совместно с сотрудниками Института пищевых технологий и анализа Технологического университета г. Лодзь (Республика Польша) (профессор Г. Будрин (G. Budryn)). Электронно-микроскопические исследования структуры митохондрий проводили совместно с ведущим научным сотрудником НИЛ ГрГМУ, кандидатом биологических наук Р. И. Кравчук. Моделирование алкогольного поражения печени у

животных осуществлено совместно с сотрудниками отдела биохимической фармакологии Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (профессор В. У. Буко). Из совместно опубликованных работ в диссертацию включены результаты, полученные автором лично или на паритетных условиях с соавторами.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследований были представлены на конференциях различного уровня: Республиканской научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы» (Гродно, 19–20 мая 2016 г., 15–16 мая 2018 г.); 12 съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 28–30 июня 2016 г.). Конференции молодых ученых с международным участием «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 5–6 июля 2016 г., 11–12 мая 2017 г.); III Международном симпозиуме «Метаболический синдром: эксперимент, клиника, терапия» (Гродно, 20–22 сентября 2017 г.); Международной научной конференции молодых ученых (Минск, 9 ноября 2017 г.); «II Doktoranckie sempoizjum nanotechnologii NanoMat» (Лодзь, 21–22 апреля 2018 г.); «VII Lodzkie sympozjum Doktorantov Chemii» (Лодзь, 9–10 мая 2019 г.); Международной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы биохимии» (Гродно, 31 мая 2019 г.); «Current environmental ISSUES 2019» (Белосток, 24–26 сентября 2019 г.); Международной конференции «Свободные радикалы в химии и жизни» (Минск, 10–11 октября 2019 г.).

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры биохимии УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы» (акт внедрения № 03-8/132 от 12.09.2017 г.; акт внедрения № 03-8/005 от 11.01.2019 г.); в научно-исследовательский процесс отраслевой лаборатории биологически активных веществ республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (акт внедрения от 18.11.2019).

Опубликование результатов диссертации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 25 работ: 10 статей в научных рецензируемых журналах (4 за рубежом), соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 12 статей – в сборниках научных работ и 3 тезисов докладов. Общий объем опубликованных материалов в рецензируемых журналах – 9,8 авт. л. (6,1 авт. л. без соавторов), в

сборниках научных работ – 2,2 авт. л. (1 авт. л. без соавторов), в тезисах докладов – 0,2 авт. л. (0,1 авт. л. без соавторов).

Структура и объем диссертации

Диссертация включает следующие разделы: «Перечень сокращений и условных обозначений», «Введение», «Общая характеристика работы», 6 глав основной части, «Заключение», «Библиографический список», включающий 367 источников (из них 25 публикаций соискателя), 3 приложения. Полный объем диссертации составляет 193 страницы, основной текст размещен на 157 страницах, включающих 15 таблиц, занимающих 7 страниц, и 54 рисунка, занимающих 30 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Комплексы включения полифенолов с циклодекстринами были получены согласно методу, предложенному И. М. Савиком (I. M. Savic) и соавторами [Savic et al., 2015]. Спектры FT-IR образцов (кверцетин, HP- β -CD, комплекс кверцетин-HP- β -CD) регистрировали в диапазоне волновых чисел 4000–400 cm^{-1} (Nicolet iS10, США). Исследование фазовой растворимости полифенолов в присутствии циклодекстринов проводили по методу Хигучи-Коннора (T. Higuchi, K. A. Connors) [Higuchi, Connors, 1965] (Jasco V-650, Япония). Энергетические эффекты образования комплексов включения определяли методом калориметрического титрования (MicroCal PEAQ-ITC, США). Квантово-химические расчеты молекулярной структуры комплекса кверцетин- β -CD/HP- β -CD проводили, используя пакет HyperChem 8.0 и базис 6-31G [Erkok et al., 2003]. Масс-спектры экстракта полифенолов кожуры плодов клюквы получены в диапазоне масс 50–1500 м/з (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, США). Идентификацию пиков фенольных соединений проводили на основании сравнения со спектрами стандартов.

Митохондрии печени крыс изолировали методом дифференциального центрифугирования [Johnson, Lardy, 1967]. Окислительные процессы *in vitro* в митохондриях печени крыс моделировали, инкубируя органеллы с tBHP/H₂O₂ при 25 °С. Внемитохондриальный уровень генерации активных форм кислорода (АФК) определяли с помощью флуоресцентного зонда дихлородигидрофлуоресцеин (DCF) (Solar CM 2203, Беларусь).

Моделирование алкогольного поражения печени *in vivo* проводили на половозрелых крысах-самцах линии Wistar (масса 200–230 г). Все процедуры, выполняемые в эксперименте, соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для научных целей, руководству по уходу и использованию лабораторных животных (Страсбург, 1986). Животные были разделены на 5 групп (8–10 животных в группе). Группа 1 (Контроль)

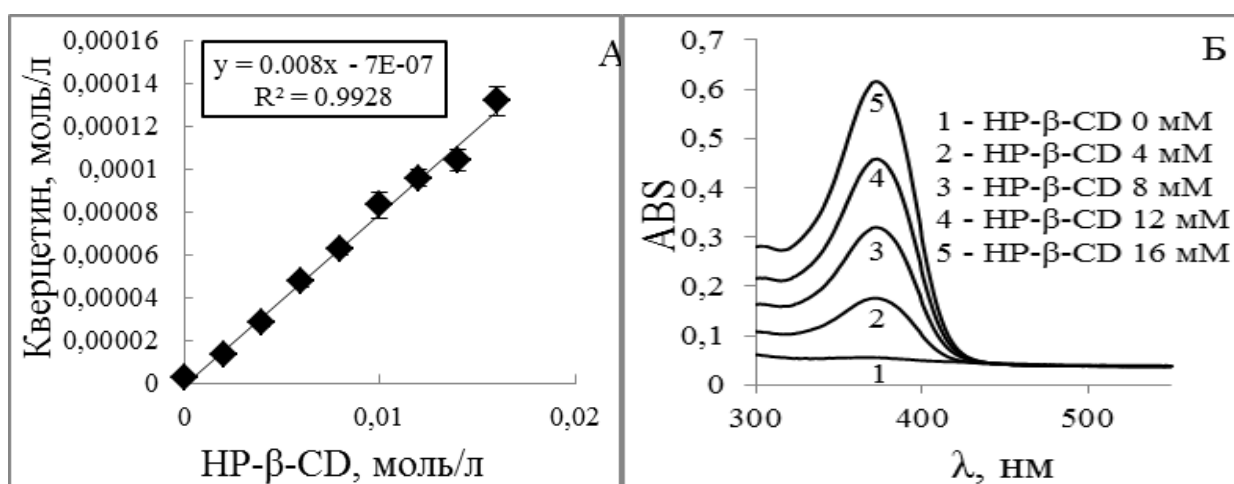
получала физиологический раствор внутривенно. Группа 2 (АСГ) получала этанол (30 %) (4 г/кг) в течение 8 недель. Группа 3 (АСГ + HP- β -CD) получала HP- β -CD (17,5 мг/кг) и этанол (4 г/кг). 4 – (АСГ + полифенолы кожуры плодов клюквы) получала экстракт полифенолов (4 мг фенольных соединений/кг) и этанол (4 г/кг). 5 – (АСГ + комплекс полифенолы-HP- β -CD) получала комплекс экстракта полифенолов плодов клюквы (4 мг фенольных соединений/кг) с HP- β -CD (17,5 мг/кг HP- β -CD) и этанол (4 г/кг).

