
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ
ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС
ПРИ ГИПОТЕРМИИ**

© 2024 г. Р. А. Халилов¹, А. М. Джафарова^{1, *}, З. Г. Рабаданова¹, М. Б. Джафаров²

¹Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

²Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Астрахань,
Россия

*E-mail: albina19764@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 03.05.2024 г.

Принята к публикации 07.05.2024 г.

Снижение температуры тела гомойотермных животных может вызвать состояние организма, называемое гипотермическим. Оно сопровождается развитием целого ряда патологических процессов, многие из которых связаны с дисфункцией митохондрий и развитием оксидативного стресса. В связи с широким внедрением гипотермии в медицинскую практику, вопрос о возможности регуляторного влияния на прооксидантно-антиоксидантный статус митохондрий при низких температурах тела остается актуальным. В последние годы широкую популярность в качестве терапевтических средств, обладающих антиоксидантным и мембранопротекторным воздействием, получили растительные полифенолы, в частности, диgidрохверцетин (ДГК). В данной работе предпринято исследование эффектов ДГК на интенсивность оксидативного стресса в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии. Обнаружено, что курсовое (5 дней) пероральное введение ДГК в дозе 100 мг/кг существенно снижает уровни продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительную модификацию белков в митохондриях печени контрольных крыс, повышая содержание неферментативных компонентов тиол-дисульфидной антиоксидантной системы. ДГК эффективно защищает митохондрии печени от развития оксидативного стресса при гипотермии, о чем свидетельствует существенное снижение (в некоторых случаях и полная нормализация) уровней диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, шиффовых оснований и карбонильных групп у группы животных, подвергшихся гипотермии на фоне предварительного введения этого полифенола. При этом ДГК существенно повышает уровни глутатиона и витамина Е, а также нормализует содержание тиоловых групп в митохондриальных белках. *In vitro* ДГК демонстрирует дозозависимый антиоксидантный эффект, подавляя и окислительную модификацию белков в митохондриях, инкубированных в среде Фентона ($IC_{50} = 0.160$ мг/мл).

Ключевые слова: гипотермия, крысы, митохондрии, оксидативный стресс, антиоксиданты, диgidрохверцетин

ВВЕДЕНИЕ

Гипотермия – это состояние гомойотермного животного, при котором температура тела падает до уровня ниже, чем необходимо для поддержания функций организма. Снижение температуры может нарушить некоторые физиологические и биохимические процессы в организме, включая изменения в микроциркуляции крови и снижение поступления кислорода в ткани, нарушение митохондриального дыхания и синтеза АТФ. Падение температуры тела также влияет на различные ферментативные системы, на содержание в клетках воды и ионов натрия, калия и кальция [1].

Ключевую роль в патогенезе гипотермического состояния у гомойотермных животных играют активные формы кислорода (АФК) и азота [2]. Известно множество внутриклеточных источников АФК (эндоплазматический ретикулум, пероксисомы, митохондрии, НАДФН-оксидазы, NO-синтазы, моноамиоксидазы, митохондрии, липоксигеназы и др). Несмотря на то, что в норме общий вклад митохондрий в производство АФК в гепатоцитах не столь значителен ($\approx 15\%$) [3], они традиционно считаются основными источниками АФК при патологических состояниях организма, когда развивается митохондриальная дисфункция, резко повышающая уровни АФК.

АФК могут вызывать повреждение клеток при воздействии на ДНК, липидные мембраны, белки и ферменты, что приводит к нарушению их функциональной активности [4]. Показано существование не менее одиннадцати связанных с электрон-транспортной цепью источников АФК в митохондриях [3], из которых Комплексы I и III считаются основными [4]. Снижение уровня кислорода в тканях на начальных этапах гипотермии вызывает избыточную генерацию АФК, нарушение тиолового статуса белков и редокс-регуляции, что приводит к развитию оксидативного стресса [2, 5–7]. Это в свою очередь оказывает существенное влияние на структурно-динамическое состояние митохондриальных мембран и их ультраструктурную организацию, активность участников электрон-транспортной цепи и респираторные характеристики, способствует открытию неспецифической Ca^{2+} -индуцируемой митохондриальной поры (МРТР) и нарушению кальций-аккумулирующей способности митохондрий [8, 9]. Поскольку АФК могут играть ключевую роль в патогенезе гипотермических состояний, вопрос о возможности регуляторного воздействия на интенсивность оксидативного стресса в митохондриях гомойотермных животных при низких температурах тела остается актуальным.

Среди множества антистрессорных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами и оказывающих мембранопротекторное воздействие и при этом малотоксичных и безопасных для применения, особое место отводится полифенолам растительного происхождения. Являясь природными соединениями с одной или несколькими гидроксильными группами, присоединенными к бензольному кольцу, эти вещества способны обезвреживать свободные радикалы и тем самым защищать клетки от оксидативных повреждений [10].

К настоящему времени установлено, что ряд полифенолов оказывает положительное влияние на функции митохондрий. Так, исследование влияния природных полифенолов (ресвератрола, дигидромирицетина, пиносильвина, эпигаллокатехина, мирицетина и дигидрокверцетина (таксифолина, ДГК)) на скорость генерации АФК митохондриями печени крыс при развитии токсического повреждения печени показало, что все эти полифенолы *in vitro* в концентрации 10 мкМ оказывали антиоксидантное действие. При этом в условиях неспецифической Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондриальной мембраны наиболее выраженное уменьшение скорости генерации перекиси водорода демонстрировали ДГК и мирицетин [11]. Учитывая обнаруженные ранее отрицательные эффекты гипотермии на структурно-функциональные характеристики митохондрий, обусловленные оксидативным стрессом и индукцией МРТР [9], в качестве потенциального кандидата в митохондриально-адресованные протекторы гипотермических повреждений можно предложить ДГК. Целью данной работы явилось исследование эффектов ДГК на интенсивность оксидативного стресса в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Опыты проводились на белых ненаркотизированных (аутбрендных) крысах Wistar массой 220–230 г, полученных из питомника «Столбовая» (Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России) и содержащихся в стандартных условиях вивария (средняя температура воздуха – 26 °С, влажность воздуха – 40–60%) Дагестанского государственного университета. Во избежание возрастных и суточных колебаний на результаты экспериментов, опыты проводили в одно и то же время дня (с 9 до 11 ч). Животных делили на 4 группы по 8 животных в каждой:

