

УДК 54:577.35

АНТИРАДИКАЛЬНОЕ И МЕМБРАНОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЯ КВЕРЦЕТИНА И ЕГО КОМПЛЕКСА С АЛЮМИНИЕМ

¹Махмутов Б.Б., ¹Абдрасилов Б.С., ²Ким Ю.А.

¹Карагандинский индустриальный университет, Темиртау, e-mail: bolat200@mail.ru;

²Институт биофизики клетки РАН ФГБУН «ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, e-mail: yuk01@rambler.ru

В работе представлены результаты экспериментальных исследований антиоксидантного действия хемиллюминесцентным методом комплекса флавоноида (кверцетин) с Al (III) и взаимодействие комплекса с искусственными липидными мембранами (липосомами). Предварительно методом УФ-видимой спектроскопии было получено, что при смешивании флавоноида с ионами трехвалентного алюминия происходит образование комплексов с соотношением Al (III) : кверцетин как 1:1. Интенсивность свечения системы при добавлении флавоноидного металлокомплекса была ниже, чем при добавлении свободного кверцетина. Из проведенных ранее экспериментов следовало, что свободный алюминий не оказывает влияния на кинетику хемиллюминесценции. Фазовые переходы в липидных мембранах изучены достаточно детально. Мы исследовали влияние кверцетина и комплекса с ионами алюминия на плавление липидной мембраны, сформированной из липида димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ). Кверцетин в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-5} M незначительно подавляет главный фазовый переход в мембранах, но при концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} он вызывает снижение температуры главного фазового перехода. Комплекс с Al^{3+} (при молярном соотношении от 1:0,5 до 1:10) вызывает снижение T_m , однако меньше влияет на кооперативность. В фосфолипидном бислое процессы комплексообразования флавоноидов с катионами железа могут отличаться от таковых в водном растворе.

Ключевые слова: кверцетин, комплекс [кверцетин + Al (III)], стехиометрия, антирадикальная активность, липосомы, микрокалориметрия

ANTIRADICAL AND MEMBRANOTROPIC ACTIONS OF QUERCETIN AND ITS COMPLEX WITH ALUMINUM

¹Makhmutov B.B., ¹Abdrasilov B.S., ²Kim Yu.A.

¹Karaganda Industrial University, Temirtau, e-mail: bolat200@mail.ru;

²Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: yuk01@rambler.ru

The paper presents the results of experimental studies of the antioxidant action of the complex of flavonoid (quercetin) with Al (III) by the chemiluminescent method and the interaction of the complex with artificial lipid membranes (liposomes). Preliminarily, by the method of UV-visible spectroscopy, it was obtained that when a flavonoid is mixed with trivalent aluminum ions, complexes are formed with a ratio of Al (III): quercetin as 1: 1. The luminescence intensity of the system with the addition of a flavonoid metal complex was lower than with the addition of free quercetin. It followed from previous experiments that free aluminum does not affect the chemiluminescence kinetics. Phase transitions in lipid membranes have been studied in sufficient detail. We investigated the effect of quercetin and a complex with aluminum ions on the melting of a lipid membrane formed from the lipid dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC). Quercetin at concentrations from 10^{-6} to 10^{-5} M slightly suppresses the main phase transition in membranes, but at concentrations of $5 \cdot 10^{-5}$ and 10^{-4} it causes a decrease in the temperature of the main phase transition. The complex with Al^{3+} (at a molar ratio of 1:0.5 to 1:10) causes a decrease in T_m , but has less effect on cooperativity. In the phospholipid bilayer, the processes of complex formation of flavonoids with iron cations may differ from those in an aqueous solution.

Keywords: quercetin, complex [quercetin + Al (III)], stoichiometry, antiradical activity, liposomes, microcalorimetry

Кверцетин (Qr) – это флавоноид с разнообразными биологическими свойствами, относится к группе витамина P, используется в медицине для профилактики и лечения нарушений проницаемости сосудов, гипертонической и лучевой болезни, ревматизме, аллергических реакций [1] и обладает высокой антиоксидантной активностью [2]. Вместе с тем его терапевтический потенциал ограничен из-за низкой растворимости в воде (0,02– 0,03%) при 20 °С и низкой биодоступности (5,3%) [3]. Однако наличие хелатирующих сайтов в структуре молекулы, позволяющих молекулам кверцетина образовывать комплексы с рядом катионов

[4], решает задачу биодоступности, и, более того, при этом еще усиливаются антиоксидантная, антибактериальная, противоопухолевая способность влиять на многие виды ферментативной [5].

