

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ФЛАВОНОИДЫ ФИЗЕТИН, АПИГЕНИН, КЕМПФЕРОЛ, НАРИНГЕНИН, НАРИНГИН РЕГУЛИРУЮТ РЕСПИРАТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ И МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ И ИНГИБИРУЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС

А.И. Савко, Т.В. Ильич*, А.Г. Вейко, Т.А. Коваленя, Е.А. Лапина, И.Б. Заводник

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
230009, Беларусь, Гродно, бульвар Ленинского Комсомола, 5; *эл. почта: Illich_TV@grsu.by

Флавоноиды — вторичные метаболиты растений — представляют наиболее распространённую гетерогенную группу фитохимических веществ. Целью настоящей работы было сравнительное исследование антиоксидантной активности и регуляторных свойств ряда флавоноидов, принадлежащих различным классам, — физетина, апигенина, кемпферола, нарингенина, нарингина, — используя в качестве объектов воздействия митохондрии печени и эритроциты крыс. Физетин, апигенин, кемпферол, нарингенин, нарингин в диапазоне концентраций 2,5–25 мкМ дозозависимо предотвращали окислительные повреждения эритроцитов: накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окисление глутатиона (GSH), индуцируемое 700 мкМ *трет*-бутилгидропероксидом. Значения IC_{50} , соответствующие концентрации флавоноида, ингибирующего на 50% процесс ПОЛ в мембранах эритроцитов, составили $3,9 \pm 0,8$ мкМ в случае физетина, $6,5 \pm 1,6$ мкМ в случае кемпферола, $8,1 \pm 2,1$ мкМ в случае апигенина, $37,8 \pm 4,4$ мкМ в случае нарингенина и $64,7 \pm 8,6$ мкМ в случае нарингина. Антиоксидантный эффект флавоноидов был значительно выше в мембранных структурах по сравнению с цитоплазмой клеток. Все исследованные флавоноиды (10–50 мкМ) эффективно ингибировали дыхательную активность изолированных митохондрий печени крыс и, за исключением кемпферола, стимулировали Ca^{2+} -индуцируемую диссипацию мембранного потенциала митохондрий. Циклоспорин А и рутений красный ингибировали стимулируемую флавоноидами Ca^{2+} -зависимую деполяризацию мембран, что указывает на участие в эффекте флавоноидов митохондриального кальциевого унипортера и процесса открытия пор высокой проницаемости. Флавоноиды как редокс-активные соединения, обладающие антиоксидантными свойствами, способны регулировать митохондриальный потенциал и респираторную активность, предотвращать митохондриальный окислительный стресс. Их можно рассматривать в качестве эффективных фармакологических агентов или нутрицевтиков.

Ключевые слова: флавоноиды; митохондрии; эритроциты; глутатион; окислительный стресс

DOI: 10.18097/PBMC20236905281

ВВЕДЕНИЕ

Флавоноиды — соединения, принадлежащие к обширному семейству полифенолов, — являются вторичными метаболитами растений. Они представляют наиболее распространённую группу фитохимических веществ и имеют важное значение как компоненты диеты человека [1, 2]. Эти соединения обладают высокой физиологической и фармакологической активностью как в растениях, так и в тканях животных и человека [3]. В растениях флавоноиды обеспечивают защиту от УФ-излучения, вирусов и других фитопатогенов, окислительного стресса, участвуют в пигментации плодов и цветов, выступают сигнальными молекулами (аллелохимические вещества) [4].

Флавоноиды имеют общий углеродный скелет C6–C3–C6 (бензо-γ-пирон); широкий спектр структурного разнообразия флавоноидов связан с различной степенью гидроксирования, метоксилирования, гликозилирования или глюкуронылирования этих соединений [4]. Это способствует большому разнообразию биологических свойств. На сегодняшний день идентифицировано более 6000 соединений, принадлежащих к семейству флавоноидов [4]. Молекула флавона содержит 15 атомов углерода и

состоит из пары ароматических колец (А и В), которые связаны между собой оксигенированным гетероциклическим С-кольцом. В свою очередь флавоноиды разделены на подгруппы в зависимости от типа гетероциклов: флавонолы, флавоны, флаваноны, изофлавоны, флаванолы, антоцианы. Основная биологическая активность флавоноидов связана с их антирадикальными/антиоксидантными свойствами (редокс-потенциалом), которые обеспечиваются системой сопряжённых колец и гидроксильных групп [5]. Флавоноиды также способны активировать ферменты детоксикации свободных радикалов, такие как NAD(P)H-хинон оксидоредуктазы, глутатион-S-трансферазы или УДФ-глюкуронозилтрансферазы [6], взаимодействовать с белками и мембранными структурами, регулировать многие сигнальные каскады, как AMPK, MAPK, NF-κB-зависимые пути [7] и устранять токсичность ионов металлов, участвующих в окислительно-восстановительных превращениях. Известно, что флавоноиды взаимодействуют с Nrf2-Keap 1 каскадом — основным сигнальным каскадом, регулирующим цитопротекторный ответ при окислительном стрессе [8]. Рекомендуемое потребление флавоноидов составляет 50 мг/день в расчёте на изофлавоны [9].

Многочисленные экспериментальные и эпидемиологические исследования демонстрируют благоприятные эффекты флавоноидов при инфекционных (бактериальных и вирусных), нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, возрастных заболеваниях, диабете, раке и ряде других заболеваний [10] при отсутствии побочных эффектов.

В то же время существуют сложные взаимоотношения между потреблением растительных полифенолов и клеточным гомеостазом, включая метаболическое, окислительно-восстановительное равновесие, протеостаз, воспалительные реакции [11].

