

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ

КОМИЛОВ ЭСОХОН ЖЎРАЕВИЧ

**МИТОХОНДРИЯЛАРНИНГ ИОН-ТРАНСПОРТ ТИЗИМЛАРИГА
АЙРИМ ФЛАВОНОИДЛАРНИНГ ТАЪСИР МЕХАНИЗМЛАРИ**

03.00.08- Одам ва ҳайвонлар физиологияси

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент–2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)
Content of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Комилов Эсохон Жўраевич

Митохондрияларнинг ион-транспорт тизимларига айрим флавоноидларнинг таъсир механизлари.....3

Комилов Эсохон Жўраевич

Механизмы действия некоторых флавоноидов на ион-транспортующие системы митохондрий.....21

Komilov Esokhon Jo'raevich

Mechanisms of actions of some flavonoids on mitochondrial ion-transport systems39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works.....43

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА
ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ

КОМИЛОВ ЭСОХОН ЖЎРАЕВИЧ

**МИТОХОНДРИЯЛАРНИНГ ИОН-ТРАНСПОРТ ТИЗИМЛАРИГА
АЙРИМ ФЛАВОНОИДЛАРНИНГ ТАЪСИР МЕХАНИЗМЛАРИ**

03.00.08-Одам ва ҳайвонлар физиологияси

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент–2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси хузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2017.2.PhD/B72 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация иши Ўзбекистон Миллий университети хузуридаги Биофизика ва биокимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.ibb-nuu.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот таълим порталида (www.ziyounet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Асраров Музаффар Исламович
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар:

Шахмурова Гульнара Абдуллаевна
биология фанлари доктори, профессор

Кулкараев Абдисалим Каримович
тиббиёт фанлари номзоди, доцент

Етакчи ташкилот:

Андижон давлат университети

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти хузуридаги DSc. 03/30.12.2019.B.01.13 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «14» ИЮНЬ соат 16⁰⁰ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246–68–96.

Диссертация билан Ўзбекистон Миллий университети хузуридаги Биофизика ва биокимё институти Ахборот–ресурс марказида танишиш мумкин (14 рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246–68–96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru

Диссертация автореферати 2020 йил «14» ИЮНЬ да тарқатилди.
(2020 йил «12» ИЮНЬ даги № 1 рақамли реестр баённомаси).



Р.З.Сабилов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси,
б.ф.д., академик

Р.Ш.Курбанназарова
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.д.

И.Г.Ахмеджанов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги
илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD)диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Ҳозирги вақтда дунёда юрак-қон томир, эндокрин, асаб тизими ва бошқа касалликларни даволашда янги самарали фармакологик воситаларни излаш ва уларни тиббиётга тадбиқ этиш долзарб мавзулардан бири бўлиб қолмоқда. Табиий бирикмалар асосидаги дори воситалари синтетик препаратларга нисбатан хавфсизроқ эканлиги, уларнинг самаралилик даражаси ҳам юқори бўлганлиги сабабли, янги дори воситаларини яратишда полифенол бирикмаларга катта эътибор берилмоқда. Шунингдек, дори воситаларининг асосини ташкил қилган полифенол бирикмаларни ҳужайра, митохондрия ва молекуляр даражада таъсир механизмларини аниқлаш муҳим аҳамият касб этади.

Кейинги йилларда жаҳоннинг йирик илмий марказларида ўсимликлардан ажратиб олинган турли флавоноидлар асосида янги самарали фармакологик препаратлар яратилган. Ушбу препаратларнинг антиоксидант ҳамда антигипоксант хоссалари аниқланган, шунингдек уларнинг ҳужайравий, апоптик ва мембранавий жараёнларга таъсири кўрсатилган. Ҳозирги вақтда янги фармагентларни яратишда, уларнинг патологик ҳолатларда биомембраналарга, митохондрияларга таъсир механизмларини аниқлашни ва турли мембранавий бузилишларни коррекциялашни тақозо этади.

Бугунги кунда мамлакатимизда ўсимлик полифеноллари асосида истиқболли дори воситаларини яратишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу борада кўпгина флавоноидларнинг фармакологик хоссалари, организмда кечаётган турли ҳужайравий ва физиологик жараёнларга уларнинг таъсири аниқланган. Аммо уларнинг молекуляр ва мембраналар даражасидаги таъсир механизмлари шу вақтгача тўлиқ ёритилмаган. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг тўртинчи йўналишида «фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларини арзон, сифатли дори воситалари билан таъминлашни яхшилаш...»¹ вазифалари белгилаб берилган. Мазкур вазифаларни амалга оширишда ўсимлик полифенолларининг мембранавий ва митохондриал жараёнларга таъсирини аниқлашга, мембранавий шикастланишларни флавоноидлар билан коррекция қилишга, тадқиқ қилинган флавоноидлар асосида фармакологик воситалар яратишга йўналтирилган тадқиқотлар муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, 2018 йил 23 январдаги ПҚ-3489-сон «Дори воситалари ва тиббиёт буюмларини ишлаб чиқариш ҳамда олиб киришни янада тартибга солиш чора тадбирлари тўғрисида»ги ва 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғини жадал

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 07.02.2017 йилдаги «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги ПФ-4947-сонли Фармони.

ривожлантириш бўйича қўшимча чора-тадбирлар тўғрисидаги» қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бўлган бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда келтирилган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг Республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот Республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ўсимликлардан ажратиб олинган янги флавоноид бирикмаларнинг биологик мембраналарга ва унга боғлиқ жараёнларга таъсир механизмларини аниқлаш ҳозирги вақтда дунёнинг йирик илмий марказларида амалга оширилмоқда. Хусусан, А.У.Сhoi ва ҳаммуаллифлари (2011) нейробластомаларда, Q.Chen ва ҳаммуаллифлари (2012) G.Seelinger ва ҳаммуаллифлари (2008) карциномаларда лютеолин апоптозни индукциялашини ва турли каспаза ферментларини фаоллаштиришини кўрсатиб берган. Бундан ташқари, Qiao ва ҳаммуаллифлари (2016) ороксилин А митохондрияларда оксидланишли фосфорланиш жараёнини ажратувчи оксилларни бошқариш йўли билан антиканцероген фаолликни намоён қилишини кўрсатган.

МДХ мамлакатларида проф. Г.Д.Миронова (2008, 2011) раҳбарлигида флавоноид тутувчи препаратларнинг митохондриялардаги АТФга боғлиқ K^+ -каналига (мито K_{ATP} -канал) таъсири тадқиқ қилинган. Бундан ташқари, А.М.Попов ва унинг ҳамкасблари (2016) лютеолиннинг антиоксидантлик ва мембранотроп хоссаларини турли модел тизимларда аниқлаган.

Республикада проф. К.Т.Алматов (2005) флавоноидларнинг митохондриялар оксидланишли фосфорланиш жараёнлари ва митохондриялар фермент тизимларига таъсири бўйича илмий изланишлар олиб борган. Шунингдек, проф. М.И.Асраров раҳбарлигида митохондрия функционал параметрларига турли биологик фаол моддалар, хусусан, флавоноидларнинг ҳам таъсири тадқиқ этилмоқда. Бироқ флавоноидларнинг жигар митохондриялари ион транспорт тизимларига таъсир механизмлари чуқур ёритилмаган. Шу сабабдан ушбу илмий тадқиқотларни амалга ошириш долзарб илмий-амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф5-Т084 «Митохондриялар транспорти ва метаболик жараёнлар биорегуляторларининг меъёр ва патологиядаги таъсирини тавсифлаш» (2012-2016) мавзусидаги фундаментал лойиҳа, ЎЗР ФА Биоорганик кимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-АЁО-11 «Лютеолин полифенолининг ҳамда унинг ҳосилаларини (цинарозид) циклодекстринлар билан сувда эрийдиган комплексларини олиш усулларини ишлаб чиқиш ва уларни биологик фаолликларини ўрганиш» (2017-2018) мавзусидаги ёшлар илмий лойиҳа доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади каламушлар жигар митохондрияларининг баъзи ион-транспорт тизимларига ва энергетик метаболизмга ўсимлик флавоноидларнинг таъсир механизмларини тавсифлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

in vitro тажрибаларда ороксилин А, лютеолин, пуликарин ва изорамнетин флавоноидларининг каламуш жигар митохондрияларининг Ca^{2+} -боғлиқ РТР га, мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналига таъсирини тавсифлаш;

ороксилин А, лютеолин, пуликарин ва изорамнетин флавоноидларининг каламуш жигар митохондрияларининг нафас олиши ва оксидланишли фосфорланишига таъсирини аниқлаш;

ороксилин А, лютеолин, пуликарин ва изорамнетин флавоноидларининг каламуш жигар митохондрияларида липидларнинг перекисли оксидланишига таъсирини тадқиқ қилиш;

in vitro тажрибаларда каламуш жигар митохондрияларининг мембранаси пассив ўтказувчанлигига ороксилин А, лютеолин, пуликарин ва изорамнетин флавоноидларининг таъсирини аниқлаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида каламуш жигари митохондриялари, РТР, мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канал, ўсимлик флавоноидлари (ороксилин А, лютеолин, пуликарин ва изорамнетин), митохондрия ички мембранаси пассив ион ўтказувчанлиги, липидларнинг перекисли оксидланиши олинган.

Тадқиқотнинг предмети ўсимлик флавоноидларининг мембранафаол хоссалари, уларнинг каламуш жигари митохондриялари функциясига таъсири ҳисобланади.

Тадқиқот усуллари. Тадқиқотларни бажаришда замонавий физиологик, биокимёвий ва биофизик жараёнларни тадқиқ қилишда кенг қўлланиладиган дифференциал центрифугалаш, фотометрия, спектрофотометрия, полярография усулларидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

ороксилин А, лютеолин, пуликарин, изорамнетин флавоноидлари диазоксид каби жигар мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канални фаоллаштириши аниқланган;

каламуш жигар митохондрияларининг Ca^{2+} -га боғлиқ РТР сини очилишини ороксилин А, лютеолин, пуликарин, изорамнетин ингибирлаши исботланган;

митохондрия мембраналарида Fe^{2+} /аскорбат тизими билан индуцирланган липидларнинг перекисли оксидланишини ороксилин А, лютеолин, пуликарин, изорамнетин флавоноидлари билан ингибирланиши исботланган;

ороксилин А ва лютеолин флавоноидлари митохондрия ички мембранасининг H^+ , K^+ , Na^+ ва Ca^{2+} катионлари учун пассив ион ўтказувчанлигини ошириши аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

ороксилин А, лютеолин, пуликарин, изорамнетин флавоноидлари митохондриялар мембранасини стабиллаштирган, улар асосида янги цитопротекторлар яратилиши истикболлари очилган;

флавоноидларни антиоксидант хоссалари янги самарали фармакологик воситалар яратишга асос бўлган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги уларнинг замонавий биофизик тадқиқот усуллари ва асбоб-ускуналари, орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Олинган натижаларнинг исботи, шунингдек, уларнинг тадқиқот натижаларининг рецензияланган илмий нашрларда чоп этилишида экспертларнинг ижобий тақризи билан изоҳланади. Олинган маълумотларни қайта ишлаш Стъудент критерияси ёрдамида ўртача қийматнинг ишончлилиқ интервали оралиқ қийматларини ҳисоблаган ҳолда Origin 6.1 компьютер дастурида (OriginLab Corporation, АҚШ) статистик таҳлил қилинди.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.

Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти флавоноидларнинг митохондриялар мембранасида жойлашган ион каналлари – Ca^{2+} -боғлиқ РТР ва митоK_{АТФ}-каналлини модуляцияловчи механизмларини ёритиш билан изоҳланади. Аниқланган таъсир механизмлар биологик фаол моддаларнинг организмга таъсири тўғрисидаги ҳозирги замон илмий тасаввурларини бойитиш билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, ушбу биологик фаол флавоноидлар юқори антиоксидант моддалар бўлиб, улар асосида янги цитопротекторлар ва дори воситалар яратиш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Флавоноид моддаларни митохондрия функционал тизимларига таъсири буйича олинган натижалар асосида:

флавоноид бирикмаларни аниқланган антиоксидант хоссаларидан Сургут давлат университетининг «Инновационные технологии извлечения, идентификации полифенолов дикоросов ХМАО-Югры и исследование их геропротекторных свойств при возраст-ассоциированных заболеваниях на Севере» мавзусидаги амалий лойиҳасида патологик шароитларда биомембраналарни стабиллашувини аниқлашда фойдаланилган (Сургут давлат университетининг 2019 йил 5 апрелдаги № 12,03/1150-сон маълумотномаси). Натижада флавоноид бирикмаларнинг ёшга доир геропротектор таъсир механизмларини тавсифлаш имконини берган;

лютеолиннинг антиоксидантлик ва РТР ни очилишини ингибирлаш хоссаларидан ФА-Ф6-Т083 рақамли «Юрак ва силлиқ мускул хужайраларини Ca^{2+} -гомеостазини биологик фаол моддалар ёрдамида модуляция йўллариини излаш ва тавсифлаш» мавзусидаги фундаментал лойиҳасида каламуш аорта препаратида флавоноиднинг релаксант таъсирини аниқлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2019 йил 21 февралдаги №4/1255-482 рақамли маълумотномаси). Натижада лютеолиннинг антиоксидант хоссаси ҳамда силлиқ мускул хужайраларида жойлашган L-тип Ca^{2+} -каналлари фаоллигини сусайтирувчи таъсири ўртасидаги боғлиқлик исботланган;

пуликарин флавоноидининг митохондриялар АТФ га боғлиқ калий каналлини фаоллаштириши хоссасидан ФА-Ф6-Т083 рақамли «Юрак ва

силлиқ мускул хужайраларини Ca^{2+} -гомеостазини биологик фаол моддалар ёрдамида модуляция йўллари излаш ва тавсифлаш» мавзусидаги фундаментал лойиҳасида юрак папилляр мускулларига таъсирини тавсифлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2019 йил 21 февралдаги №4/1255-482 рақамли маълумотномаси). Натижада пуликариннинг кардиопротектор фаоллигини тавсифлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари, жумладан 3 та ҳалқаро ва 5 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 13 та илмий иш нашир этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий журналларда 5 та мақола, жумладан, 2 таси республика ва 3 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 109 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, илмий тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устивор йўналишларга мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Митохондрияларда ионлар транспорти ва уларга биологик фаол моддаларнинг таъсир механизмлари**» деб номланган биринчи бобида митохондрияларнинг функционал фаоллиги, хужайра физиологиясидаги уларнинг роли, митохондриялардаги ион-транспорт тизимларининг бошқарилиш механизмлари, Ca^{2+} -боғлиқ РТР ва мито K_{ATP} -каналли тузилиши ва функцияси бўйича замонавий адабиёт маълумотлари таҳлил қилинган. Бундан ташқари флавоноидларнинг жигар митохондриялари функционал параметрларига таъсири баён қилинган

Диссертациянинг «**Митохондриялар функционал ҳолатини аниқлашда тадқиқот материаллари ва усуллари**» деб номланган иккинчи бобида тадқиқотларни олиб бориш босқичлари, уларни бажаришда фойдаланилган материаллар ва усуллар келтирилган. Жумладан, каламуш жигаридан митохондрияларни дифференциал центрифугалаш усулида ажратиш, митохондрия мембранасининг Ca^{2+} -боғлиқ РТР, мито K_{ATP} -каналли фаоллигини аниқлашнинг фотометрик усули, митохондрияларда

липидларнинг перекисли оксидланиш маҳсулотларини аниқлаш, мембраналар пассив ион ўтказувчанлигини фотометрик ўлчаш, митохондрия нафас олиши ва оксидланишли фосфорланишни полярографик аниқлаш усуллари. Шунингдек, митохондриялардаги оксил миқдорини аниқлаш усуллари ва натижаларни статистик қайта ишлаш услуги ёритилган.