Три доступных сайта для хелатирования металлов, включая орто-дигидроксил (катехол) группа кольца В (сайт А), 5-гидрокси-4-кетогруппа (сайт В) и 3-гидрокси-4-кетогруппа (сайт С), обладают способностью образовывать комплексы с металлами [6], в том числе и с ионами алюминия. Хотя соединения алюминия не так токсичны, как тяжелые металлы, чрезмерное поступление алюминия в организм человека может вы-

звать серьезные проблемы со здоровьем, такие как повреждение нервной системы, потеря памяти, болезнь Альцгеймера, анемия, остеопороз, неврологический синдром [7]. В одном из последних обзоров [8] большое внимание уделяется способности природных молекул антиоксидантов, в частности кверцетина, образовывать комплексы Al (III) и Fe (III) с целью оценки координационных свойств, так как структурная характеристика комплексов (схема 1) имеет первостепенное значение для понимания их потенциальной применимости.

Цель исследования – формирование комплекса [кверцетин + Al (III)] и исследование его антиоксидантной и мембранотропной активности.

Материалы и методы исследования

Кверцетин (Qr), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ) (Avanti Polar Lipids, США), гемоглобин (Hb) («Sigma», США), («Merck», Германия), остальные реактивы отечественного производства.

Приготовление липосом

Навеску липида ДМФХ растворяли в хлороформе в концентрации 10 мг/мл, высушивали в струе аргона и вакуумировали сутки для полного удаления растворителя. Далее липид гидратировали в 20 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) путем механического встряхивания и нагревали до 37 °С в течение 1 ч. Кверцетин, растворенный в этаноле, добавляли к липиду, находящемуся в органическом растворителе, перед формированием липосом (добавление изнутри), или в суспензию готовых липосом (добавление извне).

Определение антирадикальной активности комплекса кверцетина с алюминием хемилюминесцентным методом

Определение степени ингибирования процесса образования активной формы кислорода в присутствии комплекса [кверцетин + Al (III)] в модельной биохимической системе, содержащей пероксид водорода (H_2O_2) $3 \cdot 10^{-5}$ %, гемоглобин (Hb) $5 \cdot 10^{-7}$ М и люминол, было выполнено на хемилюминометре LK В «Wallac-1251». Реакционная среда содержала 0,20 мкМ Hb и 10 мкМ люминола в фосфатном буфере (20 мМ Na_2HPO_4 , 100 мкМ ЭДТА, pH 7,4). Иницирование свободнорадикального окисления осуществляли введением 20 мкМ пероксида водорода.

Исследование кверцетина и его комплекса с алюминием с помощью адиабатной дифференциальной сканирующей микрокалориметрии

Температурную зависимость избыточного удельного теплопоглощения (далее

термограммы) липидных мембран регистрировали с помощью дифференциального адиабатного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (СКБ АН СССР, г. Пущино). Все измерения проведены в фосфатно-солевом растворе (20 мМ Na_2HPO_4 , 145 мМ NaCl, pH 7,4), при скорости прогрева 1 К/мин. Концентрация липида составляла 0,2 мг/мл. Анализ термограмм проводили с помощью MicroCal™ Origin™ 5 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA USA).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ исследуемых веществ методом УФ-видимой спектроскопии

Спектр поглощения кверцетина в этаноле содержит характерную для флавонолов полосу I в длинноволновой области (λ_{max} 375 нм) и полосу II в коротковолновой области (λ_{max} 255 нм). В результате комплексообразования в УФ-спектре поглощения кверцетина максимум полосы I сдвигается с 375 до 435 нм (батохромный сдвиг). Проблема состава комплексов флавоноидов с ионами металлов является предметом многочисленных научных исследований, и нельзя сказать, что она решена и в настоящее время. Доказано, что хелатирование кверцетином Al^{3+} происходит только по двум центрам – с участием 4-оксогруппы и 3-ОН-группы, а также с участием 3',4'-дигидрокси-группировки (рис. 1) [9].

