

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАРИНГЕНИНА, АПИГЕНИНА И МЕНАДИОНА С МЕМБРАНАМИ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ И КВАНТОВОЙ ХИМИИ

А. Г. Вейко*, Е. А. Лапшина, Г. Г. Юхневич, И. Б. Заводник

УДК 577.352.2+577.332+577.29

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
Гродно, Беларусь; e-mail: Veiko_AG@grsu.by

(Поступила 14 марта 2023)

Проведено квантово-химическое моделирование оптимальной геометрии нарингенина, апигенина и менадиона. С использованием метода флуоресцентной спектроскопии зондов оценены их электронные свойства и взаимодействие с искусственными липосомальными мембранами. Установлено, что исследуемые флавоноиды и хинон эффективно взаимодействуют с липосомальными мембранами 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина. С помощью флуоресцентных зондов ТМА-DPH и DPH показано, что апигенин, нарингенин (5–50 мкМ) и менадион (50 мкМ) уменьшают микротекучесть липидного бислоя липосомальных мембран на различной глубине, одновременно апигенин (но не менадион и нарингенин) эффективно тушит флуоресценцию зондов ТМА-DPH и DPH, встроенных в липидный бислой. Взаимодействие исследуемых соединений с мембранами зависит от полярности, объема, геометрии и растворимости молекул в воде. С помощью зонда лаурдана показано, что нарингенин и менадион, встраиваясь в липосомы, дозозависимо переводят бислой в более упорядоченное состояние, тогда как апигенин снижает упорядоченность упаковки молекул липида и повышает гидратацию в области полярных группировок. Торсионный угол между кольцами в планарных молекулах менадиона и апигенина составляет 180°, в молекуле нарингенина — 86.4°. Гликозиды флавоноидов, изолированные из плодов клюквы (25–50 мкг/мл), незначительно повышают микротекучесть липосомальной мембраны в области полярных групп фосфолипидов.

Ключевые слова: флавоноиды, нарингенин, апигенин, менадион, липосома, флуоресцентная спектроскопия, квантово-химическое моделирование, константа Штерна—Фольмера, флуоресцентный зонд.

We performed quantum chemical modeling of the optimal geometry of naringenin, apigenin and menadione and evaluated their electronic properties and interactions with artificial liposomal membranes using fluorescence probe spectroscopy. The fluorescence analysis demonstrated that the flavonoids and quinones under study strongly interacted with 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine liposomal membranes. Using the fluorescent probes TMA-DPH and DPH, incorporated in the lipid bilayer, we showed that apigenin and naringenin (5–50 μ M) and menadione (50 μ M) decreased the microfluidity of the liposomal membrane bilayer at different depths and apigenin rather than menadione and naringenin effectively quenched the fluorescence of these probes TMA-DPH and DPH. Interaction of the studied compounds with the membranes depended on the polarity, volume, geometry and water solubility of the molecules. Using the Laurdan probe we observed that naringenin and menadione dose-dependently transferred the bilayer to a more ordered state, whereas apigenin decreased the order of lipid molecule packing and increased hydration in the region of polar head groups due to incorporation of the effectors into the liposomes. The torsion angle between the rings of the planar menadione and apigenin molecules was equal to 180°, while that of the naringenin molecule was equal to 86.4°, respectively. The cranberry flavonoids in the glycosylated form

STUDY OF THE INTERACTION OF NARINGENIN, APIGENIN AND MENADIONE WITH MEMBRANES USING FLUORESCENT PROBES AND QUANTUM CHEMISTRY

A. G. Veiko*, E. A. Lapshina, H. G. Yuxhnevich, I. B. Zavodnik (Yanka Kupala Grodno State University, Grodno, Belarus; e-mail: Veiko_AG@grsu.by)

(25–50 $\mu\text{g/mL}$) slightly increased the microfluidity of the liposomal membrane in the region of the polar head groups.

Keywords: flavonoids, naringenin, apigenin, menadione, liposome, fluorescence spectroscopy, quantum chemical modeling, Stern–Volmer constant, fluorescence probe.

