

КВЕРЦЕТИН И ЕГО КОМПЛЕКС С ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ ИНГИБИРУЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ И ЭРИТРОЦИТОВ: ЭКСПЕРИМЕНТЫ *in vitro* И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ

© 2018 г. Т.В. Ильич, А.Г. Вейко, Е.А. Лапшина, И.Б. Заводник

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
230030, Гродно, бульвар Ленинского комсомола, 50, Республика Беларусь

E-mail: zavodnik_il@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.18 г.

Проведено сравнение эффективности кверцетина, одного из наиболее известных и хорошо изученных флавоноидов, и комплекса включения кверцетина с гидроксипропил-β-циклодекстрином в коррекции нарушений окислительно-восстановительного баланса митохондрий печени и эритроцитов крыс и регулировании процесса формирования митохондриальных пор высокой проницаемости *in vitro* и теоретически рассчитана оптимальная структура молекул кверцетина и его окисленных форм, их молекулярные и электронные свойства. Кверцетин (5–100 мкМ) дозозависимо ингибировал процессы перекисного окисления липидов и окисления восстановленного глутатиона в митохондриях печени и эритроцитах крыс, индуцируемые *терт*-бутилгидропероксидом (700 мкМ). Одновременно кверцетин (25 мкМ) стимулировал Ca²⁺-индуцируемое формирование пор высокой проницаемости в митохондриях и ингибировал этот процесс при больших концентрациях (100 мкМ). Включение кверцетина в супрамолекулярный комплекс с гидроксипропил-β-циклодекстрином повышало его антиоксидантный потенциал, в первую очередь в цитоплазме клетки и матриксе митохондрий. Молекулы кверцетина, семихинон-радикалов и стабильных продуктов окисления, *орто*-хинона и *p*-хинонметидов, обладают планарной структурой. Рассчитанное значение дипольного момента молекулы кверцетина составляет 4,34 Д. Молекула кверцетина термодинамически более стабильна по сравнению с продуктами его окисления, среди которых наиболее устойчив *p*-хинонметид III.

Ключевые слова: кверцетин, флавоноиды, митохондрии, эритроциты, глутатион.

DOI: 10.1134/S0006302918040075

Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонол, от лат. «*quercus*» – дуб, в древесине и коре которого присутствует это вещество) является одним из наиболее известных и хорошо изученных флавоноидов [1] и обладает широким спектром биологической и фармакологической активности, проявляя антиоксидантные, противовоспалительные, антимуtagenные, иммуномодулирующие свойства [2].

Флавоноиды, большая гетерогенная группа производных бензо-γ-пирона, широко распространены в растительном мире в качестве вторичных метаболитов и не синтезируются в ор-

ганизме животных, неизбежно присутствуют в диете человека и, вероятно, играют значительную роль в обеспечении равновесного уровня восстановительных эквивалентов в клетке и организме и имеют, соответственно, существенный терапевтический потенциал [1]. Флавоноиды, как известно, вступают в реакции с водородом и жирорастворимыми неорганическими и органическими свободными радикалами, нейтрализуют активные формы кислорода, азота, хлора, восстанавливая супероксиданион-радикал, гидроксильный радикал, пероксильный и алкоксильный радикалы, аскорбатанион-радикал, гидроперекиси липидов, взаимодействуют с гипохлорной кислотой, оксидом и диоксидом азота, пероксинитритом, радикалами ароматических аминокислот [3]. Однако весьма низкие концентрации поступающих с пищей флавоноидов в кровотоке и тканях, их быстрый метаболизм вызывают вопрос о реальном участии

Сокращения: HP-β-CD – гидроксипропил-β-циклодекстрин, tBHP – *терт*-бутилгидропероксид, ТБКРС – ТБК-реактивные соединения (соединения, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой), GSH – восстановленный глутатион, AM1 – The Austin Model 1.

флавоноидов в системе антиоксидантной защиты организма [4].

Кверцетин обладает амфифильной структурой, проникает через гематоэнцефалический барьер, оказывает синергический эффект, взаимодействуя с такими антиоксидантами, как витамины А и С [5]. Однако применение кверцетина ограничено его низкой биодоступностью, что связано с чрезвычайно малой растворимостью в воде. Для повышения биодоступности, уменьшения токсичности, расширения возможностей фармакологического использования лекарственных средств разрабатываются разнообразные системы доставки: липосомы, наночастицы, мицеллы, дендримеры, квантовые точки и т.д. В качестве молекулярного контейнера доставки широко используются β -циклодекстрин и его производные, формирующие комплексы включения с многочисленными липофильными лекарственными средствами [6]. В настоящее время описаны многочисленные благоприятные эффекты включения многих флавоноидов в комплексы с циклодекстринами [7, 8]. Ранее рядом авторов было продемонстрировано образование комплекса включения кверцетина и гидроксипропил- β -циклодекстрина (HP- β -CD) (1 : 1) методом совместной преципитации из раствора в этаноле [8] или в кислой среде (ацетатный буфер, pH 4,5) [9]. Константа комплексообразования кверцетина и HP- β -CD равна 950 M^{-1} [9]. Комплекс HP- β -CD–кверцетин, как предполагают авторы, представляет потенциальную фармацевтическую формулу для терапевтического применения [8].

Химическая структура молекулы кверцетина обуславливает его выраженные антиоксидантные свойства. Благодаря большому количеству гидроксильных групп и конъюгированных π -орбиталей он может выступать донором электронов или атома водорода [10,11]. При этом возможно существование флавоноидов как в виде нейтральной молекулы, так и в виде фенолят-иона. Механизм свободнорадикальных превращений кверцетина во многом зависит от структуры флавоноида, природы образующейся свободнорадикальной частицы (семихинон-радикала), условий проведения реакции.

Помимо прямого антиоксидантного эффекта флавоноиды модулируют активность ферментов фаз I и II метаболизма ксенобиотиков, протеинкиназы С, инозитол-3-киназы, ингибируют ферменты, синтезирующие активные формы кислорода (ксантинооксидазу, NO-синтазу и др.), регулируют ряд клеточных сигнальных каскадов, подавляют пролиферацию клеток, влияют на экспрессию генов, в частности гена

p53 [12]. Прямой антиоксидантный эффект флавоноидов требует концентраций 10–100 мкМ, непрямой эффект флавоноидов, опосредованный регулированием сигнальных каскадов и активацией системы антиоксидантной защиты, наблюдается в диапазоне концентраций 0,5–5 мкМ [13]. В то же время следует учитывать потенциальную токсичность метаболитов кверцетина (парадокс кверцетина).

Существенный интерес представляет способность полифенолов, в том числе кверцетина, модулировать митохондриальный биоэнергетизм, регулировать формирование пор высокой проницаемости в митохондриях, мембранный потенциал, активность электрон-транспортной цепи, кальциевый гомеостаз митохондрий [13,14]. Поры высокой проницаемости, неселективные кальций-чувствительные каналы в митохондриальной мембране, обеспечивающие диффузию компонентов матрикса ($< 1500 \text{ Da}$), формируются в условиях митохондриального окислительного стресса и нарушений гомеостаза ионов Ca^{2+} [15]. В то же время имеются противоречивые данные об эффектах флавоноидов как протекторов, так и индукторов митохондриальных повреждений [13,14,16].