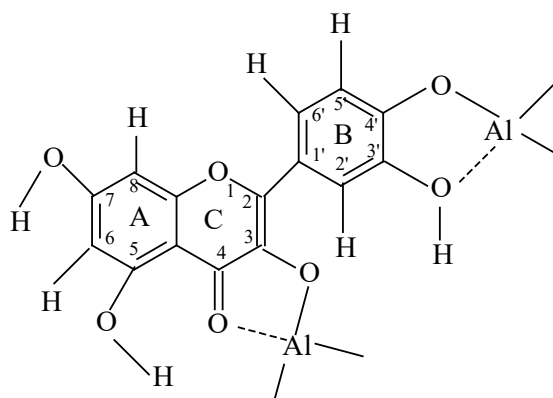


Рис. 1. Центры хелатирования комплексов кверцетина с хлоридом алюминия [9]

Данные о комплексообразовании кверцетина с ионами Al (III) и Fe (III) получены из нескольких исследований [10], сочетающих экспериментальные и теоретические подходы [6]. В водном растворе комплексообразование происходило при соотношении лиганд / катионы 1:1 для Al^{3+} [6].

Методом молярных отношений (методом «насыщения») [11] в условиях наших

экспериментов мы определили стехиометрию комплекса $[Qr + Al^{3+}]$ как 1:1 по интенсивности максимума в спектре поглощения при 430 нм

Определение антирадикальной активности комплекса кверцетина с алюминием хемилюминесцентным методом

Модельная система для тестирования антиокислительной активности кверцетина и его комплексов с алюминием, в составе которого содержалась значительная часть метгемоглобина (MetHb), при взаимодействии с H_2O_2 приводит к образованию феррил-радикалов [12]. Указанные радикалы индуцируют свободнорадикальное

окисление люминола, сопровождающееся хемилюминесценцией (ХЛ). Количество выделившихся квантов света ХЛ пропорционально количеству образовавшегося конечного продукта окисления и, следовательно, является мерой степени окисленности ЛМ. Добавление в данную модельную систему веществ, способных препятствовать окислению ЛМ (антиоксидантов), будет приводить к уменьшению количества квантов света ХЛ.

На рис. 2 представлена кинетика хемилюминесценции, развиваемая в данной модельной системе, после введения пероксида водорода.

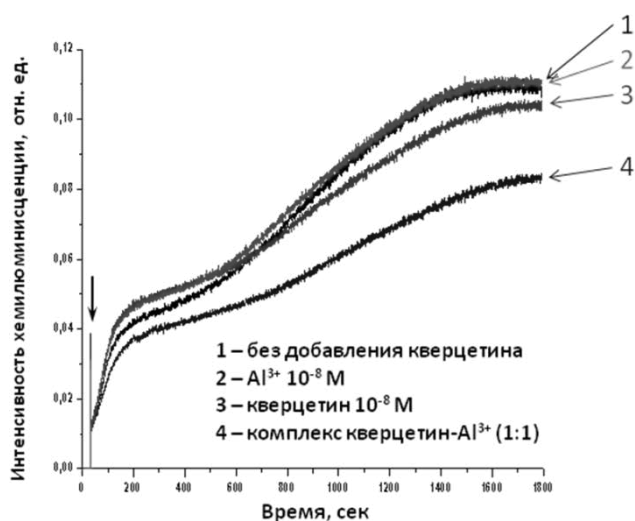


Рис. 2. Кинетика хемилюминесценции в модельной системе гемоглобин – люминол после введения пероксида водорода. Стрелкой указан момент введения пероксида водорода

