

## АНОТАЦІЯ

**Ганін В.Ю. Розробка способу одержання та оцінка гепатотропної активності хлорогенової кислоти.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 Біологія). – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2026.

Процеси розвитку та старіння біологічних систем і досі займають одне з центральних місць серед нерозв'язаних біомедичних проблем. Така ситуація пояснюється тим, що в основі процесів старіння лежать складні, нелінійні процеси темпоральних взаємодій організму із сукупністю чинників навколишнього середовища — експосою. Результати таких взаємодій проявляються у системній перебудові метаболізму, яка спрямована на збереження цілісності та життєздатності системи. Ці явища ми визначаємо як процеси динамічної адаптації.

При розгляді проблеми адаптації дослідники часто стикаються з формуванням «втрати» реактивності біологічної системи на дії експосоми, тобто формуванням таких станів, за яких біологічна система втрачає «чутливість» до подальших дій експосоми, і такі стани прийнято визначати як хронічні патології. Більшість хронічних патологій мають вік-залежний характер.

При дослідженні процесів старіння науковці стикаються з явищем збільшення кількості хронічних патологій, які не піддаються лікуванню та скорочують тривалість життя. Розуміння механізмів формування хронічних патологій та розробка способів їх профілактики й лікування є однією з найактуальніших задач на стику біології та медицини.

Вдалим прикладом темпоральних взаємодій організму з чинниками експосоми є зміна балансу міді в організмі у бік її збільшення та формування такої хронічної патології, як Cu-індукований фіброз печінки. Раніше в нашій

лабораторії було показано, що послідовні дії іонів міді на організм експериментальних тварин, з одного боку, супроводжувалися формуванням стійкості таких тварин до токсичної дії цього металу та проявом гормезису, однак на тлі такого позитивного ефекту мало місце й формування фіброзу печінки.

Попри актуальність та значні зусилля щодо розробки способів лікування хронічних патологій, проблема далека від вирішення. Суть проблеми формування хронічних патологій може бути зведена до пошуку відповіді на питання: «Чому і як адаптивна відповідь організму, спрямована на виживання в нових екстремальних умовах, призводить до втрати подальшої адаптивності та формує загрозливі патологічні стани?»

**Метою роботи було:** розробка концепції механізму формування хронічних станів на моделі Cu-індукованого фіброзу печінки та дослідження ролі природних поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, у запобіганні формуванню таких хронічних станів.

**У зв'язку з цим вирішували такі завдання:** 1 – розробити й обґрунтувати концепцію «експосом-індукованого метаболічного ресетингу»; 2 – дослідити роль балансу міді в механізмах регуляції біологічних процесів на різних біологічних моделях (ссавці, дріжджі та бактерії); 3 – дослідити вплив поліфенольних сполук соняшникового шроту на кількість імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки за різних способів їх введення в організм; 4 – розробити спосіб отримання супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками з метою стабілізації хлорогенової кислоти та надати характеристику цим комплексам; 5 – дослідити вплив отриманих супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та поліфенольними сполуками на кількість імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із Cu-індукованим фіброзом печінки; 6 – дослідити вплив отриманих супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива та

поліфенольними сполуками на деякі біохімічні показники у тварин із Су-індукованим фіброзом печінки.

Вибір поліфенольних сполук соняшникового шроту як засобів усунення фібротичних характеристик печінки пояснюється кількома обставинами: 1 – усі відомі класичні гепатопротекторні медичні препарати малоефективні й не дозволяють лікувати фібрози на стадії цирозу; 2 – показано, що найбільш ефективними у сповільненні розвитку патологій печінки є природні сполуки; 3 – природні поліфенольні сполуки надзвичайно різноманітні та мають дуже широкий спектр біологічної дії, крім того, вони відносно легко можуть бути отримані у великих кількостях із широко доступного соняшникового шроту; 4 – поліфенольні сполуки не набули широкого застосування через їх здатність до окиснення, у зв'язку з цим отримання супрамолекулярних комплексів із такими харчовими білками, як казеїн, і зокрема казеїн молозива, може забезпечити стабілізацію такої поліфенольної сполуки, як хлорогенова кислота, та розширити їх застосування.