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

Постановка эксперимента и моделирование гипотермии

Контрольную группу представляли интактные животные. Для учета возможных эффектов ДГК крысам второй группы ежедневно в течение 5 дней однократно перорально вводили раствор ДГК из расчета 100 мг сухого вещества на кг массы тела. Введение осуществлялось с помощью специального зонда. На 6-й день животных декапитировали. У 3-й группы индуцировали кратковременную умеренную гипотермию. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная вода. Температуру тела крыс снижали равномерно со скоростью 0.28 °С/мин до 30 °С и пролонгировали это состояние в течение 1 ч. Температуру измеряли в прямой кишке на глубине 4–5 см ректальным цифровым термометром MS6501.

Выделение митохондрий

Выделение интактных митохондрий производили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Все процедуры выполнялись на холоде при температуре 2–4 °С. Печень предварительно измельчали, пропускали через пресс и готовили 10%-ный гомогенат в среде выделения (0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА, 0.1% BSA, pH = 7.4), после чего центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отделяли и центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин на центрифуге MR23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный дважды отмытый осадок доводили до 2 мл и суспендировали в 0.32 М сахарозе. Суспензию митохондрий насаивали на заранее приготовленный градиент плотности сахарозы (содержащий 3.5 мл 1.1 М сахарозы; 7.5 мл 0.8 М; 7.5 мл 0.5 М и 5 мл 0.3 М) и центрифугировали в бакетном роторе SW32 Ti при 7500 об/мин на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США). Все растворы сахарозы, использованные для создания градиента ее плотности в пробирке, были приготовлены на буфере 10 мМ HEPES, содержащем 1 мМ ЭДТА (pH 7.2) и 0.1% альбумина.

Митохондрии, находящиеся в слоях 0.5–0.8 М отсасывали специальным приспособлением для отбора фракций и осаждали при 15000 g на центрифуге MR23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный осадок промывали в среде промывки (0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА, pH 7.4) и повторно центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Осадок митохондрий ресуспендировали в среде промывки и замораживали при температуре –70 °С.

Определение продуктов ПОЛ

Продукты ПОЛ экстрагировали из митохондрий смесью гептана и изопропанола. Полученные гептановые и изопропанольные экстракты сканировали на спектрофотометре Beckman DU-730 в области длин волн от 190 до 400 нм. Поглощение в области 232–240 нм соответствовало диеновым конъюгатам (ДК), а 362 нм – основаниям Шиффа (ШО).

Определение содержания малонового диальдегида (МДА)

Содержание МДА в митохондриях определяли по реакции его с тиобарбитуровой кислотой. Расчет производили с использованием коэффициента молярного поглощения $1.56 \cdot 10^5$ л/(моль·см) в нмолях на 1 мг белка.

Определение содержания карбонильных и сульфгидрильных групп

Содержание карбонильных групп в белках митохондрий определяли по реакции их с 2,4-динитрофенилгидразином [12]. Расчет производили с использованием коэффициента молярного поглощения 22000 л/(моль·см) в нмолях на 1 мг белка. Содержание SH-групп в белках митохондрий измеряли колориметрическим методом по реакции их с 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой. Концентрацию выражали в нмолях на 1 мг белка, используя для расчета коэффициент молярного поглощения 13600 л/(моль·см).

Определение содержания глутатиона (GSH) в митохондриях печени крыс

Содержание GSH в митохондриях определяли методом Элмана. Концентрацию выражали в нмолях на мг белка, рассчитывая ее с использованием коэффициента молярного поглощения 13600 л/(моль·см).

Определение содержания витамина Е в митохондриях печени крыс

Для определения содержания витамина Е производили предварительную подготовку проб, включающую омыление и экстрагирование. Оптическую плотность полученной пробы измеряли в диапазоне длин волн 250–350 нм. Максимум поглощения α -токоферола соответствует $\lambda = 292$. Концентрацию рассчитывали с использованием коэффициента молярного поглощения 75.8 л/(моль·см) и выражали в нмолях на 1 мг белка.

Определение антиоксидантной активности ДГК in vitro

Изолированные митохондрии предварительно инкубировали (в течение 15 мин) при 30 °С в 1 мл среды инкубации, содержащей различные концентрации ДГК (0.0125; 0.025; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.8 мг/мл). Для контроля митохондрии инкубировали 15 мин в 1 мл среды инкубации без добавления ДГК. Для генерации АФК добавляли в каждую пробирку, содержащую митохондрии и ДГК, аскорбиновую кислоту (конечная концентрация 4 мМ), сульфат железа (5 мкМ) и перекись водорода (4 мМ). Через 15 мин из каждой пробирки отбирали аликвоту и определяли в ней содержание продуктов окислительной модификации белков – карбонильных групп.

Статистическая обработка данных

Обработка данных произведена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США) и SPSS Statistics 22 (IBM, США). Нормальность распределения определяли по критерию Шапиро–Уилка. Равенство дисперсий экспериментальных данных оценивали с помощью критериев Левеня и Уэлча. Для

множественных сравнений независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ и критерий Краскела–Уоллиса (H-test). При обнаружении статистически значимых различий между группами проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Манна–Уитни с новым критическим уровнем значимости, учитывающим количество сравниваемых групп. Данные в таблицах представлены в виде медианы с указанием нижнего и верхнего квартилей – Ме [Q1: Q3]. Для корреляционного анализа использовали критерий Спирмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ДГК на интенсивность ПОЛ и ОМБ в митохондриях печени крыс

Интенсивность ПОЛ в биосистеме можно оценить по содержанию в ней первичных (ДК, гидроперекиси), вторичных (кетодиены, сопряженные триены и МДА) и третичных (ШО) продуктов перекисидации.