До настоящего времени отсутствует подробная информация о механизмах химических и ферментативных превращений кверцетина, его метаболизме в клетке, образующихся промежуточных продуктах превращений, взаимодействиях с клеточными сигнальными каскадами и клеточных эффектах, что ограничивает фармакологическое применение кверцетина. В работе мы сравнили антиоксидантную активность флавоноида кверцетина и комплекса его включения с гидроксипропил- β -циклодекстрином (HP- β -CD–кверцетин) при нарушениях окислительно-восстановительного баланса митохондрий печени и эритроцитов крыс *in vitro*. Окислительный стресс моделировали, экспонируя клетки и клеточные органеллы органическому *tert*-бутилгидропероксиду (tBHP), водорастворимому аналогу гидроперекисей липидов. Для выяснения возможных механизмов реакции кверцетина со свободными радикалами наряду с определением антиоксидантной активности кверцетина *in vitro* методами квантовой химии мы рассчитали оптимальную структуру молекул кверцетина и его окисленных форм, их молекулярные и электронные свойства. Одновременно мы оценили регуляторный эффект кверцетина и HP- β -CD–кверцетина на процесс формирования митохондриальных пор высокой проницаемости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали кверцетин, *tert*-бутилгидропероксид, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) – реактив Элмана, 2-тиобарбитуровую кислоту, трихлоруксусную кислоту, этанол (Sigma-Aldrich GmbH, Германия), гидроксипропил- β -циклодекстрин (CycloLab Ltd, Венгрия), остальные реактивы соответствовали квалификации х.ч. («Реахим», Россия).

Методы. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования из печени крыс [17]. Митохондриальный осадок суспендировали в среде выделения (150 мМ KCl, 20 мМ KH_2PO_4 , 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,4, концентрация белка – 35–40 мг/мл). Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий регистрировали как изменение величины оптической плотности суспензии митохондрий (0,5 мг белка/мл) на длине волны 520 нм [18] при 25°C, используя среду, содержащую 0,25 М сахарозы, 0,02 М трис-HCl и 0,001 М KH_2PO_4 , pH 7,4 в присутствии 5 мМ сукцината как субстрата дыхания. Ионы Ca^{2+} (60 мкМ) вносили в суспензию митохондрий и регистрировали скорость терминальной фазы набухания ($\Delta D^{520}/\text{мин}$). Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавт. [19]. Для получения эритроцитов гепаринизированную кровь крыс центрифугировали при 3000 об/мин для отделения плазмы. Эритроциты дважды промывали изотоническим раствором NaCl (145 мМ NaCl, 1,9 мМ $\text{NaN}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 8,1 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4).

В случае регистрации антиоксидантных эффектов митохондрии (12 мг белка/мл среды выделения) или эритроциты (10% гематокрит в изотоническом растворе NaCl) экспонировали tBHP (700 мкМ) в течение 30 мин при 27°C в отсутствие или в присутствии кверцетина (50–200 мкМ) или комплекса HP- β -CD–кверцетин. Количество продуктов перекисного окисления липидов, соединений, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных соединений – ТБКРС), в митохондриях печени и эритроцитах крыс определяли после воздействия tBHP по методу, описанному в работе [20], используя коэффициент экстинкции $156 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ (532 нм). Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) в митохондриях и эритроцитах определяли спектрофотометрически по методу, описанному в работе [21], используя коэффициент экстинкции $13,6 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ (412 нм).

Комплекс включения HP- β -CD–кверцетин (1 : 1) получали по методу, предложенному в работе [8], при совместном перемешивании

кверцетина (1 мг) и HP- β -CD (5 мг) в 1 мл этанола в темноте в течение 10 ч при 25°C. Использовали свежеприготовленные растворы кверцетина, HP- β -CD и комплекса включения.

Теоретические расчеты. Теоретически рассмотрели структуру молекул кверцетина, семихион-радикалов и четырех изомеров соответствующего хинона (продукта реакции двух-электронного окисления), их электронные и молекулярные свойства. Полная оптимизация структуры проведена в рамках полуэмпирического метода AM1 (The Austin Model 1) с использованием неограниченного метода Хартри–Фока (unrestricted Hartree–Fock method, UHF) в приближении самосогласованного поля. Электронную структуру систем рассчитывали, используя неэмпирический метод *ab initio* (в рамках неограниченного формализма Хартри–Фока) и базис 6-31G. Расчеты проводили, используя пакет HyperChem 8.0 (Hypercube Inc., США).

Статистический анализ. Результаты представляли как среднее значение пяти–шести измерений \pm SEM, использовали тест Колмогорова–Смирнова для анализа результатов, демонстрирующих ненормальное распределение (согласно тесту Шапиро–Вилка). Анализ результатов проводили с помощью пакета Statistica 6.0 (StatSoft, США). Достоверным принимали уровень значимости различий при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антиоксидантный эффект кверцетина и его комплекса (HP- β -CD–кверцетин) *in vitro* при окислительном повреждении митохондрий печени и эритроцитов крыс. В соответствии с многочисленными наблюдениями, взаимодействие tBHP с эритроцитами крыс сопровождалось интенсивным перекисным окислением мембранных липидов и истощением внутриэритроцитарного GSH. Кверцетин в диапазоне концентраций 5–100 мкМ дозозависимо предотвращал окислительные повреждения эритроцитов: содержание ТБКРС в присутствии 100 мкМ кверцетина уменьшалось на 70% по сравнению с суспензией эритроцитов, подвергнутых воздействию окислителя в отсутствие флавоноида, уровень GSH в присутствии кверцетина (100 мкМ) возрастал в пять раз (рис. 1а, 2а). Следует отметить, что при более высоких концентрациях кверцетина (200 мкМ) протекторный эффект достоверно уменьшался (рис. 1а), что указывает, вероятно, на проявление прооксидантных механизмов при повышении кон-