Несмотря на многочисленные исследования, механизмы биохимических, физиологических, фармакологических эффектов флавоноидов требуют дальнейшего изучения, что необходимо для выяснения молекулярной основы успешного применения флавоноидов в качестве фармакологических агентов и нутрицевтиков. Наши исследования взаимодействия ряда флавоноидов (кверцетин, нарингенин и катехин) с клеточными и искусственными мембранами и показали, что флавоноиды эффективно ингибируют перекисное окисление липидов (ПОЛ), повышают чувствительность к Ca^{2+} -индуцированному открытию пор высокой проницаемости в изолированных митохондриях, изменяют упорядоченность упаковки и степень гидратации липосомальных мембран на различной глубине липидного бислоя [12].

Целью настоящей работы было сравнительное исследование антиоксидантной активности и регуляторных свойств ряда флавоноидов, принадлежащих различным подгруппам: флавонолов физетина (fisetin, 7,3',4'-flavon-3-ol) и кемпферола (kaempferol, 3,4',5,7-tetrahydroxyflavone), флавона апигенина (apigenin, 4',5,7-trihydroxyflavone), флаванона нарингенина (naringenin, 4',5,7-trihydroxyflavan-4-one) и его гликозида нарингина (4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside) (рис. 1). В качестве объектов воздействия флавоноидов использовали митохондрии печени и эритроциты крыс.

МЕТОДИКА

Реактивы и материалы

При выполнении работы были использованы следующие реактивы: нарингенин, физетин, кемпферол, апигенин, нарингин, сахароза, *трет*-бутилгидропероксид (tBHP), динатриевая соль янтарной кислоты (сукцинат), трис(гидроксиметил)аминометан (трис-HCl), этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ЭГТА), аденозиндифосфат (ADP), сафранин О, карбонилцианид *n*-трифторметокси-фенилгидразон (FCCP), тиобарбитуровая кислота (ТБК), трихлоруксусная кислота (ТХУ), циклоспорин А (CsA), рутений красный (RuR) ("Sigma-Aldrich Biochemie

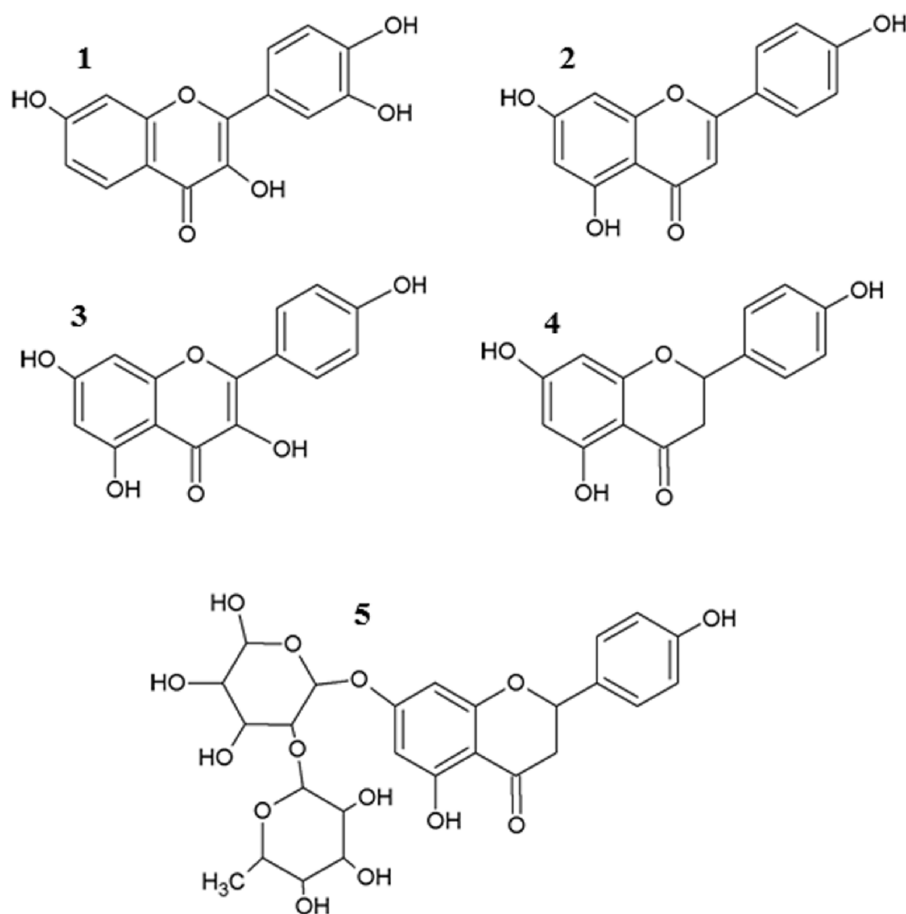


Рисунок 1. Химические структуры флавоноидов. 1 – физетин, 2 – апигенин, 3 – кемпферол, 4 – нарингенин, 5 – нарингин.

Gmbh”, Германия или “Sigma-Aldrich”, США); 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота) (реактив Элмана) (“Chem-Impex International Inc.”, США), хлорид калия, хлорид натрия, хлорид кальция, соляная кислота, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, ортофосфорная кислота, этанол, диметилсульфоксид (ДМСО) (“РЕАХИМ”, Россия). Растворы были приготовлены на воде, очищенной в системе Milli-Q Direct (“Merck KGaA”, Германия).

Подготовка материала для анализа

Использовали клинически здоровых (Санитарно-гигиеническое заключение №33-48/500 от 28.09.2017 г., Центр гигиены и эпидемиологии Первомайского района г. Минск) аутбредных крыс линии Wistar массой 120–140 г разведения вивария Института физиологии НАН Беларуси. После декапитации крыс пункцией абдоминальной аорты получали образцы артериальной крови и стабилизировали их гирудином (50 мкг/мл). Эритроциты крыс трижды отмывали в изотоническом фосфатном буфере (PBS), содержащем 145 mM NaCl, 1,9 mM NaH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4 в соотношении 1:4. После декапитации крыс печень извлекали и помещали в буфер, содержащий 0,02 M Трис-HCl, 0,25 M сахарозу, pH 7,2, охлажденный до 4°C. Все манипуляции проводили на льду при температуре 0–4°C. После промывания от крови орган осушали фильтровальной бумагой, взвешивали, навеску печени массой 6 г измельчали ножницами и помещали в гомогенизатор (тефлон-стекло) вместе с пятикратным объемом буфера и гомогенизировали со скоростью 600 об/мин в течение 1 мин. Фракцию клеточных ядер отделяли центрифугированием при 4°C при 600 g (центрифуга Hermle Z 32 HK, “Hermle Labortechnik GmbH”, Германия) в течение 10 мин. Митохондрии из полученного супернатанта осаждали центрифугированием при 4°C при 8500 g (центрифуга Hermle Z 32 HK, “Hermle Labortechnik GmbH”) в течение 10 мин, затем дважды промывали в среде выделения при 4°C и ресуспендировали в среде выделения таким образом, чтобы содержание белка составило 35–40 мг/мл [13]. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [14].