Диеновые конъюгаты, являющиеся первичными продуктами ПОЛ, относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. При свободнорадикальном окислении ненасыщенной жирной кислоты происходит отрыв водорода в α -положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК. Из табл. 1 видно, что курсовое введение ДГК уменьшает уровень ДК на 26.8%; снижение температуры тела до 30 °С у животных сопровождается значительным (на 31.9%) их повышением.

Таблица 1. Влияние ДГК на содержание маркеров ПОЛ и ОМБ в митохондриях печени крыс при гипотермии (Ме [Q1: Q3])

Животные	ДК, нмоль/мг белка	МДА, нмоль/мг белка	ШО, нмоль/мг белка	Карбонильные группы, нмоль/мг белка
Контроль	38.5 [36.4:40.4]	0.41 [0.39:0.48]	1.56 [1.42:1.62]	8.2 [7.2:8.9]
ДГК	28.1 [22.8:28.6]*	0.19 [0.18:0.27]*	0.86 [0.74:0.98]*	4.0 [3.7:4.7]*
Гипотермия	50.8 [42.6:57.6]*	0.65 [0.59:0.82]*	2.29 [1.95:2.48]*	14.2 [12.9:15.5]*
ДГК+ гипотермия	39.55 [36.4:43.2]#+	0.49 [0.44:0.50]#+	1.34 [1.27:1.64]#+	10.9 [10:13]*#+

* $p < 0.05$ – относительно контроля, # – относительно гипотермии, + – относительно ДГК.

Однако предварительное введение ДГК в течение пяти дней снижает уровень ДК у гипотермизированных животных на 22.2%. Таким образом, ДГК может уменьшать интенсивность ПОЛ посредством снижения уровня первичных продуктов.

Вторичным продуктом перекисидации липидов является МДА – эндогенный альдегид, образующийся в результате метаболизма арахидоновой и других полиненасыщенных жирных кислот. Вследствие дальнейших биохимических превращений он окисляется до диоксида углерода или вступает во взаимодействие с фосфолипидами, аминокислотами и нуклеиновыми кислотами. Исследование содержания МДА в митохондриях печени крыс, представленное в табл. 1, свидетельствуют о том, что ДГК снижает уровень МДА на 53.7%. Снижение температуры тела до 30° повышает его на 41.5%. Предварительный курс ДГК способствует снижению содержания МДА на 24.5% по сравнению с гипотермией.

ШО являются результатом взаимодействия различных ПОЛ с аминокислотными остатками белков. Они образуются в результате обратимой реакции между карбонильной группой альдегида или кетона со свободной аминогруппой. Непрерывное накопление оснований Шиффа дестабилизирует мембраны и способствует деструкции клеток. Анализ содержания третичных продуктов ПОЛ – ШО в митохондриях печени крыс показал, что курсовое введение ДГК уменьшает содержание ШО на 44.9% (табл. 1). Гипотермия повышает уровень ШО у крыс, не получивших курс ДГК на 44%. Предварительное введение ДГК снижает уровень ШО у гипотермированных крыс на 41.5%.

АФК и продукты ПОЛ могут способствовать окислительной модификации митохондриальных белков. При этом окислению могут подвергаться остатки положительно заряженных аминокислот (лизина, аргинина и гистидина), а также остатки пролина с образованием карбонильных групп. Карбонилирование является необратимой формой модификации белка, поскольку в митохондриях нет ферментов, способных осуществить катализ обратной реакции.

Из табл. 1 видно, что введение ДГК уменьшает уровень образования карбонильных групп в белках митохондрий печени крыс на 51.3%. Умеренная гипотермия способствует значительному повышению (на 37%) уровня карбонильных групп. Предварительный курс ДГК у гипотермированных животных снижает уровень карбонильных групп относительно гипотермии на 23.3%.

Корреляционный анализ показал, что между различными параметрами ПОЛ и ОМБ обнаружены положительные корреляции: между карбонильными группами и ДК ($r=0.78$, $p < 0.05$), между МДА и карбонильными группами ($r=0.84$, $p < 0.05$).

Влияние ДГК на состояние антиоксидантной системы митохондрий печени крыс

Поскольку высокие уровни АФК способны необратимо повредить биологические структуры, клетки обладают множеством ферментативных и неферментативных антиоксидантных защитных механизмов, поддерживающих окислительно-восстановительный гомеостаз. К антиоксидантным ферментам относят различные изоформы супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), тиоредоксинредуктаза (Trx-R), тиоредоксин (Trx), пероксиредоксин, глутароредоксин, глутатион-S-трансфераза (GST). К неферментативным антиоксидантам – глутатион (GSH), витамины Е, А, С. Двумя основными антиоксидантами, защищающими клетку от АФК, являются GSH и коэнзим Q_{10} [13].

Исследование показало, что курсовый прием ДГК у интактных крыс существенно увеличивает уровень GSH (табл. 2). Умеренная гипотермия значительно (на 47.3%) снижает концентрацию GSH относительно контроля. При этом предварительный курс ДГК сохраняет содержание данного антиоксиданта на достаточно высоком уровне, превышающем на 62% таковой у гипотермированных крыс.