Респираторную активность митохондрий регистрировали полярографически при 26 °С, используя изготовленную в нашей лаборатории термостатируемую ячейку с электродом Кларка [Dremza et al., 2006]. Мембранный потенциал митохондрий измеряли спектрофлуориметрически с помощью флуоресцентного зонда сафранин О (Solar CM 2203, Беларусь) [Akerman, Wikström, 1976]. Формирование пор высокой проницаемости митохондрий определяли по изменению оптической плотности суспензии митохондрий во времени при длине волны 520 нм [Petronilli et al., 1993]. Активность α -кетоглутаратдегидрогеназы измеряли спектрофотометрически по скорости восстановления НАД⁺ по изменению оптической плотности при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340}=6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Активность сукцинатдегидрогеназы определяли по скорости восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола при длине волны 610 нм [Nulton-Persson, Szweda, 2001]. Активность комплекса I дыхательной цепи митохондрий оценивали как активность НАДН-дегидрогеназы по методу описанному Т. Сингером (T. Singer) [Singer, 1974]. Активность комплекса IV оценивали по скорости восстановления цитохрома С, регистрируемой по изменению оптической плотности при 550 нм [Wikström, Casey, 1985]. Содержание восстановленного глутатиона и суммарное содержание сульфгидрильных групп определяли методом Элмана ($\epsilon_{412}=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [Ellman, 1959]. Содержания смешанных дисульфидов глутатиона с белками (GSSP) определяли методом Р. Росси (R. Rossi) [Rossi et al., 1995]. Активность глутатионтрансферазы в митохондриях определяли по методу В. Г. Хабига (W. H. Habig) [Habig, Pabst, Jacoby, 1974]. Концентрацию стабильных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBARS), определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{532}=1,56*10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [Stocks, Dormandy, 1971]. Степень токсического повреждения клеток печени оценивали по активности ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) и содержанию билирубина в плазме крови [Pappas, 1986]. АЛТ и АСТ определяли, используя наборы реагентов («LaChema», Чехия). Содержание билирубина определяли, используя тест-системы для определения общего и свободного билирубина («Анализ Плюс», Беларусь). Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури (Jasco V-650, Япония) [Lowry et al., 1951]. Ультраструктуру митохондрий оценивали с

помощью электронного микроскопа (JEM-1011, Япония) при увеличении 10000–40000. Эксперименты *in vitro* проводили на 8–10 животных. Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием пакета программ StatSoftStatistica 6.0. Результаты представляли в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего или медианы \pm верхний и нижний квартили. Достоверность межгрупповых различий оценивали, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением теста Тьюки или теста Краскела-Уоллиса.

Термодинамические параметры комплексов включения полифенолов с β -CD и HP- β -CD

В данной разделе рассмотрены стехиометрия и термодинамические параметры формирования комплексов включения кверцетин-HP- β -CD, сезамин-HP- β -CD, нарингенин-HP- β -CD. Константы ассоциации комплексов, рассчитанные методом фазовых диаграмм (рисунок 1), равны $301 \pm 47 \text{ M}^{-1}$, $3611 \pm 312 \text{ M}^{-1}$, $746 \pm 101 \text{ M}^{-1}$ для комплексов кверцетин- β -CD, сезамин- β -CD, нарингенин- β -CD соответственно. Значения K_s в случае кверцетина и нарингенина свидетельствуют об относительно слабом взаимодействии между молекулами. K_s комплекса сезамин- β -CD характеризует образование стабильной супрамолекулярной структуры. Константы ассоциации комплексов полифенолов с HP- β -CD составляют $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$, $2507 \pm 368 \text{ M}^{-1}$, $1073 \pm 112 \text{ M}^{-1}$ для кверцетин-HP- β -CD, сезамин-HP- β -CD, нарингенин-HP- β -CD соответственно, что свидетельствует о формировании стабильных комплексов включения.



А) фазовая растворимость кверцетина в водном растворе HP- β -CD при 377 нм;
 Б) спектры поглощения кверцетина в отсутствие (1) и в присутствии (2-5) HP- β -CD
 Рисунок 1. – Зависимость растворимости кверцетина от концентрации HP- β -CD

Различия в значении констант комплексообразования в случае β -CD и HP- β -CD можно объяснить вовлечением гидроксипропильных радикалов в формирование дополнительных стабильных связей между полифенолами и циклодекстринами. Стехиометрия комплексов составляет 1:1 для кверцетина и нарингенина и 1:1/1:2 для сезамина. Образование комплексов с β -CD характеризуется увеличением растворимости кверцетина, сезамина, нарингенина в 5, 30 и 12 раз соответственно, при концентрации β -CD 16 мМ. Растворимость данных полифенолов в присутствии 16 мМ HP- β -CD возрастает в 50, 60 и 30 раз соответственно. Квантово-химическое моделирование показывает, что формирование комплекса включения изменяет геометрию молекул «гостя» и «хозяина», увеличивая размеры внутренней полости β -CD, расположение колец в молекуле кверцетина и ее полярность. Формирование комплекса включения кверцетина и HP- β -CD приводит к существенным изменениям интенсивности и частот колебаний функциональных групп компонентов по сравнению с ИР-спектром физической смеси (рисунок 2), что позволяет проследить структурные изменения кверцетина и образование новых связей в комплексе включения.