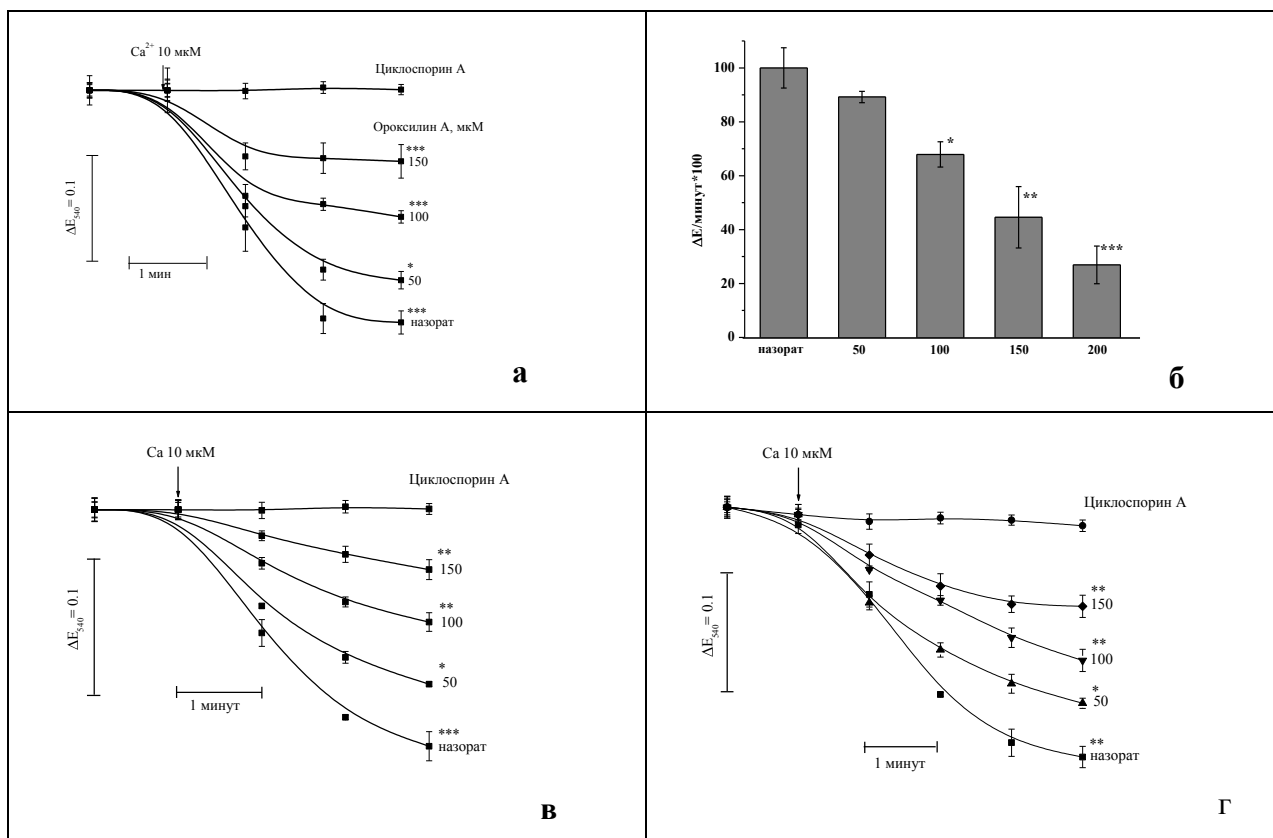
Диссертациянинг «Флавоноидларнинг митохондриялар ион транспорт тизимига таъсир механизмларини тадқиқ қилиш» деб номланган учинчи бобида ороксиллин А, лютеолин, пуликарин, изорамнетин флавоноидларини *in vitro* тажрибаларда каламуш жигари митохондриялари РТР сига, митоK_{АТФ}-каналли фаоллигига ва оксидланишли фосфорланишига таъсири ҳамда митохондрияларда Fe²⁺/аскорбат тизими билан индуцирланган ЛПО га, шунингдек митохондриялар ички мембранасининг пассив ион ўтказувчанлигига таъсири тадқиқ қилинди.

Жигар митохондриялари Ca²⁺-га боғлиқ РТР ҳолатига флавоноидларнинг таъсири¹. Ca²⁺-га боғлиқ РТР ички мембранада жойлашган, табиатан канал бўлиб ички мембранани кесиб ўтади ва мембрана ўтказувчанлиги ўзгаришларини таъминлайди. Ҳайвон ҳужайралари фаолиятида митохондриялар РТР си муҳим аҳамиятга эга бўлиб, у метаболизм ва ион алмашинуви регуляциясида иштирок этади.

In vitro тадқиқотларда митохондрияларнинг CaCl₂ нинг 10 мкМ концентрацияси таъсиридаги бўкиш ҳолатида ороксиллин А, лютеолин, пуликарин ва изорамнетин флавоноидларнинг 50, 100, 150 ва 200 мкМ концентрацияларининг Ca²⁺-боғлиқ РТР га таъсири тадқиқ этилди (1,а-расм). Бунда ороксиллин А флавоноиди 50 мкМ концентрацияда РТР нинг очилишини назоратга нисбатан 18,8% га ингибирлаши аниқланди. Флавоноиднинг 100 ва 150 мкМ концентрациялари таъсирида РТР очилишини, назоратга нисбатан мос равишда – 45,6% ва 69,7% га ингибирлаши аниқланди (1,а-расм). Шундай қилиб, ороксиллин А РТР га ингибирловчи таъсир кўрсатади, бунда флавоноиднинг РТР ни яриммаксимал ингибирловчи (IC₅₀) концентрацияси IC₅₀=108,4±4,5 мкМ ни ташкил этди.

Лютеолиннинг 50 мкМ концентрацияси РТР нинг очилишини, назоратга нисбатан 10,8% га, 100 мкМ концентрацияси эса 32,0% га ингибирлаши аниқланди (1,б-расм). Шунингдек, лютеолиннинг 150 ва 200 мкМ концентрациялари РТР нинг очилишини, назоратга нисбатан мос равишда, 55,4% ва 73,1% га ингибирлаши кўрсатилди. Олиб борилган тажрибалардан маълум бўлдики, лютеолин флавоноиди жигар митохондрияларидаги Ca²⁺-боғлиқ РТР га ингибирловчи таъсир кўрсатиб, унинг яриммаксимал ингибирловчи концентрацияси IC₅₀=137,4±5,3 мкМ ни ташкил этди.

¹ Митохондриялар ион транспорт тизимларига флавоноидларнинг таъсирини ўрганиш бўйича тадқиқотлар б.ф.н. Н.А.Эргашев билан ҳамкорликда бажарилган.



1-расм. Каламуш жигари митохондрияларида Ca^{2+} -боғлиқ РТР га: а) ороксиллин А, б) лютеолин, в) изорамнетин, г) пуликарин флавоноидларнинг таъсири (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,001$; $n=6$).**

Изорамнетиннинг 50 мкМ концентрацияси РТР очилишини 23,9% га ингибирлаши кўрсатилди (1,в-расм). Ушбу флавоноид 100 мкМ ва 150 мкМ концентрацияларида Ca^{2+} -ионлари билан чақирилган РТР очилишини, назоратга нисбатан, мос равишда 44,7% ва 74,3% га ингибирлайди. Шундай қилиб, изорамнетин РТР очилишига ингибирловчи таъсир кўрсатиб, ушбу флавоноиднинг яриммаксимал ингибирловчи концентрацияси $IC_{50}=103,7 \pm 4,5$ мкМ ни ташкил этди.

Тажрибаларда пуликарин флавоноидининг митохондрия РТР сига таъсири ўрганилди ва пуликариннинг 50 мкМ концентрацияси РТР нинг Ca^{2+} -боғлиқ очилишини назоратга нисбатан 21,4% га ингибирлаши аниқланди (1,г-расм). Флавоноиднинг 100 ва 150 мкМ концентрациялари РТР очилишини назоратга нисбатан мос равишда 39,0% ва 60,3% га ингибирлаши аниқланди. Ушбу флавоноиднинг яриммаксимал ингибирловчи концентрацияси $IC_{50}=123,0 \pm 3,5$ мкМ ни ташкил этди.

Демак, юқорида тадқиқ қилинган флавоноидлар (ороксиллин А, лютеолин, пуликарин ва изорамнетин) жигар митохондриялари ички мембранасида жойлашган РТР ҳолатига ингибирловчи таъсир кўрсатар экан. Маълумки, турли патологик ҳолатларда турли хил хужайралар митохондриялари специфик пораси РТР ўтказувчанлигини ўзгариши, яъни очилиши кузатилади. Бунда шуни таъкидлаш керакки, олинган натижалар РТР нинг структуравий элементи бўлган оқсил циклофилин Д нинг ингибирланиши билан изоҳлаш мумкин, чунки ушбу элемент РТР ни

очирилиши ҳамда ёпирилиши бошқариб туради. Шуни қайд этиш лозимки, флавоноидларнинг РТР нинг ингибирловчи хоссаларидан патологик ҳолатларда митохондриялар мембранасидаги турли шикастланишларни коррекцияловчи агент сифатида фойдаланиш истиқболларини очади.

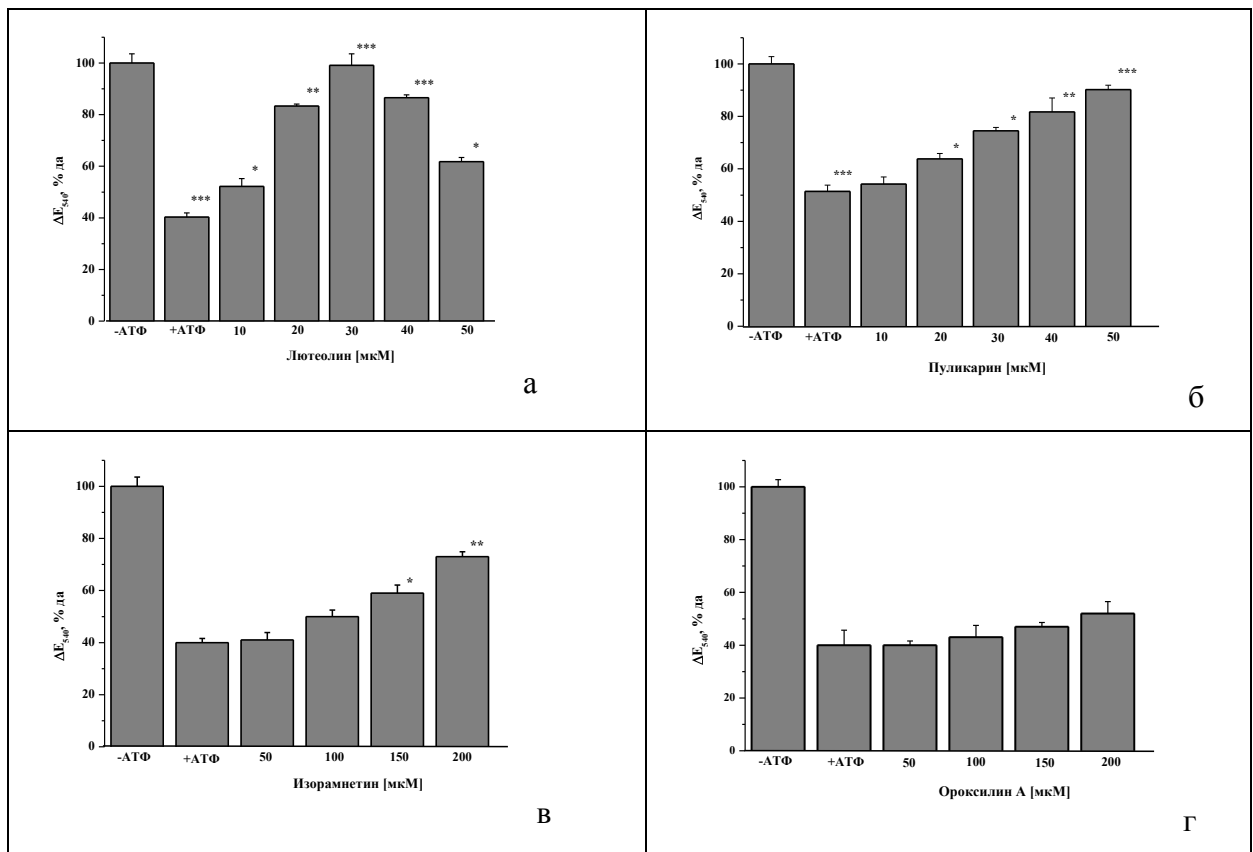
МитоК_{АТФ}-канал фаоллигига флавоноидларнинг таъсири. Маълумки, К⁺ ионларини митохондриялар матриксига ички мембранадан ўтказувчи канал АТФ нинг физиологик концентрацияси таъсирида ингибирланади. Шунга асосан, бу канал митохондриялардаги АТФ га боғлиқ К⁺-канал деб номланган (митоК_{АТФ}-канал) ва ҳозирги вақтда унинг специфик активаторлари – диазоксид, кромакалим, пинацидил аниқланган. МитоК_{АТФ}-канал организмнинг гипоксияга адаптациясида, ишемиядаги кардиопротекцияда, хужайравий жараёнларнинг регуляциясида муҳим роль ўйнагани, шунингдек, турли фармагентлар учун специфик «нишон» бўлганлиги сабабли ушбу канал фаоллигига флавоноидларнинг таъсирини тадқиқ қилдик.

