

СТАТЬЯ

УДК 57.044

**МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ДЕЙСТВИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА МЕМБРАНУ ЛИПОСОМ
ИЗ ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНА**

¹Ягольник Е.А., ²Ким Ю.А.

¹Тулский государственный университет, Тула, e-mail: yea_88@mail.ru;

²Институт биофизики клетки, Федеральный исследовательский центр

Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушчино, e-mail: yuk01@rambler.ru

В работе представлены результаты экспериментального исследования действия флавоноидов разного класса на мембрану липосом из фосфатидилэтанолamina. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии определены термодинамические параметры и охарактеризованы термограммы плавления бислойной и небислойной структуры липида в присутствии катехина, кверцетина, дигидрокверцетина, флоретина. Показано, что в интервале температур 15–30°C кверцетин и дигидрокверцетин вызывают уменьшение высоты перехода на термограммах сканирования липосом и увеличивается энтальпия. Наиболее значительное влияние оказывает флоретин, которое проявляется в снижении энтальпии перехода с 4,39 kcal/mol до 3,52 kcal/mol, при этом полуширина перехода увеличивается почти в 7 раз. Фазовый переход «бислой – гексагональная H_{II} фаза», в норме наблюдающийся в области 69°C, в присутствии катехина происходит при температуре 71,7°C. Существенное изменение вызывает дигидрокверцетин, в присутствии которого энтальпия перехода понижается с 0,49 kcal/mol до 0,32 kcal/mol. Флоретин оказывает слабое влияние на небислойную структуру, в отличие от его действия на бислой мембраны. Предполагается возможность аналогичных изменений фазового состояния липидов в клеточных мембранах при действиях флавоноидов, что может приводить к изменению баланса между липидами.

Ключевые слова: флавоноиды, мембраны, липосомы, микрокалориметрия, фосфатидилэтанолamin

**STUDY OF THE EFFECT OF FLAVONOIDS
ON THE MEMBRANE OF MICROCALORIMETRIC
LIPOSOMES FROM PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE**

¹Yagolnik E.A., ²Kim Yu.A.

¹Tula state University, Tula, e-mail: yea_88@mial.ru;

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

The paper presents the results of an experimental study of the effect of flavonoids of different classes on the membrane of liposomes from phosphatidylethanolamine. Thermodynamic parameters were determined by differential scanning calorimetry and thermograms of melting of bilayer and non-bilayer lipid structures in the presence of catechin, quercetin, dihydroquercetin, and phloretin were characterized. It has been shown that in the temperature range of 15–30°C, the actions of quercetin and dihydroquercetin cause a decrease in the transition height on the thermograms of liposome scanning and an increase in enthalpy. Phloretin has the most significant effect, causing a decrease in the enthalpy of transition from 4.39 kcal/mol to 3.52 kcal/mol, while the half-width of the transition increases by almost 7 times. The phase transition bilayer – hexagonal H_{II} phase, normally observed in the region of 69 °C, in the presence of catechin occurs at a temperature of 71.7°C. A significant change is caused by dihydroquercetin, in the presence of which the enthalpy of transition decreases from 0.49 kcal/mol to 0.32 kcal/mol. Phloretin has little effect on the non-bilayer structure, in contrast to its effect on the bilayer membrane. The possibility of similar changes in the phase state of lipids in cell membranes under the action of flavonoids is assumed, which can lead to a change in the balance between lipids.

Keywords: flavonoids, membranes, liposomes, microcalorimetry, phosphatidylethanolamine

Большинство исследований взаимодействия полифенольных соединений растительного происхождения с липидами и липидными мембранами, представленных в литературе [1–3], проводились с использованием фосфолипидов, входящих в состав наружной стороны мембран, обычно фосфатидилхолинов, образующих бислой [2, 3]. Однако биологические мембраны состоят из широкого спектра липидов: липидов, которые образуют бислой, и липидов, которые могут принимать небислой-