Рисунок 2. – Фурье-ИК спектр смеси HP- β -CD и кверцетина (сплошная линия) и комплекса включения кверцетин-HP- β -CD (прерывистая линия)

Формирование комплексов включения полифенолов с HP- β -CD характеризуется высокими отрицательными значениями изменения энтальпии (ΔH): равными в случае кверцетина (-4984 ± 242 кал \times моль $^{-1}$), сезамина – ($-117 \pm 1,7$ кал \times моль $^{-1}$), нарингенина – (-4147 ± 346 кал \times моль $^{-1}$). Отрицательные значения ΔH подразумевают, что в процессе взаимодействия компонентов комплекса преобладают водородные связи и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Поскольку рассчитанные нами значения изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) отрицательны и равны (-6357 ± 314 кал \times моль $^{-1}$), (-5102 ± 412 кал \times моль $^{-1}$), (-4386 ± 321 кал \times моль $^{-1}$) для кверцетина, сезамина,

нарингенина, можно сделать вывод о том, что процессы комплексообразования полифенолов с HP- β -CD протекают экзотермически и самопроизвольно. Положительное по знаку изменение энтропии (ΔS), но небольшое по величине: $4,6 \pm 0,8$ кал \times моль $^{-1}\times$ K $^{-1}$, $14,3 \pm 1,01$ кал \times моль $^{-1}\times$ K $^{-1}$, $3,2 \pm 0,4$ кал \times моль $^{-1}\times$ K $^{-1}$ для кверцетина, сезамина, нарингенина соответственно, связано с перемещением молекул полифенола из водной фазы и высвобождением молекул воды из относительно связанного состояния в организованных структурах (гидратных оболочках молекул полифенола и циклодекстрина). Как энтальпийный, так и энтропийный эффекты вносят вклад в процесс комплексообразования с преобладанием энтальпийного эффекта.

Функциональное состояние митохондрий печени крыс при окислительном воздействии *in vitro*.

Протекторный эффект кверцетина и его комплекса включения с HP- β -CD

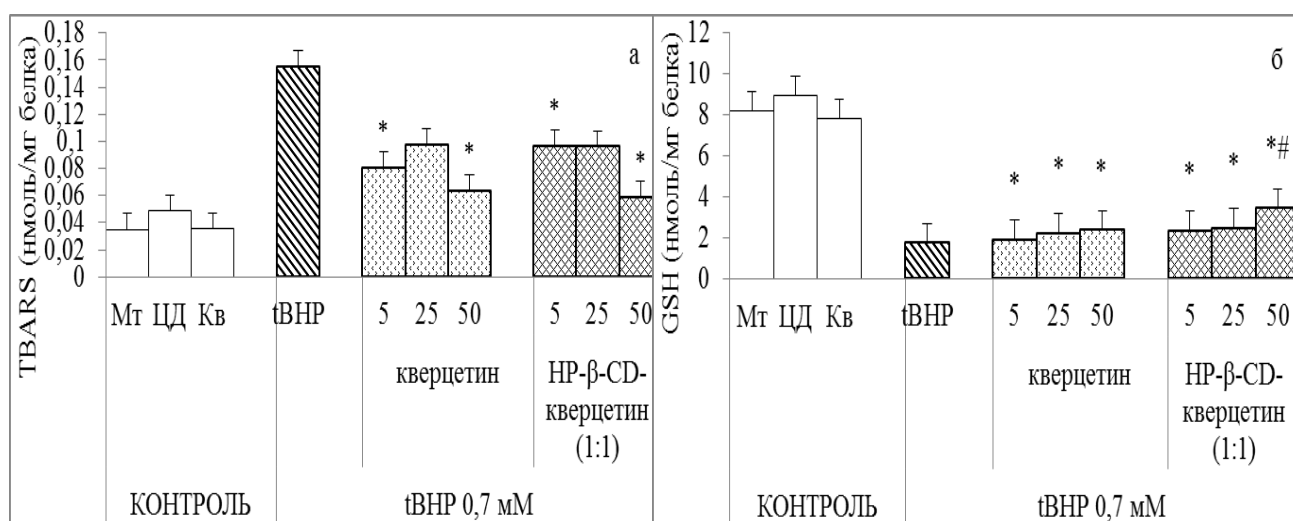
В настоящем разделе мы оценили митохондриальные эффекты флавоноида кверцетина и комплекса кверцетин-HP- β -CD, протекторный эффект флавоноида и его комплекса при воздействии двух окислительных агентов, действующих по различным механизмам: tBHP, генерирующего в митохондриях ряд радикальных продуктов и хлорирующего окислителя HOCl.

Кверцетин ингибирует респираторную активность митохондрий печени крыс, вызывает мягкое разобщение процессов дыхания и фосфорилирования и стимулирует Ca $^{2+}$ -индуцированный процесс формирования MPTP (25–50 мкМ). Этим можно объяснить известный проапоптотический эффект кверцетина [Choi, Chee, Lee, 2003]. Комплекс кверцетин-HP- β -CD оказал менее выраженный ингибирующий эффект по сравнению с кверцетином, что может быть связано со снижением липофильности флавоноида в структуре комплекса.

При моделировании окислительного стресса воздействием на митохондрии органического гидропероксида, аналога гидроперекисей липидов (tBHP), наблюдали уменьшение уровня GSH, возрастание уровня смешанных глутатион-белковых дисульфидов и TBARS, нарушение процессов окислительного фосфорилирования, что происходит в результате повреждения компонентов дыхательной цепи митохондрий и инактивации ферментов ЦТК, снижения мембранного потенциала. Предварительное внесение в суспензию митохондрий кверцетина и комплекса кверцетин-HP- β -CD эффективно предотвращает накопление TBARS. Одновременно, присутствие кверцетина (50 мкМ) частично предотвращает окисление восстановленного глутатиона: в присутствии кверцетина содержание GSH возросло на 25 %, а в присутствии комплекса кверцетин-HP- β -CD (50 мкМ) – на 45 %, комплекс кверцетин-HP- β -CD оказался более эффективным антиоксидантом в матриксе митохондрий по сравнению с мембраной (рисунок 3). Кверцетин в

значительной степени предотвращает окисление свободных, в первую очередь, гликогенных аминокислот в матриксе митохондрий. Можно предположить, что известный гепатопротекторный эффект кверцетина связан с антиоксидантными и радикал-скэвенджерными свойствами флавоноида [Kostyuk, et al., 2011] и специфическим предотвращением митохондриальных повреждений.

В наших экспериментах обработка митохондрий хлорноватистой кислотой (НОСl) *in vitro* существенно нарушает их функциональную активность. Предварительное внесение кверцетина и его комплекса с НР-β-CD (10–50 мкМ) предотвращают ингибирование дыхательной активности митохондрий, диссипацию мембранного потенциала при НОСl-индуцированном повреждении.