Тажрибаларда пуликарин, изорамнетин ва ороксиллин А флавоноидлари митоК_{АТФ}-канал фаолиятига ўзига хос фаоллаштирувчи таъсир кўрсатиши аниқланди (2-расм). Бунда лютеолин, ушбу флавоноидлардан фарқ қилиб, митоК_{АТФ}-канал фаоллигига икки фазали, яъни ҳам фаоллаштирувчи, ҳам ингибирловчи таъсир кўрсатди. Лютеолин 10, 20 ва 30 мкМ концентрацияларда митоК_{АТФ}-канал фаоллигини, АТФ ингибирлаган ҳолатга нисбатан фаоллаштириши аниқланди. Флавоноиднинг 30 мкМ концентрацияси таъсирида эса энг юқори фаоллиги кузатилди, яъни АТФ иштирокида ингибирланишига нисбатан 2,5 бараварга ошириши намойён бўлди. Лютеолиннинг концентрацияларини янада оширилиши митоК_{АТФ}-канал фаоллигини максимумга нисбатан камайишига олиб келди.

Лютеолиннинг ҳам фаоллаштирувчи, ҳам ингибирловчи таъсири, яъни «гумбазсимон» эффекти айрим флавоноид тутувчи – «Эксралайф», «Бадан» ва «Амла» препаратларида ҳам кузатилган.

Пуликариннинг ушбу каналга эффекти, лютеолиннинг «гумбазсимон» таъсиридан фарқ қилади, яъни флавоноид 20 мкМ концентрацияда митоК_{АТФ}-канал фаоллигини, инкубация муҳитида АТФ мавжудлиги шароитида, 24,7% га ҳамда 30 мкМ концентрацияда 45,2% га оширди (2, б-расм). Пуликарин флавоноиди юқорироқ 40 ва 50 мкМ концентрацияларда ҳам митоК_{АТФ}-канални фаоллаштириши аниқланди: бунда канал фаоллиги, мос равишда, 58,4% га ва 75,1% га ошди (2, б-расм).

Изорамнетин флавоноидининг митоК_{АТФ}-канал фаоллигига таъсири ўрганилганда, ушбу флавоноид 10 мкМ дан 50 мкМ гача бўлган концентрацияларда канал фаоллигига таъсир этмади (2, в-расм). Флавоноиднинг 100 мкМ концентрацияси таъсирида митоК_{АТФ}-канал фаоллиги, канални АТФ ингибирлаган ҳолатга нисбатан, 10,3% га, 150 мкМ концентрацияда эса 19,7% га ва ниҳоят 200 мкМ концентрацияда эса 33,1% га ошириши аниқланди. Олинган натижалардан кўриниб турибдики, изорамнетин юқори концентрацияларда митоК_{АТФ}-каналга фаоллаштирувчи таъсир кўрсатади.



2-расм. Жигар митохондриялари митоK_{АТФ}-канал фаоллигига флавоноидларнинг таъсири: а) лютеолин, б) пуликарин, в) изорамнетин, г) ороксиллин А (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; $n=6$).

Ороксиллин А нинг ўрганилган 50 ва 100 мкМ концентрациялари таъсирида митоK_{АТФ}-канал фаоллигида деярли ўзгариш сезилмади. Аммо флавоноиднинг 150 мкМ концентрацияси таъсирида митоK_{АТФ}-канал фаоллиги 7,1% га, 200 мкМ концентрацияси таъсирида эса 12,4% га фаоллашиши аниқланди (2,г-расм). Олинган натижалардан кўринадики, ороксиллин А юқори концентрацияларда митоK_{АТФ}-канал фаоллигида кучли ўзгаришлар келтириб чиқармас экан. Шундай қилиб, ушбу тадқиқ қилинган флавоноидлар қаторида пуликарин бирикмаси изорамнетин ва ороксиллин А га нисбатан фаол эканлиги аниқланди.

Флавоноидларнинг митохондриялар нафас олиши ва оксидланишли фосфорланишга (ОФ) таъсири. Митохондрияларда ушбу флавоноидларнинг энергетик метаболизмга таъсирини аниқладик (1-жадвал). Лютеолин митохондриялардаги ОФ ва нафас олиш жараёнларига ўзига хос таъсир кўрсатди: 10 мкМ концентрацияда нафас олишни V_3 ҳолатда, назоратга нисбатан 14,5% га камайтирди, V_4 ҳолатда эса 11,5% га ингибирлади. Бунда нафас назорати (НН) ва АДФ/О кўрсаткичлари, назоратга нисбатан камайди. Бироқ, лютеолиннинг концентрацияси 20 мкМ га оширилганда митохондрия нафас олиши V_3 ҳолатда, назоратга нисбатан 12,9% га ҳамда V_4 ҳолатда эса 36,7% га ишонарли ортди. Ушбу ҳолатларда митохондриялар НН ва АДФ/О қийматлари, назоратга нисбатан, мос равишда 17,2% га ва 29,3% га камайди. Флавоноиднинг 40 мкМ концентрациясида нафас олиш V_3 ҳолатда, назоратга нисбатан, 15,1% га

хамда V_4 ҳолатда эса 53,6% га ортганлиги аниқланди. Ушбу ҳолатларда НН ва АДФ/О қийматлари, назоратга нисбатан, мос равишда 25% га ва 45,5% га камайганлиги аниқланди (1-жадвал). Демак, лютеолин жигар митохондриялари нафас олиши ва ОФ ига ўзига хос таъсир кўрсатиб, субстратлар оксидланиши ва АДФ фосфорланишини «юмшоқ ажралиши»га олиб келди.

1-жадвал

Жигар митохондрияларининг нафас олиши ва оксидланишли фосфорланиш жараёнига лютеолиннинг таъсири

Гуруҳлар	V_3	V_4	НН	АДФ/О
Назорат	85,33±5,9	34,91±3,4	2,44±0,15	1,91±0,09
Лютеолин 10 мкМ	74,37±2,5*	31,29±0,5	2,37±0,03	1,82±0,07
Лютеолин 20 мкМ	96,32±4,2*	47,74±3,7*	2,02±0,12*	1,35±0,06*
Лютеолин 40 мкМ	98,24±3,9*	53,63±3,5*	1,83±0,09*	1,04±0,09*

Изоҳ: * – $p < 0,05$; $n=4-5$.

Ороксиллин А кичикроқ концентрацияларда митохондриялар нафас олишини V_3 ва V_4 ҳолатларига деярли таъсир қилмади (2-жадвал). Ушбу флавоноиднинг митохондрия нафас олиши V_3 ҳолатига 30 ва 40 мкМ ларда ҳам таъсири сезилмади. Бироқ, ороксиллин А нинг 30 мкМ концентрацияси нафас олишнинг V_4 ҳолатида, назоратга нисбатан 38% га ишонарли равишда оширди, 40 мкМ концентрацияда эса ушбу кўрсаткични 65,1% га кўпайтирди. Шу билан бирга НН ва АДФ/О кўрсаткичлари флавоноиднинг 30 мкМ концентрацияси таъсирида, назоратга нисбатан, мос равишда 27,2% ва 19,6% га камайиши аниқланди. Ороксиллин А 40 мкМ концентрацияда НН ва АДФ/О кўрсаткичларини, назоратга нисбатан, мос равишда 38,1 ва 22,6% га камайтирди (2-жадвал). Демак, ороксиллин А ҳам, лютеолин сингари, жигар митохондриялари нафас олиши ва ОФ жараёнларига таъсир этиб, уларни «юмшоқ ажралиши»га олиб келади.

2-жадвал

Жигар митохондрияларининг нафас олиши ва оксидланишли фосфорланиш жараёнига ороксиллин А нинг таъсири

Гуруҳлар	V_3	V_4	НН	АДФ/О
Назорат	90,53±4,11	32,18±0,97	2,81±0,13	1,68±0,02
Ороксиллин А 10 мкМ	89,61±5,75	33,35±0,51	2,69±0,15	1,58±0,03**
Ороксиллин А 20 мкМ	85,32±4,53	35,37±1,87	2,41±0,23	1,60±0,02*
Ороксиллин А 30 мкМ	91,77±5,07	44,41±2,42***	2,06±0,20**	1,35±0,10***
Ороксиллин А 40 мкМ	92,54±1,91	53,0±45,30***	1,74±0,12***	1,30±0,08***

Изоҳ: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; $n=4-5$.

Пуликарин 10 мкМ концентрацияда каламуш жигар митохондриялари нафас олишини, назоратга нисбатан V_3 ҳолатини ишончсиз камайтирди, V_4 ҳолатда эса оширди (3-жадвал). Флавоноиднинг 20 мкМ концентрацияси митохондриялар нафас олишини V_3 ҳолатини, назоратга нисбатан ишончли

равишда 13,2% га камайтирди, НН ва АДФ/О коэффициентлари, назоратга нисбатан мос raviшда 17,8% ва 14,0% га ингибирланди. Пуликариннинг 40 мкМ концентрацияси митохондрия нафас олишини метаболик V₃ ҳолатини 15% га ингибирлаган бўлса, V₄ ҳолати эса, аксинча, 15,3% га ортганлиги аниқланди. Бунинг натижасида НН ва АДФ/О қийматлари, назоратга нисбатан, мос raviшда 26,1 ва 32,0% га ингибирлангани аниқланди (3-жадвал). Ушбу флавоноид ҳам жигар митохондриялари нафас олишига ва ОФ жараёнига лютеолин ва ороксиллин А флавоноидлари сингари таъсир кўрсатиши, яъни 2 та уйғунлашган жараёнларнинг тўлиқ ажрамаслиги аниқланди.

3-жадвал

Жигар митохондрияларининг нафас олиши ва оксидланишли фосфорланиш жараёнларига пуликариннинг таъсири

Гуруҳлар	V ₃	V ₄	НН	АДФ/О
Назорат	86,16±5,9	33,94±3,8	2,53±0,11	1,78±0,04
Пуликарин 10 мкМ	83,34±3,1	34,18±2,3	2,44±0,13	1,61±0,05
Пуликарин 20 мкМ	76,13±6,2*	36,51±5,7	2,08±0,18*	1,53±0,09*
Пуликарин 40 мкМ	73,27±4,7**	39,15±1,5*	1,87±0,11**	1,21±0,06**

Изоҳ: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; $n=4-5$.

Кейинги олиб борилган тажрибаларда каламуш жигар митохондриялари ОФ жараёнига изорамнетин флавоноидининг концентрацияга боғлиқ таъсири ўрганилди (4-жадвал). Ушбу флавоноид 10 мкМ концентрацияда жигар митохондриялари нафас олишининг V₃ ҳолатини, назоратга нисбатан 7,7% га ишонарли камайтирди. Бунда НН ва АДФ/О коэффициентлари, назоратга нисбатан мос raviшда 8,2% ва 10,9% га камайганлиги аниқланди. Флавоноиднинг 20 мкМ концентрацияси таъсирида жигар митохондриялари нафас олишининг V₃ ҳолати, назоратга нисбатан 15,9% га ингибирланган бўлса, V₄ ҳолати эса 20,4% га кўпайганлиги аниқланди. Бунда НН ва АДФ/О қийматлари, назоратга нисбатан мос raviшда 30,2% ва 18,1% га камайганлиги кўрсатилди. Флавоноиднинг 40 мкМ концентрацияси таъсирида ОФ жараёнининг V₃ ҳолати 9,6% га ингибирланган бўлса, V₄ ҳолати эса 23,3% га ортганлиги аниқланди. Ушбу ҳолатда НН ва АДФ/О кўрсаткичлари назоратга нисбатан мос raviшда 28,0% ва 38,3% га камайиши кўрсатилди (4-жадвал). Шундай қилиб, изорамнетин ҳам, юқорида ўрганилган флавоноидлар сингари, жигар митохондриялари нафас олиши ва ОФ жараёнларига «юмишқоқ ажратувчи» сифатида таъсир кўрсатади.

**Изорамнетинни жигар митохондриялари нафас олиши ва оксидланишли
фосфорланишига таъсири**

Гуруҳлар	V ₃	V ₄	НН	АДФ/О
Назорат	87,98±3,6	32,83±3,8	2,68±0,14	1,93±0,04
изорамнетин 10 мкМ	81,61±2,2*	33,14±4,3	2,46±0,18	1,72±0,07
изорамнетин 20 мкМ	74,12±4,2**	39,56±2,7*	1,87±0,11*	1,58±0,05*
изорамнетин 40 мкМ	79,66±3,7*	41,13±2,6**	1,93±0,14*	1,19±0,08**

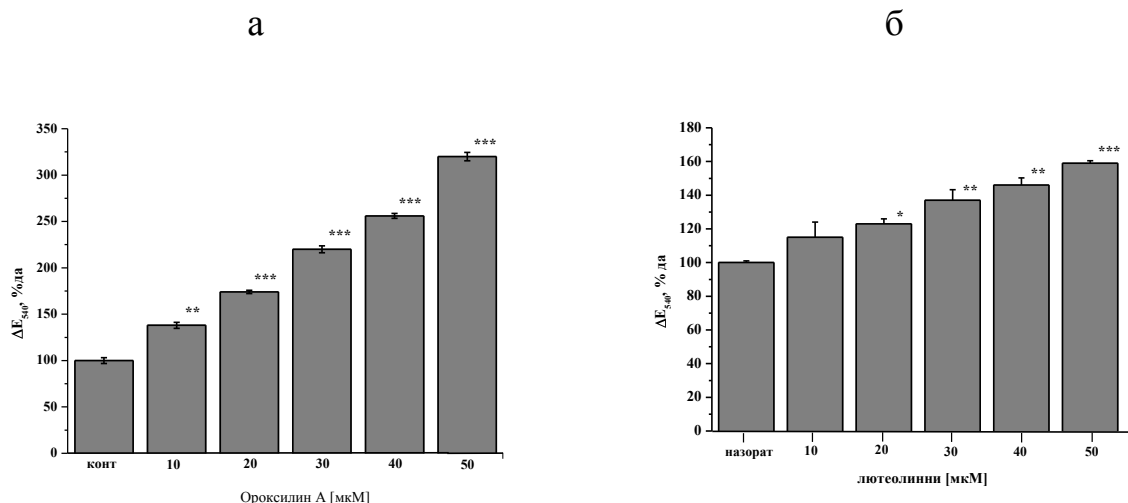
Изоҳ: (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; $n=4-5$).

Олинган натижалар таҳлили шуни кўрсатадики, лютеолин, пуликарин, изорамнетин ва ороксиллин А флавоноидлари, бир томондан, Ca^{2+} -боғлиқ РТР га ингибирловчи таъсир кўрсатиб митохондрия мембраналарини стабиллаштиради, иккинчи томондан эса оксидланиш ва фосфорланиш жараёнларини «юмшоқ» ажратади.