В работе использовали свежеприготовленные 5 mM растворы физетина, апигенина, кемпферола, нарингенина, нарингина в этаноле. Преинкубации эритроцитов и митохондрий с флавоноидами проводили в течение 5 мин при температуре 25°C. CsA, RuR готовили в день эксперимента в метаноле и воде соответственно. В используемых концентрациях растворители не оказывали значимых эффектов на регистрируемые параметры. CsA (1 мкМ), RuR (1 мкМ) вносили в пробу непосредственно перед началом измерения.

Определение биохимических параметров

Определение содержания восстановленного глутатиона (GSH) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах крыс

Окислительный стресс в эритроцитах крыс индуцировали внесением в суспензию эритроцитов

(5% гематокрит в PBS, pH 7,4) водорастворимого аналога гидроперекисей липидов tBHP. Эритроциты инкубировали в присутствии 700 мкМ tBHP в течение 1 ч в случае регистрации процесса ПОЛ и 100 мкМ tBHP в течение 5 мин в случае регистрации окисления GSH (27°C). После воздействия окислителя эритроциты обрабатывали 20% раствором ТХУ. Пробы центрифугировали при 2500 g в течение 5 мин (центрифуга Hermle Z 32 HK (ротатор для микропробирок), “Hermle Labortechnik GmbH”), к 1 мл супернатанта добавляли 1,2 мл 0,5 M фосфатного буфера (pH 7,8) и 0,05 мл (5 mM) раствора реактива Элмана, определение GSH проводили по величине оптической плотности образующегося продукта при длине волны 412 нм [15]. Концентрацию стабильных продуктов перекисного окисления мембранных липидов в эритроцитах крыс (малонового диальдегида и некоторых минорных низкомолекулярных диальдегидов), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ образовавшегося хромогена — аддукта малонового диальдегида и ТБК [16]. Эритроциты осаждали внесением 20% ТХУ. Осадок отделяли центрифугированием при 2500 g в течение 5 мин (центрифуга Hermle Z 32 HK (ротатор для микропробирок), “Hermle Labortechnik GmbH”), к 1 мл супернатанта добавляли 0,25 мл 1% раствора ТБК в 0,05 M NaOH. Пробы помещали на кипящую водяную баню на 20 мин для образования окрашенного аддукта и определяли его оптическую плотность, используя спектрофотометр Jasco V-650 (Япония). IC_{50} определяли как концентрацию флавоноида, при которой ингибирование ПОЛ составляло 50%.

Определение мембранного потенциала и респираторной активности митохондрий печени крыс

Мембранный потенциал митохондрий регистрировали спектрофлуориметрически с помощью положительно заряженного липофильного флуоресцентного зонда сафранина О в среде, содержащей 125 mM KCl, 10 mM Трис-HCl, 50 mM сахарозы, 2,5 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgSO_4 , pH 7,5 [17]. Потенциал-зависимое накопление зонда в митохондриях приводит к тушению флуоресценции. Флуоресценцию сафранина О возбуждали при длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ нм}$ и регистрировали при длине волны $\lambda_{\text{em}} = 586 \text{ нм}$, используя спектрофлуориметр Solar CM 2203 (Беларусь). Среда содержала зонд сафранин О (8 мкМ), субстрат дыхания — сукцинат (5 mM). Реакцию запускали внесением в среду митохондрий печени крыс (0,3 мг/мл), в конце измерения вносили разобщитель FCCP (0,5 мкМ). Значения потенциала митохондриальной мембраны (mV) определяли с помощью калибровочного графика, представляющего зависимость интенсивности флуоресценции сафранина О от значения потенциала, изменяющегося в зависимости от немитохондриальной концентрации ионов калия и рассчитанного по уравнению Нернста [17].

Респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс регистрировали полярографически при 26°C, используя электрод Кларка, встроенный в герметическую термостатируемую ячейку объемом 2 мл; измерения проводили с помощью полярографа Hansatech Oxytherm+Chamber (Великобритания), как описано нами ранее [18]. Калибровку полярографического электрода осуществляли, используя сульфит натрия. В ячейку со средой, содержащей 0,05 М сахарозы, 0,01 М трис-HCl, 0,125 М KCl, 2,5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 , pH 7,2, вносили необходимый объем (≈ 50 мкл) митохондриальной суспензии для получения концентрации белка 1 мг/мл, после чего вносили субстрат дыхания (сукцинат — 5 мМ) и ADP (180 мкМ).

Статистический анализ

Нормальность распределения данных определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты представляли в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием критерия Тьюки. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel 2013 и прикладных программ STATISTICA 10.0. Статистически значимыми принимали различия между значениями параметров в группах при $p < 0,05$.