* - $p < 0,05$ при сравнении с образцами, инкубируемым с tBHP (700 мкМ)

в отсутствие антиоксидантов;

- $p < 0,05$ при сравнении с образцами, инкубируемым с tBHP (700 мкМ)

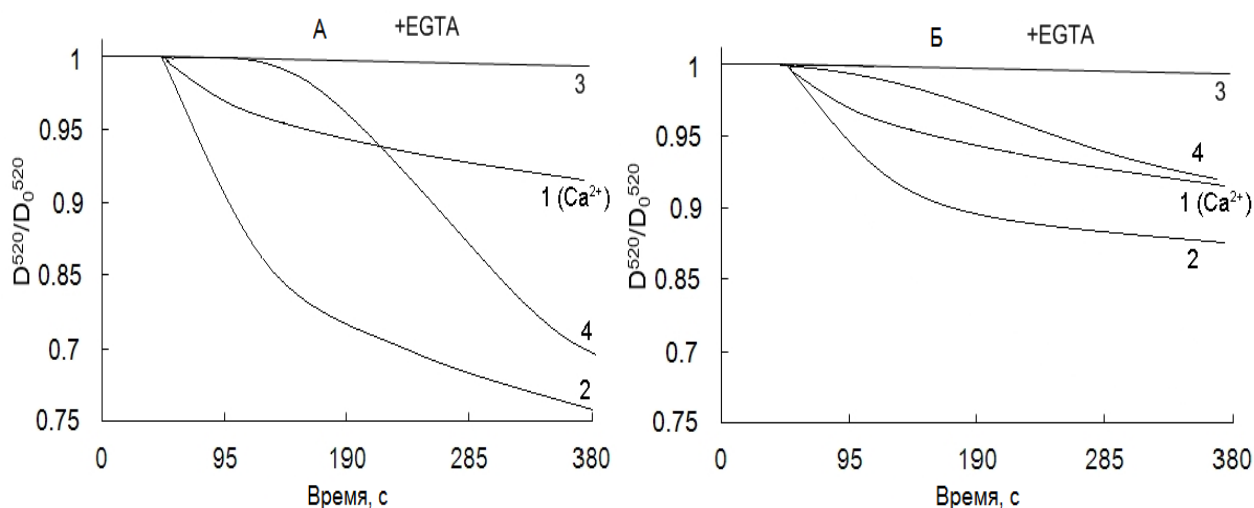
в присутствии кверцетина

Рисунок 3. – Содержание продуктов перекисного окисления липидов (А) и содержание GSH (Б) в митохондриях печени крыс при окислительном воздействии tBHP (700 мкМ)

Кверцетин и комплекс кверцетин-НР-β-CD дозозависимо восстанавливают активности α-кетоглутаратдегидрогеназы и SDH, содержание GSH при окислительном воздействии НОСl. При этом комплекс кверцетин-НР-β-CD (10–25 мкМ) более эффективно увеличивал активность α-кетоглутаратдегидрогеназы по сравнению с самим флавоноидом. Очевидно, включение флавоноида в комплекс повышает его доступность для водорастворимых компонентов матрикса.

Эффект ферутина/комплекса ферутинин-HP-β-CD на мембранный потенциал и формирование пор высокой проницаемости в митохондриях печени крыс

В настоящем разделе рассмотрены механизмы митохондриальных эффектов терпеноида ферутина/комплекса ферутинин-HP-β-CD на процесс МРТР. Впервые показано, что ферутинин действует как электрогенный Ca^{2+} -транспортер в изолированных митохондриях печени крыс. Ферутинин/комплекс ферутинин-HP-β-CD дозозависимо (10–60 мкМ) индуцируют диссипацию мембранного потенциала митохондрий в отсутствие и присутствии ионов кальция, что частично ингибируется этиленгликолем тетрауксусной кислоты (EGTA) и выраженно стимулируют Ca^{2+} -индуцируемое образование МРТР (рисунок 4).



а) репрезентативные кривые Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий в присутствии ферутина; б) репрезентативные кривые Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий в присутствии комплекса ферутинин-HP-β-CD
 1 – 200 мкМ Ca^{2+} ; 2 – 200 мкМ Ca^{2+} + 12,5 мкМ ферутина/комплекса; 3 – 1 мкМ рутения красного + 200 мкМ Ca^{2+} ; 4 – 1 мкМ рутения красного + 200 мкМ Ca^{2+} + 12,5 мкМ ферутина/комплекса; (субстрат глутамат/малат (+ EGTA))

Рисунок 4. – Ингибирование Ca^{2+} -индуцированного формирования МРТР рутением красным в присутствии и отсутствие ферутина/комплекса ферутинин-HP-β-CD в среде, содержащей EGTA

Циклоспорин А (CsA) значительно ингибирует Ca^{2+} -индуцированную деполяризацию мембран, что указывает на участие МРТР в диссипации митохондриального мембранного потенциала. Для оценки роли митохондриального кальциевого унипортера (MCU) в эффектах ферутина/комплекса на митохондриальную мембрану мы использовали рутений красный (специфический ингибитор MCU). В наших экспериментах

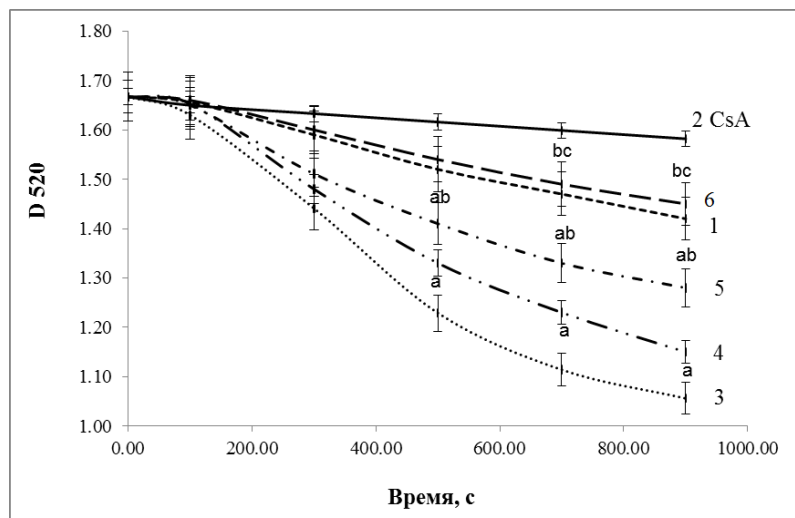
рутений красный предотвращал Ca^{2+} -индуцируемый процесс МРТР и деполяризацию мембран, но не влиял на эффект ферутина/комплекса на Ca^{2+} -индуцированное образование МРТР и деполяризацию митохондриальной мембраны (рисунок 4). Можно предположить, что открытие МРТР – основной механизм индуцированной ферутином деполяризации митохондриальной мембраны. Ферутинин способствует Ca^{2+} -индуцированной апоптотической гибели клеток [Dubis et al., 2015], что может быть связано со стимуляцией процесса МРТР. Стимуляция ферутином МРТР в отсутствие ионов Ca^{2+} указывает на участие ферутина в транспорте одновалентных катионов. Комплекс ферутинин-НР- β -CD оказывает значительно меньший эффект на проницаемость митохондриальных мембран, по сравнению с ферутином, что, вероятно, связано со снижением липофильности ферутина в комплексе включения.

Окислительное фосфорилирование, система антиоксидантной защиты митохондрий печени крыс при алкогольном поражении.