Флавоноидларнинг жигар митохондрияси мембраналари пасив ион ўтказувчанлигига таъсири. Флавоноидларнинг биологик мембраналарга таъсир механизмларини ёритишда, уларнинг пасив ион ўтказувчанлигига таъсирини аниқлаш муҳим бўлганлиги сабабли, кейинги тажрибаларда нитратли изоосмотик муҳитда деэнергияланган митохондриялар ички мембраналарининг H^+ , K^+ , Na^+ ва Ca^{2+} ионлари учун пасив ўтказувчанлигига флавоноидларнинг таъсири ўрганилди. Пуликарин ва изорамнетин каламуш жигари митохондриялари ички мембранасининг тадқиқ этилган катионлар учун пасив ўтказувчанлигига деярли таъсир кўрсатмади.

Ороксиллин А NH_4NO_3 ли изоосмотик муҳитда митохондрия мембранасининг протонлар учун пасив ўтказувчанлигини 10 мкМ концентрацияда, назоратга нисбатан 38 % га, 20 мкМ концентрацияда - 78 % га, 30 мкМ концентрацияда - 120 % га, 40 мкМ концентрацияда - 156 % га, 50 мкМ концентрацияда эса 220 % га оширди (3,а-расм). Ороксиллин А нинг 10 мкМ концентрацияси KNO_3 ли изоосмотик муҳитда, митохондриялар ички мембранаси K^+ ионлари учун ўтказувчанлигини, назоратга нисбатан 45,6% га оширди. Ушбу флавоноиднинг юқори 50 мкМ концентрацияси K^+ - ўтказувчанлигини, назоратга нисбатан 132,5% га оширди. Ороксиллин А нинг, митохондриялар ички мембранасининг Na^+ ионлари учун ҳам пасив ўтказувчанлигини, назоратга нисбатан оширди: ушбу кўрсаткичлар 10 ва 20 мкМ концентрацияларда мос равишда 33 ва 79,3% ни, 30, 40 ва 50 мкМ концентрацияларда эса мос равишда 127,6%, 162,3 ва 190,4% ни ташкил қилди. Митохондрия ички мембранасининг $Ca(NO_3)_2$ ли муҳитда, Ca^{2+} ионлари учун пасив ўтказувчанлигига ороксиллин А нинг таъсири ўрганилганда, ушбу флавоноиднинг 25, 50, 75 ва 100 мкМ концентрациялари Ca^{2+} -ион ўтказувчанлигини, назоратга нисбатан мос равишда, 8,1%, 14,2%, 33,5 ва 41,1 % га ишонарли ошириши аниқланди (3,а-расм). Шундай қилиб, ороксиллин А протонофорлик ва ионофорлик хоссаларини намоён қилди, бу эса ушбу флавоноиднинг оксидланиш ва фосфорланиш жараёнларини ажратиш механизмини изоҳлаб беради.

Лютеолин ҳам ороксиллин А каби митохондрия ички мембранаси пасив ўтказувчанлигини турли ионлар учун оширди. Митохондриянинг протонлар учун пасив ўтказувчанлиги, лютеолиннинг 10 мкМ концентрацияси таъсирида, назоратга нисбатан 34% га, 20 мкМ концентрацияси таъсирида - 54% га, 30, 40 ва 50 мкМ концентрациялари таъсирида эса, мос равишда 111, 165 ва 198% га юқори бўлди. Лютеолиннинг 10 мкМ концентрацияси KNO_3 ли изоосмотик мухитда митохондриялар ички мембранаси K^+ ионлари учун ўтказувчанлигини, назоратга нисбатан 17,6% га оширди. Ушбу флавоноиднинг юқори 50 мкМ концентрацияси K^+ ионлари учун мембрана ўтказувчанлигини, назоратга нисбатан 99,3 % га оширди. Лютеолин ҳам 10 мкМ концентрацияда митохондрия мембранаси Na^+ ионлари учун пасив ўтказувчанлигини, назорат кўрсаткичларига нисбатан, 59,8 % га кўпайтирди. Флавоноиднинг 20, 30, 40 ва 50 мкМ концентрациялари таъсирида митохондрия ички мембранасининг Na^+ ионлари учун пасив ўтказувчанлиги, назоратга нисбатан, мос равишда 125,3%, 180,7%, 233,8% ва 275,2% га ортганлиги аниқланди.



3-расм. Ороксиллин А ва лютеолин флавоноидларининг изоосмотик тузли мухитда жигар митохондриялари мембраналарининг ионлар учун пасив ўтказувчанлигига таъсири. а) ороксиллин А нинг H^+ ионлари учун мембрана ўтказувчанлигига таъсири; б) лютеолиннинг Ca^{2+} ионлари пасив транспортига таъсири (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; $n=6$).

Лютеолин ҳам митохондрия ички мембраналарининг Ca^{2+} ионлари учун пасив транспортига ороксиллин А каби таъсир қилди (3,б-расм). Ушбу флавоноид 10 мкМ концентрацияда митохондрия мембранасининг Ca^{2+} -ўтказувчанлигини, назоратга нисбатан 15,2% га, 20 мкМ концентрацида эса 22,8% га ошириши аниқланди. Лютеолиннинг 30, 40 ва 50 мкМ концентрациялари таъсирида митохондрия пасив Ca^{2+} -ўтказувчанлиги, назоратга нисбатан, мос равишда 36,7%, 46,1% ва 59,4% га ишонарли оширди. Ороксиллин А ва лютеолиннинг иккита молекуласининг 2 та гидроксиль гуруҳи, бизнинг фаразимизча, битта Ca^{2+} ионини бириктириб мембранадан пасив ўтказди.

Ушбу олинган натижалар, яъни флавоноидларни аниқланган протонофорлик ва ионофорлик хоссалари, флавоноидлар таъсиридаги оксидланиш ва фосфорланиш жараёнларининг қисман ажралишининг механизми бўлиши мумкин; ионларнинг митохондрия мембранасидан ташилиши натижасида мембрана потенциали пасайиб кетади ва оксидланишли фосфорланишни ажралишига олиб келади.

Флавоноидларнинг митохондриялар ЛПО жараёнларига таъсири.

Ҳозирги вақтда жаҳоннинг етакчи лабораторияларида оксидатив стресс ва ЛПО натижасида келиб чиққан зарарли жараёнларни ингибирлаш, турли патологиялардаги мембранавий бузилишларни коррекция қилиш мақсадида флавоноидларнинг мембраналарга таъсир механизмлари кенг қамровли ўрганилмоқда.

Таҷрибаларда *in vitro* шароитда, Fe^{2+} /аскорбат тизими иштирокида митохондрия мембраналарида МДА ҳосил бўлиш жараёнига ороксилин А, лютеолин, пуликарин ва изорамнетин флавоноидларининг турли концентрацияларининг таъсири аниқланди. Ороксилин А флавоноидининг 4 мкМ концентрацияси Fe^{2+} /аскорбат чақирган МДА ҳосил бўлиши, назоратга нисбатан 16,4% га, 12 мкМ концентрацияда эса 34,1% га, 20 мкМ концентрацияда 65,7% га ва 28 мкМ концентрацияда 86,3% га ингибирлаши аниқланди. Шундай қилиб, ороксилин А, Fe^{2+} /аскорбат тизими иштирокида чақирилган ЛПО жараёни индукциясини концентрацияга боғлиқ равишда камайтиради; флавоноиднинг яриммаксимал ингибирловчи концентрацияси қиймати $IC_{50} = 15,6 \pm 2,4$ мкМ ни ташкил қилди.

Лютеолиннинг 4 мкМ концентрацияси каламуш жигари митохондрияларида Fe^{2+} /аскорбат чақирган МДА ҳосил бўлишини, назоратга нисбатан 18,0% га, 12 мкМ концентрацияда 52,0% га, 20 мкМ ва 28 мкМ концентрацияларда эса мос равишда 80,8% ва 92,1% га ингибирлади. Флавоноиднинг ЛПО жараёнининг яриммаксимал ингибирловчи концентрацияси $IC_{50} = 11,2 \pm 3,2$ мкМ ни ташкил қилиши аниқланди.

Навбатдаги таҷрибаларда митохондриялар моделида пуликарин флавоноидининг антиоксидант хоссалари аниқланди. Митохондрияларда Fe^{2+} /аскорбат тизими чақирган МДА ҳосил бўлишини, пуликарин 4 мкМ концентрацияда назоратга нисбатан 6,0% га, 12 мкМ концентрацияда эса 26,1% га, 20 ва 28 мкМ концентрацияларда, мос равишда 50,0 ва 80,5% га камайтирди. Пуликарининг ЛПО жараёнини яриммаксимал ингибирловчи концентрацияси $IC_{50} = 20,0 \pm 2,2$ мкМ ни ташкил этди.

Изорамнетиннинг Fe^{2+} /аскорбат тизими чақирган МДА ҳосил бўлиш жараёнига таъсири ўрганилганда, ушбу флавоноиднинг 4, 12, 20 28 мкМ концентрациялари ЛПО жараёнини, назоратга нисбатан, мос равишда 14,2, 40,0%, 79,1 ва 97,3% га ингибирлаши аниқланди. Ушбу флавоноиднинг таъсир эттирилган концентрациялари диапозонида унинг яриммаксимал ингибирловчи концентрацияси $IC_{50} = 13,6 \pm 5,6$ мкМ га тенг бўлди.

Адабиётлардан маълумки, флавоноидлар кимёвий структурасида гидроксил гуруҳларнинг мавжуд бўлиши кислород фаол шакллари – супероксид радикал (O_2^-), водородпероксид (H_2O_2) ва гидроксил

радикалларни (OH^-) нейтраллаш қобилиятини белгилаб беради. Кверцетин билан олинган квант кимёвий ҳисоб-китобларга кўра, флавоноид халқасининг 4'-, 3'- ва 3-гидроксил гуруҳлари радикаллар билан реакцияга фаол киришади. Тадқиқотларимизда ўрганилган флавоноидларнинг структурасидаги гидроксил гуруҳларнинг жойлашиш ўрни бўйича кверцетинга яқинроғи пуликарин ва изорамнетин бўлиб, пуликарин структурасида кверцетинга ўхшаш 4'-, 3'- ва 3-гидроксил гуруҳлар ўрнида метокси гуруҳлар жойлашган, изорамнетин эса бевосита кверцетиннинг ҳосиласи бўлиб, 3'-ҳолатда метокси гуруҳи жойлашган. Бу иккала флавоноид структуравий тузилишидан келиб чиқадиган бўлсак, кверцетинга ўхшаш таъсирга эга эканлигини кўраимиз. Ушбу флавоноидлар *in vitro* тадқиқотларда Fe^{2+} /аскорбат тизими бўйича чақирилган ЛПО натижасида каламуш жигар митохондрияларида МДА ҳосил бўлиш жараёнини пуликарин 80,0% га, изорамнетин эса 97,3% га ингибирлаши аниқланди. Бундан кўриниб турибдики, изорамнетин пуликарин флавоноидига нисбатан юқори антиоксидант фаоллигига эга. Лютеолин ва ороксиллин А флавоноидлари структуравий тузилиши ва гидроксил гуруҳларнинг жойлашиши ва сони бўйича кверцетиндан фарқ қилади. Бироқ лютеолин флавоноиди структурасида гидроксил гуруҳларнинг кўплиги билан ороксиллин А флавоноидидан антиоксидант таъсири бўйича устунлиги кўзга ташланади. Лютеолин флавоноидининг структурасидаги 4'- ва 3'-ҳолатлардаги гидроксил гуруҳлар кверцетин структурасига мос келади. Аниқланишича, ушбу ҳолатдаги гидроксил гуруҳлар радикаллар билан фаолроқ реакцияга киришиб, уларни нофаол ҳолатга ўтказишади. Шундан бўлса керак, лютеолин флавоноиди *in vitro* тадқиқотларда антиоксидант фаоллигини ўрганиш Fe^{2+} /аскорбат тизими бўйича чақирилган липидларнинг перекисли оксидланиши натижасида каламуш жигар митохондрияларида МДА ҳосил бўлиш жараёнини 92,1% га ингибирлаши аниқланди. Бироқ ороксиллин А структурасидаги гидроксил гуруҳларнинг камлиги ва уларни 5-, 6- ва 7-ҳолатларда жойлашиши ҳамда шу билан кверцетин структурасидаги гидроксил гуруҳларни жойлашишига нисбатан фарқ қилиши ушбу флавоноидни *in vitro* тадқиқотларда Fe^{2+} /аскорбат тизими бўйича чақирилган липидларнинг перекисли оксидланиши натижасида каламуш жигар митохондрияларида МДА ҳосил бўлиш жараёнини 86,0% га ингибирлаши аниқланди.

Шундай қилиб, ўрганилган флавоноидлар митохондриялар дисфункциясига боғлиқ патологияларнинг ривожланишини олдини олиб, мембраналарга специфик коррекцияловчи таъсир кўрсатади.

ХУЛОСАЛАР

1. Изорамнетин, лютеолин, ороксиллин А ва пуликарин флавоноидлари *in vitro* шароитда митохондриялар мембраналари Ca^{2+} -боғлиқ РТР ни ингибирлайди, уларнинг ярим максимал (IC_{50}) концентрациялари

лютеолин флавоноиди учун $137,4 \pm 5,3$ мкМ ни, изорамнетин флавоноиди учун $103,70 \pm 3,5$ мкМ ни, ороксиллин А флавоноиди учун $108,4 \pm 4,5$ мкМ ни ва пуликарин флавоноиди учун эса $123,0 \pm 3,5$ мкМ ни ташкил этади. Флавоноидларнинг митохондрия РТР сини очилишини ингибирлаши, уларни митохондрия функциясига таъсир қилиш механизмларидан бири бўлиши мумкин.

2. Изорамнетин ва пуликарин флавоноидлари каламуш жигари митохондриялар мембранасида жойлашган митоK_{АТФ}-канал фаоллигини концентрацияга боғлиқ равишда фаоллаштиради, бу эса гипоксия, ишемия ва реперфузия ҳолатларида тўқималарнинг зарарланишини олдини олишда муҳим роль ўйнаши мумкин. Лютеолин флавоноиди эса қуйи 10-30 мкМ концентрацияларда митоK_{АТФ}-канални фаоллаштириб, юқорироқ 40-50 мкМ концентрацияларда ушбу канал фаоллигини максимумига нисбатан ингибирлайди.

3. Тадқиқ этилган лютеолин ҳамда ороксиллин А флавоноидлари митохондриялар ички мембранасининг K⁺, Na⁺, H⁺ ва Ca²⁺ ионлари учун пассив ўтказувчанлигини оширади. Ушбу натижалар флавоноидлар таъсиридаги оксидланиш ва фосфорланиш жараёнларининг қисман ажралишининг механизми бўлиши мумкин.

4. Изорамнетин ва пуликарин флавоноидлари каламуш жигар митохондриялари нафас олиши ва оксидланишли фосфорланиш жараёнларига самарали таъсир этади. Лютеолин ва ороксиллин А флавоноидлари эса оксидланиш ва фосфорланиш жараёнларининг қисман ажралишига олиб келади.