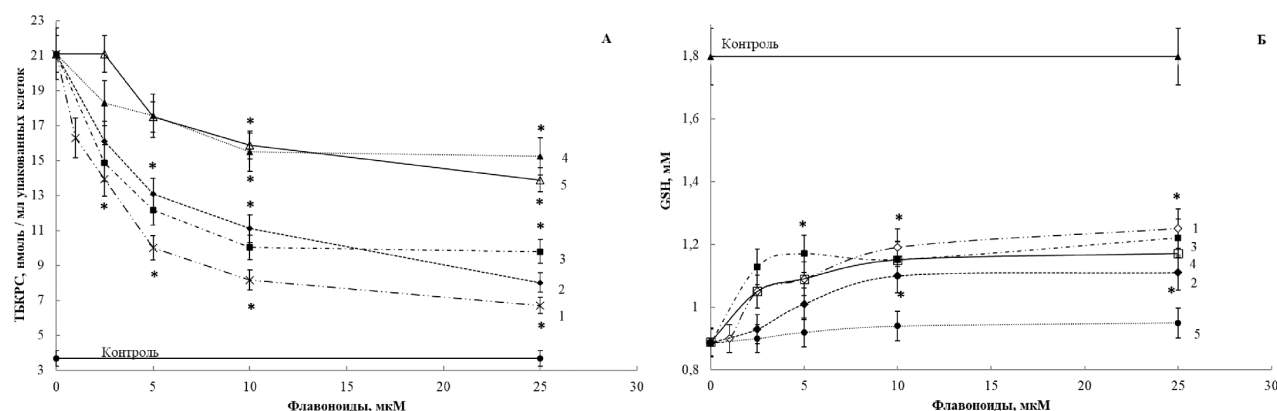
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антиоксидантный эффект флавоноидов *in vitro* при окислительном повреждении эритроцитов крыс

В соответствии с многочисленными наблюдениями [18, 23], взаимодействие tBHP с эритроцитами крыс сопровождалось интенсивным перекисным окислением мембранных липидов и истощением внутриэритроцитарного GSH (рис. 2). Флавоноиды, физетин, апигенин, кемпферол, нарингенин, нарингин в диапазоне концентраций 2,5–25 мкМ дозозависимо предотвращали окислительные повреждения эритроцитов:

накопление ТБКРС и окисление GSH, индуцируемое экспонированием окислителем (tBHP) (рис. 2). Оцененные нами значения IC_{50} , соответствующие концентрации флавоноида, ингибирующего на 50% процесс ПОЛ в мембранах эритроцитов, составляли $3,9 \pm 0,8$ мкМ в случае физетина, $6,5 \pm 1,6$ мкМ в случае кемпферола, $8,1 \pm 2,1$ мкМ в случае апигенина, $37,8 \pm 4,4$ мкМ в случае нарингенина и $64,7 \pm 8,6$ мкМ в случае нарингина ($p < 0,05$). Эффективность ингибирования накопления ТБКРС в эритроцитах крыс уменьшалась в ряду физетин > апигенин = кемпферол > нарингенин > нарингин (различия в ряду статистически достоверны, $p < 0,05$). В случае ингибирования окисления внутриэритроцитарного глутатиона эффективности физетина, кемпферола, апигенина и нарингенина достоверно не отличались, гликозид нарингин не оказал протекторного эффекта. Следует отметить, что физетин и кемпферол содержат четыре ОН-группы, выступающие донорами атома водорода в реакциях восстановления, в то время как остальные флавоноиды содержат по три ОН-группы. Ранее, используя эффективность восстановления стабильного радикала DPPH, для ряда флавоноидов был показан следующий порядок возрастания активности удаления свободных радикалов: кверцетин > катехин > литеолин > таксифолин > кемпферол > апигенин. Это коррелирует с изменением величины энергии удаления атома водорода гидроксильных групп полифенолов [19]. В предыдущем эксперименте мы также показали, что флавоноиды кверцетин и катехин, но не нарингенин, эффективно восстанавливали стабильный DPPH радикал в бесклеточной системе; при этом все исследуемые флавоноиды предотвращали лизис эритроцитов, индуцируемый хлорноватистой кислотой [20].

Антиоксидантная активность флавоноидов в эритроцитарной мембране (ингибирование образования продуктов ПОЛ) была значительно выше по сравнению с эффективностью в клеточной цитоплазме (предотвращение окисления глутатиона) (рис. 2), что отражает высокую липофильность исследуемых флавоноидов [21].



Благодаря большому количеству гидроксильных групп и конъюгированных π -орбиталей, флавоноиды выступают эффективными донорами электрона или атома водорода [22]. При этом возможно существование флавоноидов как в виде нейтральной молекулы, так и в виде фенолят-иона. Ранее нами была рассмотрена электронная структура молекул ряда флавоноидов, например, кверцетина и его семихинон-радикала, оценена их антиоксидантная активность и показано, что активные электронные орбитали (HOMO и LUMO) кверцетина и его семихинон-радикала делокализованы по всем фенольным кольцам, что обеспечивает стабилизацию радикала [23].

Регуляция флавоноидами респираторной активности и мембранного потенциала изолированных митохондрий печени крыс

Исследуемые флавоноиды в концентрации 10–50 мкМ эффективно ингибировали респираторную активность митохондрий печени крыс: в присутствии возрастающих концентраций флавоноидов скорость субстрат-зависимого потребления кислорода V_2 возрастала, в то время как скорость ADP-стимулируемого потребления кислорода V_3 выражено уменьшалась, коэффициенты дыхательного контроля V_3/V_2 и ADP/O также уменьшались (рис. 3А–Д), свидетельствуя о нарушении сопряжения дыхания и фосфорилирования. Наиболее эффективно