ные структуры, такие как инвертированная гексагональная фаза (H_{II}) [4]. Фосфатидилэтанолamin, второй по распространенности фосфолипид, является примером этого небислойного класса фосфолипидов, молекулы которого в изолированном виде образуют бислойные структуры в диапазоне температур вблизи точки плавления липида. При дальнейшем нагревании липид претерпевает фазовый переход из бислоя в гексагональную H_{II} фазу, который зависит от различных внутренних и внешних факто-

ров [5]. Предполагается, что небислойные фосфолипиды в силу своей формы образуют локальные переходные структуры, которые, как считается, играют важную роль в жизненно важных клеточных процессах, таких как слияние мембран, образование везикул и деление клеток [6]. Помимо этих процессов, небислойные фосфолипиды воздействуют на функцию мембран, влияя на объемные свойства мембран, которые, в свою очередь, влияют на вставку, укладку и функцию некоторых интегральных мембранных белков [7]. Модулятором фазовых переходов в мембранах могут служить некоторые растительные полифенолы из большого класса флавоноидов. Например, было обнаружено, что некоторые флавоноиды способны инициировать образование небислойной фазы [8] в липидной мембране, процесс которого зависит от количества ОН-групп в молекуле [9].

Несмотря на большое количество опубликованных работ по взаимодействию флавоноидов с липидами *in vitro* в модельных бислоях (липосомах), действие липидов, способных формировать и изменять небислойные структуры, остается мало изученным.

Цель исследования – исследование влияния флавоноидов на термически индуцированные фазовые переходы фосфолипидов в мембранах липосом.

Материалы и методы исследования

В работе использовали фосфолипид: 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилэтанолламин (ФЭ) (Avanti Polar Lipids, USA), флавоноиды (Sigma-Aldrich, USA), Tris-HCl (Serva, Germany).

Приготовление липосом. В круглодонной колбе растворенный в хлороформе фосфолипид фосфатидилэтанолламин (ФЭ) высушивали в струе аргона до образования тонкой пленки на стенке сосуда. Для полного удаления растворителя препарат вакуумировали в течение 24 часов, затем липид гидратировали в 10 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,4) путем механического встряхивания на вортексе или шейкере при температуре выше фазового перехода. Для полной гидратации липосом образцы медленно нагревали до температуры 90°C – выше температуры фазового перехода бислоя мембраны в небислойную структуру, охлаждали до комнатной температуры и использовали в экспериментах.

Флавоноиды (катехин, дигидрокверцетин, флоретин (рис. 1B, 1C, 1D), растворенные в 70%-ном этаноле, кверцетин (рис. 1A) – в ДМСО) добавляли в суспензию готовых липосом, встряхивая на шейкере или вортексе. Объем вносимого растворителя составлял не более 0,1%.

Плавление липидов в липосомах для термического анализа осуществляли с использованием дифференциального адиабатного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (ИБП РАН, г. Пушкино, Россия). Скорость прогрева составляла 1 К/мин [10]. Температуры фазового перехода (гелевый в жидкокристаллический (T_m) или бислой в небислойную фазу (T_{hex})) определяли как температуру пикового максимума на термограммах сканирования липосом. Изменение энтальпии фазовых переходов (ΔH) получали по площадям под пиками переходов.