Для розв'язання цих завдань використовували комплекс фізико-хімічних методів (синтез квантових точок, спосіб формування супрамолекулярних комплексів між казеїном молозива, які отримували з молозива, та поліфенольними сполуками, метод отримання яких був розроблений самостійно), біофізичні методи (УФ-спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, електропровідність водних розчинів супрамолекулярних комплексів), біохімічні методи (визначення активності ряду ферментів печінки, вмісту альбуміну, креатиніну, холестерину, глюкози, тригліцеридів тощо), цитологічні методи (визначення кількості імунокомпетентних клітин, кількості еритроцитів і тромбоцитів), мікробіологічні методи (інтенсивність росту мікроорганізмів), біотехнологічні методи (отримання та характеристика автолізатів дріжджів і мікроводоростей) та фізіологічні методи (моделювання Су-індукованого

фіброзу печінки й оцінка біологічної дії біологічних субстанцій на експериментальних тваринах).

Розроблено концепцію: «Експосом-індукованого метаболічного ресетингу», суть якої полягає в тому, що в процесі формування хронічних станів біологічна система проходить низку послідовних, взаємопов'язаних етапів: адаптація; формування метаболічної та епігенетичної пам'яті й закріплення сформованих адаптивних метаболічних патернів у формі стабільних незворотних метаболічних станів — ресетингу.

Особливістю цих стійких станів є те, що сформовані метаболічні патерни, як адаптивні варіанти на дії середовища, у даному випадку зміщення балансу міді у бік її збільшення, здатні до автозбереження навіть після усунення факторів, що їх індукували. Усунення таких домінуючих метаболічних патернів можливе лише шляхом формування нового (зворотного) ресетингу.

Висловлено припущення, що формування зворотного ресетингу може бути здійснене лише у випадку застосування природних субстанцій

Розроблено простий та ефективний спосіб отримання поліфенольних сполук із соняшникового шроту. Синтезовано квантові точки на основі фенілефрину та розроблено чутливий флуоресцентний метод визначення кількості хлорогенової кислоти в розчинах. Показано, що у складі поліфенольних сполук соняшникового шроту міститься не менше ніж 15 % хлорогенової кислоти.

Вперше розроблено спосіб отримання супрамолекулярних комплексів між казеїном та поліфенольними сполуками соняшникового шроту. Доведено, що такі комплекси формуються водневими зв'язками; методом молекулярного докінгу показано ймовірність наявності 9 потенційних центрів локалізації хлорогенової кислоти в молекулах  $\beta$ -казеїну. Усі центри зв'язування хлорогенової кислоти мали різну афінність

Вперше показано, що пероральний прийом поліфенольних сполук соняшникового шроту тваринами з Cu-індукованим фіброзом печінки

відновлював кількість імунокомпетентних клітин до контрольних інтактних значень на ранніх стадіях розвитку фіброзу. Такий позитивний, протизапальний ефект більшою мірою проявлявся у випадку перорального введення порівняно з внутрішньочеревним введенням поліфенольних сполук. Цей факт опосередковано вказує на те, що ще одним із можливих механізмів дії поліфенольних сполук може бути пов'язаний із участю мікробіома кишечника в реалізації біологічних ефектів поліфенолів.

Вперше показано, що отримані супрамолекулярні комплекси «казеїн-поліфеноли», які забезпечували тривале збереження хлорогенової кислоти, сприяли нормалізації кількості імунокомпетентних клітин у кровотоці тварин із фіброзом печінки. Активність аланінамінотрансферази, яка була інгібована у тварин із Си-індукованим фіброзом, відновлювалася до рівня інтактного контролю після перорального прийому супрамолекулярних комплексів. Доведено, що така дія супрамолекулярних комплексів «казеїн-поліфенольні», збагачених хлорогеновою кислотою, є перспективними продуктами функціонального харчування, які виконують профілактичну функцію фіброзу печінки на ранніх стадіях його розвитку.