5. Изорамнетин, лютеолин, ороксиллин А ва пуликарин флавоноидлари митохондрия мембранасида Fe²⁺/аскорбат билан чақирилган липидларнинг перекисли оксидланишини ингибирлайди. Ушбу флавоноидларнинг *in vitro* шароитида жигар митохондриялари мембраналарида антиоксидантлик фаолликлари қуйидаги қатор бўйича бўлиши аниқланди: изорамнетин > лютеолин > ороксиллин А > пуликарин.

6. Изорамнетин, лютеолин, ороксиллин А ва пуликарин флавоноидларнинг митохондриялар ион транспорт тизимлари тўғрисида олинган маълумотлар, митохондриялар дисфункцияси билан боғлиқ бўлган патологияларни даволаш учун самарали дори воситаларини яратишга назарий асос бўлади.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.03/30.12.2019.B.01.13 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ БИОФИЗИКИ И
БИОХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА УЗБЕКИСТАНА**

ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ

КОМИЛОВ ЭСОХОН ЖУРАЕВИЧ

**МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ ФЛАВОНОИДОВ НА ИОН-
ТРАНСПОРТИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ МИТОХОНДРИЙ**

03.00.08–Физиология человека и животных

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD) ПО
БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент–2020

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.2. PhD/B72

Диссертация выполнена в Институте биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана имени Мирзо Улугбека.

Автореферат диссертации на трех языках (русский, узбекский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (ibb-nuu.uz) и Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

Научный руководитель: **Асраров Музаффар Исламович**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Шахмурова Гульнара Абдуллаевна**
доктор биологических наук, профессор

Кулкарарев Абдисалим Каримович
кандидат медицинских наук, доцент

Ведущая организация: **Андижанский государственный университет**

Защита диссертации состоится «14» ИЮНЬ 2020 года в 16⁰⁰ часов на заседании Научного совета DSc.03/30.12.2019.B.01.13 при Институте биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана (Адрес: 100174, г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская 174. Тел.: (+99871) 246-68-96.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана (зарегистрирована под № 13). Адрес: 100174, г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская 174. Тел.: (+99871) 246-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru

Автореферат диссертации разослан: «12» ИЮНЬ 2020 г.
(реестр протокола рассылки № 1 от «12» ИЮНЬ 2020 г.)



Р.З. Сабиров
Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., академик

Р.Ш. Курбанназарова
Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученых степеней д.б.н.

И.Г. Ахмеджанов
Председатель научного семинара при Научном
совете по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. На сегодняшний день в мире одной из актуальных задач является поиск и внедрение новых эффективных фармакологических средств для лечения сердечно-сосудистых, эндокринных, онкологических, нервных и других заболеваний. В связи с тем, что лекарственные средства на основе природных соединений являются более безопасными и эффективными по сравнению с синтетическими аналогами, большое внимание уделяется химическим соединениям полифенолов при разработке новых лекарств. Также, важно определить механизмы действия полифенольных соединений, которые составляют основу лекарств, на клеточном, митохондриальном и молекулярном уровнях.

В последние годы в ведущих научных центрах мира на основе различных растительных флавоноидов разработаны новые эффективные фармакологические препараты. Выявлены антиоксидантные и антигипоксантные свойства данных препаратов, а также показано их влияние на клеточные, апоптотические и мембранные процессы. В настоящее время при создании новых фармагентов, необходимо выявлять механизмы их действия на биомембраны, митохондрии в различных патологических состояниях и коррекции мембранных нарушений.

В настоящее время в нашей стране особое внимание уделяется разработке перспективных лекарственных средств на основе растительных полифенолов. При этом выявлены фармакологические свойства множества флавоноидов, их действие на различные клеточные и физиологические процессы, протекающие в организме. Однако до сих пор не выяснены механизмы их действия на организм на молекулярном и мембранном уровнях. В четвертом направлении Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан определены задачи, направленные на «дальнейшее развитие фармацевтической промышленности, улучшение обеспечения населения доступными качественными лекарственными средствами и медицинскими учреждениями....». В реализации поставленных задач особую роль играют исследования, направленные на установления механизмов действия растительных полифенолов на мембранные и митохондриальные процессы, коррекции флавоноидами мембранных нарушений и создание новых фармакологических средств на основе изученных полифенолов.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит решению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 года «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан» № УП-4947 и в Постановлении

¹ Указ Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 года «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан» № УП-4947.

Президента Республики Узбекистан от 14 февраля 2018 года «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли» ПП-3532, а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики VI «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы. В настоящее время в ведущих научных центрах мира проводятся исследования по выяснению механизмов действия растительных флавоноидов на биологические мембраны и протекающие в них процессы. В частности, A. Choi и соавторы на нейробластомах (2011), Q. Chen и соавторы (2012), G. Seelinger и соавторы (2008) на карциномах показали, что лютеолин индуцирует апоптоз и активирует различные ферменты каспазы. Кроме этого, Qiao и соавторы (2016) показали, что флавоноид ороксиллин А проявляет антиканцерогенную активность, контролируя белки, которые разобщают процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях.

В странах СНГ под руководством проф. Г.Д. Мироновой (2008, 2011) исследовано влияние флавоноидсодержащих препаратов на АТФ-зависимый K^+ - канал ((мито K_{ATP} -канал) в митохондриях. Кроме того, А. М. Попов и коллеги (2016) определили антиоксидантные и мембранотропные свойства лютеолина в различных модельных системах.

В нашей республике проф. Алматов К.Т. (2005) провел исследование по действию флавоноидов на процесс окислительного фосфорилирования и на ферментные системы митохондрий. Кроме того, под руководством проф. М.И. Асрарова исследуется влияние различных биологически активных веществ, в том числе и флавоноидов, на функциональные параметры митохондрий. Однако механизмы влияния флавоноидов на ион-транспортные системы митохондрии печени недостаточно изучены. Поэтому проведение этих научных исследований имеет большое научное и практическое значение.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательской работы фундаментального проекта Института биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана ФА-Ф5-Т084 «Характеристика влияния биорегуляторов транспорта и метаболических процессов митохондрий в норме и патологии» и молодёжного прикладного проекта Института биоорганической химии АН ФА-АЁО-11 «Разработка оптимального метода получения водорастворимых комплексов включения лютеолина и его производного цинарозида с циклодекстринами и изучение их биологической активности» (2017-2018).

Целью исследования является охарактеризовать механизмы действия растительных флавоноидов на некоторые ион-транспортующие системы и энергетический метаболизм митохондрий печени крыс.

Задачи исследования:

охарактеризовать действие флавоноидов ороксилена А, лютеолина, пуликарина и изорамнетина на Ca^{2+} -зависимую РТР, мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канал митохондрий печени крыс в экспериментальных условиях *in vitro*;

определить влияние флавоноидов ороксилена А, лютеолина, пуликарина и изорамнетина на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий в печени крыс;

исследовать влияние флавоноидов ороксилена А, лютеолина, пуликарина и изорамнетина на ПОЛ в митохондриях печени крыс;

выявить эффект флавоноидов ороксилена А, лютеолина, пуликарина и изорамнетина на пассивную проницаемость мембран митохондрий печени крыс в условиях *in vitro*.

Объектами исследования являются митохондрии печени крыс, РТР, мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канал, флавоноиды растений (ороксилена А, лютеолин, пуликарин и изорамнетин), пассивная ионная проницаемость внутренней мембраны митохондрий, перекисное окисление липидов.

Предметом исследования являются мембраноактивные свойства флавоноидов растений, их влияние на функцию митохондрий печени крыс.

Методы исследования. В ходе исследования использованы современные методы биофизики, биохимии и физиологии, такие как дифференциальное центрифугирование, фотометрия, спектрофотометрия, полярография.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

установлено, что флавоноиды ороксилена А, лютеолин, пуликарин, изорамнетин активируют мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канал печени подобно диазоксиду;

доказано ингибирование ороксипином А, лютеолином, пуликарином, изорамнетином открывание Ca^{2+} -зависимой РТР митохондрий печени крыс;

доказано ингибирование флавоноидами ороксипином А, лютеолином, пуликарином, изорамнетином перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий, индуцированного системой Fe^{2+} /аскорбат;

установлено увеличение пассивной ионной проницаемости мембраны митохондрий для катионов H^+ , K^+ , Na^+ и Ca^{2+} ороксипином А и лютеолином.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

флавоноиды ороксилена А, лютеолин, пуликарин и изорамнетин стабилизируют мембраны митохондрий, что открывает перспективы для разработки новых цитопротекторов;

антиоксидантные свойства флавоноидов послужат основанием для создания новых эффективных фармакологических средств.

Достоверность результатов исследований подтверждается тем, что они получены с применением современных биофизических методов и приборов. Подтверждением достоверности полученных данных служат также оценки экспертов, полученные при опубликовании результатов этих

исследований в рецензируемых научных журналах. Для статистической обработки достоверности различий в сравниваемых показателях использовали коэффициент Стьюдента, компьютерные программы Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США).

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования обусловлена выяснением механизмов модуляции флавоноидами ионных каналов, локализованных в митохондриальной мембране - Ca^{2+} -зависимой РТР и мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канала. Обнаруженные механизмы действия характеризуются обогащением современных научных представлений о воздействии биологически активных веществ на организм.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что данные биологически активные флавоноиды проявляют высокие антиоксидантные свойства, что позволяет на их основе разработать новые цитопротекторы и лекарственные средства.

Внедрение результатов исследований. На основании полученных результатов подействию флавоноидов на функциональные параметры митохондрий:

антиоксидантные свойства исследованных соединений использованы при определении стабилизации биомембран в условиях патологии в рамках прикладного проекта Сургутского государственного университета «Инновационные технологии извлечения, идентификации полифенолов дикоросов ХМАО-Югры и исследование их геропротекторных свойств при возраст-ассоциированных заболеваниях на Севере» (справка Сургутского государственного университета от 5 апреля 2019 года № 12, 03/1150). В результате удалось охарактеризовать механизмы геропротекторного действия флавоноидных соединений в зависимости от возраста;

антиоксидантные и РТР-ингибирующие свойства лютеолина были использованы для идентификации релаксантных эффектов флавоноидов в препаратах аорты крыс в фундаментальном проекте ФА-Ф6-Т083 «Характеристика и поиск методов модуляции Ca^{2+} -гомеостаза клеток сердца гладких мышц биологически активными соединениями» (справка от 21 февраля 2012 г. № 4 / 1255-482 Академии наук Республики Узбекистан). В результате стало возможным доказать взаимосвязь между антиоксидантным свойством и ингибирующим действием лютеолина на активность Ca^{2+} -каналов L-типа гладкомышечных клеток.

свойство флавоноида пуликарина активировать активность АТФ зависимого калиевого канала митохондрий было использовано при характеристике его эффектов на папиллярные мышцы сердца в фундаментальном проекте ФА-Ф6-Т083 «Характеристика и поиск методов модуляции Ca^{2+} - гомеостаза клеток сердца гладких мышц биологически активными соединениями» (справка от 21 февраля 2012 г. № 4 / 1255-482 Академии наук Республики Узбекистан). В результате стало возможным охарактеризовать кардиопротекторное свойство пуликарина.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований были

обсуждены на 3 международных и 7 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 4 научных статей, в том числе 2 в республиканских и 2 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, выводов, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 109 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновываются актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, научно-практическая значимость полученных результатов, внедрение результатов исследования в практику, приведены сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Транспорт ионов в митохондриях и механизмы действия на них биологически активных веществ**» анализируется современная литература, посвященная функции митохондрий, их роли в физиологии клеток, механизмы регуляции ион транспортных систем в митохондриях, структура и функция Ca^{2+} -зависимой РТР, а также мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канала. Кроме того, описано влияние флавоноидов на функциональные параметры митохондрий.

Во второй главе диссертации «**Материалы и методы исследования функционального состояния митохондрий**» приведены этапы исследования, материалы и методы, использованные при выполнении данной работы. В частности, метод выделения митохондрий из печени крыс дифференциальным центрифугированием, фотометрический метод определения активности Ca^{2+} -зависимой РТР и активности мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канала, фотометрический метод исследования пассивной ионной проницаемости мембран, биохимический метод определения продуктов ПОЛ в митохондриях, полярографический метод измерения дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях. Описаны методы количественного определения содержания белка в митохондриях и методы статистической обработки результатов.

Третья глава диссертации под названием «**Механизмы влияния флавоноидов на ион-транспортирующую систему митохондрий**» посвящена *in vitro* исследованиям по влиянию флавоноидов ороксилена А, лютеолина, пуликарина, изорамнета на активность РТР митохондрий печени крыс, активность мито $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канала, на дыхание и окислительное фосфорилирование, а также на процесс ПОЛ, индуцированного Fe^{2+} /аскорбат

системой, а также на пассивную ионную проводимость внутренней мембраны митохондрий.

Влияние флавоноидов на состояние Ca^{2+} -зависимой РТР митохондрий печени¹. Ca^{2+} -зависимая РТР митохондрий, локализованная во внутренней мембране, представляет собой канал, проходящий через внутреннюю мембрану; обеспечивает изменение проницаемости мембраны. РТР митохондрий играет важную роль в деятельности животных клеток, она участвует в регуляции метаболизма и ионного гомеостаза.

В экспериментах *in vitro* было изучено влияние флавоноидов ороксилена А, лютеолина, пуликарина и изорамнетина в концентрациях 50, 100, 150 и 200 мкМ на открывание Ca^{2+} -зависимой РТР, индуцированное 10 мкМ $CaCl_2$ (рис. 1,а). При этом установлено, что ороксилин А при концентрации 50 мкМ ингибирует открывание РТР на 18,8% по сравнению с контролем. Ороксилин А при концентрациях 100 и 150 мкМ подавляет открывание РТР по сравнению с контролем на 45,6% и 69,7%, соответственно (рис. 1, а). Таким образом, ороксилин А оказывает ингибирующее влияние на РТР в митохондриях печени крыс, при этом полумаксимальная концентрация ингибирования (IC_{50}) РТР для флавоноида составляет $IC_{50}=108,4\pm 4,5$ мкМ.

Лютеолин при концентрации 50 мкМ ингибирует открывание РТР на 10,8% по сравнению с контролем, а при концентрации 100 мкМ ингибирование РТР фиксировалось на уровне 32,0% (рис.1,б). Также было показано, что лютеолин в концентрациях 150 и 200 мкМ ингибирует открытие РТР по сравнению с контролем на 55,4% и 73,1%, соответственно. По результатам полученных данных установлено, что лютеолин оказывает ингибирующее действие на РТР митохондрий с полумаксимальной ингибирующей концентрацией $IC_{50} = 137,4\pm 5,3$ мкМ.