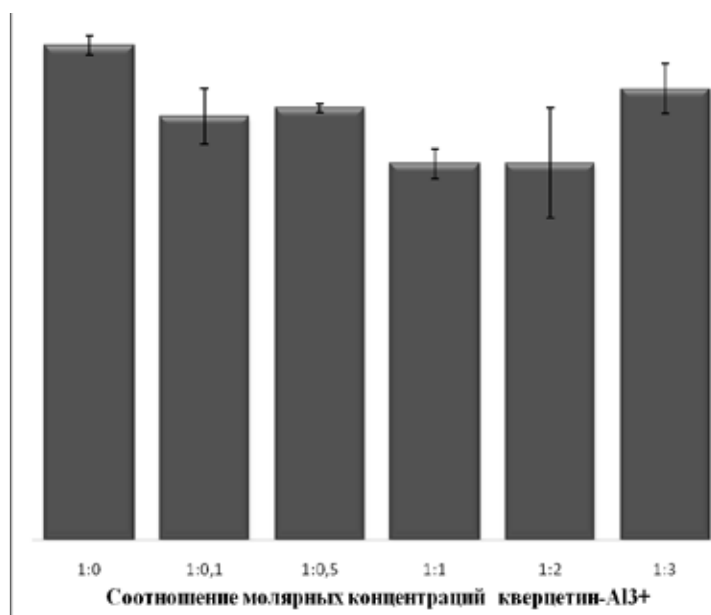


Рис. 3. Диаграмма зависимости значения максимума интенсивности хемилюминесценции от молярных соотношений веществ

Видно, что после добавления H_2O_2 к реакционной среде, содержащей гемоглобин и люминол, развивается свечение ХЛ, которое достигает некоторого максимального значения. В системе, содержащей кверцетин и возрастающие концентрации алюминия, происходило уменьшение амплитуды свечения до определенного соотношения молярных концентраций, а затем происходило возрастание интенсивности хемилюминесценции. Максимальная интенсивность свечения (амплитуда ХЛ) была выбрана в качестве измеряемого параметра.

По полученным значениям была построена диаграмма зависимости значения максимума развивающейся хемилюминесценции от молярных соотношений веществ (рис. 3).

Интенсивность хемилюминесценции снижалась при добавлении ионов алюминия. Минимальное значение наблюдается при молярных соотношениях добавленных веществ 1:1 и 1:2. При соотношении 1:3 наблюдается повышение интенсивности хемилюминесценции относительно соотношений веществ 1:1 и 1:2. Однако интенсивность свечения системы при добавлении металлокомплекса ниже, чем при добавлении свободного кверцетина. Из проведенных ранее экспериментов видно, что алюминий не оказывает влияния на кинетику хемилюминесценции.

Влияние кверцетина и его комплекса с алюминием на фазовый переход в липидной мембране

Взаимодействие флавоноидов с биологическими мембранами является важным процессом, определяющим их действие на клетку в целом [13]. При изучении механизмов взаимодействия биологически

активных веществ с липидным бислоем, важное место занимают исследования влияния этих веществ на фазовые переходы мембран, так как они дают информацию о месте локализации вещества в бислое в модельных условиях, о тонких механизмах взаимодействия с липидами, что способствует глубокому пониманию его действия на более высоком биологическом уровне. Фазовые переходы в липидных мембранах изучены достаточно детально. Мы исследовали влияние кверцетина и комплекса с ионами алюминия на плавление липидной мембраны (липосомы), сформированной из ДМФХ.

Кверцетин (Qr) в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-5} М незначительно подавляет главный фазовый переход в мембранах, но при концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} он вызывает снижение температуры главного фазового перехода. Его комплекс с Al^{3+} (при молярном соотношении от 1:0,5 до 1:10) вызывает снижение T_m , однако меньше влияет на кооперативность.

Для флавоноидов, так же как для многих других биологически активных веществ, гидрофобность и, соответственно, способность взаимодействовать с биологическими мембранами является одним из необходимых условий проявления фармакологической активности. Представленные нами ранее экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при образовании комплексов флавоноидов с катионами Fe^{3+} наблюдается изменение липофильности этих веществ, а также их способности влиять на фазовое поведение липидов. Подобные явления недавно были описаны нами в отношении комплексов флавоноидов с катионами железа (II) [14].