**Ключові слова:** *Експосома, метаболічний ресетинг, адаптація, епігенетична пам'ять, хронічні патології, Си-індукований фіброз, поліфенольні сполуки, хлорогенова кислота, супрамолекулярні комплекси, казеїн молозива, імунокомпетентні клітини, функціональне харчування, протизапальний ефект, квантові точки.*

## ABSTRACT

**Hanin V.Yu.** Development of a method for obtaining and evaluation of the hepatotropic activity of chlorogenic acid. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology (Field of Knowledge 09 Biology). – V.N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2026.

The processes of development and aging of biological systems still occupy one of the central positions among unresolved biomedical problems. This situation is explained by the fact that the basis of aging processes lies in complex, non-linear temporal interactions of the organism with the set of environmental factors — the exposome. The results of such interactions are manifested in systemic metabolic restructuring aimed at preserving the integrity and viability of the system. We define these phenomena as processes of dynamic adaptation.

When considering the problem of adaptation, researchers often encounter the formation of a “loss” of reactivity of the biological system to the actions of the exposome, i.e., the formation of states in which the biological system loses “sensitivity” to subsequent actions of the exposome, and such states are defined as chronic pathologies. Most chronic pathologies are age-dependent.

In studying aging processes, scientists face the phenomenon of an increase in chronic pathologies that are resistant to treatment and reduce life expectancy. Understanding the mechanisms of chronic pathology formation and developing methods for their prevention and treatment is one of the most urgent tasks at the intersection of biology and medicine.

A striking example of temporal interactions of the organism with exposome factors is the upward shift in the body's copper balance and the subsequent development of a chronic pathology such as Cu-induced liver fibrosis.

Previously, in our laboratory, it was shown that sequential actions of copper ions on the organism of experimental animals, on the one hand, were accompanied by the formation of resistance of such animals to the toxic effects of this metal and

the manifestation of hormesis, however, against the background of such a positive effect, liver fibrosis was also formed.

Despite the relevance and significant efforts to develop methods for treating chronic pathologies, the problem remains far from being solved. The essence of the problem of chronic pathology formation can be reduced to the search for an answer to the question: “Why and how does the adaptive response of the organism, aimed at survival in new extreme conditions, lead to the loss of subsequent adaptability and the formation of threatening pathological states?”

**The aim of the work was:** to develop a concept of the mechanism of chronic state formation on the model of Cu-induced liver fibrosis and to study the role of natural polyphenolic compounds enriched with chlorogenic acid in preventing the formation of such chronic states.

**To this end, the following tasks were addressed:** 1 – To develop and substantiate the concept of “exposome-induced metabolic resetting.” 2 – To investigate the role of copper balance in the mechanisms regulating biological processes in various biological models (mammals, yeast, and bacteria) 3) to investigate the effect of sunflower meal polyphenolic compounds on the number of immunocompetent cells in the bloodstream of animals with Cu-induced liver fibrosis depending on the route of administration; 4) to develop a method for obtaining supramolecular complexes of colostrum casein with polyphenolic compounds to stabilize chlorogenic acid and to characterize these complexes; 5) to study the effect of the obtained supramolecular complexes of colostrum casein with polyphenolic compounds on the number of immunocompetent cells in the bloodstream of animals with Cu-induced liver fibrosis; 6) to investigate the effect of the obtained supramolecular complexes on certain biochemical parameters in animals with Cu-induced liver fibrosis.