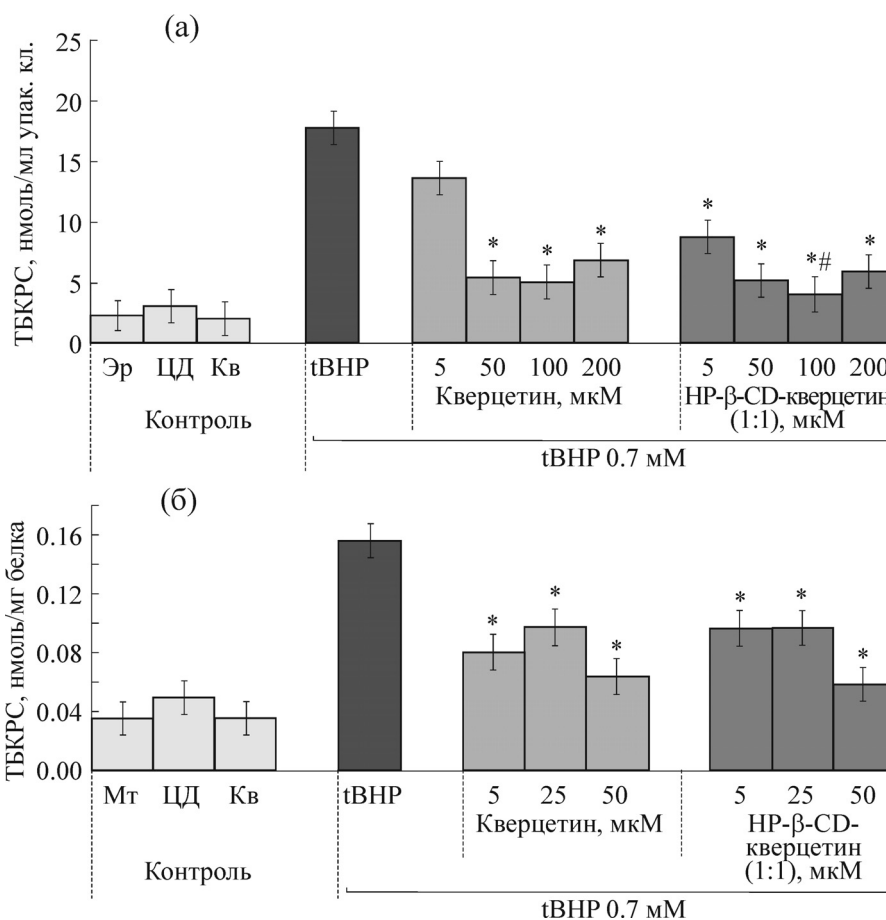


Рис. 1. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитах (а) и митохондриях печени (б) крыс. Эритроциты (10%-й гематокрит в изотоническом растворе NaCl) или митохондрии (12 мг белка/мл среды выделения) экспонировали tVHP (700 мкМ) в течение 30 мин при 27°C, pH 7,4 в отсутствие или в присутствии кверцетина или комплекса HP-β-CD-кверцетин. В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов (Эр) и суспензию митохондрий (Мт), инкубируемых в отсутствие и в присутствии кверцетина (Кв, 25 мкМ) или HP-β-CD (Цд, 100 мкМ); * – $p < 0,05$ при сравнении с образцами, инкубируемыми с tVHP в отсутствие антиоксидантов; # – $p < 0,05$ при сравнении с образцами, инкубируемыми с tVHP в присутствии кверцетина.

центрации флавоноида. Комплекс HP-β-CD-кверцетин более эффективно предотвращал окислительные повреждения эритроцитов по сравнению с исходным антиоксидантом: содержание продуктов липопероксидации в эритроцитах в присутствии 100 мкМ комплекса было меньше на 20% ($p < 0,05$), а уровень GSH был выше на 30% по сравнению с эритроцитами, экспонированными окислителем только в присутствии 100 мкМ кверцетина.

Подобным образом tVHP (700 мкМ) индуцировал выраженное окислительное повреждение митохондрий печени крыс – пероксидацию мембранных липидов и истощение митохондриального GSH (рис. 16, 26). Предварительное внесение в суспензию митохондрий кверцетина (5–50 мкМ) оказывало дозозависимый протекторный эффект: уровень ТБКРС в митохондриях при концентрации 5 мкМ достоверно

уменьшался на 50%, в то время как содержание GSH достоверно не изменялось, при концентрации 50 мкМ кверцетина уровень ТБКРС в митохондриях уменьшался на 60%, содержание восстановленного глутатиона возрастало на 25% по сравнению с митохондриями, экспонированными окислителем в отсутствие антиоксиданта ($p < 0,05$) (рис. 16, 26). В присутствии комплекса HP-β-CD-кверцетин (50 мкМ) содержание GSH в митохондриях, подвергнутых окислительному воздействию, было достоверно выше (на 30%, $p < 0,05$) по сравнению с митохондриями, подвергнутыми действию tVHP в присутствии только кверцетина (50 мкМ) (рис. 26). В то же время эффективность комплекса в реакции ингибирования процесса пероксидации липидов митохондриальных мембран не отличалась от эффективности кверцетина (рис. 16).

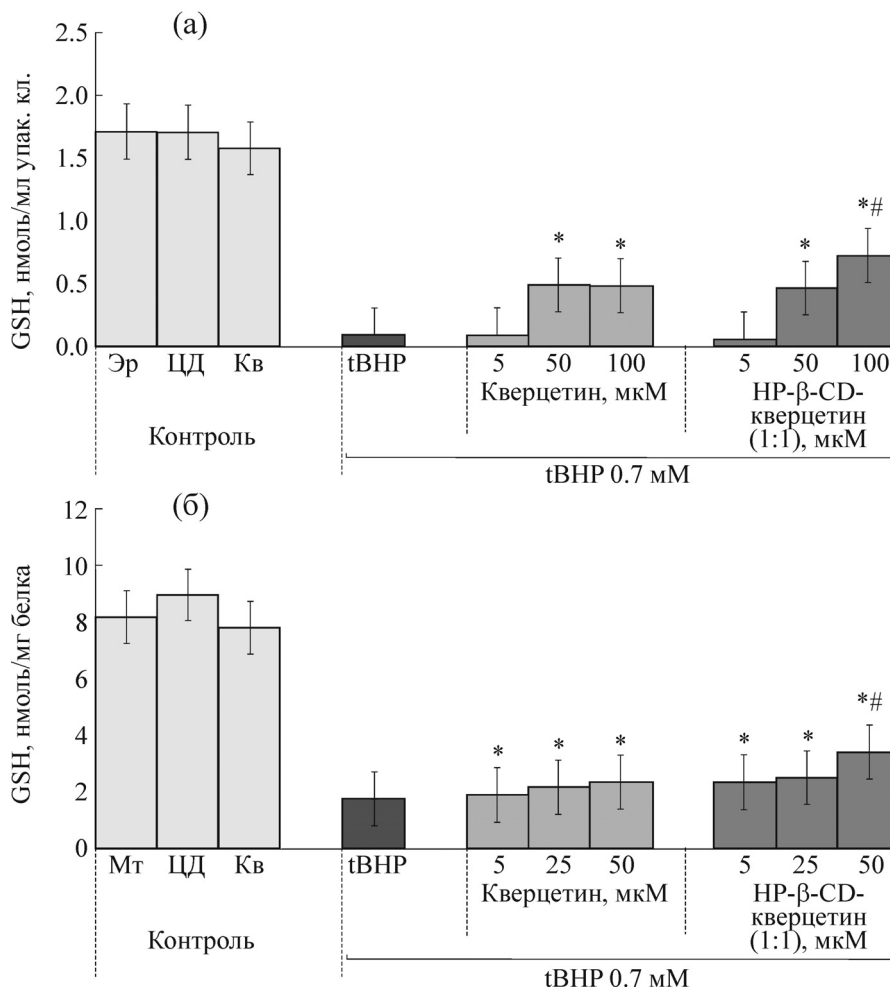


Рис. 2. Содержание GSH в эритроцитах (а) и митохондриях печени (б) крыс. Эритроциты (10% гематокрит в изотоническом растворе NaCl) или митохондрии (12 мг белка/мл среды выделения) экспонировали tBHP (700 мкМ) в течение 30 мин при 27°C, pH 7,4 в отсутствие или в присутствии кверцетина и комплекса HP-β-CD-кверцетин. В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов (Эр) и суспензию митохондрий (Мт), инкубируемых в отсутствие и в присутствии кверцетина (Кв, 25 мкМ) или HP-β-CD (Цд, 100 мкМ); * – $p < 0,05$ при сравнении с образцами, инкубируемыми с tBHP в отсутствие антиоксидантов; # – $p < 0,05$ при сравнении с образцами, инкубируемыми с tBHP в присутствии кверцетина.

Регуляция кверцетином и его комплексом (HP-β-CD-кверцетин) формирования пор высокой проницаемости в митохондриях. Рис. 3 представляет эффект кверцетина и HP-β-CD-кверцетина на скорость кальций-индуцируемого набухания митохондрий печени крыс. Если в концентрации 25 мкМ кверцетин достоверно стимулировал формирование пор высокой проницаемости в митохондриях (при концентрации 25 мкМ кверцетина скорость возрастала на 55%, $p < 0,05$), то при более высоких концентрациях флавоноида мы наблюдали ингибирующий эффект (при 100 мкМ кверцетин полностью предотвращал формирование пор). Комплекс HP-β-CD-кверцетин оказал значительно меньший эффект на мембранный мито-

хондриальный процесс: отсутствовало стимулирование набухания, при 100 мкМ комплекс ингибировал набухание на 50% (рис. 3).