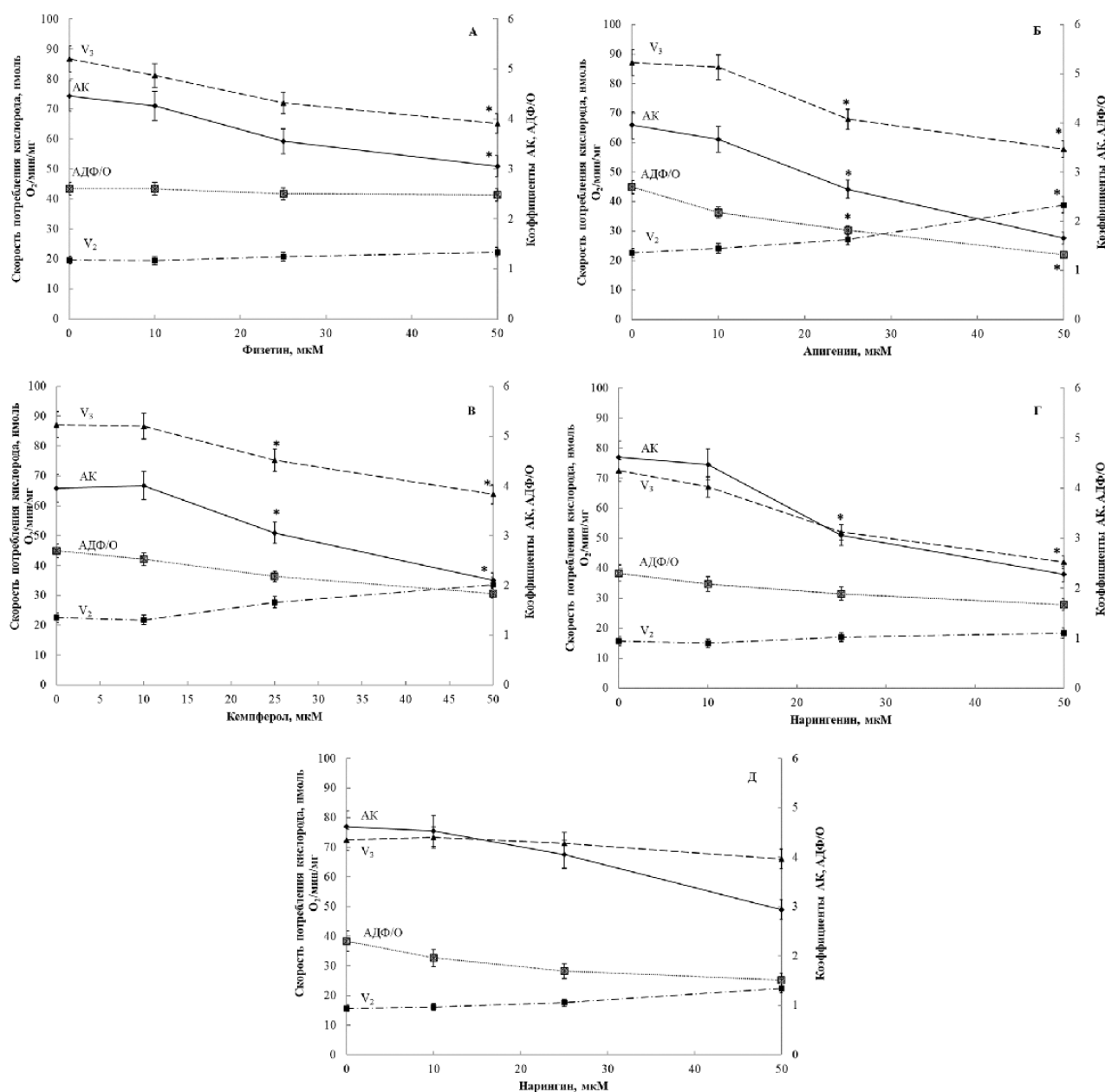


Рисунок 3. Респираторная активность изолированных митохондрий печени крыс (1 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии флавоноидов, физетина (А), апигенина (Б), кемпферола (В), нарингенина (Г), нарингина (Д) в среде, содержащей 0,05 М сахарозы, 0,01 М трис-HCl, 0,125 М KCl, 2,5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, pH 7,2, 26°C, в присутствии 5 мМ сукцината как субстрата и 180 мкМ ADP. * – $p < 0,05$ при сравнении со значениями в отсутствие флавоноидов.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ФЛАВОНОИДОВ

влиял на скорость потребления кислорода митохондриями апигенин, эффект нарингенина, физетина и кемпферола менее выражен. Мы не обнаружили достоверного изменения скорости субстрат-зависимого потребления кислорода и коэффициента ADP/O в присутствии физетина и нарингенина и коэффициента ADP/O в присутствии кемпферола, гликозид нарингин не оказал значимого эффекта на респираторные параметры (рис. 3А-Д).

Одним из следствий ингибирования реакции окислительного фосфорилирования в митохондриях будет диссипация мембранного потенциала.

Митохондриальный мембранный потенциал, генерируемый при работе электрон-транспортной цепи митохондрий, определяет функциональное состояние этих клеточных органелл. В нашем эксперименте апигенин, нарингенин (10–50 мкМ), но не кемпферол, физетин и гликозид нарингин, в среде, не содержащей ЭГТА, дозозависимо вызывали диссипацию мембранного потенциала энергизованных сукцинатом митохондрий (рис. 4А-Д).

Как мы предполагаем, флавоноиды индуцируют частичное разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях

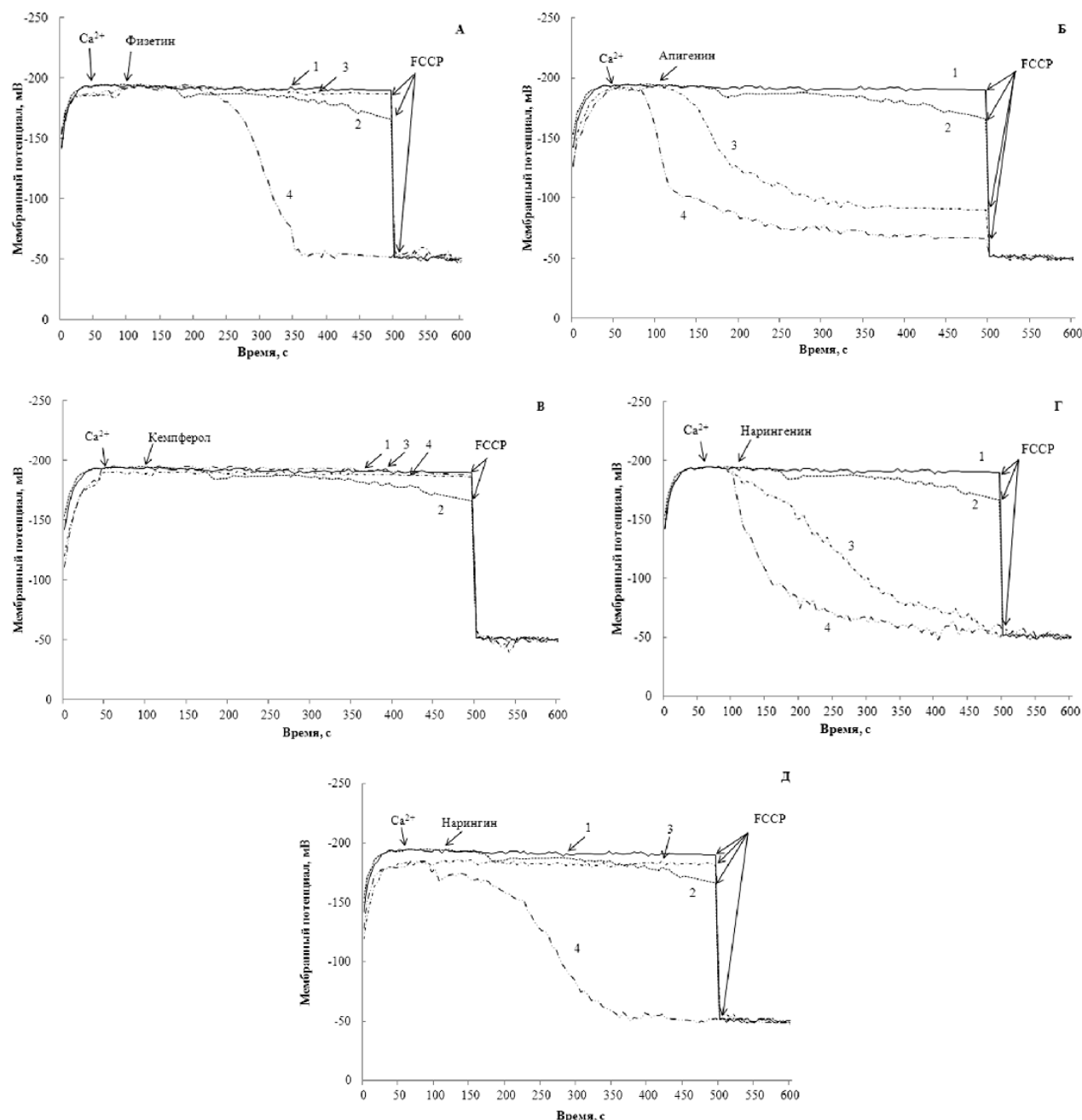


Рисунок 4. Репрезентативные кинетические кривые диссипации мембранного потенциала в митохондриях печени крыс, регистрируемые по изменению интенсивности флуоресценции зонда сафранина О, эффект физетина (А), апигенина (Б), кемпферола (В), нарингенина (Г), нарингина (Д). В суспензию митохондрий (0,5 мг белка/мл) в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,02 М Трис-НСl и 0,001 М K_2HPO_4 , pH 7,4, в присутствии 5 мМ сукцината, вносили ионы Ca^{2+} (30 мкМ) и флавоноиды (50 мкМ). 1 – контроль, 2 – Ca^{2+} (30 мкМ), 3 – флавоноид (50 мкМ), 4 – Ca^{2+} (30 мкМ) + флавоноид (50 мкМ).

печени крыс, что сопровождается снижением митохондриального мембранного потенциала и нарушением синтеза АТФ. Такое мягкое разобщение, в свою очередь, приводит к уменьшению продукции активных форм кислорода компонентами электрон-транспортной цепи митохондрий, что предотвращает развитие окислительного стресса, демонстрируя цитопротекторный эффект флавоноидов.

Внесение ионов Ca^{2+} (30 мкМ) приводит к деполяризации мембран митохондрий (рис. 4А-Д). Апигенин, физетин, нарингенин и нарингин, но не кемпферол, стимулировали деполяризующий эффект ионов Ca^{2+} , возможно, выступая в качестве кальциевых ионофоров. В случае оценки совместного эффекта ионов Ca^{2+} и флавоноидов, первоначально в суспензию митохондрий вносили ионы Ca^{2+} , через 100 с вносили флавоноиды. Ранее нами было показано, что флавоноиды, кверцетин, катехин, нарингенин (10–50 мкМ), повышали чувствительность митохондрий к Ca^{2+} -зависимому процессу формирования пор высокой проницаемости [12].

RuR — селективный ингибитор митохондриального кальциевого унипортера — предотвращал стимулируемую нарингенином Ca^{2+} -индуцируемую диссипацию мембранного потенциала, что можно рассматривать как указание на эффект флавоноидов на кальцевый унипортер, обеспечивающий перенос ионов кальция в митохондрии (данные не представлены). Подобным образом, ранее в нашем эксперименте RuR эффективно предотвращал Ca^{2+} -индуцируемое открытие митохондриальных пор высокой проницаемости в присутствии флавоноидов, что мы объясняем активацией флавоноидами Ca^{2+} -унипортера. Стимулирование митохондриального Ca^{2+} -унипортера рядом флавоноидов было показано ранее [24]. В то же время можно предположить протонотормный эффект липофильных флавоноидов, представляющих собой слабые кислоты, во внутренней митохондриальной мембране, что будет приводить к нарушению сопряжения дыхания и фосфорилирования и деполяризации мембран.

Циклоспорин А — ингибитор открытия пор высокой проницаемости — также полностью предотвращал стимулируемую флавоноидами Ca^{2+} -зависимую деполяризацию мембран, что свидетельствует о процессе открытия пор высокой проницаемости как причине деполяризации митохондриальной мембраны.