The choice of sunflower meal polyphenolic compounds as a means of eliminating liver fibrotic characteristics is explained by several factors: 1) all known classical hepatoprotective medical drugs are ineffective and do not cure fibrosis at the cirrhosis stage; 2) natural compounds have been shown to be the

most effective in slowing the progression of liver pathologies; 3) natural polyphenolic compounds are extremely diverse, have a very broad spectrum of biological activity, and can be relatively easily obtained in large quantities from widely available sunflower meal; 4) polyphenolic compounds have not been widely used due to their susceptibility to oxidation; thus, obtaining supramolecular complexes with food proteins such as casein, particularly colostrum casein, can stabilize polyphenolic compounds like chlorogenic acid and expand their application.

To accomplish these tasks, a combination of physicochemical methods was used (synthesis of quantum dots, a method for forming supramolecular complexes of casein obtained from colostrum with polyphenolic compounds, the extraction method for which was developed independently), alongside biophysical methods (UV spectroscopy, fluorescence spectroscopy, electrical conductivity of aqueous solutions of supramolecular complexes), biochemical methods (determination of the activity of several liver enzymes, albumin, creatinine, cholesterol, glucose, triglycerides, etc.), cytological methods (determination of immunocompetent cell, erythrocyte, and platelet counts), microbiological methods (microbial growth intensity), biotechnological methods (obtaining and characterizing autolysates of yeast and macroalgae), and physiological methods (modeling of Cu-induced liver fibrosis and evaluation of the biological effect of biological substances on experimental animals).

The concept of "exposome-induced metabolic resetting" has been developed. Its core lies in the fact that during the formation of chronic states, a biological system undergoes a series of sequential, interconnected stages: adaptation, formation of metabolic and epigenetic memory, and the consolidation of formed adaptive metabolic patterns in the form of stable irreversible metabolic states — resetting.

A specific feature of these stable states is that the formed metabolic patterns, acting as adaptive responses to environmental impacts (in this case, an upward shift in copper balance), are capable of self-preservation even after the removal of

the inducing factors. The elimination of such dominant metabolic patterns is only possible through the formation of a new (reverse) resetting. It has been hypothesized that the formation of reverse resetting can only be achieved through the application of natural substances.

A simple and effective method for obtaining polyphenolic compounds from sunflower meal has been developed. Quantum dots based on phenylephrine were synthesized, and a sensitive fluorescent method for determining the amount of chlorogenic acid in solutions was developed. It was shown that sunflower meal polyphenolic compounds contain at least 15% chlorogenic acid.

For the first time, a method for obtaining supramolecular complexes of casein with sunflower meal polyphenolic compounds was developed. It was proven that such complexes are formed by hydrogen bonds; molecular docking demonstrated the probability of 9 potential localization centers for chlorogenic acid in  $\beta$ -casein molecules. All chlorogenic acid binding centers exhibited different affinities.

For the first time, it was shown that oral administration of sunflower meal polyphenolic compounds to animals with Cu-induced liver fibrosis restored the number of immunocompetent cells to intact control values at early stages of fibrosis development. This positive anti-inflammatory effect was more pronounced with oral administration compared to intraperitoneal injection. This fact indirectly indicates that another possible mechanism of action of polyphenolic compounds may be associated with the involvement of the gut microbiome in mediating their biological effects.

For the first time, it was shown that the obtained "casein-polyphenol" supramolecular complexes, which ensured long-term preservation of chlorogenic acid, facilitated the normalization of immunocompetent cells in the bloodstream of animals with liver fibrosis. Alanine aminotransferase activity, which was inhibited in animals with Cu-induced fibrosis, was restored to the intact control level after oral administration of the supramolecular complexes. It was proven that such "casein-polyphenol" supramolecular complexes enriched with chlorogenic

acid are promising functional food products that provide a prophylactic function against liver fibrosis at the early stages of its development.

**Keywords:** *Exposome, metabolic resetting, adaptation, epigenetic memory, chronic pathologies, Cu-induced fibrosis, polyphenolic compounds, chlorogenic acid, supramolecular complexes, colostrum casein, immunocompetent cells, functional nutrition, anti-inflammatory effect, quantum dots.*