Молекулярная структура и электронные свойства кверцетина и продуктов его окисления.

Для оценки взаимоотношения структуры молекулы флавоноида и его биологической и фармакологической активности, селекции возможных лекарственных средств на основе кверцетина, методами квантовой химии мы определили оптимальную структуру молекулы кверцетина и его окисленных форм, их молекулярные и электронные свойства. На рис. 4 и 5 представлены оптимизированные структуры молекулы кверцетина, семихинон-радикалов и стабильных продуктов двухэлектронного окисления, *ortho*-хинона и *p*-хинонметидов (полу-

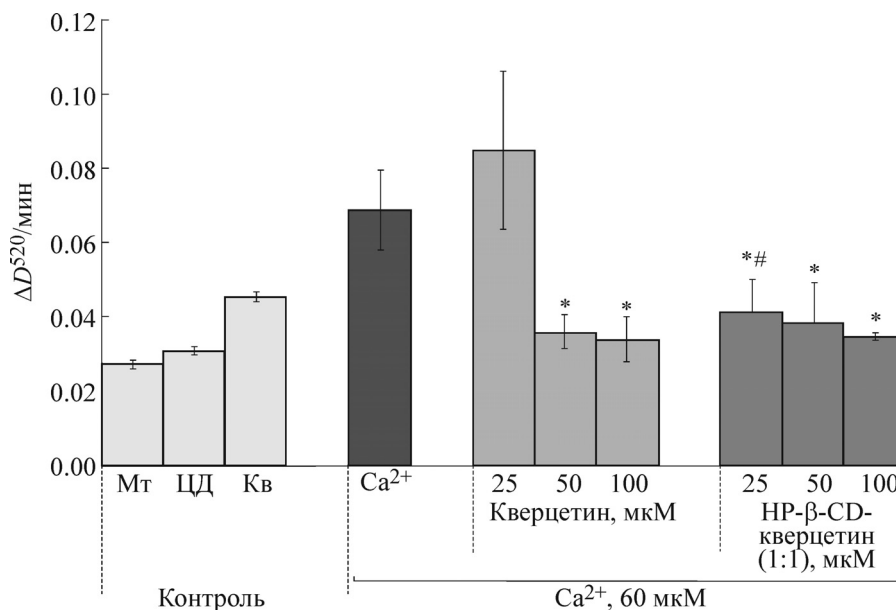


Рис. 3. Скорость процесса формирования пор высокой проницаемости в митохондриях печени крыс ($\Delta D^{520}/\text{мин}$) в отсутствие или в присутствии кверцетина и комплекса HP- β -CD-кверцетин. В суспензию митохондрий (0,5 мг белка/мл) в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,02 М трис-НСl и 0,001 М KH_2PO_4 , рН 7,4, в присутствии 5 мМ сукцината, вносили ионы Ca^{2+} (60 мкМ). В качестве контроля использовали суспензию митохондрий (Мт), инкубируемых в отсутствие и в присутствии кверцетина (Кв, 25 мкМ) или HP- β -CD (Цд, 100 мкМ); * – $p < 0,05$ при сравнении с образцами, стимулируемыми Ca^{2+} (60 мкМ); # – $p < 0,05$ при сравнении с образцами, стимулируемыми Ca^{2+} (60 мкМ) в присутствии кверцетина.

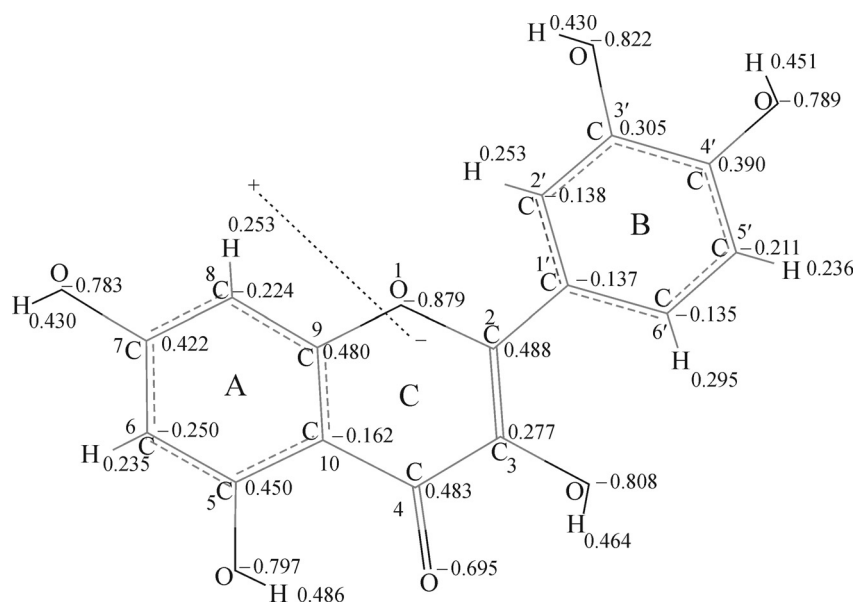


Рис. 4. Оптимизированная структура и избыточные заряды атомов (рассчитаны методом *ab initio* с применением базиса 6-31G) молекулы кверцетина.

ченные согласно модели AM1), избыточные заряды атомов (рассчитанные методом *ab initio*), а также ориентации дипольного момента молекул. Оптимизация геометрии молекул демонстрирует планарную структуру (торсионные углы между кольцами АС и В равны 180°) квер-

цетина, семихинон-радикалов и хинонов (таблица), что во многом определяется наличием двойной $\text{C}2=\text{C}3$ связи в кольце С. Ранее также сообщалось о стабильной структуре молекулы кверцетина как о планарной [22].