Способность флавоноидов модулировать митохондриальный биогенез, регулировать формирование пор высокой проницаемости, генерацию активных форм кислорода в митохондриях, мембранный потенциал, активность электрон-транспортной цепи, кальцевый гомеостаз митохондрий представляет существенный интерес [25, 26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флавоноиды, вторичные метаболиты растений, представляют наиболее распространённую группу фитохимических веществ и обладают высокой

биохимической и фармакологической активностью. В нашем эксперименте ряд флавоноидов в диапазоне концентраций 2,5–25 мкМ дозозависимо предотвращал окислительные повреждения эритроцитов и митохондрий печени крыс: накопление продуктов ПОЛ и окисление глутатиона, индуцируемое инкубацией клеток и митохондрий с окислителем tBHP. Эффективность ингибирования накопления ТБКРС в эритроцитах уменьшалась в ряду физетин > кемпферол = апигенин > нарингенин > нарингин. Антиоксидантная эффективность флавоноидов в мембранных структурах была значительно выше по сравнению с эффективностью в цитоплазме клеток и матриксе митохондрий. Исследуемые флавоноиды (10–50 мкМ), за исключением гликозида нарингина, эффективно ингибировали респираторную активность митохондрий печени крыс, нарушая сопряжение дыхания и фосфорилирования. Одновременно, апигенин, нарингенин (50 мкМ), но не физетин, кемпферол и гликозид нарингин, в среде, не содержащей ЭГТА, вызывали диссипацию мембранного потенциала энергизованных сукцинатом митохондрий. Апигенин, физетин, нарингенин и нарингин стимулировали также деполяризующий эффект ионов Ca^{2+} в митохондриальной мембране. Можно предположить, что липофильные флавоноиды, представляющие собой слабые кислоты, оказывают протонотормный эффект во внутренней митохондриальной мембране. Это будет приводить к нарушению сопряжения дыхания и фосфорилирования. Нельзя исключить и стимулирование флавоноидами кальцевого унипортера. Флавоноиды как редокс-активные соединения, обладающие выраженными антиоксидантными свойствами, способны регулировать процесс открытия митохондриальной поры (MPTP), митохондриальный потенциал и респираторную активность, предотвращать митохондриальный окислительный стресс. Их можно рассматривать в качестве фармакологических агентов или нутрицевтиков, используемых для коррекции митохондриальной дисфункции и связанных с ней заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках проектов “Коррекция биоэнергетической функции митохондрий сердца крыс: механизм кардиопротекторного действия природных полифенолов и хинонов” Государственной программы научных исследований “Конвергенция-2025” Республики Беларусь на 2021–2025 годы, № ГР 20211784 и “Механизмы коррекции природными соединениями и их наноструктурированными комплексами метаболических нарушений в тканях печени и сердца крыс при диабете и интоксикации” Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № M23КИ-014 (совместно с Научным фондом Китая).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными были выполнены с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным, одобрены Этическим комитетом Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (протокол от 12.03.2021 г. № 29/21) и соответствовали ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами” (Межгосударственный стандарт, введён в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. (2013) Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина (под ред. Е.И. Маевского) Synchrobook, Пушино, 310 с. [Tarakhovsky Y.S., Kim Y.A., Abdrazilov B.S., Muzafarov E.N. (2013) Flavonoids: Biochemistry, Biophysics, Medicine (Mayevsky E.I., ed.) Synchrobook, Pushchino, 310 p.]
2. Червяковский Е.М., Курченко В.П., Костюк В.А. (2009) Физиологическое и терапевтическое значение окислительных процессов протекающих с участием флавоноидов в растительных и животных организмах. Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем, 4(1), 9-26. [Chervyakovskiy E.M., Kurchenko V.P., Kostyuk V.A. (2009) Physiological and therapeutic significance of oxidative processes occurring with the participation of flavonoids in plant and animal organisms. Trudy BGU. Physiological, Biochemical and Molecular Basis for the Functioning of Biosystems, 4(1), 9-26.]
3. Sinha D. (2019) Pharmacological importance of polyphenols: A review. Int. Res. J. Pharm., 10(9), 13-23. DOI: 10.7897/2230-8407.1009255
4. Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. Plant Science, 196, 67-76. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014
5. Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011) The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. Food Chem., 125(2), 288-306.
6. Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A. (2001) Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr., 74(4), 418-425.
7. Xu D., Hu M.-J., Wang Y.-Q., Cui Y.-L. (2019) Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. Molecules, 24(6), 1123. DOI: 10.3390/molecules24061123
8. Safe S., Jayaraman A., Chapkin R.S., Howard M., Mohankumar K., Shrestha R. (2021) Flavonoids: Structure-function and mechanisms of action and opportunities for drug development. Toxicol. Res., 37, 147-162. DOI: 10.1007/s43188-020-00080-z
9. Mennen L.I., Walker R., Bennetau-Pelissero C., Scalbert A. (2005) Risks and safety of polyphenol consumption. Am. J. Clin. Nutr., 81(suppl), 326S-329S.
10. Kumar S., Pandey A.K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. Sci. World J., 2013, 162750. DOI: 10.1155/2013/162750
11. Leri M., Scuto M., Ontario M.L., Calabrese V., Calabrese E.J., Bucciantini M., Stefani M. (2020) Healthy effects of plant polyphenols: Molecular mechanisms. Int. J. Mol. Sci., 21, 1250. DOI: 10.3390/ijms21041250
12. Veiko A.G., Sekowski S., Lapshina E.A., Wilczewska A.Z., Markiewicz K.H., Zamaraeva M., Zhao H.-C., Zavodnik I.B. (2020) Flavonoids modulate liposomal membrane structure, regulate mitochondrial membrane permeability and prevent erythrocyte oxidative damage. Biochim. Biophys. Acta Biomembr., 1862(11), 183442. DOI: 10.1016/j.bbamem.2020.183442
13. Johnson D., Lardy H.A. (1967) Isolation of liver and kidney mitochondria. Meth. Enzymol., 10, 94-101.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
15. Ellman G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82(1), 70-77.
16. Stocks J., Dormandy T.L. (1971) The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Br. J. Haematol., 20(1), 95-111.
17. Akerman K.E.O., Wikström M.K.F. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett., 6(2), 191-197.
18. Drenza I.K., Lapshina E.A., Kujawa J., Zavodnik I.B. (2006) Oxygen-related processes in red blood cells exposed to tert-butyl hydroperoxide. Redox Report, 11(4), 185-192.
19. Zhu L., Chen J., Tan J., Liu X., Wang B. (2017) Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures. Molecules, 22, 195. DOI: 10.3390/molecules22030195
20. Veiko A.G., Lapshina E.A., Zavodnik I.B. (2021) Comparative analysis of molecular properties and reactions with oxidants for quercetin, catechin, and naringenin. Mol. Cell. Biochem., 476(12), 4287-4299. DOI: 10.1007/s11010-021-04243-w
21. Chen Z.Y., Chan P.T., Ho K.Y., Fung K.P., Wang J. (1996) Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. Chemistry Physics Lipids, 79(2), 157-163. DOI: 10.1016/0009-3084(96)02523-6
22. Heijnen C.G.M., Haenen G.R., van Acker F.A., van der Vijgh W.J., Bast A. (2001) Flavonoids as peroxynitrite scavengers: The role of the hydroxyl groups. Toxicol. In Vitro, 15, 3-6.
23. Вейко А.Г., Ильич Т.В., Лапшина Е.А., Буко В.В., Заводник И.Б. (2018) Квантово-химическое моделирование электронной структуры кверцетина и ингибирование кверцетином и комплексом кверцетин-гидроксипропил-β-циклодекстрин перекисного окисления липидов в митохондриях и эритроцитах крыс. Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук, 63(4), 499-511. [Veiko A.G., Ilyich T.V., Lapshina E.A., Buko V.V., Zavodnik I.B. (2018) Quantum-chemical modeling of the electronic structure of quercetin and inhibition by quercetin and the quercetin-hydroxypropyl-β-complex cyclodextrin lipid peroxidation in rat mitochondria and erythrocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series, 63(4), 499-511.]