Гепатопротекторный эффект полифенолов кожуры плодов клюквы и комплекса полифенолы-НР- β -CD

Учитывая полученные нами ранее доказательства антиоксидантной и цитопротекторной активности растительных полифенолов, в данном разделе мы оценили гепатопротекторный потенциал экстракта полифенолов кожуры плодов клюквы (экстракт полифенолов экзокарпия ягод *Vaccinium macrocarpon*) и их комплексов с НР- β -CD при алкогольном поражении печени у крыс. Известно, что выраженный гепатопротекторный эффект растительных полифенолов при алкогольном и неалкогольном поражении печени обусловлен, главным образом, снижением синтеза триацилглицеролов, увеличением скорости окисления жирных кислот и уменьшением окислительных процессов и воспаления – основных факторов, ответственных за повреждение печени [Aguirre et al., 2014]. В полученном нами экстракте полифенолов кожуры плодов клюквы методом масс-спектрометрии мы идентифицировали 39 фенольных соединений: флавонолы, флаван-3-олы, проантоцианидины, антоцианы, гидроксibenзойные и гидроксикоричные кислоты. Развитие токсического повреждения печени у крыс, получавших в течение 8 недель этанол, сопровождалось постоянным окислительным стрессом и выраженным нарушением функционального состояния митохондрий, снижением коэффициентов дыхательного контроля (ДК) и фосфорилирования (АДФ/О), увеличением митохондриальной генерации супероксид-анионных радикалов, ингибированием комплексов I, II и IV ЭТЦ и разобщением процессов дыхания и окислительного фосфорилирования. Точно так же чувствительность митохондрий печени к Ca^{2+} -индуцированному формированию МРТР была

значительно выше у крыс, получавших этанол, вероятно, из-за нарушения структуры и стабильности митохондриальной мембраны (рисунок 5).



1 – контрольная группа, 2 – CsA, 3 – группа АСГ, 4 – группа АСГ + НР-β-CD, 5 – группа АСГ + полифенолы, 6 – группа АСГ + комплекс полифенолы-НР-β-CD; a – относительно контрольной группы (p<0,05); b – относительно группы АСГ (p<0,05); c – относительно группы АСГ+полифенолы кожуры плодов клюквы (p<0,05)
Рисунок 5. – Ca²⁺-индуцированное набухание митохондрий печени крыс (МРТР)

Существенным представляется восстановление функциональной активности митохондрий, снижение чувствительности к Ca²⁺-индуцированному процессу формирования МРТР при введении полифенолов кожуры плодов клюквы крысам, как и комплекса полифенолы-НР-β-CD на фоне АСГ. Полифенолы клюквы/комплекс оказывали выраженный гепатопротекторный эффект: мы обнаружили уменьшение содержания триглицеролов, уменьшение активности маркерных ферментов АСТ и АЛТ, а также уменьшение содержания общего билирубина в сыворотке крови крыс, получавших алкоголь. Комплекс полифенолы-НР-β-CD продемонстрировал более выраженный протекторный эффект на фоне алкогольной интоксикации по сравнению с полифенолами, эффективно нормализуя такие параметры, как активность SDH, цитохром-с-оксидазы, уровень TBARS. Наши результаты показывают, что терапия растительными полифенолами при алкогольном воздействии снижает уровень окислительного повреждения в печени крыс и предотвращает развитие митохондриальной дисфункции. Эффект комплекса полифенолов с НР-β-CD связан с повышением биодоступности липофильных полифенолов в комплексе включения.

Моделирование окислительного повреждения воздействием tВНР (700 мкМ) на суспензию митохондрий *in vitro* приводило к значительному увеличению количества измененных органелл с электронно-светлым набухшим

матриксом и уменьшенным числом крист, характеризующихся сниженным биоэнергетическим и биосинтетическим потенциалом. Экстракт полифенолов кожуры плодов клюквы (25 мкг/мл) поддерживает нативное состояние митохондрий, что связано с антиоксидантными свойствами растительного экстракта. Одним из механизмов положительного воздействия растительных полифенолов является возможность их взаимодействия с липидным бислоем, изменения физических свойств мембран и предотвращения повреждений структуры и функций митохондрий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Растворимость кверцетина в водной среде возрастает более чем в 5 раз в присутствии 16 мМ β -CD и более чем в 50 раз в присутствии 16 мМ HP- β -CD за счет формирования комплекса включения. Значения констант ассоциации комплексов равны: кверцетин- β -CD – $301 \pm 47 \text{ M}^{-1}$, кверцетин-HP- β -CD – $3275 \pm 448 \text{ M}^{-1}$, сезамин- β -CD – $3611 \pm 312 \text{ M}^{-1}$, сезамин-HP- β -CD – $2507 \pm 368 \text{ M}^{-1}$, нарингенин- β -CD – $746 \pm 101 \text{ M}^{-1}$, нарингенин-HP- β -CD – $1073 \pm 112 \text{ M}^{-1}$. Стехиометрия образования комплексов включения полифенолов с β -циклодекстринами равна 1:1 в случае кверцетина и нарингенина, и – 1:1 и 1:2 в случае сезамина. Включение кверцетина в супрамолекулярный комплекс сопровождается изменением его геометрии и молекулярных свойств (дипольный момент, теплота образования), увеличением размеров полости β -циклодекстринов и связано с формированием водородных связей [1; 9; 10; 18–20; 22].

2. Кверцетин (25 мкМ) стимулирует Ca^{2+} -зависимое формирование пор высокой проницаемости митохондрий печени крыс, снижает скорость потребления кислорода, сопряженного с фосфорилированием, и частично разобщает процессы дыхания и окислительного фосфорилирования. Комплекс кверцетин-HP- β -CD в меньшей степени влияет на респираторную активность митохондрий печени крыс, что связано со снижением липофильности кверцетина в комплексе включения [2; 5; 9; 12; 22].

3. Кверцетин и комплекс кверцетин-HP- β -CD (50 мкМ) дозозависимо ингибировали перекисное окисление липидов мембран и в меньшей степени предотвращали окисление восстановленного глутатиона и образование GSSP при моделировании окислительного повреждения изолированных митохондрий печени крыс внесением tBHP (700 мкМ). Кверцетин (25–50 мкМ) эффективно предотвращал окисление свободных аминокислот в матриксе митохондрий *in vitro*. При экспонировании митохондрий HOCl (150 мкМ) кверцетин и комплекс кверцетин-HP- β -CD предотвращали нарушение респираторной активности митохондрий, восстанавливая активности

α -кетоглутаратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и содержание восстановленного GSH [3; 5; 6; 8; 9; 13–17; 21; 23; 25].

4. Ферутинин/комплекс ферутинин-HP- β -CD (20–60 мкМ) индуцируют диссипацию митохондриального мембранного потенциала, формирование МРТР в присутствии Ca^{2+} , что частично ингибируется EGTA и циклоспорином А и связано со стимуляцией Ca^{2+} -проницаемости мембраны и вовлечением транспорта одновалентных катионов. Рутений красный (ингибитор кальциевого унипортера) полностью ингибирует Ca^{2+} -индуцируемые диссипацию мембранного потенциала и процесс формирования МРТР, но не влияет на стимуляцию ферутинином/комплексом ферутинин-HP- β -CD Ca^{2+} -индуцируемых процессов в митохондриях. Комплекс ферутинин-HP- β -CD, ограничивающий растворимость ионофора в липидном бислое, оказывает менее выраженные эффекты по сравнению с ферутинином [2; 4].