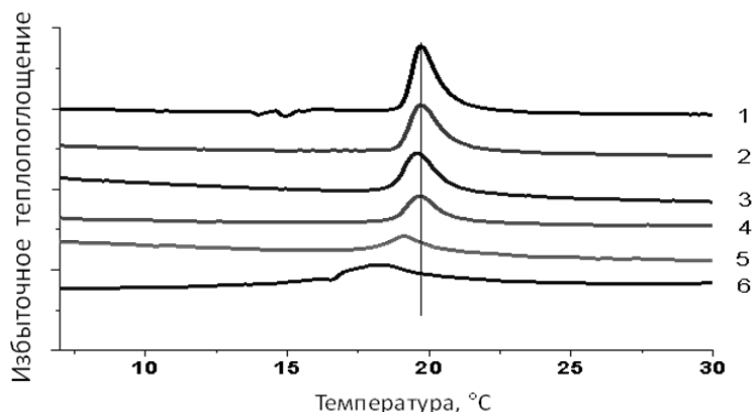


Рис. 4. Термограммы плавления липидов ДМФХ (0,2 мг/мл). 1 – контроль. В присутствии кверцетина (Qr): 2 – $1 \cdot 10^{-6}$ М, 3 – $5 \cdot 10^{-6}$ М, 4 – $1 \cdot 10^{-5}$ М, 5 – $5 \cdot 10^{-5}$ М, 6 – $1 \cdot 10^{-4}$ М, 6 – $5 \cdot 10^{-4}$ М

Таблица 1

Параметры плавления липидов ДМФХ, определенных из термограмм, приведенных на рис. 4

Образец	Максимум температуры перехода (T_{max}), °C	Полуширина перехода ($\Delta T_{1/2}$), °C	Энтальпия (ΔH), Ккал/моль
Липосомы (ДМФХ, 0,2 мг/мл)	19,7	1,0	3,72
Липосомы+Qr, $1,0 \cdot 10^{-6}$ М	19,7	1,2	3,05
Липосомы+Qr, $5,0 \cdot 10^{-6}$ М	19,6	1,2	2,81
Липосомы+Qr, $1,0 \cdot 10^{-5}$ М	19,7	1,2	1,91
Липосомы+Qr, $5,0 \cdot 10^{-5}$ М	19,1	1,3	0,95
Липосомы+Qr, $1,0 \cdot 10^{-4}$ М	18,2	2,4	1,81

Таблица 2

Параметры плавления липидов ДМФХ (0,2 мг/мл) в присутствии комплекса [Qr + Al³⁺] при различных молярных соотношениях веществ

Образец	Максимум температуры перехода (T_{max}), °C	Полуширина перехода ($\Delta T_{1/2}$), °C	Энтальпия (ΔH), Ккал/моль
Липосомы (ДМФХ, 0,2 мг/мл)	19,7	1,2	3,84
Липосомы+[Qr+Al ³⁺], 1:0,1	19,8	1,7	3,23
Липосомы+[Qr+Al ³⁺], 1:0,5	19,5	1,8	4,21
Липосомы+[Qr+Al ³⁺], 1:1	19,5	1,7	3,81
Липосомы+[Qr+Al ³⁺], 1:5	19,1	1,4	1,55
Липосомы+[Qr+Al ³⁺], 1:10	18,9	1,3	0,61

На основании полученных данных можно заключить, что в фосфолипидном бислое процессы комплексообразования флавоноидов с катионами алюминия могут отличаться от таковых в водном растворе. В настоящее время не существует общей теории, позволяющей связать структуру флавоноидов с их антиоксидантной активностью. Неверно утверждать, что какие-то флавоноиды более эффективны, чем другие, не учитывая конкретные условия эксперимента и особенностей окислителя.

Выводы

1. Методом УФ-видимой спектроскопии получено, что при смешивании флавоноида кверцетина с ионами трехвалентного алюминия образуются комплексы с соотношением кверцетин : Al³⁺ как 1 : 1.
2. Антирадикальная активность комплекса кверцетин : Al (III) выше, чем у свободного флавоноида по данным хемилюминесценции в модельной системе гемоглобин – люминол – пероксид водорода.