Введение. Флавоноиды, вторичные метаболиты высших растений, не синтезируемые в животных тканях, характеризуются огромным разнообразием химических структур и демонстрируют многочисленные благоприятные биохимические и фармакологические эффекты в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [1]. Флавоноиды — класс растительных полифенолов, характеризующихся общей дифенилпропановой структурой С6–С3–С6. Природные фенольные соединения структурно варьируют от простых фенольных молекул до сложных высокомолекулярных полимеров и не только являются простыми антиоксидантами, но и модулируют высокоспецифичные внутриклеточные реакции и сигнальные пути [2]. В ходе модельных и эпидемиологических исследований показано, что флавоноиды, их метаболиты и синтетические производные обладают рядом важных фармакологических свойств, которые предотвращают развитие неврологических, сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний [1, 3, 4]. Ранее нами были изучены благоприятные протекторные эффекты флавоноидов при диабете [5], токсическом повреждении печени [6], их антибактериальная активность [7]. Молекулярные и клеточные механизмы биохимических и фармакологических эффектов флавоноидов активно исследуются. Широко известны антимутагенный, противовоспалительный потенциал полифенолов, их антиоксидантная активность, способность детоксифицировать свободные радикалы. Флавоноиды эффективно регулируют редокс-баланс клеток, многочисленные клеточные сигнальные пути, экспрессию определенных генов. Однако отсутствует детальная информация о метаболизме флавоноидов и хинонов, механизмах химических превращений *in vitro* и *in vivo*, образующихся промежуточных продуктах, взаимодействиях с клеточными структурами и сигнальными каскадами, что ограничивает их фармакологическое применение. Биохимические эффекты флавоноидов во многом определяются их непосредственным взаимодействием с белками и мембранами. В настоящей работе оценены параметры взаимодействия избранных флавоноидов — флавона апигенина и флаванона нарингенина, широко представленных в диете человека, и хинона менадиона с искусственными липосомальными бислойными мембранами, полученными из 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (DMPC) с использованием флуоресценции зондов, встроенных в липосомальные мембраны. Флавоноиды нарингенин и апигенин относятся к вторичным метаболитам растений и проявляют разнообразную биологическую активность. Наряду с полифенолами (флавоноидами) рассмотрено взаимодействие с мембранами хинона, в качестве которого выбран липофильный ароматический кетон менадион (витамин К₃). Известно, что цитотоксичность флавоноидов, которая во многом определяется их прооксидантным действием, связана с образованием свободных радикалов и продуктов окисления — хинонов. Цитотоксичность возрастает по мере снижения окислительно-восстановительного потенциала пары семихинон/гидрохинон (пары фенокислительный радикал/фенол) и роста липофильности флавоноидов [8].

Менадион (2-метил-1,4-нафтохинон) представляет собой полициклический ароматический кетон (витамин К), восстанавливаемый до соответствующего фенола в окислительно-восстановительном цикле. Менадион — перспективный химиотерапевтический агент, легко встраивается в мембранные системы, изменяя организации мембранных структур; высокая реакционность менадиона обусловлена его высокой токсичностью [9]. Показано прямое взаимодействие менадиона с мембранным насосом — белком NoxA. Встраивание менадиона в мембраны бактериальных клеток приводит к изменению организации мембран и морфологии бактериальной клетки [10].

Цель настоящей работы — определение электронных свойств и механизмов взаимодействия полифенолов (апигенина, нарингенина) и хинона (менадиона) с мембранными структурами с использованием метода флуоресцентной спектроскопии.

Эксперимент. Использованы трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-HCl), 6-лауроил-N,N-диметил-2-нафтиламин (лаурдан) (Sigma-Aldrich-Merck, США-Германия); 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (DPH) и N,N,N-триметил-4-(6-фенил-1,3,5-гексатриен-1-ил)фениламмоний *para*-толуолсульфонат (TMA-DPH) (Molecular Probes, США); апигенин (4',5,7-тригидроксифлавоон), нарингенин (Toronto Research Chemicals, Канада); менадион (Chem-Impex INT'L INC, США); 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин (DMPC) (Avanti Polar Lipids, США). Хлорид натрия, натрий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный, органические растворители соответство-

вали квалификации ч.д.а. (“Ленреактив”, “Реахим”, Россия) и использованы без дополнительной очистки. Комплекс флавоноидов плодов клюквы выделяли, как описано в [11]. Общее содержание полифенолов составляло 480 мг в 100 г лиофилизованного экстракта. Использовали свежеприготовленные растворы комплекса флавоноидов в изотоническом растворе PBS (145 mM NaCl, 1.9 mM NaH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) в концентрации 300 мкг/мл, свежеприготовленные 5 mM растворы флавоноидов и менадиона в этаноле.