Изорамнетин при концентрации 50 мкМ ингибирует открывание РТР на 23,9 % по сравнению с контролем (рис. 1,в). Данный флавоноид при концентрациях 100 мкМ и 150 мкМ ингибирует открытие РТР по сравнению с контролем на 44,7% и 74,3%, соответственно. Таким образом, изорамнетин оказывает ингибирующее действие на открывание РТР с полумаксимальной ингибирующей концентрацией $IC_{50}=103,7\pm 4,5$ мкМ.

Далее было исследовано влияние пуликарина на Ca^{2+} -зависимую РТР митохондрий печени и показано, что при концентрации 50 мкМ пуликарин ингибирует набухание митохондрия в этих же условиях на 21,4% по сравнению с контролем (рис. 1,г). Данный флавоноид в концентрациях 100 и 150 мкМ ингибирует открывание РТР по сравнению с контролем на 39,0% и 60,3%, соответственно. Полумаксимальная ингибирующая концентрация пуликарина была равна к $123,0 \pm 3,5$ мкМ.

¹ Влияние флавоноидов на ион-транспортующие системы митохондрий изучено вместе с к.б.н. Н.А.Эргашевым.

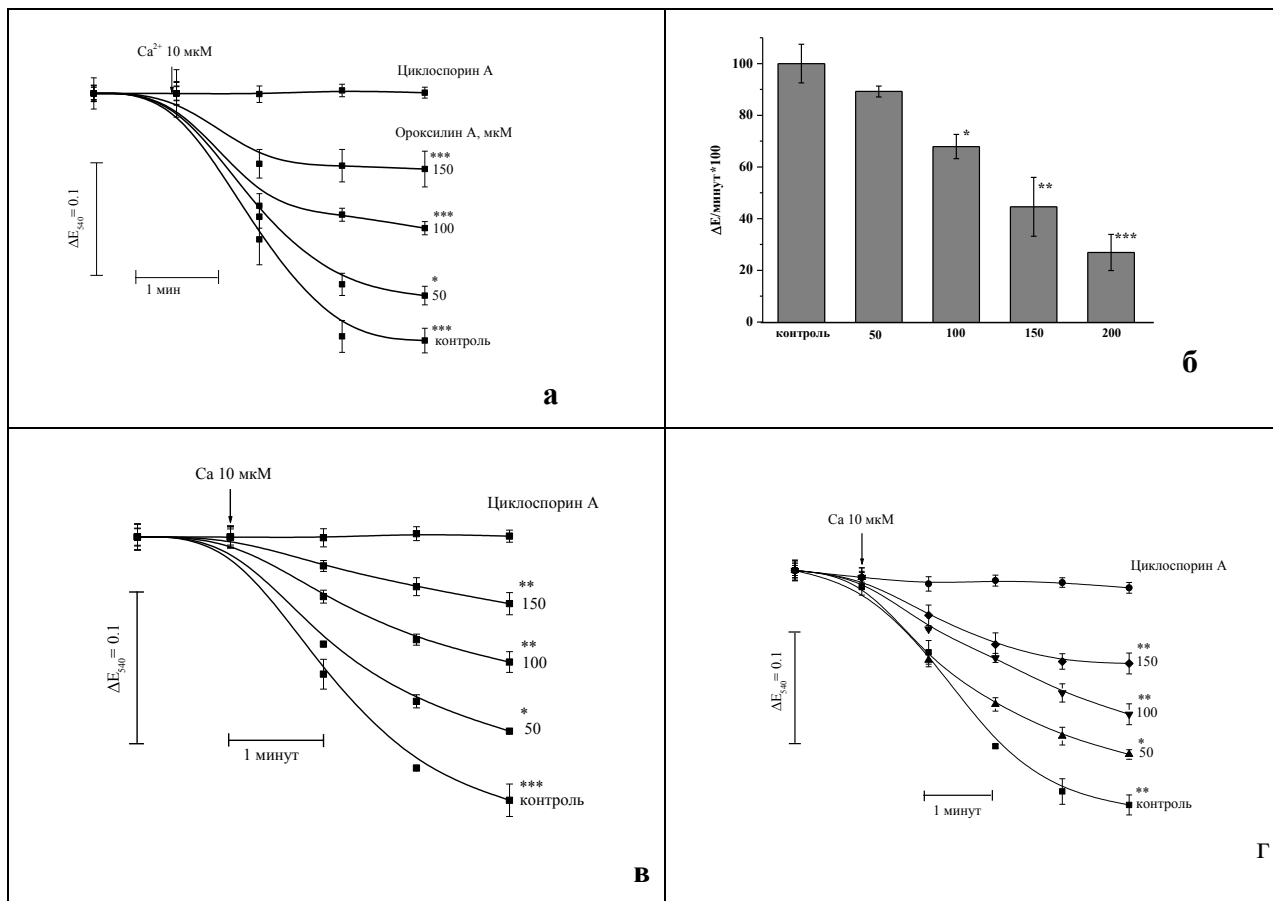


Рис.1. Влияние флавоноидов на состояние Ca^{2+} -зависимой РТР митохондрий печени: а) ороксиллин А, б) лютеолин, в) изорамнетин, г) пуликарин (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; $n=6$).

Следовательно, выше изученные флавоноиды - ороксиллин А, лютеолин, пуликарин и изорамнетин оказывают ингибирующее действие на состояние Ca^{2+} -зависимой РТР внутренней мембраны митохондрий печени. Известно, что при различных патологических состояниях наблюдается изменение проницаемости РТР, т.е. открывание её в митохондриях различных типов клеток. Следует отметить, что обнаруженный нами эффект флавоноидов на РТР можно объяснить ингибированием ими активности структурного элемента мегапоры - белка циклофилина D, который регулирует открывание и закрытие РТР. Необходимо отметить, что ингибирующие свойства данных флавоноидов открывают возможность использования их в качестве агентов для коррекции различных нарушений в митохондриальной мембране при патологических состояниях.

Влияние флавоноидов на активность мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -канала. Известно, что канал, пропускающий ионы K^+ через внутреннюю мембрану митохондрий в матрикс митохондрий, ингибируется физиологическими концентрациями АТФ. В связи с этим этот канал получил название АТФ-зависимый K^+ -канал митохондрий (мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -канал) и в настоящее время установлены его специфические активаторы - диазоксид, кромакалим, пинацидил. В связи с тем, что мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -канал играет важную роль в адаптации организма к гипоксии, в кардиопротекции при ишемии, в регуляции клеточных процессов

клетки, а также является специфической «мишенью» для различных фармагентов, изучали влияние флавоноидов на активность данного канала.

В экспериментах было показано, что флавоноиды пуликарин, изорамнетин и ороксиллин А оказывают специфическое активирующее влияние на активность митоK_{АТФ}-канала (рис. 2). В то же время лютеолин, в отличие от других флавоноидов, оказывает двухфазное, т.е. как активирующее, так и ингибирующее действие на активность канала. Лютеолин в концентрациях 10, 20 и 30 мкМ увеличивал активность митоK_{АТФ}-канала по сравнению с ингибированным АТФ состоянием. При концентрации флавоноида 30 мкМ наблюдалась самая высокая активность канала, которая увеличивалась до 2,5 раза по сравнению с контролем. Дальнейшее повышение концентрации лютеолина приводило к снижению активности митоK_{АТФ}-канала по сравнению с максимумом. Как активирующий, так и ингибирующий эффект лютеолина, т.е. его «куполообразное» действие наблюдалось ранее и для также некоторых флавоноид содержащих препаратах экстралайф, бадан и амла.

Эффект пуликарина на данный канал отличался от «куполообразного» эффекта лютеолина, т.е. при концентрации пуликарина 20 мкМ, в присутствии АТФ в инкубационной среде, активность митоK_{АТФ}-канала увеличилась на 24,7%, а при концентрации 30 мкМ - на 45,2% (рис.2,б). Пуликарин активировал митоK_{АТФ}-канал и в более высоких концентрациях 40 и 50 мкМ: при этом наблюдалось увеличение активности канала, по сравнению с ингибированным АТФ состоянием, на 58,4% и 75,1%, соответственно (рис.2,б).

При изучении влияния изорамнетина на активность митоK_{АТФ}-канала показано, что исследуемый флавоноид в концентрациях от 10 мкМ до 50 мкМ не влияет на активность канала (рис. 2, в). Обнаружено, что активность митоK_{АТФ}-канала увеличивается при действии флавоноида в концентрации 100 мкМ в инкубационной среде на 10,3% по сравнению с ингибированным с АТФ состоянием, а при 150 мкМ - на 19,7% и, наконец при 200 мкМ - на 33,1%. Результаты показывают, что изорамнетин в более высоких концентрациях также оказывает активирующее действие на митоK_{АТФ}-канал.

При исследовании действия ороксиллина А в концентрациях 50 и 100 мкМ на активность митоK_{АТФ}-канала показано, что изменений в активности данного канала не наблюдается (рис. 2, г). Однако было обнаружено, что активность митоK_{АТФ}-канала увеличивается, по сравнению с контролем, на 7,1% при концентраций 150 мкМ и на 12,4% при концентрации флавоноида 150 мкМ. Результаты показывают, что флавоноид ороксиллин А в более высоких концентрациях оказывает слабое влияние на активность митоK_{АТФ}-канала (рис. 2, г). Таким образом, среди исследованных флавоноидов, пуликарин обладает более выраженным эффектом на митоK_{АТФ}-канал по сравнению с изорамнетином и ороксиллином А.

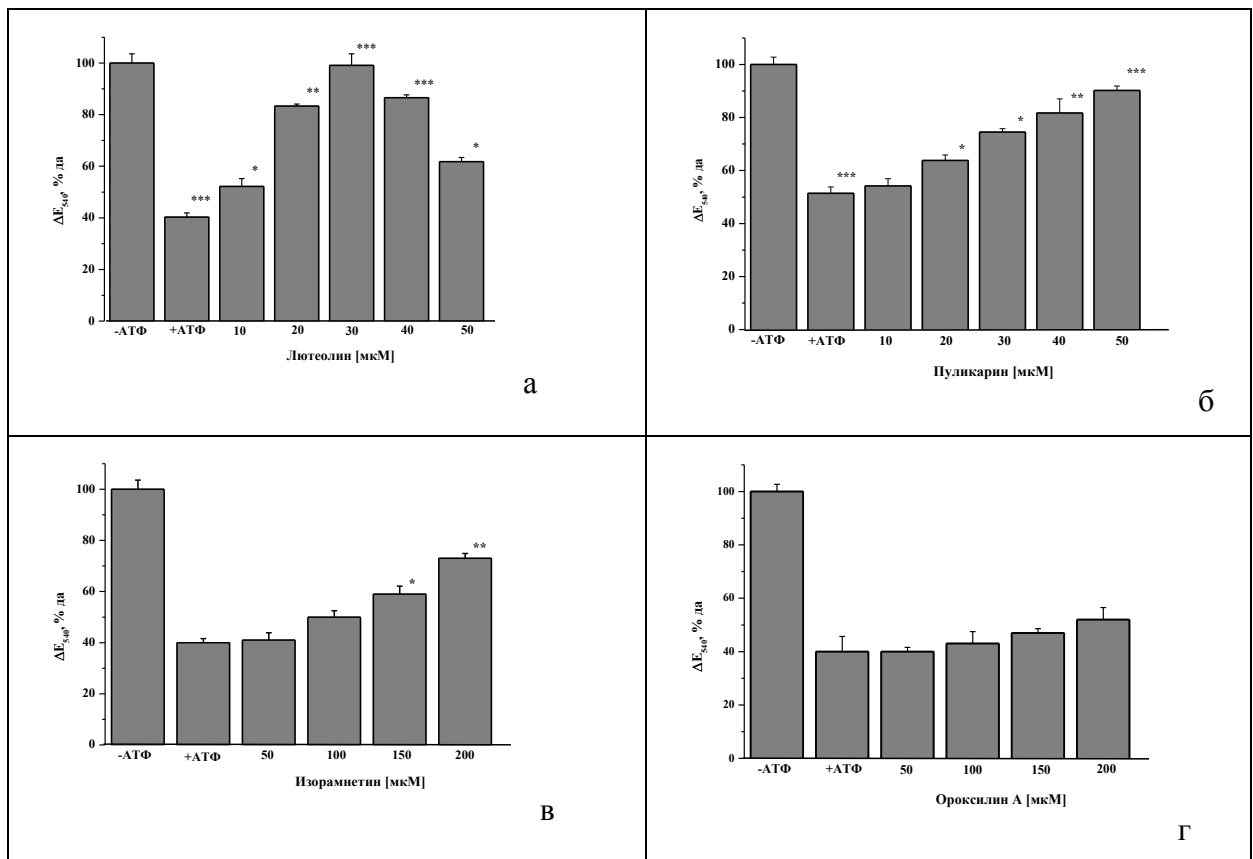


Рис.2. Влияние флавоноидов на активность митоK_{ATP}-канала митохондрий. а) лутеолин, б) пуликарин, в) изорамнетин, г) ороксиллин А (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; $n=6$).

Влияние флавоноидов на дыхание и окислительное фосфорилирование (ОФ) в митохондриях. Нами также изучено действие флавоноидов на энергетический метаболизм в митохондриях. Было показано, что лутеолин оказывает специфическое влияние на дыхание и ОФ в митохондриях: в концентрации 10 мкМ ингибировал дыхание в состоянии V_3 на 14,5% по сравнению с контролем, а в состоянии V_4 - на 11,5% (табл. 1). При этом показатели дыхательного контроля (ДК) и АДФ/О недостоверно уменьшились по сравнению с контролем. Однако, при увеличении концентрации лутеолина до 20 мкМ было обнаружено, что дыхание в состояниях V_3 и V_4 достоверно увеличилось по сравнению с контролем на 12,9 и 36,7%, соответственно. В этих случаях значения ДК и АДФ/О были снижены на 17,2% и 29,3% по сравнению с контролем, соответственно. Показано, что дыхание митохондрий в состоянии V_3 при концентрации флавоноида 40 мкМ увеличилось, по сравнению с контролем, на 15,1% и на 53,6% - в состоянии V_4 . В этих случаях коэффициенты ДК и АДФ/О уменьшились, по сравнению с контролем, на 25,0% и 45,5%, соответственно (табл. 1). Таким образом, лутеолин оказывал специфическое влияние на дыхание и ОФ митохондрий печени, вызывая «мягкое разобщение» окисления субстратов и фосфорилирования АДФ.

Таблица 1

Влияние лютеолина на дыхание и ОФ митохондрий печени крыс

Группы	V ₃	V ₄	ДК	АДФ/О
Контроль	85,33±5,9	34,91±3,4	2,44±0,15	1,91±0,09
Лютеолин 10 мкМ	74,37±2,5*	31,29±0,5	2,37±0,03	1,82±0,07
Лютеолин 20 мкМ	96,32±4,2*	47,74±3,7*	2,02±0,12*	1,35±0,06*
Лютеолин 40 мкМ	98,24±3,9*	53,63±3,5*	1,83±0,09*	1,04±0,09*

Примечание: * – $p < 0,05$, $n=4-5$.