Таблица 2. Влияние ДГК на содержание неферментативных компонентов антиоксидантной системы в митохондриях печени крыс при гипотермии (Ме [Q1: Q3])

Животные	Тиоловые группы, нмоль/мг белка	GSH, нмоль/мг белка	Витамин Е, нмоль/мг белка
Контроль	76.2 [66.2:80.1]	5.5 [5.2:6.9]	3.8 [3.5:4.1]
ДГК	115.5 [98.3:120.4]*	11.5 [8.9:12.6]*	4.1 [3.8:4.8]
Гипотермия	39.3 [30.3:54.1]*	2.9 [2.4:3.2]*	2.3 [1.8:2.7]*
ДГК+гипотермия	66.2 [60.5:80.7]++	4.7 [3.8:4.7]++	3.2 [2.9:3.7]++

* $p < 0.05$ * – относительно контроля, # – относительно гипотермии, ++ – относительно ДГК.

Множество клеточных белков содержат в своем составе остатки цистеина очень чувствительных к АФК, поэтому тиоловые группы белков часто рассматривают в качестве маркеров ОМБ. При этом поверхностные цистеины белков действуют как «антиоксидантные ловушки» для АФК и являются важными элементами тиол-дисульфидной антиоксидантной системы.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что ДГК повышает уровень тиоловых групп в белках митохондрий на 51.3% (табл. 2). Умеренная кратковременная гипотермия снижает их содержание на 48.4% относительно контроля.

Предварительный курс ДГК нивелирует отрицательные эффекты гипотермии на содержание тиоловых групп. Уровень их повышается относительно гипотермии на 69.2%, однако остается ниже контрольных значений на 12%. Корреляционный анализ по Спирману показал, что между глутатионом и тиоловыми группами белков имеется высокая степень положительной корреляции (рис. 1) ($r = 0.88$, $p < 0.05$). Известно, что GSH поддерживает все тиоловые группы протеома в клетке, участвуя совместно с глутаредоксином (Grx) в реакциях тиол-дисульфидного обмена [14].

С системой глутатиона тесно связан важнейший антиоксидант биомембран, способствующий обрыву цепной реакции процесса ПОЛ – витамин Е (α -токоферол). Содержание витамина Е в митохондриях у крыс, получивших курс ДГК, не претерпевает изменений (табл. 2). Умеренная гипотермия снижает его уровень на 36.5% относительно контроля. Предварительный курс ДГК способствует повышению уровня витамина Е у гипотермированных крыс, однако полной его нормализации не происходит. Между содержанием витамина Е и глутатионом была обнаружена положительная корреляция умеренной силы ($r = 0.63$, $p < 0.05$).

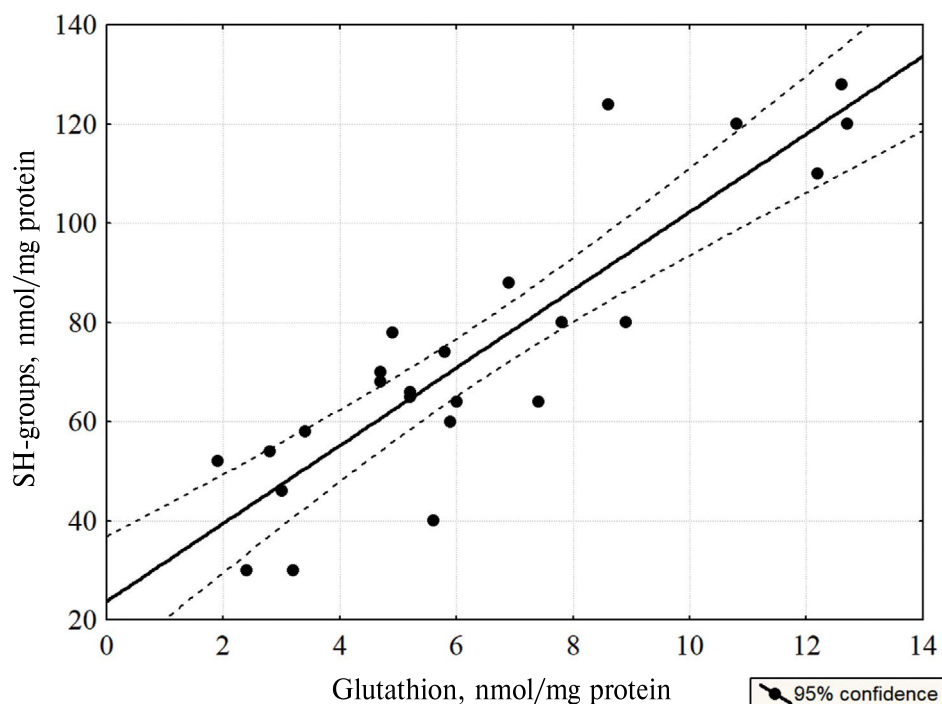


Рис. 1. Корреляционные связи между уровнем глутатиона и содержанием сульфгидрильных групп в белках митохондрий печени крыс при различных физиологических состояниях (контроль, курсовое ДГК, кратковременная гипотермия, умеренная гипотермия на фоне курсового введения ДГК). $r = 0.88$, $p < 0.05$.