Липосомы (бислойные замкнутые везикулы) получены методом экструзии с использованием мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, США) из DMPC (14:0), как описано в [12]. Смесь хлороформ/липид выпаривали в атмосфере азота, полученную тонкую липидную пленку растворяли в PBS (pH 7.4), нагревая до 45 °C. Суспензию липидов фильтровали, пропускали 15 раз через поликарбонатную мембрану экструдера (диаметр пор 100 нм) для получения однородной суспензии липосом. Конечная концентрация липосом 100 мкг/мл.

Структуру искусственных липосомальных мембран анализировали по анизотропии флуоресценции зондов 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (DPH) и N,N,N-триметил-4-(6-фенил-1,3,5-гексатриен-1-ил)фениламмоний *para*-толуолсульфонат (ТМА-DPH). DPH растворяли в тетрагидрофуране, ТМА-DPH — в метаноле, исходная концентрация зонда 1 mM. Липосомы (100 мкг/мл) инкубировали с DPH или ТМА-DPH в конечной концентрации 1 мкМ в течение 20 мин при 25 °C в PBS, pH 7.4. Значения анизотропии флуоресценции регистрировали в отсутствие и в присутствии флавоноидов (спектрофлуориметр Perkin-Elmer LS 55B, Великобритания). Изменения микровязкости мембран после внесения полифенолов и менадиона определяли по анизотропии флуоресценции (r), рассчитанной программой управления параметрами флуоресценции спектрофлуориметра:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}},$$

где I_{VV} и I_{VH} — вертикальная и горизонтальная интенсивности флуоресценции при вертикальной поляризации возбуждающего светового потока; G — поправочный коэффициент, корректирующий поляризационные эффекты монохроматора: $G = I_{HV}/I_{HH}$, где I_{HV} и I_{HH} — вертикальная и горизонтальная интенсивности флуоресценции при горизонтальной поляризации возбуждающего светового потока. Результаты представлены в виде отношения r_s/r_0 , где r_s и r_0 — анизотропия флуоресценции зондов в присутствии и в отсутствие полифенолов. Длины волн возбуждения и излучения 348 и 426 нм для DPH, 340 и 430 нм для ТМА-DPH.

Структура и гидратация липосомальных мембран проанализированы с помощью флуоресцентного зонда лаурдана. Флуоресцентный зонд 6-лауроил-N,N-диметил-2-нафтиламин (лаурдан) растворяли в диметилсульфоксиде (1 mM) и инкубировали в суспензии липосомальных мембран (100 мкг/мл) в PBS, pH 7.4, в течение 15 мин при 37 °C, чтобы позволить зонду встроиться в мембрану, конечная концентрация зонда 0.3 мкМ. Флуоресценцию лаурдана регистрировали с помощью спектрофлуориметра Perkin-Elmer LS 55B (Великобритания). Генерализованную поляризацию (GP) лаурдана рассчитывали по формуле: $GP = (I_{440} - I_{490})/(I_{440} + I_{490})$, где I_{440} и I_{490} — интенсивности флуоресценции зонда при возбуждении на длине волны 350 нм, зарегистрированные при 440 и 490 нм. Флуоресценция лаурдана чувствительна к полярности окружающей среды и отражает изменения состояния и гидратацию мембраны благодаря связи дипольного момента зонда с его спектром флуоресценции. Степень гидратации оценивали по величине GP флуоресценции [13].