3. Кверцетин в концентрациях от $1,0 \cdot 10^{-6}$ М до $1,0 \cdot 10^{-5}$ М незначительно подавляет главный фазовый переход в мембранах, но при концентрациях

$5,0 \cdot 10^{-5}$ М и $1,0 \cdot 10^{-4}$ М он вызывает снижение температуры главного фазового перехода. Комплекс флавоноида с Al³⁺ (при молярном соотношении от 1:0,5 до 1:10) вызывает снижение T_m , однако меньше влияет на кооперативность.

Список литературы

1. Xu D., Hu M.J., Wang Y.Q., Cui Y.L. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*. 2019. Vol. 24. No. 6. P. 1123–1138. DOI: 10.3390/molecules24061123.
2. Salehi B., Machin L., Monzote L., Sharifi-Rad J., Ezzat S., Salem Mohamed A., Merghany R.M., El Mahdy Nihal M., Kiliç C.S., Sytar O., Sharifi-Rad M., Sharopov F., Martins N., Martorell M., Cho W. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*. 2020. Vol. 5. No. 20. P. 11849–11872. DOI: 10.1021/acsomega.0c01818.
3. Zu Y., Wu W., Zhao X., Li Y., Wang W., Zhong C., Zhang Y., Zhao X. Enhancement of solubility, antioxidant ability and bioavailability of taxifolin nanoparticles by liquid

- antisolvent precipitation technique. *Int. J. Pharm.* 2014. Vol. 471. No. (1–2). P. 366–376. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.049.
4. Samsonowicz M., Regulska E. Spectroscopic study of molecular structure, antioxidant activity and biological effects of metal hydroxyflavonol complexes. *Spectrochim. Acta Part A*. 2017. Vol. 173. P. 757–771. DOI: 10.1016/j.saa.2016.10.031.
5. Mendoza E.E., Burd R. Quercetin as a Systemic Chemopreventative Agent: Structural and Functional Mechanisms. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2011, Vol. 11. P. 1216–1221. DOI: 10.2174/13895575111091216.
6. Corrente G.A., Malacaria L., Beneduci A., Furia E., Marino T., Mazzone G. Experimental and theoretical study on the coordination Properties of quercetin towards aluminum(III), iron(III) and copper(II) in aqueous solution. *J. Mol. Liq.* 2021. Vol. 325. P. 115171. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.115171.
7. Wang Z., Wei X., Yang J., Suo J., Chen J., Liu X., Zhao X. Chronic exposure to aluminium and risk of Alzheimers disease: A meta-analysis. *Neuroscience Letters*. 2016. Vol. 610. P. 200–206. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.11.014.
8. Malacaria L., Corrente G., Beneduci A., Furia E., Marino T., Mazzone G. A Review on Coordination Properties of Al (III) and Fe (III) toward Natural Antioxidant Molecules: Experimental and Theoretical Insights. *Molecules*. 2021. Vol. 26. P. 2603–2627. DOI: 10.3390/molecules26092603.
9. Токавкина Н.А., Зурабян С.Э., Белобородов В.Л. *Органическая химия: учебник для вузов: В 2 кн. Специальный курс*. М.: Дрофа, 2008. 592 с.
10. Kejík Z., Kaplánek R., Masařík M., Babula P., Matkowski A., Filipenský P., Vesela K., Gburek J., Sýkora D., Martásek P., Jakubek M. Iron Complexes of Flavonoids-Antioxidant Capacity and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. P. 646–647. DOI: 10.3390/ijms22020646.
11. Inczedy J. *Analytical applications of complex equilibria*, Ellis Horwood Ltd., New York, 1976.
12. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Определение антиоксидантной активности плазмы крови с помощью системы гемоглобин – пероксид водорода – люминол // *Вопросы медицинской химии*. 1997. Т. 44. № 1. С. 70–76.
13. Oteiza P.I., Erlejman A.G., Verstraeten S.V., Keen C.L., Fraga C.G. Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin. Dev. Immunol.* 2005. Vol. 12. P. 19–25. DOI: 10.1080/10446670410001722168.
14. Kim Yu.A., Tarahovsky Yu.S., Yagolnik E.A., Kuznetsova S.M., Muzafarov E.N. Lipophilicity of flavonoid complexes with iron (II) and their interaction with liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 431. P. 680–685. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.060.