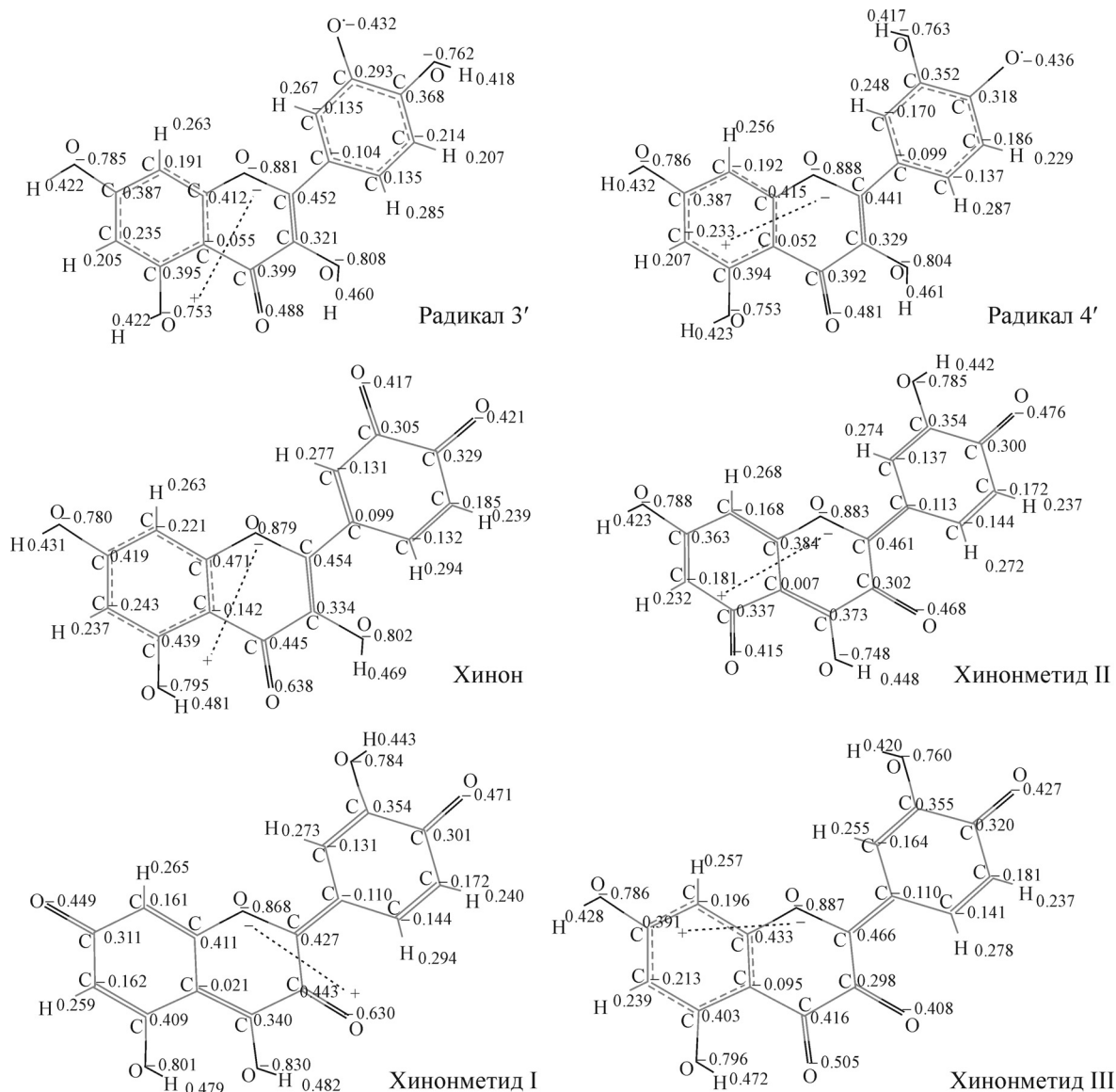


Рис. 5. Оптимизированная структура и избыточные заряды атомов (рассчитаны методом *ab initio*) продуктов окисления кверцетина: радикала 3' (а), радикала 4' (б), хинона (в), хинонметида I (г), хинонметида II (д), хинонметида III (е).

Молекулярные и электронные параметры (значения энергии молекулы, рассчитанные методами AM1 и *ab initio*), значения энергий высшей заполненной молекулярной орбитали (НОМО) и низшей незаполненной молекулярной орбитали (LUMO), энергетический интервал $\Delta E = \text{НОМО} - \text{LUMO}$, дипольный момент μ , общий избыточный заряд колец молекулы представлены в табл. 1. Молекула кверцетина достаточно полярна, дипольный момент молекулы, рассчитанный нами методом *ab initio*, равен 4,34 Д. Величина и направление дипольного момента определяет ориентацию молекулы в реакции взаимодействия с мишенью. Продук-

ты окисления кверцетина становятся более полярными, в первую очередь семихинон-радикалы, что отражает усиление их взаимодействия с молекулами окружения.

Полученные нами значения параметров во многом соответствуют значениям, представленным в литературе. Ранее авторы работы [22] получили значения дипольного момента μ кверцетина и семихинон-радикала (локализованного в положении С4' кольца В), равные 3,013 и 4,963 Д, энергии связывания $-3717,9$ и $-3641,1$ ккал/моль, теплоты образования $-216,7$ и $-191,9$ ккал/моль, разности энергий ΔE (для β -электронов): 8,114 и 7,827 эВ соответственно

Рассчитанные молекулярные параметры, значения энергии, дипольные моменты кверцетина, семихинон-радикалов, орто-хинона и хинон метидов

Параметры	Кверцетин	Радикал 3'	Радикал 4'	o-Хинон	p-Хинон-метид I	p-Хинон-метид II	p-Хинон-метид III	
AM1								
Общая энергия, ккал/моль	-99165,11	-98817,54	-98819,84	-98453,49	-98478,99	-98479,30	-98489,74	
Энергия связывания, ккал/моль	-3717,94	-3633,17	-3635,47	-3531,92	-3557,42	-3557,74	-3568,17	
Теплота образования, ккал/моль	-216,6590	-183,9921	-186,2893	-134,8483	-160,3508	-160,6631	-171,1003	
Количественные соотношения «структура–свойство»								
Площадь поверхности молекулы, Å ²	453,13	458,88	459,95	451,99	447,72	454,62	453,52	
Объем молекулы, Å ³	751,12	757,38	756,21	745,51	739,61	747,67	743,42	
Масса, а.е.м.	302,24	301,23	301,23	300,22	300,22	300,22	300,22	
Энергия гидратации, ккал/моль	-32,67	-26,62	-26,47	-18,12	-20,66	-22,02	-22,63	
Ab initio (6-31G)								
Число электронов	156	155	155	154	154	154	154	
Общее число орбиталей	218	216	216	214	214	214	214	
E(НОМО) α, eV	-8,1739	-8,5503	-9,1463	-9,6732	-9,8623	-9,6854	-9,3503	
E(НОМО) β, eV	-8,1746	-9,3346	-8,9262	-9,0106	-9,5270	-8,3104	-9,8186	
E(LUMO) α, eV	1,1609	1,8023	2,4205	1,9032	0,4169	1,0688	0,8231	
E(LUMO) β, eV	1,1625	2,3358	1,5096	1,3107	0,3152	1,2430	0,9932	
ΔE = E(НОМО) – E(LUMO)α, eV	9,3348	10,3526	11,5669	11,5765	10,2793	10,7542	10,1734	
ΔE = E(НОМО) – E(LUMO)β, eV	9,3372	11,6704	10,4359	10,3214	9,8422	9,5535	10,8119	
Дипольный момент, Д	4,34	6,00	9,31	5,60	2,89	1,65	5,41	
Торсионный угол	C3–C2– B1'–B2'	180	180	180	180	180	180	
Общий избыточный заряд кольца молекулы, e	A	0,54	0,487	0,489	0,56	0,54	0,462	0,537
	C	-0,352	-0,188	-0,187	-0,288	-0,246	-0,084	-0,282
	B	0,128	0,056	0,06	0,059	0,093	0,052	0,082

(авторы использовали метод AM1, что дает отличные от метода *ab initio* результаты). В то же время в работе [23] были представлены значения молекулярных параметров кверцетина $\Delta E = 3,7493$ эВ, $\mu = 2,41$ Д. Авторы работы [23] предполагают, что *o*-дигидроксистеруа молекулы обеспечивает стабильность феноксильного радикала, участвуя в делокализации электрона [23].

Разница энергий ΔE , характеризующая энергию возбуждения молекулы, кверцетина (9,335 эВ в случае α -электронов и 9,337 эВ в случае β электронов) меньше соответствующих значений продуктов его окисления (табл. 1). Среди конечных продуктов окисления термодинамически наиболее устойчив *p*-хинонметид III (теплота образования –171,1 ккал/моль), имеющий на 10–40 ккал/моль большую теплоту образования по сравнению с другими тауто-

мерными формами хинона. Минимальной энергией обладает структура *орто*-хинона (теплота образования –134,8 ккал/моль). Следует отметить, что окисление кверцетина существенно не изменяет объем и площадь поверхности молекулы. Избыточный отрицательный заряд кольца C (–0,352 e, табл. 1) позволяет рассматривать это кольцо как возможный центр электрофильной атаки, величина отрицательного заряда кольца C существенно уменьшается при окислении кверцетина.