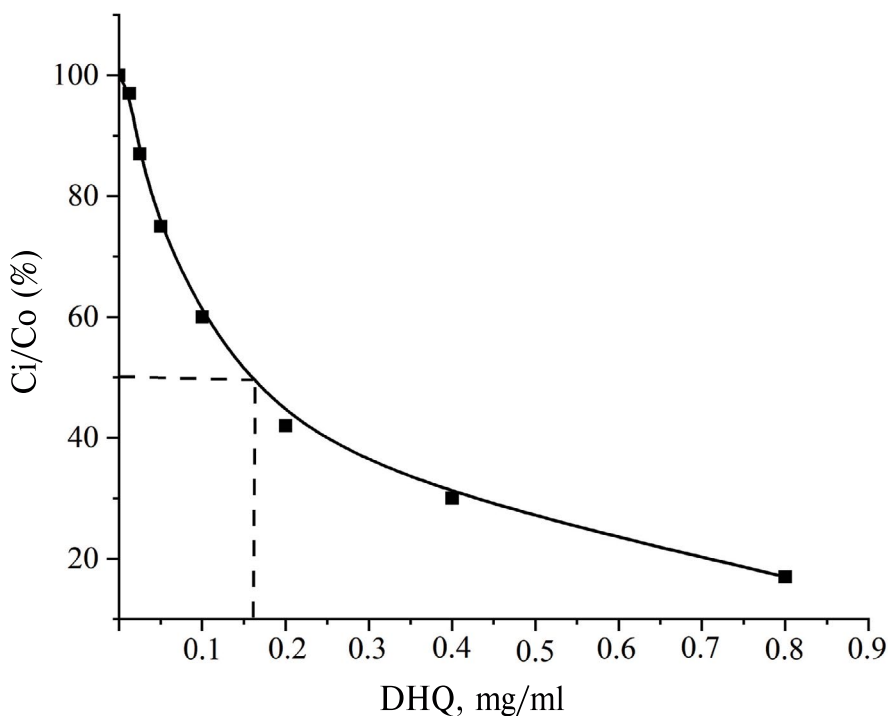


Рис. 2. Кинетическая кривая зависимости C_i/C_o (%) от концентрации ДГК (C_i – концентрация карбонильных групп при данной концентрации ДГК, C_o – это концентрация карбонильных групп в среде без ДГК). Пунктиром показана концентрация ДГК, вызывающая 50%-ное подавление (IC_{50}) интенсивности ОМБ при инкубации изолированных митохондрий в среде Фентона.

Таким образом, ДГК оказывает выраженное влияние на тиол-дисульфидную систему митохондрий, при этом уровень витамина Е меняется не существенно. Однако при гипотермии его курсовое введение предотвращает окисление витамина Е.

Для того чтобы оценить антиоксидантную активность различных веществ можно использовать метод, основанный на влиянии потенциальных антиоксидантов на интенсивность окислительных процессов в различных изолированных клеточных структурах, инкубированных в среде генерации АФК, в частности, в среде Фентона.

Результаты исследования влияния ДГК на содержание карбонильных групп в белках изолированных митохондрий, инкубированных в среде Фентона, представлены в виде кинетической кривой зависимости C_i/C_o (%) от концентрации ДГК на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что ДГК дозозависимо подавляет образование карбонильных производных в аминокислотных остатках митохондриальных белков. Причем с повышением концентрации ДГК доля карбонильных групп в белках митохондрий печени крыс значительно снижается. Мы определили значение IC_{50} (концентрацию вещества, при которой происходит 50%-ное ингибирование процесса окисления белков). IC_{50} равна 0.160 мг/мл, то есть при данной концентрации ДГК происходят 50%-ное ингибирование процессов окислительной модификации белков митохондрий, инкубированных в среде Фентона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Умеренная гипотермия возникает вследствие нарушения регуляторных механизмов в условиях длительного воздействия низкой температуры. На начальных этапах гипотермия способствует развитию ряда реакций, связанных с функциональной активностью гипоталамуса и направленных либо на снижение потери тепла, либо на повышение теплопродукции [15].

Активация гипоталамуса инициирует гипоталамо-гипофизарно-адреналовые системы. В результате этого в крови повышается уровень катехоламинов и кортикостероидов. Эти стрессорные гормоны являются основной причиной множества реакций, направленных как на сохранение тепла, так и на его продукцию [16].

Увеличение теплопродукции может происходить за счет сократительного и несократительного термогенеза. Сократительный термогенез связан с активным сокращением скелетных мышц, сопровождающийся интенсивной дрожью, учащенным дыханием и сердцебиением, высокой скоростью обмена веществ и увеличением потребления кислорода. Несократительный термогенез обусловлен продукцией тепла за счет интенсификации окислительных процессов, повышением потребления кислорода митохондриями и снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Ранее нами было обнаружено, что начальные этапы гипотермии и ее пролонгирование в течение 1 ч значительно повышают скорости потребления кислорода в митохондриях печени крыс при всех метаболических состояниях митохондрий. При этом существенно снижается коэффициент окислительного фосфорилирования и дыхательный контроль [8].

Наряду с процессами, направленными на производство тепла, в организме гомойотермных животных при гипотермии происходят процессы, связанные с уменьшением теплоотдачи. Известно, что начальные этапы гипотермии сопровождаются спазмом сосудов и централизацией кровотока, увеличением вязкости крови [1]. Падение минутного объема крови, нарушение микроциркуляции и резкий сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево [5] могут снижать доставку кислорода к тканям и приводить к развитию гипоксии. Гипоксия на фоне интенсивных окислительных процессов увеличивает уровень восстановленности комплексов I и III электрон-транспортной цепи митохондрий. Известно, что именно эти комплексы ответственны, главным образом, за генерацию супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$) [4].

Супероксид представляет собой умеренно реакционноспособный радикал, который можно считать «первичным» окислителем. Его генерация может привести к образованию более сильных окислителей – гидроксильного радикала ($OH^{\cdot}$), перекиси водорода (H_2O_2), пероксинитрита. Супероксид может подвергаться дисмутации, катализируемой СОД, с образованием перекиси водорода. В присутствии восстановленных переходных металлов (например, Fe^{2+} или Cu^+) перекись водорода может превращаться в гидроксильный радикал (реакция Фентона). Гидроксильный радикал обладает высокой избирательной реакционной способностью, коротким периодом полураспада *in vivo* (10^{-9} с) и незначительным эффективным радиусом действия (около 30 ангстрем). Он окисляет большинство органических молекул со скоростью, ограниченной диффузией [17]. H_2O_2 обладает меньшей активностью по сравнению с гидроксильным радикалом, однако она более стабильна (период полураспада около 1 мс) и может диффундировать далеко от своего источника.