При изучении влияния ороксина А на дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени крыс было обнаружено, что флавоноид оказывает аналогичное с лютеолином действие на митохондрии (табл. 2). Ороксин А в концентрации 10 и 20 мкМ недостоверно снижал, по сравнению с контролем, дыхание митохондрий в состоянии V₃, однако, при этом увеличивал дыхание в состоянии V₄. В этих условиях коэффициенты ДК и АДФ/О уменьшились по сравнению с контролем. Ороксин А в более низких концентрациях слабо влиял на дыхание митохондрий в состояниях V₃ и V₄. В концентрациях 30 и 40 мкМ влияние данного флавоноида на дыхание митохондрий в активном метаболическом состоянии V₃ также было неэффективным. Однако, ороксин А при концентрации 30 мкМ достоверно увеличивал дыхание митохондрий в состоянии V₄ на 38,3% по сравнению с контролем, а при концентрации 40 мкМ – на 65,1%. При этом было обнаружено, что при действии флавоноида в концентрации 30 мкМ коэффициенты ДК и АДФ/О снизились, по сравнению с контролем на 27,2% и 19,6%, соответственно. Ороксин А при концентрации 40 мкМ достоверно уменьшал коэффициенты ДК и АДФ/О по сравнению с контролем на 38,1 и 22,6% соответственно. Таким образом, ороксина А, как и лютеолин, эффективно влияет на процессы дыхания и ОФ в митохондриях печени, вызывая «мягкое разобщение» процессов окисления субстратов и фосфорилирования.

Таблица 2

Влияние ороксина на дыхание и ОФ митохондрий печени

Группы	V ₃	V ₄	ДК	АДФ/О
Контроль	90,53±4,11	32,18±0,97	2,81±0,13	1,68±0,02
Ороксин А 10 мкМ	89,61±5,75	33,35±0,51	2,69±0,15	1,58±0,03**
Ороксин А 20 мкМ	85,32±4,53	35,37±1,87	2,41±0,23	1,60±0,02*
Ороксин А 30 мкМ	91,77±5,07	44,41±2,42***	2,06±0,20**	1,35±0,10***
Ороксин А 40 мкМ	92,54±1,91	53,0±45,30***	1,74±0,12***	1,30±0,08***

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; $n=4-5$.

Пуликарин в концентрации 10 мкМ недостоверно снижал дыхание митохондрий печени крыс в состоянии V₃, при этом наблюдали увеличение V₄ по сравнению с контролем (табл. 2). Обнаружено, что при концентрации флавоноида 20 мкМ дыхание митохондрий в состоянии V₃ по сравнению с

контролем достоверно уменьшилось на 13,2%, при этом коэффициенты ДК и АДФ/О снизились на 17,8% и 14,0%, соответственно. Пуликарин в концентрации 40 мкМ достоверно уменьшал дыхание митохондрий в метаболическом состоянии V_3 на 15,0% по сравнению с контролем, в то же время состояние V_4 , напротив, увеличилось на 15,3%. В результате этого коэффициенты ДК и АДФ/О снизились на 26,1 и 32,0%, соответственно (табл. 3). Таким образом, показано, что данный флавоноид влияет на дыхание и ОФ митохондрий печени аналогично флавоноидам лютеолину и ороксилину А, т.е. не наблюдается полное разобщение двух сопряженных процессов.

Таблица 3
Влияние пуликарина на дыхание и ОФ митохондрий печени

Группы	V_3	V_4	НН	АДФ/О
Контроль	86,16±5,9	33,94±3,8	2,53±0,11	1,78±0,04
Пуликарин 10 мкМ	83,34±3,1	34,18±2,3	2,44±0,13	1,61±0,05
Пуликарин 20 мкМ	76,13±6,2*	36,51±5,7	2,08±0,18*	1,53±0,09*
Пуликарин 40 мкМ	73,27±4,7**	39,15±1,5*	1,87±0,11**	1,21±0,06**

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; $n=4-5$.

Далее в экспериментах было исследовано концентрационно-зависимое влияние изорамнетина на дыхание и ОФ митохондрий печени крыс (табл.4). Показано, что данный флавоноид при концентрации 10 мкМ достоверно уменьшает дыхание митохондрий печени в состоянии V_3 по сравнению с контролем на 7,7%. При этом было установлено, что значения ДК и АДФ/О снижаются, по сравнению с контролем, на 8,2% и 10,9% соответственно. Изорамнетин в концентрации 20 мкМ ингибирует дыхание митохондрий в состоянии V_3 на 15,9%, а в состоянии V_4 на 20,4%, по сравнению с контролем. В данном случае показатели ДК и АДФ/О, по сравнению с контролем, снизились соответственно на 30,2% и 18,1%. Обнаружено, что при концентрации флавоноида 40 мкМ дыхание митохондрий в состоянии V_3 снизилось на 9,6% относительно контроля, тогда как состояние V_4 увеличилось на 23,3%. В этом случае коэффициенты ДК и АДФ/О были снижены, по сравнению с контролем, на 28,0% и 38,3% соответственно (табл. 4). Таким образом, изорамнетин, как и другие изученные флавоноиды, при действии на энергетический метаболизм митохондрий приводит к «мягкому разобщению» процессов дыхания и ОФ.

Таблица 4
Влияние изорамнетина на дыхание и ОФ митохондрий печени

Гурухлар	V_3	V_4	НН	АДФ/О
Контроль	87,98±3,6	32,83±3,8	2,68±0,14	1,93±0,04
Изорамнетин 10 мкМ	81,61±2,2*	33,14±4,3	2,46±0,18	1,72±0,07
Изорамнетин 20 мкМ	74,12±4,2**	39,56±2,7*	1,87±0,11*	1,58±0,05*
Изорамнетин 40 мкМ	79,66±3,7*	41,13±2,6**	1,93±0,14*	1,19±0,08**

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; $n=4-5$.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что флавоноиды лютеолин, пуликарин, изорамнетин и ороксиллин А, с одной стороны, стабилизируют мембраны митохондрий, ингибируя Ca^{2+} -зависимую РТР, а с другой стороны, вызывают “мягкое разобщение” процессов окисления субстратов и фосфорилирования.

Действие флавоноидов на пассивную проницаемость мембран митохондрий. В связи с тем, что при выяснении механизмов действия флавоноидов на биологические мембраны играет важное значение изменение их ионной проницаемости, в следующих экспериментах в изоосмотических солевых средах исследовано влияние флавоноидов на ионную проницаемость внутренней мембраны митохондрия для ионов K^+ , Ca^{2+} , Na^+ и H^+ .

Пуликарин и изорамнетин не влияли на ионную проницаемость внутренних мембран митохондрий для исследованных катионов.

Ороксиллин А в изоосмотической среде NH_4NO_3 при концентрации 10 мкМ увеличивал пассивную проницаемость митохондриальных мембран для протонов, по сравнению с контролем, на 38 %, при концентрации 20 мкМ – на 78 %, при концентрации 30 мкМ – на 120 %, при концентрациях 40 мкМ и 50 мкМ - на 156 % и 220 %, соответственно (рис.3,а). В изоосмотической среде KNO_3 ороксиллин А при концентрации 10 мкМ увеличивал пассивную проницаемость внутренних мембран для ионов K^+ , по сравнению с контролем, на 45,6%. Увеличение концентрации данного флавоноида до 50 мкМ приводит к повышению K^+ -проницаемости мембран на 132,5% по сравнению с контролем. Ороксиллин А также увеличивал пассивную проницаемость внутренних мембран для ионов Na^+ по сравнению с контролем: такое увеличение при его концентрациях 10 и 20 мкМ - составило 33 и 79,3%, соответственно, в более высоких концентрациях 30, 40 и 50 мкМ - на 127,6, 162,3 и 190,4%, соответственно. При изучении влияния ороксиллина А в изоосмотической среде $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ на пассивную проницаемость для ионов Ca^{2+} показано, что флавоноид в концентрациях 25, 50, 75 и 100 мкМ достоверно увеличивает, по сравнению с контролем, Ca^{2+} -проницаемость на 8,1, 14,2, 33,5 и 41,1 %, соответственно. Таким образом, нами выявлено, что ороксиллин А проявляет протонофорные и ионофорные свойства и это объясняет механизм разобщения флавоноидом окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Лютеолин, также как ороксиллин А, увеличивал пассивную проницаемость мембран митохондрий для различных катионов. Лютеолин в концентрации 10 мкМ увеличивал, по сравнению с контролем, пассивную проницаемость мембран митохондрий для протонов на 34%, в концентрации 20 мкМ на 54%, в концентрациях 30, 40 и 50 мкМ увеличение было выше, чем в контроле на 111, 165 и 198%, соответственно. В изоосмотической среде KNO_3 пассивная проницаемость для катионов K^+ в присутствии лютеолина в концентрации 10 мкМ была выше на 17,6%, чем в контроле. Более высокая концентрация 50 мкМ данного флавоноида увеличивала пассивную проницаемость для катионов K^+ , по сравнению с контролем, на 99,3 %. Лютеолин в концентрации 10 мкМ также увеличивал пассивную Na^+ -

проницаемость по сравнению с контролем на 59,8 %. Изучаемый флавоноид в концентрациях 20, 30, 40 и 50 мкМ увеличивал пассивную проницаемость мембран митохондрий для ионов Na^+ , по сравнению с контролем, на 125,3, 180,7, 233,8 и 275,2%, соответственно.

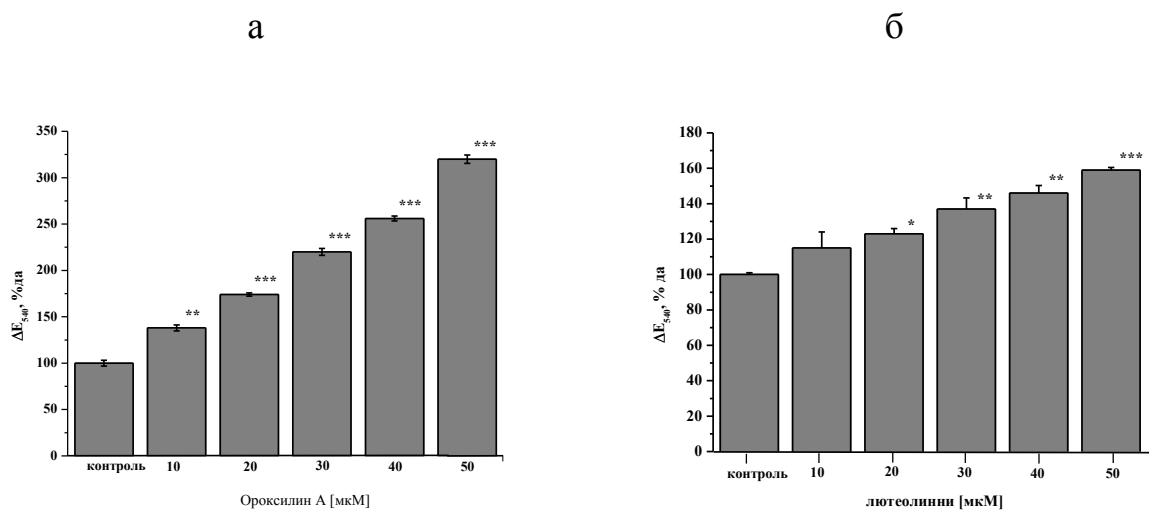


Рисунок 3. Действие ороксиллина А и лютеолина на пассивную проницаемость мембран митохондрий печени крыс для ионов в изоосмотических солевых средах. а) действие ороксиллина А на проницаемость мембран для H^+ ; б) действие лютеоли на пассивный транспорт Ca^{2+} (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,001$; $n = 6$).**

Лютеолин подобно ороксилину А увеличивал пассивный транспорт ионов Ca^{2+} в митохондриях (рис.3,б). Показано, что данный флавоноид в концентрации 10 мкМ увеличивал Ca^{2+} -проницаемость мембран митохондрий, по сравнению с контролем, на 15,2%, а в концентрации 20 мкМ на 22,8%. Лютеолин в концентрациях 30, 40 и 50 мкМ достоверно повышал пассивную Ca^{2+} - проницаемость мембран, по сравнению с контролем, соответственно на 36,7, 46,1 и 59,4 % .

По нашему мнению, пассивный перенос иона Ca^{2+} через мембрану осуществляется за счет его связывания двумя гидроксильными группами двух молекул ороксиллина А или лютеолина. Полученные данные, т.е. обнаруженные нами протонотические и ионотические свойства флавоноидов, могут являться одним из механизмов частичного разобщения окислительного фосфорилирования флавоноидами; в результате переноса ионов через мембран митохондрий резко снижается мембранный потенциал, что приводит к разобщению окислительного фосфорилирования.

Влияние флавоноидов на процессы ПОЛ митохондрий. В настоящее время широко изучаются механизмы действия флавоноидов на биологические мембраны с целью ингибирования негативных процессов, вызванных окислительным стрессом и ПОЛ, а также для коррекции мембранных нарушений при различных патологиях. В условиях *in vitro* изучалось влияние различных концентраций ороксиллина А, лютеолина,

пуликாரина и изорамнетина на образование МДА в мембранах митохондрий при наличии в инкубационной среде Fe^{2+} /аскорбат системы. Показано, что ороксиллин А при концентрации 4 мкМ снижает Fe^{2+} /аскорбат индуцированное образование МДА в митохондриях печени крыс на 16,4% по сравнению с контролем, при концентрации 12 мкМ на 34,1%, при концентрации 20 мкМ на 65,7 %, при концентрации 28 мкМ на 86,3%. Таким образом, ороксиллин А концентрационно-зависимо уменьшает образование МДА в мембранах, вызванное Fe^{2+} /аскорбат системой; полумаксимальная ингибирующая концентрация флавоноида при этом составляла $IC_{50} = 15,6 \pm 2,4$ мкМ. Установлено, что лютеолин при концентрации 4 мкМ уменьшает вызванное Fe^{2+} /аскорбат системой образование МДА в митохондриях печени крыс на 18,0% по сравнению с контролем, при концентрации 12 мкМ на 52,0%, при концентрациях 20 и 28 мкМ на 80,8% и 92,1%, соответственно. Таким образом, данный флавоноид ингибирует процесс ПОЛ при изученных концентрациях с полумаксимальной ингибирующей концентрацией $IC_{50} = 11,2 \pm 3,2$ мкМ.