24. Montero M., Lobaton C.D., Hernandez-Sanmiguel E., Santodomingo J., Vay L., Moreno A., Alvarez J. (2004) Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *Biochemical J.*, **384**, 19-24. DOI: 10.1042/BJ20040990
25. Daussin F.N., Heyman E., Burelle Y. (2021) Effects of (-)-epicatechin on mitochondria. *Nutr Rev.*, **79**(1), 25-41. DOI: 10.1093/nutrit/nuaa094
26. Kicinska A., Jarmuszkiewicz W. (2020) Flavonoids and mitochondria: Activation of cytoprotective pathways? *Molecules*, **25**(13), 3060. DOI: 10.3390/molecules25133060

Поступила в редакцию: 25. 07. 2023.
После доработки: 14. 08. 2023.
Принята к печати: 23. 08. 2023.

THE FLAVONOIDS Fisetin, Apigenin, Kaempferol, Naringenin, Naringin Regulate Respiratory Activity and Membrane Potential of Rat Liver Mitochondria and Inhibit Oxidative Processes in Erythrocytes

A.I. Savko, T.V. Ilyich*, A.G. Veiko, T.A. Kovalenia, E.A. Lapshina, I.B. Zavodnik

Yanka Kupala State University of Grodno,
5 Leninskogo Komsomola blvd., Grodno, 230030 Belarus; *e-mail: Ilich_TV@grsu.by

Flavonoids, secondary plant metabolites, represent the most abundant heterogeneous group of phytochemicals. The aim of this study to compare antioxidant activity and regulatory properties of several representatives of different classes of flavonoids, fisetin, apigenin, kaempferol, naringenin, naringin, using liver mitochondria and erythrocytes as research objects. In the concentration range of 2.5–25 μM fisetin, apigenin, kaempferol, naringenin, and naringin dose-dependently prevented oxidative damage of erythrocytes induced by 700 μM *tert*-butyl hydroperoxide: accumulation of lipid peroxidation (LPO) products and oxidation of glutathione GSH. The IC_{50} values corresponding to the flavonoid concentration inhibiting the LPO process in erythrocyte membranes by 50%, were $3.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$ in the case of fisetin, $6.5 \pm 1.6 \mu\text{M}$ in the case of kaempferol, $8.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$ in the case of apigenin, $37.8 \pm 4.4 \mu\text{M}$ in the case of naringenin, and $64.7 \pm 8.6 \mu\text{M}$ in the case of naringin. The antioxidant effect of flavonoids was significantly higher in the membrane structures compared to the cytoplasm of cells. All flavonoids studied (10–50 μM) effectively inhibited the respiratory activity of isolated rat liver mitochondria and, with the exception of kaempferol, stimulated Ca^{2+} -induced dissipation of the mitochondrial membrane potential. Cyclosporine A and ruthenium red inhibited flavonoid-stimulated Ca^{2+} -dependent membrane depolarization, thus indicating that the mitochondrial calcium uniporter and the mitochondrial permeability transition pore opening were involved in the flavonoid effects. Flavonoids, as the redox-active compounds with antioxidant properties, are able to regulate mitochondrial potential and respiratory activity, and prevent mitochondrial oxidative stress. They can be considered as effective pharmacological agents or nutraceuticals.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: flavonoids; mitochondria; erythrocytes; glutathione; oxidative stress

Funding. The work was carried out within the framework of the projects “Correction of the bioenergetic function of rat heart mitochondria: the mechanism of the cardioprotective action of natural polyphenols and quinones” of the State Scientific Research Program “Convergence-2025” of the Republic of Belarus for 2021–2025, No. GR 20211784 and “Mechanisms for correction by natural compounds and their Nanostructured Complexes of Metabolic Disorders in the Liver and Heart Tissues of Rats with Diabetes and Intoxication” of the Belarusian Republican Foundation for Basic Research No. M23KI-014 (Jointly with the China Science Foundation).

Received: 25.07.2023; revised: 14.08.2023; accepted: 23.08.2023.