5. Экстракт полифенолов кожуры плодов клюквы содержит кверцетин (9 производных), рутин, катехин (4 производных), мирицетин (3 производных), антоцианы (4 типа), процианидины А- и В-типов (димеры и тримеры), гидроксibenзойные (5 представителей) и гидроксикоричные кислоты (5 производных). Суммарное содержание полифенолов в экстракте – 480 мг/100 г. Введение экстракта полифенолов кожуры плодов клюквы (4 мг полифенолов/кг в день)/комплекса полифенолы-HP- β -CD крысам на фоне хронической интоксикации этанолом (4 г/кг, 8 недель) уменьшают содержание триглицеролов, общего билирубина и активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови, препятствуют нарушению функциональной активности митохондрий печени, генерации супероксиданион-радикалов, восстанавливают активность комплексов I и II ЭТЦ и резистентность митохондрий к Ca^{2+} -индуцированному открытию МРТР. Комплекс полифенолы-HP- β -CD оказывает более выраженный гепатопротекторный эффект по сравнению с экстрактом, что связано с улучшением биодоступности полифенолов в комплексе. Полифенолы плодов клюквы (25 мкг/мл) предотвращают повреждение ультраструктуры митохондрий при окислительном воздействии tVHP (700 мкМ) *in vitro*: снижают количество митохондрий с электронно-светлым набухшим матриксом и увеличивают количество крист [3; 7; 11; 24].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Результаты исследования цитопротекторных свойств и антиоксидантной эффективности флавоноида кверцетина и его супрамолекулярного комплекса с циклодекстрином при моделировании окислительных процессов в митохондриях печени продемонстрировали способность комплексов включения корректировать дисфункцию митохондрий, что может быть использовано при разработке эффективного способа регуляции функциональной активности

митохондрий полифенолами. Предложенный способ регуляции функциональной активности митохондрий используется в научно-исследовательском и учебном процессах УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы» (акт внедрения от 12.09.2017 № 03-8/132).

Полифенолы кожуры плодов клюквы демонстрируют выраженный гепатопротекторный эффект при хроническом токсическом воздействии алкоголя у крыс. Комплекс полифенолов кожуры плодов клюквы демонстрирует цитопротекторные и антиоксидантные свойства и рекомендуется в качестве средства коррекции метаболизма при поражении печени. Предложенный способ коррекции метаболизма митохондрий печени крыс используется в научно-исследовательском и учебном процессах УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы» (акт внедрения от 11.01.2019 № 03-8/005) и научно-исследовательской работе республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (акт внедрения от 18.11.2019).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в научных рецензируемых журналах

1. Лучиц, Т. В. Циклодекстрины как контейнеры для направленной доставки лекарственных средств / Т. В. Лучиц // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 147–157.

2. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca^{2+} ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents / N. G. Golovach, V. T. Cheshchevik, E. A. Lapshina, Т. V. Пыич, I. B. Zavodnik // Journal of Membrane Biology. – 2017. – Vol. 250, № 2. – P. 225–236.

3. Ультраструктура митохондрий и содержание в них свободных аминокислот при моделировании *in vitro* окислительного стресса воздействием трет-бутилгидропероксида: протекторное действие флавоноидов клюквы / И. Б. Заводник, Р. И. Кравчук, Т. В. Ильич, А. А. Глазев, Е. А. Лапшина, О. Б. Островская, Л. И. Нефёдов, С. Д. Клиса, М. Н. Курбат, И. И. Климович // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 112–124.

4. Ferutinin induces membrane depolarization, permeability transition pore formation, and respiration uncoupling in isolated rat liver mitochondria by stimulation of Ca^{2+} -permeability / Т. Пыич, O. Charishnikova, S. Sekowski, M. Zamaraeva, V. Cheshchevik, I. Dremza, N. Cheshchevik, L. Kiryukhina, E. Lapshina, I. Zavodnik // Journal of Membrane Biology. – 2018. – Vol. 251, № 4. – P. 563–572.

5. Quercetin and its complex with cyclodextrin against oxidative damage of mitochondria and erythrocytes: experimental results in vitro and quantum-chemical calculations biophysics / **T. V. Pyich**, A. G. Veiko, E. A. Lapshina, I. B. Zavodnik // Biophysics. – 2018. – Vol. 63, № 4. – P. 537–548.

6. Квантово-химическое моделирование электронной структуры кверцетина и ингибирование кверцетином и комплексом кверцетин-гидроксипропил- β -циклодекстрин перекисного окисления липидов в митохондриях и эритроцитах крыс / А. Г. Вейко, **Т. В. Ильич**, Е. А. Лапшина, В. У. Буко, И. Б. Заводник // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біялагічных навук. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 500–512.

7. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) peel polyphenol-rich extract attenuates rat liver mitochondria impairments in alcoholic steatohepatitis in vivo and after oxidative treatment in vitro / I. Zavodnik, V. Buko, O. Lukivskaya, E. Lapshina, **T. Pyich**, E. Belonovskaya, S. Kirko, E. Naruta, I. Kuzmitskaya, G. Budryn, D. Zyzelevicz, J. Orach, A. Zakrzaska, L. Kiryukhina // Journal of Functional Foods. – 2019. – Vol. 57. – P. 83–94.

8. Морфологические изменения митохондрий и клеток млекопитающих, индуцируемые гипохлорной кислотой / И. Б. Заводник, Р. И. Кравчук, **Т. В. Ильич**, Е. А. Лапшина, А. Г. Вейко, Л. Б. Заводник, О. Б. Островская, М. Н. Курбат // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біялагічных навук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 156–168.

9. **Ильич, Т. В.** Ферменты цикла Кребса и респираторная активность митохондрий печени крыс в присутствии кверцетина и комплекса кверцетин-гидроксипропил- β -циклодекстрин / **Т. В. Ильич** // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2019. – Т. 9, № 3. – С. 152–160.

10. Термодинамические параметры комплексообразования полифенолов с β -циклодекстринами / **Т. В. Ильич**, Е. А. Лапшина, Б. Палеч, А. Степняк, А. Г. Вейко, И. Б. Заводник // Новости медико-биологических наук. – 2019. – Т. 19, № 4. – С. 38–42.