Известно, что основными мишенями H_2O_2 являются тиоловые группы остатков цистеина, окисление которых приводит к образованию нескольких различных продуктов, в том числе производных сульфеновой кислоты, которые впоследствии могут подвергаться дальнейшему окислению до сульфиновой и сульфоновой кислоты. Кроме того, они могут образовывать дисульфидные связи с близлежащими цистеинами ($-SS-$) и трансформироваться в несколько аддуктов при реакции с $NO^{\cdot}$ (S-нитрозилирование)

или GSH (S-глутатиолирование). Окислительные модификации тиоловых групп приводят к изменениям в структуре и функции белка, что может изменить активность фермента, если критический цистеин расположен внутри его каталитического домена [17].

Разложение H_2O_2 катализируется гем-зависимой каталазой, селен-зависимой ГП и тиолсодержащим пероксиредоксином. В ходе детоксикации H_2O_2 селенол ГП окисляется и впоследствии повторно восстанавливается за счет двух молекул GSH, в результате чего образуется окисленный глутатион (GSSG), который восстанавливается ГР. Пероксиредоксин окисляется по своим функциональным цистеинам при удалении H_2O_2 , образуя сульфеновую кислоту или внутримолекулярный дисульфид. Оба могут быть восстановлены Trx в сочетании с НАДФН-зависимой TrxR [18].

В условиях гипоксии уровни АФК в клетке могут значительно превысить содержание и активность антиоксидантных систем. Множество научных работ подтверждают, что гипотермические состояния повышают уровни АФК, что на фоне истощения компонентов антиоксидантной системы способствует развитию оксидативного стресса [2, 5, 6, 7]. Результаты данного исследования также демонстрируют интенсификацию оксидативных процессов в митохондриях печени крыс при пролонгированной однократной умеренной гипотермии, о чем свидетельствуют высокие уровни продуктов ПОЛ и ОМБ. При этом происходит значительное снижение уровня GSH, что приводит к нарушению тиолового редокс-статуса белков митохондрий. Учитывая то, что GSH и редокс-состояние тиоловых групп играют важную роль в регуляции активности комплексов ЭТЦ и ферментов цикла Кребса, а также состояния МРТР [19], истощение пула GSH может стать ключевым событием в развитии митохондриальной дисфункции.

Оксидативный стресс можно уменьшить тремя способами: во-первых, путем уменьшения воздействия, во-вторых, за счет увеличения количества антиоксидантов как эндогенно, так и экзогенно, и, наконец, за счет модуляции функциональной активности митохондрий. Соединения с антиоксидантной активностью могут рассматриваться как перспективные универсальные средства, способствующие профилактике и лечению состояний, вызванных окислительным стрессом. Одними из потенциальных фармакологических агентов являются полифенольные соединения растений. Полифенольные соединения имеют очень широкий спектр действия на биологические объекты, проявляя антиоксидантный, гепатопротекторный, антигипоксический, мембранотропный и многие другие эффекты [20].

Результаты нашего исследования указывают на то, что курсовое потребление полифенольного соединения – ДГК снижает интенсивность оксидативных процессов как в норме, так и при гипотермии, повышает уровень компонентов тиол-дисульфидной системы. Вероятно, он обладает прямым антиоксидантным эффектом, о чем свидетельствует существенное ингибирование *in vitro* процесса окислительной модификации белков изолированных митохондрий, инкубированных в среде Фентона. Интересно то, что эффекты ДГК на различные продукты ПОЛ и ОМБ достаточно схожи (снижение всех продуктов оксидативного стресса колеблется в пределах 40–55%). Возможно, что ДГК действует одним определенным механизмом, направленным на снижение интенсивности оксидативного стресса путем нейтрализации АФК, либо посредством модуляции активности комплексов ЭТЦ и структуры МРТР.

ДГК (таксифолин) состоит из двух фенильных групп А- и В-кольца, которые соединены гетероциклическим кольцом (С-кольцом). Сложная структура придает таксифолину разнообразные фармакологические активности, наиболее фундаментальными среди которых являются антиоксидантные и противовоспалительные свойства [21]. Известно, что ДГК обладает множеством биологических свойств: препятствует повреждению мембран и развитию воспаления, ускоряет преобразование глюкозы в гликоген, повышает сопротивляемость организма к инфекциям и выносливость, улучшает функционирование сердечно-сосудистой системы. Его введение животным оказывает гепатопротекторные, противоопухолевые, нейропротекторные воздействия [21, 22].

Несмотря на такое разнообразие биологических эффектов ДГК, механизмы его влияния тесно связаны с его антиоксидантными свойствами. Антиоксидантная способность ДГК обусловлена его фенольными гидроксильными группами. Группы 5-ОН и 7-ОН, присутствующие в А- и С-кольцах позволяет ДГК проявлять мощный эффект по нейтрализации свободных радикалов [21]. ДГК показал выраженный антиоксидантный эффект *in vivo* при гепатите, индуцированном тетрахлорметаном [22]. Благодаря своей антиоксидантной активности, он демонстрировал нейропротекторный эффект, ингибируя окислительные повреждения нейронов в клетках коры головного мозга крыс [22].

Механизм ингибирования окислительных процессов, в том числе ПОЛ, в присутствии ДГК может быть различным. Обнаружено, что ДГК является эффективным поглотителем гидроксильных радикалов, который может защищать мезенхимальные клетки костномозгового происхождения (bmMSC) от повреждений, вызванных ОН[•]. Кроме того, ДГК достаточно эффективен в удалении других радикалов и снижении уровня Fe³⁺ [21]. Он может ингибировать окислительный стресс и апоптоз эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеток THP-1, индуцированный Cr(VI) [23].

В другом исследовании у крыс, получавших таксифолин, наблюдалось снижение перекисного окисления липидов в печени и сыворотке за счет реакции с тиобарбитуровой кислотой, что раскрывает антиоксидантные свойства таксифолина. Антиоксидантная активность таксифолина также проявляется через его нейропротекторное действие посредством ингибирования окислительных повреждений нейронов в кортикальных клетках крыс, что подтверждается его активностью по улавливанию радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) и ингибированию ПОЛ [24].