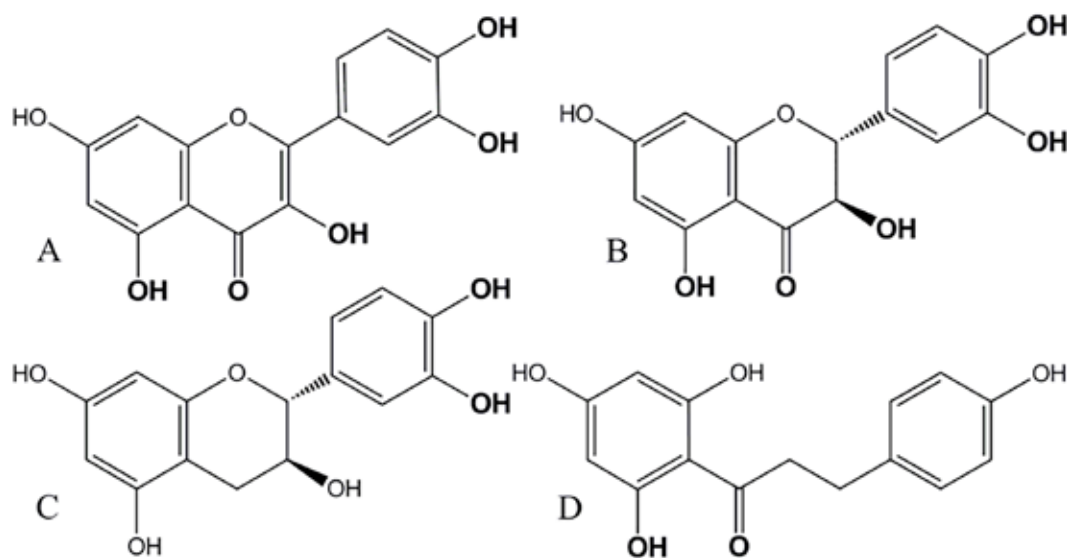


Рис. 1. Флавоноиды: А – кверцетин, В – дигидрокверцетин, С – катехин, D – флоретин

**Результаты исследования
и их обсуждение**

На рисунках 2 и 3 представлены термограммы плавления липидов ФЭ в липосомах, характеризующихся фазовыми переходами с максимумами температуры 25,1°C (рис. 2а) и 69,4°C (рис. 3а) в условиях измерения, приведенных в подписях к рисункам.

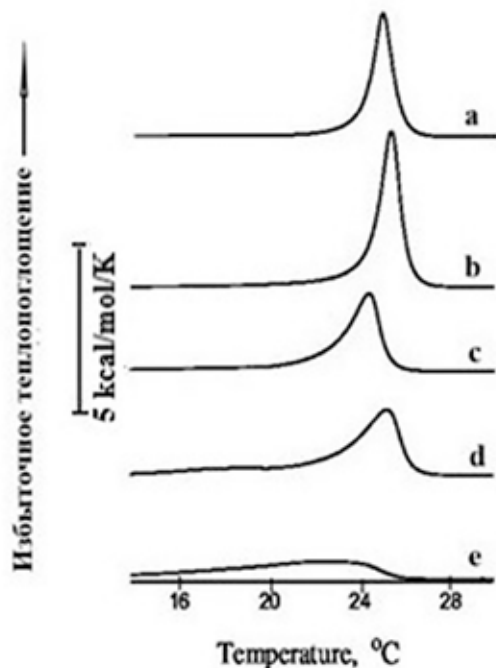


Рис. 2. Термограммы плавления липидов в липосомах из ФЭ (2 мг/мл) в диапазоне температуры плавления бислоя липосом – а. В присутствии флавоноидов ($4,0 \times 10^{-4} M$): катехин – б, кверцетин – с, дигидрокверцетин – д, флоретин – е. Среда измерения: 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4

Два температурных диапазона (рис. 2 и рис. 3), в которых наблюдаются фазовые переходы, представлены отдельно друг от друга. В интервале температур 15–30°C (рис. 2а) действие исследуемых флавоноидов мало чем отличалось от аналогичного

процесса для липосом из димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) [11]. Катехин оказывал слабое влияние на плавление бислоя, тогда как действие кверцетина и дигидрокверцетина на бислои мембраны сводилось к уменьшению высоты перехода на термограммах (рис. 2с, 2д). Наиболее существенное влияние оказывал флоретин (рис. 2е), в присутствии которого снижалась энтальпия перехода с 4,39 kcal/mol до 3,52 kcal/mol, в то время как его полуширина, наоборот, увеличилась почти в 7 раз (табл. 1). Ниже в таблице 1 приведены численные значения термодинамических параметров бислоиной структуры термотропных фазовых переходов ФЭ, термограммы которых представлены на рисунке 2.