Растительные полифенолы обладают чрезвычайным структурным и химическим многообразием, несравнимым с разнообразием, представленным в синтетических библиотеках. Значительное количество природных химических соединений и их комбинаций не исследованы в качестве потенциальных терапевтических агентов. Детальные механизмы реализации по-

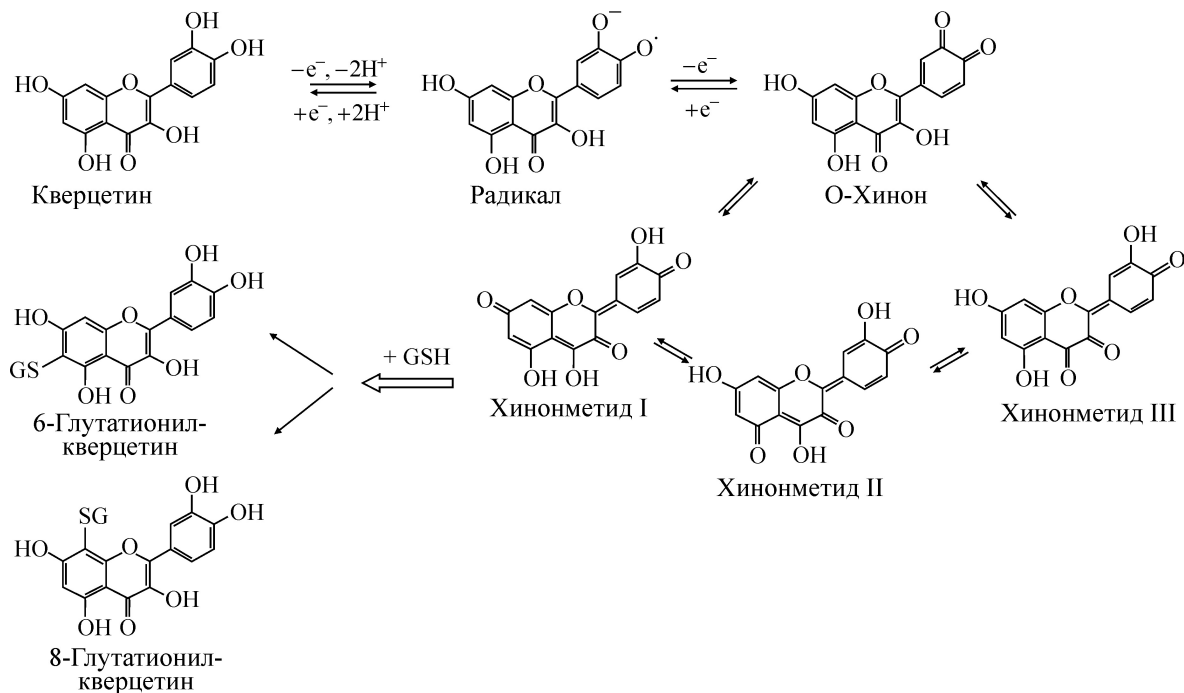


Рис. 6. Последовательные стадии реакции двухэлектронного окисления кверцетина: образование семихинон-радикала (феноксильный радикал), *орто*-хинона и трех *p*-хинонметидов и продуктов взаимодействия с восстановленным глутатионом.

лифенолами их благоприятных или токсических эффектов требуют выяснения.

Антиоксидантную активность флавоноидов связывают с наличием: 1) 3',4'-дигидрокси(катехольной) группы в кольце В, 2) кетогруппы С4=О в кольце С, 3) 3-гидроксильного заместителя в кольце С, 4) двойной связи С2=С3 в кольце С. Кверцетин, принадлежащий к классу флавоно-3-олов, содержит все четыре химические структуры, определяющие высокую антиоксидантную активность [24]. Распределение электронной плотности в молекуле кверцетина, конформация молекулы, образование таутомерных форм и внутри- и межмолекулярных водородных связей будут определять его анти-(про-)оксидантную активность [25]. Одноэлектронное ферментативное/химическое окисление полифенолов приводит к образованию промежуточного феноксильного радикала (семихинон-радикала) [26], способного участвовать в окислении NAD(P)H и других клеточных восстановителей. Недавно было показано, что прооксидантный цитотоксический эффект флавоноидов (парадокс кверцетина) возрастал по мере роста липофильности флавоноидов и уменьшения окислительно-восстановительного потенциала пары феноксильный радикал/фенол. Флавоноиды, у которых кольцо В представляет катехоловую группу, претерпевают быстрое двухэлектронное

окисление с образованием электрофильных алкилирующих хинонов и их изомеров, хинонметидов, способных конъюгировать с сульфгидрильными группами белков и GSH (рис. 6), что также отвечает за прооксидантный эффект флавоноидов [24,26]. (В нашем эксперименте кверцетин демонстрировал глутатионсберегающий эффект.) Предполагают, что существующая в клетке разветвленная сеть антиоксидантов способна восстанавливать (регенерировать) хинон кверцетина до исходного кверцетина (в частности, в реакции с аскорбиновой кислотой) [27]. В нашем эксперименте кверцетин *in vitro* эффективно ингибировал процессы перекисного окисления липидов, индуцируемые органическим гидропероксидом tВНР в митохондриях и эритроцитах, и в меньшей степени предотвращал внутриклеточные и внутриорганельные процессы окисления глутатиона, что связано, вероятно, с распределением полифенола между мембранными структурами и цитоплазмой (матриксом в случае митохондрий). Поскольку известно, что взаимодействие tВНР с гемсодержащими белками эритроцитов и митохондрий связано с образованием в первую очередь алкоксильного и пероксильного радикалов, можно предположить детоксикацию кверцетином именно этих радикалов, а также восстановление липоксильного радикала.

Кверцетин оказывал модулирующий эффект на процесс формирования пор в митохондриальных мембранах, который зависел от концентрации флавоноида – возрастание скорости при меньших концентрациях и ингибирование при больших.

В нашем эксперименте включение кверцетина в супрамолекулярный комплекс с HP- β -CD достоверно увеличило антиоксидантную активность полифенола. В случае окислительного повреждения эритроцитов комплекс HP- β -CD–кверцетин более эффективно предотвращал как накопление ТБКРС в суспензии клеток, так и окисление внутриклеточного GSH (при концентрации 100 мкМ) по сравнению с кверцетином. При окислительном воздействии на митохондрии печени крыс комплекс (50 мкМ) оказался более эффективным антиоксидантом по сравнению с кверцетином при оценке степени окисления глутатиона. Вероятно, включение полифенола в комплекс приводит к повышению его накопления в цитоплазме клетки/матрикса митохондрий. В то же время комплекс в значительно меньшей степени по сравнению с кверцетином модулировал процесс формирования митохондриальных пор высокой проницаемости. Подобным образом ранее показано, что присутствие альбумина ингибировало эффект кверцетина на этот процесс, что, по мнению авторов, доказывает необходимость сольубилизации кверцетина в липидном бислое митохондриальной мембраны [14].

Ранее было продемонстрировано, что образование комплекса кверцетина и HP- β -CD существенно увеличивает растворимость флавоноида в воде и фотостабильность [8]. Инкапсулирование флавоноидов кверцетина и мирецетина во внутреннюю полость β - и γ -циклодекстринов, но не α -циклодекстрина, существенно ингибирует ферментативное окисление флавоноидов пероксидазой [9]. Формирование комплекса рутин(кверцетин–3-О-рутинозид)–HP- β -CD ($K_s = 390,6 \text{ M}^{-1}$) повышает стабильность флавоноида и его антиоксидантную активность [28], что, как предполагают, связано с усилением водород-донорных свойств гидроксильных групп рутина за счет формирования водородных связей с циклодекстринами [28]. В то же время в работе [29] было показано незначительное (на 20%) возрастание скорости пероксидазного окисления кверцетина в присутствии β -CD, что авторы объяснили неспецифическим взаимодействием β -CD с продуктами окисления флавоноидов.