Таким образом, обнаруженные в данной работе положительные эффекты ДГК на редокс-состояние митохондрий печени крыс при гипотермии, а также множественные литературные данные о протекторных свойствах данного полифенола свидетельствуют о возможности его применения в качестве безопасного и эффективного средства предотвращения развития митохондриальной дисфункции при гипотермии.

Следует обратить особое внимание на тот факт, что ДГК существенно снижает уровень окислительных процессов и повышает содержание GSH и тиоловых групп в белках митохондрий у нормотермических крыс, то есть смещает равновесие между АФК и антиоксидантами в пользу последних. Такое смещение в соответствии с последними литературными данными может способствовать развитию так называемого «антиоксидативного стресса», приводящего к дисрегуляции множества клеточных функций [17].

Доказано, что множественные системы, генерирующие и элиминирующие АФК, активно поддерживают внутриклеточный окислительно-восстановительный баланс. АФК, в частности, перекись водорода, способны обратимо окислять важные, редокс-чувствительные остатки цистеина на белках-мишенях. Эти окислительные посттрансляционные модификации могут контролировать биологическую активность многочисленных ферментов и транскрипционных факторов, а также их клеточную локализацию или взаимодействие с лигандами [18]. Оказалось, что в низких концентрациях АФК играют важную роль регуляторных медиаторов и участвуют в процессах передачи сигналов и адаптации [17]. В связи с этим вопрос о целесообразности применения антиоксидантов в условиях нормы, когда уровни АФК находятся в пределах физиологических концентраций, все еще остается открытым и требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предварительный пятидневный курс ДГК в дозе 100 мг/кг снижает интенсивность окислительного стресса в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии. Об этом свидетельствует существенное снижение в них содержания продуктов перекисидации липидов (ДК, МДА и ШО) и окислительной деструкции белков (карбонильных

групп). При этом ДГК повышает антиоксидантный потенциал митохондрий гипотермированных животных, способствуя поддержанию в условиях низкотемпературного стресса достаточно высоких уровней неферментативных антиоксидантов (глутатиона и витамина Е). ДГК проявляет выраженные антиоксидантные свойства не только *in vivo*, но и *in vitro*, ингибируя процессы окислительной модификации белков митохондрий в среде Фентона, генерирующей АФК. Обнаруженные антиоксидантные свойства ДГК, вероятнее всего, связаны с его способностью нейтрализовать АФК, выступая в качестве их скавенджера. ДГК не приводит к полной нормализации маркеров оксидативного стресса при гипотермии несмотря на то, что у контрольных животных он демонстрирует более выраженный по сравнению с гипотермированными животными антиоксидантный эффект. Полученные в работе данные могут быть использованы для разработки новых терапевтических стратегий и фармакологических препаратов направленного действия в целях предотвращения нарушений митохондриальных функций при гипотермических состояниях у человека.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Р. А. Х. – постановка проблемы, разработка концепции статьи и дизайн исследования; А. М. Д. – получение экспериментальных данных, описание результатов; З. Г. Р. – критический анализ литературы и формирование выводов исследования; М. Б. Д. – статистическая обработка экспериментальных данных и их интерпретация.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Дагестанского государственного университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Дагестанского государственного университета, протокол №2 от 5.02.2024 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Polderman KH* (2009) Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical Care Med* 37 (7): 186–202.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181aa5241>
2. *Alva N, Palomeque J, Teresa C* (2013) Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia. *Oxidative Med. Cel. Longevity*. Article ID957054: 10.
<https://doi.org/10.1155/2013/957054>
3. *Konno T* (2021) Intracellular Sources of ROS/H2O2 in health and Neurodegeneration: Spotlight on Endoplasmic Reticulum. *Cells* 10(2): 233.
<https://doi.org/10.3390/cells10020233>
4. *Hernansanz-Agustín P* (2021) Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *Antioxidants* 10: 415.