Материалы научных конференций

11. Растительные полифенолы как регуляторы биоэнергетической функции клеток: гепатопротекторные и антиоксидантные эффекты [Электронный ресурс] / И. Б. Заводник, В. Т. Чещевик, Е. А. Лапшина, И. К. Дремза, Н. Г. Головач, **Т. В. Лучиц**, Т. А. Коваленя, Р. И. Кравчук, М. Н. Курбат // Кислород и свободные радикалы : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 19–20 мая 2016 г. / отв. ред. В. В. Зинчук. – Гродно, 2016. – С. 61–63. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

12. Индуцируемый ионами кальция процесс формирования митохондриальных пор высокой проницаемости: энергетика, стехиометрия,

роль окислительного стресса / Н. Г. Головач, В. Т. Чещевик, Л. Б. Заводник, Е. А. Лапшина, **Т. В. Лучиц**, И. Б. Заводник // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; 12 съезда Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 28–30 июня 2016 г. : в 2 ч. / редкол.: Н. Д. Волоотовский [и др.]. – Минск, 2016. – С. 198–200.

13. Окислительные процессы в клетках линии В14 индуцируемые органическим гидропероксидом / Л. Б. Заводник, **Т. В. Лучиц**, И. И. Климович, В. П. Страпко // Современные проблемы биохимии : сб. науч. ст. к I белорусскому биохимическому конгрессу, Гродно, 5–6 июля 2016 г. / НАН Беларуси, Ин-т биохимии; редкол.: Л. И. Надольник (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2016. – С. 98–102.

14. Вейко, А. Г. Антиоксидантная активность флаваноидов *Punica granatum* L. и *Populus* sp. при моделировании окислительного стресса / А. Г. Вейко, **Т. В. Ильич** // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : сб. материалов III конф. молодых ученых с междунар. участием, Гродно, 11–12 мая 2017 г. / отв. ред. Л. И. Надольник. – Гродно, 2017. – С. 35–37.

15. **Ильич, Т. В.** Антиоксидантная активность кверцетина и комплекса влечения кверцетин-гидроксипропил- β -циклодекстрин при окислительном повреждении митохондрий печени крыс *in vitro* / **Т. В. Ильич**, А. Г. Вейко, Т. А. Коваленя // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : сб. материалов III конф. молодых ученых с междунар. участием, Гродно, 11–12 мая 2017 г. / отв. ред. Л. И. Надольник. – Гродно, 2017 – С. 66–68.

16. Вейко, А. Г. Структура и антиоксидантная активность кверцетина / А. Г. Вейко, **Т. В. Ильич**, М. М. Л. Мохаммед // Метаболический синдром: эксперимент, клиника, терапия : сб. науч. ст. III Междунар. симпозиума, Гродно, 20–22 сент. 2017 г. / НАН Беларуси, Ин-т биохимии ; редкол.: Л. И. Надольник (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 223–228.

17. Растительные полифенолы и их комплексы с β -циклодекстрином предотвращают окислительные повреждения митохондрий и эритроцитов: теоретические и экспериментальные исследования [Электронный ресурс] / И. Б. Заводник, Е. А. Лапшина, **Т. В. Ильич**, А. Г. Вейко, Т. А. Коваленя, В. У. Буко // Кислород и свободные радикалы : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 15–16 мая 2018 г. / отв. ред. В. В. Зинчук. – Гродно, 2018. – С. 61–63. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

18. Badanie oddziaływan 4-fenylofenolu z α -cyclodeksrtyna w wodzie / E. Erdenebayar, A. Stepniak, B. Palecz, **Т. Пыич**, I. Zаводник // II Doktoranckie sympozjum nanotechnologii NanoMat : materialy konfer., Lodz, 21–22 czerwca 2018 r. / Uniwersytetu Lodzkiego, Wydział chemii. – Lodz, 2018. – S. 63.

19. The complexation of sesamin with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin / **T. Piyich**, E. Erdenebayar, A. Stepniak, B. Palecz, I. Zavodnik // II Doktoranckie sympozjum nanotechnologii NanoMat : materialy konfer., Lodz, 21–22 czerwca 2018 r. / Uniwersytetu Lodzkiego, Wydzial chemii – Lodz, 2018. – S. 64.

20. UV- and IR-spectroscopy of the inclusive complexes of quercetin and β -cyclodextrin / T. A. Kavalenia, **T. V. Piyich**, I. B. Zavodnik, A. Stepniak, B. Palecz // VII Lodzkie sympozjum Doktorantov Chemii : materialy konfer., Lodz, 9–10 maja 2019 r. – Lodz, 2019. – S. 104.

21. Вейко, А. Г. Протекторный эффект кверцетина в суспензии митохондрий и эритроцитов [Электронный ресурс] / А. Г. Вейко, **Т. В. Ильич** // Актуальные проблемы биохимии : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гродно, 31 мая 2019 г. / редкол.: В. В. Лелевич [и др.]. – Гродно, 2019. – С. 68–72. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

22. Функциональная активность митохондрий печени в присутствии кверцетина и комплекса кверцетин-HP- β -CD [Электронный ресурс] // **Т. В. Ильич**, Т. А. Коваленя, Е. А. Лапшина, И. Б. Заводник // Актуальные проблемы биохимии : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гродно, 31 мая 2019 г. / редкол.: В. В. Лелевич [и др.]. – Гродно, 2019. – С. 121–125. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

Тезисы докладов

23. Вейко, А. Г. Антиоксидантные и цитопротекторные свойства флавоноидов при моделировании окислительных повреждений эритроцитов *in vitro* / А. Г. Вейко, **Т. В. Ильич** // Биологическая осень 2017 : тез. докл. Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 9 ноябр. 2017 г. / БГУ, биологический факультет ; редкол.: В. В. Лысак (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – С. 94–96.

24. Plant polyphenols regulate functions of isolated rat liver mitochondria and prevent mitochondria impairments *in vivo* and *in vitro* [Electronic resource] / I. Zavodnik, E. Lapshina, V. Buko, **T. Piyich**, M. Zamaraeva, L. Zavodnik, I. Dremza, A. Karevskiy // Current environmental ISSUES 2019, Bialystok, 24–26 sept., 2019 r. / University of Bialystok, Faculty of Biology and Chemistry; B. Godlewska-Zylkiewicz [et al.]. – Bialystok, 2019. – P. 29. – 1 Electron. opt. disk (CD-ROM).

25. **Ильич, Т. В.** Регуляция кверцетином и комплексом кверцетин-гидроксипропил- β -циклодекстрин респираторной активности митохондрий печени крыс при окислительном воздействии [Электронный ресурс] / **Т. В. Ильич** // Свободные радикалы в химии жизни : тез. докл. III Междунар. конф., Минск, 10–11 окт. 2019 г. / БГУ ; редкол.: О. И. Шадыро (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2019. – С. 18. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

РЭЗІЮМЭ

Ільіч Таццяна Віктараўна

**Рэгуляцыя функцыянальнай актыўнасці мітахондрыяў печані пацукоў
комплексамі ўключэння поліфенолаў з β -цыкладэкстрынамі**

Ключавыя словы: поліфенолы, цыкладэкстрыны, комплексы ўключэння, мітахондры, антыакісляльная сістэма, поры высокай пранікальнасці.