Расчеты. Расчеты квантово-химических параметров и молекулярной геометрии выполнены с использованием пакета вычислительных программ HyperChem 8.0 (Hypercube Inc., США) на основе полуэмпирического метода AM1 (The Austin Model 1), метода *ab initio* с базисом 6-31G и алгоритма Полака—Рибьера, при которых рассчитывается оптимальная конформация молекулы с минимальным градиентом распределения энергии в вакууме. Результаты экспериментальных исследований в виде средних значений ± стандартное отклонение проверены на соответствие нормальному распределению критерием Шапиро—Уилка. При нормальном распределении данных различия между параметрами, измеренными в группах, проанализированы с помощью критерия Стьюдента. В случае, если распределения данных отличались от нормального, достоверность различий между параметрами, измеренными в группах, анализировали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы GraphPad и StatSoftStatistica. Параметр значимости установлен на уровне $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Поскольку электронные и молекулярные параметры флавоноидов и хинонов имеют большое значение для биохимической и фармакологической активности, рассчитаны квантово-химические параметры молекул нарингенина, анигенина и менадиона (табл. 1). Оптимизированные геометрии молекул представлены на рис. 1. Кольца *AC* и *B* в молекуле флавоноида апи-генина (но не нарингенина) располагаются в одной плоскости. Торсионный угол C3-C2-C1'-C2' равен 180°, планарность молекулы апигенина определяет, вероятно, наличие двойной связи C2=C3 в C-кольце структуры апигенина. Молекула менадиона также планарна. Согласно расчетам AM1, дипольный момент исследуемых молекул возрастает в следующем порядке: менадион < нарингенин < апигенин (табл. 1), что отражает эффективность электростатических взаимодействий молекул с окружением. Молекула апигенина обладает наименьшей энергией НВМО (нижняя вакантная молекулярная орбиталь, т. е. свободная орбиталь с самой низкой энергией) и, следовательно, выступает как эффективный акцептор электронов при атаке нуклеофилами.

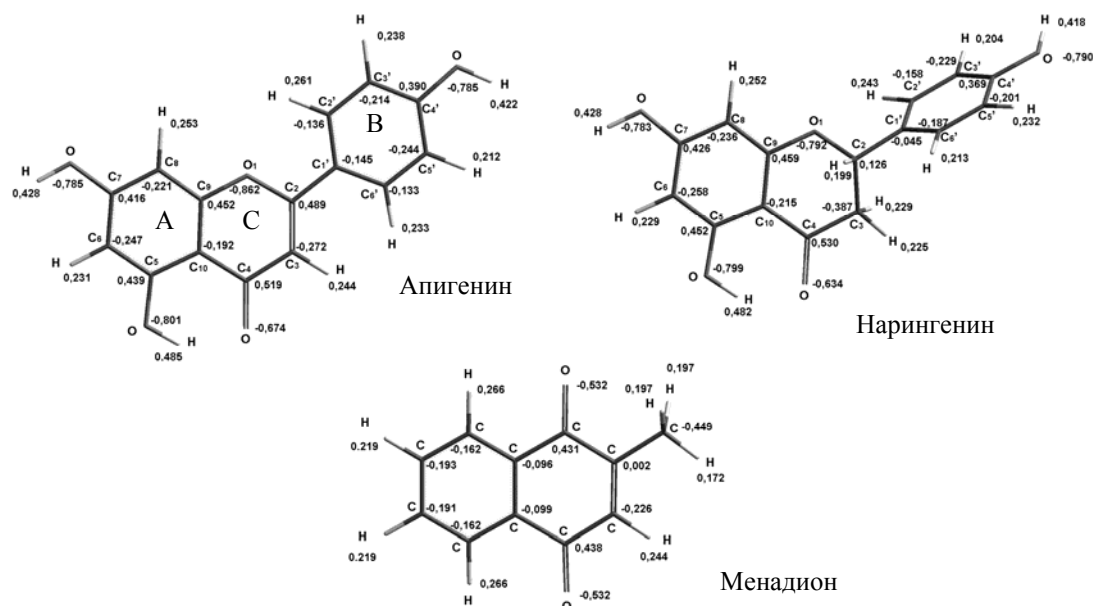


Рис. 1. Оптимизированная молекулярная структура и избыточные заряды атомов в молекулах апигенина, нарингенина, менадиона, рассчитанные неэмпирическим методом *ab initio* с использованием базиса 6-31G и неограниченного метода Хартри—Фока в приближении самосогласованного поля и алгоритма Полака—Рибьера