5. Zinchuk VV, Hlutkin SV (2015) Blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant balance in rats under hypothermia and rewarming combined with modification of L-arginine-NO pathway. *Asian J Pharmacy Nursing Med Sci* 3(2): 55–63.
6. Халилов РА, Джафарова АМ, Хизриева СИ, Абдуллаев ВР (2019) Интенсивность свободно – радикальных процессов в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности. *Цитология* 91(7): 1–12. [Khalilov RA, Dzhaifarova AM, Khizrieva SI, Abdullaev VR (2019) The intensity of free radical processes in rat liver mitochondria under moderate hypothermia of various durations. *Cytology* 91(7): 1–12. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S1990519X1906004X>
7. Klichkhanov NK, Dzhaifarova AM (2021) The Blood Prooxidant-Antioxidant Balance and Osmotic Fragility of Red Blood Cells Depend on the Duration of Moderate. In: *Advances in Health and Disease*: 31. Ed. Lowell T. Duncan. New York: Nova Sci Publ: 261.
8. Халилов РА, Хизриева СИ, Джафарова АМ, Абдуллаев ВР (2020) Респираторные характеристики митохондрий печени крыс зависят от длительности умеренной гипотермии. *Бюл эксп биол мед* 169(1): 33–38. [Khalilov RA, Khizrieva SI, Dzhaifarova AM, Abdullaev VR (2020) Respiratory characteristics of rat liver mitochondria depend on the duration of moderate hypothermia. *Bull Exp Biol Med* 169(1): 33–38. (In Russ)].
<https://rucont.ru/efd/712358>
9. Хизриева СИ, Халилов РА, Джафарова АМ, Абдуллаев ВР (2023) Кальций-аккумулирующая способность митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности. *Журн эвол биохим физиол* 59(4): 311–319. [Khizrieva SI, Khalilov RA, Dzhaifarova AM, Abdullaev VR (2023) Calcium Accumulating Ability of Rat Liver Mitochondria in Hypothermia of Various Duration. *J Evol Biochem Physiol* 59(4): 311–319. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0044452923040046>
10. Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA (2019) The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* 10(2): 514–528.
<https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
11. Дергачева ДИ, Кляйн О И, Мариничев АА, Гесслер НН, Теплова ВВ, Исакова ЕП, Дерябина ЮИ (2020) Антиоксидантное действие природных полифенолов на митохондрии печени крыс с токсическим гепатитом. *Биол мембр* 37(3): 197–207. [Dergacheva DI, Klein OI, Marinichev AA, Gessler NN, Teplova VV, Isakova EP, Deryabina YI (2020) Antioxidant effect of natural polyphenols on liver mitochondria of rats with toxic hepatitis. *Biol Membr* 37(3): 197–207. (In Russ)].
12. Venditti P, Rosa RD, Meo SD (2004) Effect of cold – induced hyperthyroidism on H2O2 production and susceptibility of stress conditions of rat liver mitochondria. *Free Rad Biol Med* 36(3): 348–358.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.012>
13. Enns G M (2017) Glutathione as a redox biomarker in mitochondrial disease-implications for therapy. *J Clin Med* 6(5): 50.
<https://doi.org/10.3390/jcm6050050>
14. Jones DP, Go YM (2010) Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes Metab* 2: 116–125.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01266.x>
15. Кулинский ВИ, Ольховский ИА (1992) Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях – резистентная и толерантная. Роль гормонов и рецепторов. *Успехи совр биол* 112(56): 697–714. [Kulinsky VI, Olkhovsky IA (1992) Two adaptation strategies in unfavorable conditions – resistant and tolerant. The role of hormones and receptors. *Success modern times biol* 112(56): 697–714. (In Russ)].
16. Маяхи МТД, Кличханов НК (2012) Влияние даларгина на содержание гормонов гипофизарно – надпочечникового и гипофизарно – тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии. *Изв Самарск научн центра РАН* 14: 273–277. [Mayakhi MTD, Klichkhanov NK (2012) The effect of dalargin on the content of hormones of the pituitary – adrenal and pituitary – thyroid endocrine complexes in the blood of rats during hypothermia. *Proc Samara Scient Center Russ Acad Sci* 14: 273–277. (In Russ)].
17. Meo SD, Venditti P (2020) Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Med Cell Longev*, ID9829176: 32.
<https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
18. Lennicke C, Cochemé HM (2021) Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell* 81(18): 3691–3707.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018>. PMID: 34547234
19. Calabrese G, Morgan B, Riemer J (2017) Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. *Antioxid Redox Signal* 27(15): 1162–1177.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7121>

20. Бобрышева ТН, Анисимов ГС, Золоторева МС, Бобрышев ДВ, Будкевич РО, Москалев АА (2023) Полифенолы как перспективные биологически активные соединения. *Вопр питания* 92(1): 92–107. [Bobrysheva TN, Anisimov GS, Zolotoreva MS, Bobryshev DV, Budkevich RO, Moskalev AA (2023) Polyphenols as promising biologically active compounds. *Nutrit Issues* 92(1): 92–107. (In Russ)].
21. Liu Y, Shi X, Tian Y, Zhai S, Liu Y, Xiong Z, Chu S (2023) An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin. *Front Pharmacol* 14: 1173855.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1173855>
22. Sunil C, Xu B (2019) An insight into the health – promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry* 166: 112066.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112066>
23. Cao X, Bi R, Hao J, Wang S, Huo Y, Demoz RM, Banda R, Tian S, Xin C, Fu M, Pi J, Liu J (2020) A study on the protective effects of taxifolin on human umbilical vein endothelial cells and THP-1 cells damaged by hexavalent chromium: a probable mechanism for preventing cardiovascular disease induced by heavy metals. *Food Funct* 11(5): 3851–3859.
<https://doi.org/10.1039/d0fo00567c>
24. Das A, Baidya R, Chakraborty T, Samanta AK, Roy S (2021) Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 142: 112004.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha>

Effects of Dihydroquercetin on the Intensity of Oxidative Stress in Rat Liver Mitochondria at Hypothermia

R.A. Khalilov^a, A.M. Dzhaferova^a, Z. G Rabadanova^{a,*}, and M.B. Dzhaferov^b

^aDagestan State University, Makhachkala, Russia

^bAstrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

*e-mail: albina19764@mail.ru

A decrease in body temperature in homeothermic animals can cause a state of the body called hypothermic. It is accompanied by the development of a number of pathological processes, many of which are associated with mitochondrial dysfunction and the development of oxidative stress. In connection with the widespread introduction of hypothermia into medical practice, the question of the possibility of a regulatory influence on the prooxidant-antioxidant status of mitochondria at low body temperatures remains relevant. In recent years, plant polyphenols, in particular dihydroquercetin (DHQ), have gained wide popularity as therapeutic agents with antioxidant and membrane protective effects. In this work, we investigated the effects of DHQ on the intensity of oxidative stress in rat liver mitochondria under moderate hypothermia. It was found that a course (5 days) oral administration of DHA at a dose of 100 mg/kg significantly reduces the levels of LPO and OMP products in the liver mitochondria of control rats, increasing the content of non-enzymatic components of the thiol-disulfide antioxidant system's. DHQ effectively protects liver mitochondria from the development of oxidative stress during hypothermia, as evidenced by a significant decrease (and in some cases, complete normalization) in the levels of diene conjugates, MDA, Schiff bases and carbonyl groups in a group of animals subjected to hypothermia with prior administration of this polyphenol. At the same time, DHQ significantly increases the levels of glutathione and vitamin E, and also normalizes the content of thiol groups in mitochondrial proteins. In vitro, DHQ exhibits a dose-dependent antioxidant effect, suppressing OMB in mitochondria incubated in Fenton's medium (IC50 = 0.160 mg/ml).

Keywords: hypothermia, rats, mitochondria, oxidative stress, antioxidants, dihydroquercetin