В последующих экспериментах были исследованы антиоксидантные свойства флавоноида пуликாரина в модели митохондрий. При этом было обнаружено, что пуликாரин в концентрации 4 мкМ ингибировал Fe^{2+} /аскорбат индуцированное образование МДА в митохондриях, по сравнению с контролем, на 6,0%, при концентрации 12 мкМ на 26,1%, при увеличении концентрации флавоноида до 20 и 28 мкМ - на 50,0% и 80,5%, соответственно. Полумаксимальная ингибирующая концентрация пуликாரина при этом составила $IC_{50} = 20,0 \pm 2,2$ мкМ.

При изучении влияния изорамнетина на Fe^{2+} /аскорбат индуцированное образование МДА установлено, что данный флавоноид при концентрациях 4, 12, 20 и 28 мкМ ингибирует процесс ПОЛ, по сравнению с контролем, на 14,2, 40,0, 79,1 и 97,3%, соответственно. На основе исследованного концентрационного диапазона установлена его полумаксимальная ингибирующая концентрация: $IC_{50} = 13,6 \pm 5,6$ мкМ.

По литературным данным известно, что наличие гидроксильных групп в химической структуре флавоноидов определяет их способность нейтрализовать активные формы кислорода - супероксидный радикал (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильные радикалы (ON^-).

Согласно квантово-химическим расчетам молекулы кверцетина, гидроксильные группы в положении 4', 3' и 3' флавоноида реагируют с радикалами. По расположению гидроксильных групп в структуре исследованных нами флавоноидов пуликாரина и изорамнетина выявлена схожесть их локализации в кверцетине, при этом в молекуле пуликாரина на месте похожих 4'-, 3'- и 3-гидроксильных групп кверцетина расположены метокси-группы, а в изорамнетине, безусловно являющимся производным кверцетина, в положении 3' расположена метокси группа. Основываясь на структуре этих двух флавоноидов, можно предположить, что они имеют кверцетиноподобный эффект. Исследования *in vitro* показали, что при ПОЛ, индуцированной системой Fe^{2+} /аскорбат, образование МДА в митохондриях

печени крыс ингибируется на 80,0% пуликарином и на 97,3% изорамнетином. Таким образом изорамнетин проявляет более выраженную АОА по сравнению с флавоноидом пуликарином. Флавоноиды лютеолин и ороксиллин А отличаются от кверцетина структурой, расположением и числом гидроксильных групп. Однако, в структуре флавоноида лютеолин наличие гидроксильных групп больше по сравнению с ороксипином А, за счет чего и АОА проявляется выше. Гидроксильные группы в 4'- и 3'-положениях лютеолина соответствуют структуре кверцетина. Было обнаружено, что гидроксильные группы в этом состоянии более активно реагируют с радикалами и переводят их в неактивные формы. Исследования АОА флавоноида лютеолин в условиях *in vitro* в митохондриях печени крыс за счет перекисного окисления липидов, индуцированного системой Fe^{2+} /аскорбат, ингибирование образования МДА составляет 92,1%. Однако наличие гидроксильных групп в структуре ороксипина А и их в положениях 5, 6 и 7, а также различие в расположении гидроксильных групп по сравнению со структурой кверцетина, ингибирование процесса образования МДА при ПОЛ, вызванной Fe^{2+} /аскорбат системой составляет 86,0%. Следовательно, изученные флавоноиды предотвращают связанные с дисфункцией митохондрии развития патологии и оказывают специфические корректирующие эффекты на мембраны.

ВЫВОДЫ

1. Флавоноиды изорамнетин, лютеолин, ороксиллин А и пуликарин ингибируют Ca^{2+} -зависимую РТР митохондриальной мембраны в условиях *in vitro* с полумаксимальной (IC_{50}) концентрацией $137,4 \pm 5,3$ мкМ для лютеолина, $103,3 \pm 3,5$ мкМ для изорамнетина, $108,4 \pm 4,5$ мкМ для флавоноида ороксипина А и $123,0 \pm 3,5$ мкМ для флавоноида пуликарина. Предполагается, что ингибирование открытия РТР флавоноидами является одним из механизмов их влияния на функцию митохондрий.

2. Выявлена концентрационная зависимость активирования изорамнетином и пуликарином активности мито K_{ATP} -канала в митохондриях печени крыс, что может играть важную роль в предотвращении заражения тканей при гипоксии, ишемии и реперфузии. Лютеолин активирует мито K_{ATP} -канал при низких концентрациях 10–30 мкМ и ингибирует максимум активности канала при относительно высоких концентрациях 40–50 мкМ.

3. Исследованные флавоноиды лютеолин и ороксиллин А повышают проницаемость внутренней мембраны митохондрий для ионов K^+ , Na^+ , H^+ и Ca^{2+} . Данные результаты могут быть частью механизма частичного разобщения процесса окислительного фосфорилирования флавоноидами.

4. Изорамнетин и пуликарин эффективно влияют на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс. Флавоноиды

лютеолин и ороксилин А вызывают частичное разобщение процессов окислительного фосфорилирования.

5. Флавоноиды изорамнетин, лютеолин, ороксилин А и пуликарин ингибируют перекисное окисление липидов, индуцированное Fe^{2+} /аскорбат системой в мембранах митохондрий. По антиоксидантной активности в мембранах митохондрий печени крыс в условиях *in vitro* данные флавоноиды располагаются в следующем ряду: изорамнетин > лютеолин > ороксилин А > пуликарин.

6. Полученные результаты о влиянии флавоноидов изорамнетина, лютеолина, ороксилина А и пуликарина на ион-транспортирующие системы митохондрий являются теоретической основой для разработки эффективных лекарственных средств при лечении патологий, связанных с дисфункцией митохондрий.

**SCIENTIFIC COUNCIL FOR AWARDING SCIENTIFIC
DEGREES DSc.03/30.12.2019.B.01.13 AT THE INSTITUTE OF
BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY OF THE NATIONAL UNIVERSITY
OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY

KOMILOV ESOKHON JO'RAYEVICH

**THE MECHANISMS OF ACTION OF THE SOME FLAVONOIDS TO
ION-TRANSPORT SYSTEM OF MITOCHONDRIA**

03.00.08 – Human and animal`s physiology

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE PHILOSOPHY DOKTOR (PhD) OF
BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent - 2020

The dissertation of PhD has been registered with number B2017.2.PhD/B72 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.

The dissertation has been prepared at the Institute of Biophysics and biochemistry at the National University of Uzbekistan

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council www.ibb.nuu.uz and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziyo.net).

Scientific super visor:

Asrarov Muzaffar Islamovich
doctor of biological sciences, professor

Official opponents:

Shahmurova Gulnara Abdullayevna
doctor of biological sciences, professor

Kulkarayev Abdisalim Karimovich
Candidate of medical sciences, docent

Leading organization:

Andijan state university

The defense of the dissertation will take place on «14» June 2020 year 16⁰⁰ at the meeting of Scientific council DSc.30/30.12.2019.B.01.13 of scientific degrees at the Institute of the Biophysics and biochemistry, National University of Uzbekistan at the following Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, student's town, University St. 174 (4th floor of the building of the Faculty of Chemistry, National University of Uzbekistan).Phone: (+99871) 246-68-96.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre at the Institute of Biophysics and biochemistry at the National University of Uzbekistan Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, student's town, University St 174, Phone: (+99871) 246-68-96,e-mail: www.ibb-nuu@mail.ru.

The abstract of the dissertation is distributed on «12» June 2020
(Protocol at the register 1 dated «12» June 2020)



R.Z.Sabirov
Chairman of scientific degrees awarding
scientific council, D.B.Sc., academician

R.Sh.Kurbannazarova
Acting Scientific secretary of scientific degrees
awarding scientific council, D.B.Sc.

I.G.Akhmedjanov
Chairman of the seminar of scientific degrees
awarding scientific council, D.B.Sc., professor

INTRODUCTION (abstract of PhD dissertation)

The aim of the research work is to characterize mechanisms of action some vegetatable flavonoids to ion-transport system and a power mitochondrial metabolism in rat liver.

The objects of the research work: are rat liver mitochondria, PTP, $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -channel, plant flavonoids (oroxylin A, luteolin, pulicarin and isorhamnetin), passive ion permeability of the inner mitochondrial membrane, lipid peroxidation.

The scientific novelty of the research work is as follows: it was found that the flavonoids oroxylin A, luteolin, pulicarin, isorhamnetin activate the $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channel of the liver like diazoxide;

it was proved that oroxylin A, luteolin, pulicarin, isorhamnetin inhibit of the opening the Ca^{2+} -dependent PTP of rat liver mitochondria;

inhibition by flavonoids oroxylin A, luteolin, pulicarin, isorhamnetin of lipid peroxidation in mitochondrial membranes induced by the Fe^{2+} / ascorbate system was proved;

an increase in passive ionic permeability of the mitochondrial membrane for cations H^+ , K^+ , Na^+ and Ca^{2+} by oroxylin A and luteolin was established.

Implementation of the research results. Based on the results obtained by the effect of flavonoids on the functional parameters of mitochondria: the antioxidant properties of the studied compounds were used to determine the stabilization of biomembranes under pathological conditions in the framework of the applied project of Surgut State University «Innovative technologies for the extraction, identification of wild polyphenols of Khanty-Mansi Autonomous Okrug-Ugra and the study of their geroprotective properties at age-associated diseases in the North» (certificate of Surgut State University dated April 5, 2019 No. 12, 03/1150). As a result, it was possible to characterize the mechanisms of geroprotective action of flavonoid compounds depending on age; the antioxidant and PTP-inhibiting properties of luteolin were used to identify the relaxing effects of flavonoids in rat aortic preparations in the fundamental project FA-F6-T083 «Characterization and search for modulation methods of Ca^{2+} - homeostasis of smooth muscle heart cells with biologically active compounds» (certificate dated February 21, 2012 . No. 4/1255-482 of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan). As a result, it became possible to prove the relationship between the antioxidant property and the inhibitory effect of luteolin on the activity of L_2 -type Ca^{2+} channels of smooth muscle cells. The property of the flavonoid pulicarin to activate the ATP activity of the dependent potassium channel of mitochondria was used to characterize its effects on the papillary muscles of the heart in the fundamental project FA-F6-T083 «Characterization and search for modulation methods of Ca^{2+} - homeostasis of smooth muscle heart cells with biologically active compounds» (note dated February 21 2012, No. 4/1255-482 of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan). As a result, it became possible to characterize the cardioprotective property of pulicarin.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of introduction, four chapters, conclusions and list of publications. Total volume is 109 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. Асраров М.И., Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Позилов М.К., Эшбакова К.А., Тошматов З.А., Тошбекова М.Х. Механизм действия флавоноид лютеолина на функции митохондрий печени крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии (Россия). – 2015. – №12. – С. 38-43. (03.00.00. № 12.)

2. Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Асраров М.И., Эшбакова К.А. Лютеолин ва цинарозид флавоноидларнинг антиоксидантлик хоссалари // Инфекция, иммунитет и фармакология. – 2017. - №2. – С. 82-87. (03.00.00. №7)

3. Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Абдуллаева Г.Т., Гайибов У.Г., Асраров М.И., Комилов Б.Ж. Митохондрия АТФ га боғлиқ калий каналига лютеолин ва пуликарин флавоноидларнинг таъсири // ЎЗМУ хабарлари. – 2018. – №3/1. – Б. 131-134.(03.00.00. № 9)

4. Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Асраров М.И., Гайибов У.Г., Абдулхақова Г.В., Эшбакова К.А. Действие ороксилина А на проницаемость мембран митохондрий печени крыс // Universum: Химия и биология (Россия). – 2019. – №3(56). – С. 54-56. (02.00.00. № 1)

5. Gayibov U.G., Komilov E.J., N. Rakhimov R.N., Ergashev N.A., Abdullajanova N.G., Asrarov M.I., Aripov T.F. Influence of new polyphenol compound from euphorbia plant on mitochondrial function // Journal of microbiology, biotechnology and food sciences (Slovakia). – 2019. – Vol. 8(4). – P. 1021-1025. (RG IF (2018-2019) 0,27).

II бўлим (II часть; PartII)

1. Ergashev N.A., Komilov E.J., Asrarov M.I., Gayibova S. Eshbakhova K.A., Gayibov U.G. Action of oroxylin to membrane permeability of rat liver mitochondria // Adv. Biotechnol. Microbiol (USA). – 2019. – Vol. 15(1). – P. 9-10.

2. Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Асраров М.И., Эшбакова К.А. Действие некоторых флавоноидов на Са-индуцированную пермеабиллизацию мембран митохондрий // Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» Сборник тезисов. – Пущина, 2013. – С. 95.

3. Komilov E. J., Ergashev N. A., Asrarov M. I., Komilov B. J. Effect of oroxylin a on anoxidative phosphorylation in the rat liver mitochondria // Научно-практическая конференция с международным участием «Актуаль ные проблемы химии природных соединений» Сборник тезисов. – Ташкент, 2017. – С. 403.

4. Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Комилов Б.Дж., Эшбакова К.А., Комилов Д.Дж., Асраров М.И., Эшбакова К.А. Флавоноид пуликарин как активатор АТФ-зависимого калиевого канала митохондрий // Межд. конф. молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика '15» Сборник тезисов. – Пущино, 2015. – С. 83.

5. Комилов Э.Дж., Абдуллаева Г.Т., Эшбакова К.А., Асраров М.И. Влияние флавоноида лютеолина на Ca индуцированную пермеабиллизацию мембран митохондрия // Халқаро илмий анжуман «Биоорганик кимёни ривожлантиришининг долзарб муаммолари» – Ташкент, 2013. – С.106.

6. Комилов Э.Дж., Асраров М.И., Позиллов М.К., Эргашев Н.А., Эшбакова К.А. Действие флавоноид лютеолина на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс // Мирходжаев Улуғбек Закировичнинг 70 йиллик таваллудига бағишланган «Физик-кимёвий биология ва экотоксикологиянинг замонавий муаммолари» мавзусидаги илмий-амалий анжуман материаллари. – Тошкент, 2016. – С. 27-28

7. Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Махмудов Р.Р., Абдулхақова Г.В., Асраров М.И. Изорамнетин флавоноидининг митохондрия моделида антиоксидантлик хоссасини ўрганиш // «Соғлиқни сақлаш ва қишлоқ хўжалигининг долзарб муаммоларини ечишда биоорганик кимёнинг роли» ёш олимлар республика конференцияси. – Тошкент, 2016. – С. 77

8. Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Махмудов Р.Р., Эшбакова К.А., Асраров М.И. Флавоноидлар таъсирида жигар митохондрияларига Ca²⁺ га боғлиқ мегапорасини бошқарилиши // «Биофизика ва биокимёнинг ютуқлари ва истиқболлари» институт ёш олимларининг I илмий-амалий анжуманининг тезислар тўплами. – Тошкент, 2019. – С. 43-45.

Автореферат «Ўзбекистон биология журналы» журналыда
тахрирдан ўтказилиб, ўзбек, рус ва инглиз тилларидаги матнлар ўзаро
мувофиқлаштирилди.