Выяснение химизма реакций редокс-превращений фенол/хинонметид кверцетина (и других

флавоноидов) представляет значительный теоретический и прикладной интерес, поскольку объясняет благоприятные антиоксидантные цитопротекторные/прооксидантные токсические эффекты кверцетина. В настоящее время в литературе предложено несколько схем неферментативного и ферментативного (пероксидазного, тирозиназного) окисления кверцетина как *in vitro*, так и *in vivo*, представляющих сопряженный протон-электронный перенос: наиболее предпочтительным представляется перенос (донирование) одного или двух атомов водорода [25,27,30]. Наиболее вероятным в реакции двухэлектронного окисления кверцетина представляется образование четырех таутомерных форм: *орто*-хинона и продуктов его изомеризации – трех *p*-хинонметидов (рис. 5). Рассматривается также механизм, включающий стадию гидропероксидного окисления кверцетина с образованием в качестве главного продукта депсида [26,27,30]. Отмечается, что образующиеся хиноны быстро гидратируются, что делает невозможным их регистрацию.

Структура, электронные и молекулярные параметры молекулы кверцетина и его производных рассмотрены достаточно детально [23]. Известно несколько конформеров кверцетина, различающихся углом поворота кольца В и вращением ОН-групп относительно катехольной группы (негидратированный кверцетин и дигидрат кверцетина) [5]. Ранее квантово-химическими расчетами показано, что такие молекулярные параметры, описывающие оптимальную геометрию молекулы флавоноида, как дипольный момент, положение ОН-групп, в первую очередь в положении 3 кольца С и в положениях 3',4' кольца В, определяют антиоксидантные свойства флавоноидов, способность ингибировать процесс перекисного окисления липидов [23]. Вероятнее всего, эти ОН-группы участвуют в делокализации электронов, что стабилизирует образовавшийся феноксильный радикал флавоноида. Показано, что антиоксидантная активность флавоноидов обратно пропорциональна величине дипольного момента молекулы и ее размеру [23].

На основании квантово-химических расчетов в работе [31] было показано, что из четырех возможных изомеров хинона кверцетина предпочтительным представляется структура хинонметида (хинонметид III, рис. 6), составляющая более 99% окисленной формы кверцетина. Низшая незаполненная молекулярная орбиталь хинонметида кверцетина, согласно этим авторам, делокализована по всему фенольному кольцу (кольца А, В, и С) [31]. Как предполагают, 4'-ОН-группа кольца В представляет основной

реакционный центр молекулы кверцетина [25]. Рассчитанные нами молекулярные параметры радикалов, образующихся в положениях 4'-O• и 3'-O• кольца В кверцетина, близки.

Исходя из полученных нами значений энергии высшей незаполненной молекулярной орбитали, хинон и его таутомеры являются даже более сильными нуклеофилами (донорами электрона) по сравнению с кверцетином. Молекула кверцетина термодинамически более стабильна по сравнению с продуктами его окисления (теплота образования продуктов уменьшается на 30–82 ккал/моль). При этом перенос уже первого атома водорода уменьшает стабильность молекулы.

Последовательность реакций переноса электрона и протона при окислении кверцетина может быть различна. Предполагают, что перенос H-атома предпочтительнее по сравнению с переносом электрона [31]. Энтальпия диссоциации OH-групп в молекуле флавоноида определяет его антиоксидантный потенциал [32]. Экспериментальные результаты и квантово-химические расчеты позволили предположить, что 4'-ОН-, 3'-ОН- и 3-ОН-группы представляют основные центры радикальных атак в молекуле кверцетина [5]. Ранее было показано, что перенос атома водорода группы 4'-ОН кольца В кверцетина предпочтителен, поскольку электронная плотность радикала 4'-O• делокализована по всей молекуле (кольца В и С), отражая максимальную стабильность и время жизни этого радикала [32]. Максимальный по величине отрицательный заряд, согласно нашим расчетам, локализован на атоме О гидроксильной группы в положении 3' кольца В (рис. 5).

Образование *o*-хинона кверцетина, хинонметидов, алкилирующих белки и ДНК, и глутатионил-кверцетина было обнаружено в клетках меланомы В16F-10 [26], что подтверждает возможность образования токсических продуктов (прооксидантов) в результате биоактивации кверцетина клеточными тирозиназами (и пероксидазами) [26,33]. Образующиеся при одноэлектронном окислении семихинон-радикалы кверцетина способны быстро диспропорционировать с образованием хинона и исходного кверцетина [33].

Кверцетин, как показано ранее, обладает высокой эффективностью в ингибировании реакции перекисного окисления липидов микросомальных мембран, индуцируемого комплексом Fe²⁺-аскорбиновая кислота: IC₅₀ = 9 мкМ [34], что отражает высокое сродство к липопероксильному радикалу и липофильность молекулы кверцетина. Интерес представляет обнаружен-

ная нами способность кверцетина ингибировать окислительное повреждение митохондрий и модулировать важнейший процесс формирования пор высокой проницаемости. Известно, что флавоноиды способны специфически взаимодействовать с митохондриями, предотвращая дисфункцию митохондрий [35]. Кверцетин, кампферол и эпикатехин эффективно ингибировали генерацию H₂O₂ митохондриями (IC₅₀ ≈ 1–2 мкМ) [35], в более высоких концентрациях (30–50 мкМ) кверцетин ингибировал перекисное окисление липидов митохондриальных мембран, индуцируемое Fe²⁺/H₂O₂, нарушал сопряжение окисления и фосфорилирования, стимулировал истечение ионов кальция и формирование пор высокой проницаемости, как предполагают авторы, в результате прямого взаимодействия флавоноида с адениннуклеотид-трансферазой, одним из белковых компонентов поры [14]. В работе [16] кверцетин, мирицетин и морин (50 мкМ) ингибировали формирование митохондриальных пор высокой проницаемости, регистрируемое методом patch-clamp, и стимулировали этот процесс при регистрации изменения светорассеяния суспензии митохондрий. Авторы предполагают как прямое молекулярное взаимодействие кверцетина с компонентами мембраны, так и редокс-механизм, связанный с окислительным превращением кверцетина. Таким образом, митохондрии представляют мишень специфического терапевтического воздействия флавоноидов, результатом которого может быть предотвращение патологии, ассоциированной с митохондриальной дисфункцией [36].