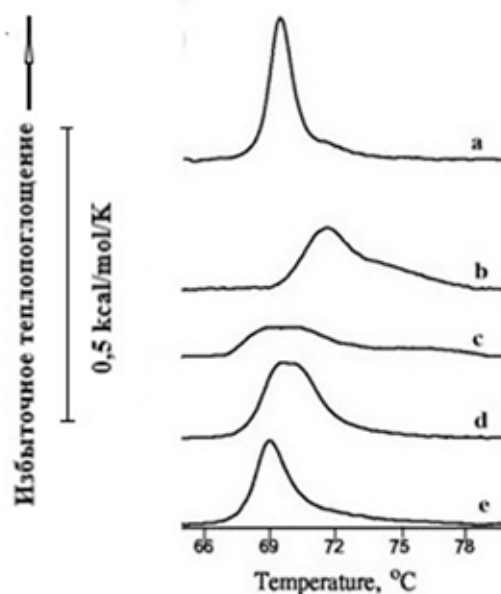


Рис. 3. Термограммы плавления липидов в липосомах из ФЭ (2 мг/мл) в диапазоне температуры перехода из бислоя в гексагональную фазу H_{II} – а. В присутствии флавоноидов ($4,0 \times 10^{-4} M$): катехин – б, кверцетин – с, дигидрокверцетин – д, флоретин – е. Среда измерения: 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4

Таблица 1

Термодинамические параметры фазовых переходов ФЭ

Флавоноид	ΔH , kcal/mol	T, °C	$T_{1/2}$, °C	ΔC_p , kcal/mol/K
ФЭ (контроль)	4,39	25,1	1,0	3,29
ФЭ + катехин	5,77	25,5	1,0	4,02
ФЭ + дигидрокверцетин	4,86	24,5	1,6	2,13
ФЭ + кверцетин	5,07	25,3	2,1	1,58
ФЭ + флоретин	3,52	22,4	7,4	0,44

Термодинамические параметры фазовых переходов ФЭ

Флавоноид	ΔH , kcal/mol	T, °C	T _{1/2} , °C	ΔC_p , kcal/mol/K
ФЭ (контроль)	0,49	69,4	1,3	0,27
ФЭ + катехин	0,45	71,7	2,9	0,12
ФЭ + дигидрокверцетин	0,32	70,2	4,2	0,06
ФЭ + кверцетин	0,52	69,6	2,8	0,15
ФЭ + флоретин	0,43	69,0	1,8	0,17

В интервале температур 65–80°C (рис. 3) действие молекул флоретина (рис. 3e) было наименее выраженным и заключалось в снижении максимума температуры перехода.

Положение максимума температуры перехода в присутствии молекул катехина увеличивалось на 2,5°C, в 2 раза увеличилась энтальпия (рис. 3b) и значительно увеличивалась полуширина перехода (табл. 2). Ниже в таблице 2 приведены численные значения термодинамических параметров гексагональной структуры термотропных фазовых переходов ФЭ, термограммы которых представлены на рисунке 3.

В присутствии дигидрокверцетина (рис. 3d) понижалась энтальпия перехода с 0,49 kcal/mol до 0,32 kcal/mol. Несмотря на существенное изменение формы термограммы плавления липида в присутствии кверцетина (рис. 3c), значение энтальпии перехода почти не изменилось. Таким образом, исследованные молекулы разного класса из обширной группы флавоноидов по-разному действуют на фазовые переходы мембраны из ФЭ как в диапазоне температуры плавления бислоя, так и в области перехода в небислою гексагональную фазу H_{II}.

Молекулы флавоноидов, использованные в работе, отличаются структурой (рис. 1), следовательно, и средством, и местом локализации в липиде. Во многих случаях молекулы флавоноидов расположены близко к полярным группам липидов [2, 12], однако в зависимости от структуры молекул расположение может варьироваться. Изменение максимума температуры плавления и формы кривых термограмм указывает на способность флавоноидов инициировать гетерогенность липидного бислоя. В частности, как отмечалось выше, флавоноиды индуцируют сегментарное упорядочение в мембране [8]. Аналогичные изменения фазового состояния липидов могут происходить и в клеточных мембранах, что способно приводить к изменению баланса между липидами и повлиять на функционирование некоторых мембранных белков. Кроме

того, эти изменения могут влиять и на процессы экзоцитоза и слияния мембран внутри клетки.