Т а б л и ц а 1. Квантово-химические параметры и торсионные углы молекул нарингенина, апигенина и менадиона

Параметр	Нарингенин	Апигенин	Менадион
AM1 UHF			
Количество электронов	102	100	64
Общая энергия, ккал/моль	-85033.734	-84380.214	-49768.600
Энергия связей, ккал/моль	-3640.1191	-3512.2053	-2439.4955
Теплота образования, ккал/моль	-153.750	-130.040	-23.772
Дипольный момент, Д	1.602	2.123	1.093
QSAR свойства			
Объем, Å ³	736.63	719.5	525.1
Энергия гидратации, ккал/моль	-22.97	-23.63	-1.28
<i>ab initio</i> UHF (6-31G)			
<i>E</i> (ВЗМО), эВ	-8.8522	-8.6236	-9.7791
<i>E</i> (НВМО), эВ	2.0381	1.4850	2.6751
$\Delta E = E$ (ВЗМО) – <i>E</i> (НВМО), эВ	-10.8903	-10.1086	-12.4542
Торсионные углы, град	86.4	180	180

Для выяснения физико-химической природы взаимодействий флавоноидов и хинонов с фосфолипидными мембранами оценены параметры связывания избранных агентов с липосомами с использованием интенсивности и анизотропии флуоресценции липофильных флуоресцентных зондов DPH, TMA-DPH и GP зонда лаурдана. Представляет интерес определение взаимосвязи структуры исследуемых соединений и их влияния на состояние искусственных мембран. Изменения микровязкости липидных бислоев мембран в присутствии флавоноидов и менадиона определяли с помощью DPH и TMA-DPH с различной локализацией в мембранном бислое. Зонд TMA-DPH локализован на границе раздела вода/мембрана в области полярных “головкок” фосфолипидов, а зонд DPH расположен в гидрофобной области липосомальных мембран, занятой углеводородными цепями фосфолипидов. Анизотропия флуоресценции этих зондов отражает изменения подвижности зондов и пропорциональна жесткости бислоя и его упорядоченности.

Результаты исследований представлены в виде зависимости отношения (r_s/r_0) анизотропии флуоресценции зондов DPH и TMA-DPH, включенных в липидный бислой (рис. 2) от концентрации полифенолов. Измерения анизотропии флуоресценции зондов DPH и TMA-DPH показывают, что липофильный флавоноид апигенин непосредственно взаимодействует с DMPC липосомальными мембранами, значительно увеличивая параметр r_s/r_0 для обоих зондов, дозозависимо (5—50 мкМ) уменьшая текучесть липидного бислоя (увеличивая упорядоченность и жесткость) как на границе раздела вода/мембрана, так и в области углеводородных цепей липидов. Влияние апигенина, более выраженное в случае регистрации флуоресценции зонда TMA-DPH по сравнению с зондом DPH, отражает преимущественную локализацию флавоноида в поверхностной области мембраны. В работе [14] сообщалось, что увеличение жесткости мембран в присутствии флавоноидов может препятствовать диффузии свободных радикалов и ингибировать перекисное окисление липидов. Нарингенин также увеличивает жесткость мембраны на границе вода-липидный бислой, однако в гораздо меньшей степени, влияние нарингенина на внутреннюю гидрофобную область мембраны еще менее выражено.