Как показано для клеток линии Jurkat, кверцетин чрезвычайно быстро накапливается в клетках и далее избирательно аккумулируется в митохондриях, обеспечивая защиту от митохондриальных повреждений [36]. В то же время флавоноиды не способны проникать через внутреннюю митохондриальную мембрану. Одним из механизмов переноса полифенолов через клеточную мембрану представляется мембранный транспортер билиннуклеотида [37]. Известна способность флавоноидов аккумулироваться в мембранных структурах, в частности в липидных рафтах, что позволяет им взаимодействовать с рецепторами и трансдукторами сигнальных каскадов.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе экспериментальное определение антиоксидантных эффектов флавоноида кверцетина и комплекса включения НР-β-CD-кверцетин в коррекции нарушений окис-

лительно-восстановительного баланса митохондрий печени и эритроцитов крыс *in vitro* мы дополнили теоретическими расчетами структуры и свойств молекул кверцетина и продуктов его окисления, что позволяет лучше представлять взаимосвязь структуры и активности кверцетина. В экспериментах *in vitro* флавоноид и его комплекс (5–100 мкМ) дозозависимо ингибировали процессы перекисного окисления липидов и окисления восстановленного глутатиона, регулировали формирования митохондриальных пор высокой проницаемости, выступая как агонистом, так и антагонистом этого процесса. Включение в комплекс уменьшало модулирующий эффект кверцетина на процессы в митохондриальной мембране и более выражено повышало антиоксидантную активность кверцетина в цитоплазме клетки и матриксе митохондрий по сравнению с липидной фазой. Можно предположить взаимодействие кверцетина с алкоксильным и пероксильным радикалами, с гидропероксильным радикалом липидов. Молекулы кверцетина, семихинон-радикала и стабильных продуктов окисления, *орто*-хинона и *p*-хинонметидов, обладают планарной структурой (торсионные углы между кольцами АС и В равны 180°). Молекула кверцетина менее полярна (дипольный момент 4,34 Д) и термодинамически более стабильна по сравнению с продуктами его окисления. Среди стабильных продуктов окисления наиболее устойчив *p*-хинонметид III.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов и Е. Н. Музафаров, *Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина* (Synchrobook, Пушино, 2013).
2. C. Boydens, B. Pauwels, L. van den Daele, and J. van de Voorde, *J. Cardiovasc Diabetol.* **18**, 15 (2016).
3. B. Helliwel, *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 107 (2008).
4. J. Morales, G. Günther, A. L. Zanocco, and E. Lemp, *PLoS One* **7**, e40548 (2012).
5. A. M. Mendoza-Wilson, R. R. Sotello-Mundo, R. R. Balandran-Quintana, et al., *J. Mol. Struct.* **981**, 187 (2010).
6. V. Buko, B. Palecz, S. Belica-Pacha, and I. Zavodnik, in *Nano- and microscale drug delivery systems: design and fabrication*, Ed. by A. Grumezescu (Elsevier, Amsterdam, 2017), Chapter 18, pp. 343–356.
7. B. Liu, W. Li, T. A. Nguyen, and J. Zhao, *Food Chem.* **134**, 926 (2012).
8. I. M. Savic, V. D. Nikolic, L. B. Nikolic, et al., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **80**, 383 (2015).
9. C. Lucas-Abellan, I. Fortea, J. A. Gabaldon, and E. Nunes-Delicado, *J. Agric. Food Chem.* **56**, 255 (2008).
10. C. G. M. Heijnen, G. R. Haenen, F. A. van Acker, et al., *Toxicol. in Vitro* **15**, 3 (2001).
11. D. Metodiewa, A. K. Jaiswal, N. Cenas, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 107 (1999).
12. S. Schaffer, H. Asseburg, S. Kuntz, et al., *Mol. Neurobiol.* **46** (1), 161 (2012).
13. C. Sandoval-Acuca, J. Ferreira, and H. Speisky, *Arch. Biochem. Biophys.* **559**, 75 (2014).
14. R. Ortega and N. García, *J. Bioenerg. Biomembr.* **41** (1), 41 (2009).
15. A. J. Kowaltowski, R. F. Castilho, and A. E. Vercesi, *FEBS Lett.* **495**, 12 (2001).
16. U. De Marchi, L. Biasutto, S. Garbisa, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1787** (12), 1425 (2009).
17. D. Johnson and H. A. Lardy, *Methods Enzymol.* **10**, 94 (1967).
18. A. P. Richardson and A. P. Halestrap, *Biochem. J.* **473** (9), 1129 (2016).
19. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
20. J. Stocks and T. L. Dormandy, *Br. J. Haematol.* **20** (1), 95 (1971).
21. J. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70 (1959).
22. S. Erkoç, F. Erkoç, and N. Keskin, *J. Molec. Struct. (Theochem.)* **631**, 141(2003)
23. B. F. Rasulev, N. D. Abdullaev, V. N. Syrov, and J. Leszczynski, *QSAR Comb. Sci.* **24** (9), 1056 (2005).
24. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933 (1996).
25. A. M. Mendoza-Wilson, H. Santacruz-Ortega, and R. R. Balandran-Quintana, *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **81**, 481 (2011).
26. H. M. Awad, M. G. Boersma, J. Vervoort, and I. M. Rietjens, *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 224 (2000).
27. I. M. Rietjens, M. G. Boersma, L. D. Haan, et al., *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **11**, 321 (2002).
28. T. A. Nguyen, B. Liu, J. Zhao, et al., *Food Chemistry* **136**, 186 (2013)
29. Л. И. Олейник, Т. С. Буслова, И. А. Веселова и Т. Н. Шеховцова, *Вестн. МГУ. Химия* **52** (3), 199 (2011).
30. С. В. Гущина, В. М. Косман и И. Г. Зенкевич, *Вестн. Санкт-Петербургского университета* **4** (1), 94 (2009).
31. H. Jacobs, M. Moalin, A. Bast, et al., *PLoS One* **5** (11), 1 (2010)
32. E. Osorio, E. G. Pérez, C. Areche, et al., *J. Mol. Model.* **19**, 2156 (2013)
33. H. M. Awad, M. G. Boersma, S. Boeren, et al., *FEBS Lett.* **520**, 30 (2002).
34. C. G. Heijnen, G.R. Haenen, R.M. Oostveen, et al., *Free Radic. Res.* **36** (5), 575 (2002).
35. R. Lagoa, I. Graziani, C. Lopez-Sanchez, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1562 (2011).
36. M. Fiorani, A. Guidarelli, M. Blasa, et al., *Nutr. Biochem.* **21**, 397 (2010).
37. L. Ziberna, K. Jong-Hun, C. Auger, et al., *Food Funct.* **3**, 1452 (2013).

Quercetin and Its Complex with Cyclodextrin against Oxidative Damage of Mitochondria and Erythrocytes: Experimental Results *in vitro* and Quantum-Chemical Calculations

T.V. Ilyich, A.G. Veiko, E.A. Lapshina, and I.B. Zavodnik

*Department of Biochemistry, Yanka Kupala Grodno State University,
bul'var Leninskogo Komsomola 50, Grodno, 230030 Belarus*

In this work, we compared the efficacy of quercetin, one of the most known and widely investigated flavonoids, and the inclusion complex of quercetin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin in prevention of disturbances in redox balance of rat liver mitochondria and erythrocytes during oxidative stress and regulation of the process of the formation of mitochondrial pores with increased permeability *in vitro* and theoretically calculated the structure of quercetin and its oxidative forms, as well as their molecular electronic properties. Quercetin (5–100 μM) inhibited membrane lipid peroxidation and reduced glutathione oxidation dose-dependently in both rat liver mitochondria and erythrocytes during exposure to *tert*-butyl hydroperoxide (700 μM). Simultaneously, quercetin (25 μM) stimulated the Ca^{2+} -induced formation of pores with increased permeability in mitochondria and inhibited this process at higher concentrations (100 μM). The incorporation of quercetin in the supramolecular complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin enhanced its antioxidative activity, first of all, in the cytoplasm of a cell and mitochondrial matrix. Molecules of quercetin, semiquinone radicals and stable products formed in the oxidation, *ortho*- and *p*-quinone methide, possess planar structure. The calculated value of the dipole moment of the quercetin molecule is 4,34 D. The quercetin molecule is thermodynamically more stable than the products of its oxidation, among which, *p*-quinone methide-III is the most stable form.

Keywords: quercetin, flavonoids, mitochondria, erythrocytes, glutathione