Выводы

1. Кверцетин и дигидрокверцетин снижают температуру фазового перехода фосфатидилэтаноламина, происходящего при 25°C, в меньшей степени, чем халкон флоретин. Катехин также снижает температуру плавления бислоя, но повышает температуру перехода из бислоя в гексагональную H_{II} фазу.

2. Флоретин значительно изменяет термодинамические параметры плавления бислоя, но слабо действует на переход в гексагональную H_{II} фазу.

Список литературы

- Karonen M. Insights into Polyphenol–Lipid Interactions: Chemical Methods, Molecular Aspects and Their Effects on Membrane Structures // *Plants* (Basel). 2022. Vol. 11. No.14. P. 1809-1830. DOI: 10.3390/plants11141809.
- Reis A., Soares S., Sousa C. F., Dias R., Gameiro P., Soares S. Interaction of polyphenols with model membranes: Putative implications to mouthfeel perception // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2020. Vol. 1862 (2). P.183133. DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.183133.
- Cyboran-Mikołajczyk S., Żyłka R., Jurkiewicz P., Pruchnik H., Oszmiański J., Hof M., Kleszczyńska H. Interaction of procyanidin B3 with membrane lipids – fluorescence, DSC and FTIR studies // *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2017. Vol. 1859. P. 1362-1371. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.04.026.
- Jouhet J. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization // *Front Plant Sci*. 2013. Vol. 4. P. 494-499. DOI: 10.3389/fpls.2013.00494.
- Yue A.W., Wong B.C., Rieder J., Lewis R.N., Mannoock D.A., McElhane R.N. Effect of independent variations in fatty acid structure and chain length on lipid polar headgroup composition in *Acholeplasma laidlawii* B membranes: regulation of lamellar/nonlamellar phase propensity // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42(5). P. 1309-1317. DOI: 10.1021/bi026923j.
- Garab G., Yaguzhinsky L.S., Dlouhý O., Nesterov S.V., Špunda V., Gasanoff E.S. Structural and functional roles of non-bilayer lipid phases of chloroplast thylakoid membranes and mitochondrial inner membranes // *Progress in Lipid Research*. 2022. Vol. 86. P. 101163. DOI: 10.1016/j.plipres.2022.101163.
- Writoban Basu Ball, John K. Neff, Vishal M. Gohill. The role of non-bilayer phospholipids in mitochondrial structure and function // *FEBS Lett*. 2018. Vol. 592(8). P. 1273-1290. DOI: 10.1002/1873-3468.12887.

8. Ostroumova O.S., Chulkov E.G., Stepanenko O.V., Schagina L.V. Effect of flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. Vol. 178. P. 77-83. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2013.12.005.
9. Efimova S.S., Ostroumova O.S. Plant Polyphenols Induced the Polymorphic Phase Transition of Membrane Lipids // *Biophysical Journal*. 2018. Vol. 114(3). P. 272a. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.11.1570.
10. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидрокверцетина) с многослойными липосомами димиристоилфосфатидилхолина // *Биофизика*. 2008. Т. 53(1). С. 78-83.
11. Кузнецова С.М., Ягольник Е.А., Тараховский Ю.С., Тулеуханов С.Т., Музафаров Е.Н., Ким Ю.А. Исследование взаимодействия растительных полифенолов с фосфолипидами мембран методом дифференциальной сканирующей микрокалоиметрии. IV Съезд Биофизиков России, 20-26 августа 2012 г. Нижний Новгород, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. Симпозиум I «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток». Материалы докладов. Нижний Новгород, 2012. 165 с.
12. Virtanen V., Puljula E., Rääkkönen S., Karonen M. Ellagitannin-lipid interaction by HR-MAS NMR // *Molecules*. 2021. Vol. 26 (2). P. 373-386. DOI:10.3390/molecules26020373.