Мэта працы: высвятліць фізіка-хімічныя ўласцівасці, рэгуляторную і антыакісляльную актыўнасці поліфенолаў і іх комплексаў з β -цыкладэкстрынамі і механізмы карэкцыі імі функцыянальнага стану мітахондрыяў печані пацукоў у мадэлях *in vitro* і *in vivo*.

Метады даследавання: УФ-, ІЧ-спектраскапія, ізатэрмічная мікракаларыметрыя, мас-спектраметрыя, ВЭВХ, флуарыметрыя, паляраграфія, электронная мікраскапія.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Вызначаны сцехіаметрыя, энтальпія, энтрапія, свабодная энергія Гібса комплексаў ўключэння поліфенолаў з цыкладэкстрынамі. Паказана, што поліфенолы і іх комплексы з НР- β -CD здольныя рэгуляваць рэспіраторную актыўнасць мітахондрыяў печані пацукоў, аднаўляць актыўнасці α -кетаглутаратдэгідрогеназы і сукцынатдэгідрогеназы, інгібіраваць перакіснае акісленне ліпідаў і прадухіляць акісленне адноўленага глутатыёна, свабодных амінакіслот матрыкса мітахондрыяў, фарміраваць МРТР у мадэлях акісляльнага пашкоджання мітахондрыяў печані пацукоў *in vitro*.

Пры мадэляванні алкагольнага пашкоджання печані вызначана, што экстракт поліфенолаў лупіны пладоў журавін/комплекс поліфенолы-НР- β -CD прадухіляюць алкагольнае пашкоджанне печані: памяншаюць ўтрыманне трыгліцэролаў, актыўнасці АЛТ і АСТ, перашкаджаюць парушэнню функцыянальнай актыўнасці мітахондрыяў печані, нармалізуючы параметры дыхання і аднаўляючы актыўнасці комплексаў I і II ЭТЛ і рэзістэнтнасць мітахондрыяў да Ca^{2+} -індуцыраванага адкрыцця МРТР.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: прадэманстравана магчымасць выкарыстання кверцэціну і яго комплексу з цыкладэкстрынам дзеля падтрымкі функцыянальнага стану мітахондрыяў і прадухілення мітахондрыяльнай дысфункцыі пры акісляльным стрэсе. Комплекс поліфенолаў лупіны пладоў журавін дэманструе цытапротэктарныя і антыакісляльныя ўласцівасці і рэкамендуецца ў якасці сродку карэкцыі метабалізму пры пашкоджанні печані.

Вобласць ужывання: біяхімія, біяфізіка, медыцына.

РЕЗЮМЕ**Ильич Татьяна Викторовна****Регуляция функциональной активности митохондрий печени крыс комплексами включения полифенолов с β -циклодекстринами**

Ключевые слова: полифенолы, циклодекстрины, комплексы включения, митохондрии, антиоксидантная система, поры высокой проницаемости.

Цель работы: выявить физико-химические свойства, регуляторную и антиоксидантную активности полифенолов и их комплексов с β -циклодекстринами и механизмы коррекции ими функциональной активности митохондрий печени крыс в моделях *in vitro* и *in vivo*.

Методы исследования: УФ-, ИК-спектроскопия, изотермическая микрокалориметрия, масс-спектрометрия, ВЭЖХ, флуориметрия, полярография, электронная микроскопия.

Полученные результаты и их новизна. Определены стехиометрия, энтальпия, энтропия, свободная энергия Гиббса комплексов включения полифенолов с циклодекстринами. Показано, что полифенолы и их комплексы с HP- β -CD способны регулировать респираторную активность митохондрий печени крыс, восстанавливая активности α -кетоглутаратдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы, ингибируя перекисное окисление липидов и предотвращая окисление восстановленного глутатиона, свободных аминокислот в матриксе митохондрий, формирование МРТР при моделировании окислительного повреждения митохондрий печени крыс *in vitro*.

При моделировании алкогольного поражения печени установлено, что экстракт полифенолов кожуры плодов клюквы/комплекс полифенолы-HP- β -CD предотвращают алкогольное повреждение печени, уменьшая содержание триглицеролов, активность АЛТ и АСТ, препятствуют нарушению функциональной активности митохондрий печени, нормализуя параметры дыхания и восстанавливая активность комплексов I и II ЭТЦ и резистентность митохондрий к Ca^{2+} -индуцированному открытию МРТР.

Рекомендации по использованию: продемонстрирована возможность использования кверцетина и его комплекса с циклодекстрином для поддержания функционального состояния митохондрий и предотвращения митохондриальной дисфункции при окислительном стрессе. Комплекс полифенолов кожуры плодов клюквы демонстрирует цитопротекторные и антиоксидантные свойства и рекомендуется в качестве средства коррекции метаболизма при поражении печени.

Область применения: биохимия, биофизика, медицина.

SUMMARY
Ilyich Tatsiana

Regulation of the functional activity of rat liver mitochondria with inclusion complexes of polyphenols with β -cyclodextrins

Key words: polyphenols, cyclodextrins, inclusion complexes, mitochondria, antioxidant system, high permeability pores.

Objective: to elucidate the physicochemical properties, as well as regulatory and antioxidant activities of polyphenols and their complexes with β -cyclodextrins and their correction mechanisms for the functional activity of rat liver mitochondria in *in vitro* and *in vivo* models.

Research methods: spectrophotometry, isothermal microcalorimetry, mass spectrometry, UHLC, IR spectrometry, fluorimetry, polarography, electron microscopy.

The results obtained and their novelty. The stoichiometry, enthalpy, entropy, Gibbs free energy of inclusion complexes of polyphenols with cyclodextrins have been determined. It was shown that polyphenols and their complexes with HP- β -CD, when modeling the oxidative damage of mitochondria in rat liver *in vitro*, inhibited lipid peroxidation and prevented oxidation of reduced glutathione, free amino acids in the mitochondrial matrix, regulated the respiratory activity of rat liver mitochondria, restoring the activity of α -ketoglutarate dehydrogenases and succinate dehydrogenases. While modeling alcoholic liver damage, it was found the cranberry fruit polyphenol extract/extract-HP- β -CD complex prevented alcohol damage to the liver: reduced triglycerols, ALT and AST, inhibited the functional activity of liver mitochondria, and the generation of superoxidion radicals in mitochondria, normalized respiration parameters, as well as restored the activity of complexes I and II of ETC and the resistance of mitochondria to the Ca^{2+} -induced opening of MPTP.

Recommendations for use: The possibility of using quercetin and its complex with cyclodextrin to maintain the functional state of mitochondria and prevent mitochondrial dysfunction during oxidative stress has been demonstrated. The complex of polyphenols of the peel of cranberry fruits demonstrated cytoprotective and antioxidant properties and is recommended as a means of metabolic correction in liver damage.

Scope: biochemistry, biophysics, medicine.