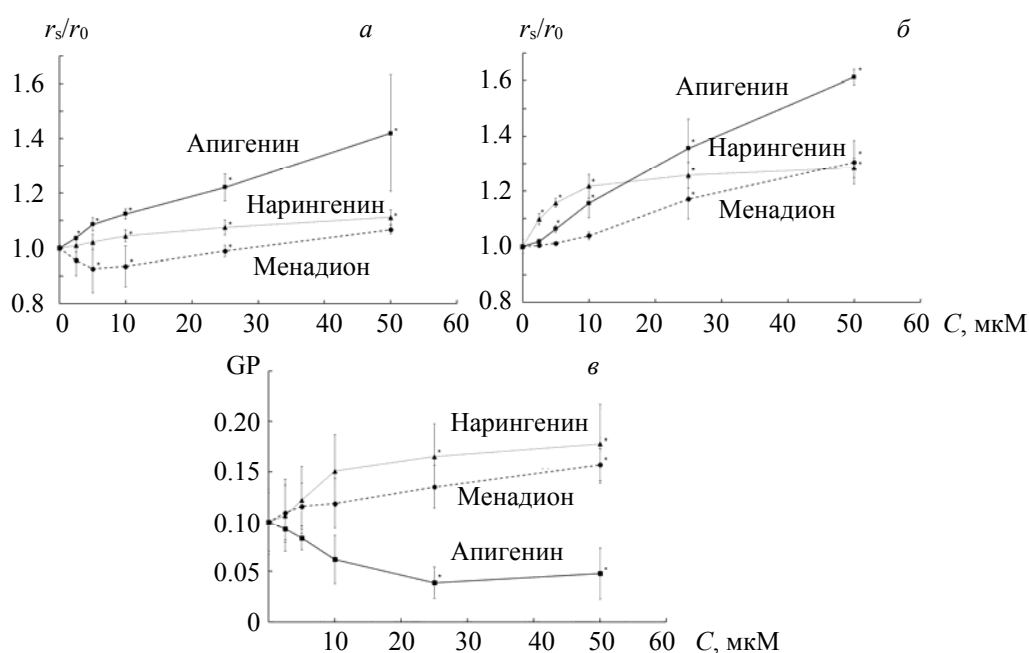


Рис. 2. Зависимости анизотропии флуоресценции зондов DPH, расположенного в гидрофобной части мембран (а), и TMA-DPH, локализованного на границе раздела вода-бислой (б), GP зонда лаурдана, встроенного в липосомальные мембраны (в), от концентрации менадиона, нарингенина и апигенина; липосомы (100 мкг/мл) инкубировали с DPH и TMA-DPH (1 мкМ) в течение 20 мин при 25 °С и с лаурданом (0.3 мкМ) в течение 5 мин при 37 °С в PBS, pH 7.4; $\lambda_{\text{возб}} = 348$ нм и $\lambda_{\text{изл}} = 426$ нм в случае DPH (а) и TMA-DPH (б), в случае лаурдана (в) интенсивности флуоресценции регистрировали при 440 и 490 нм после возбуждения флуоресценции на $\lambda = 350$ нм; $p < 0.05$ по сравнению с липосомальными мембранами в отсутствие флавоноидов и менадиона

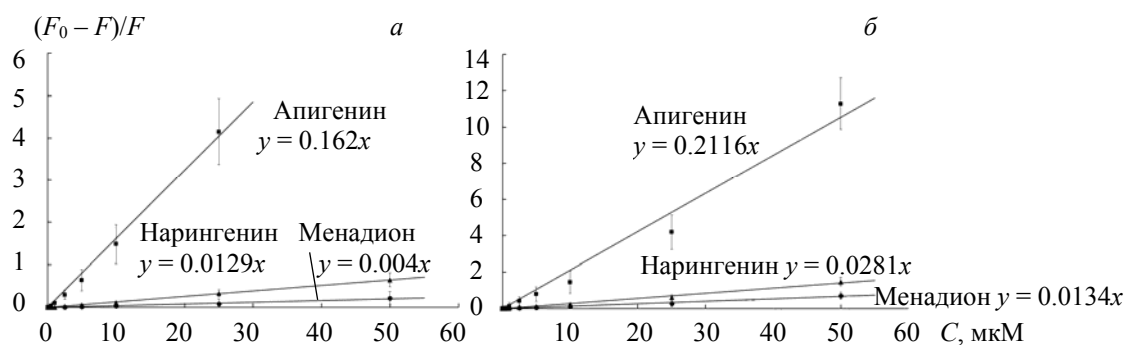


Рис. 3. Зависимости тушения флуоресценции зондов DPH (а) и ТМА-DPH (б), встроенных в липосомальные мембраны, представленные в координатах Штерна—Фольмера, где F_0 и F — интенсивности флуоресценции зонда от эффекторов; липосомы (100 мкг/мл) инкубировали с DPH и ТМА-DPH (1 мкМ) в течение 20 мин при 25 °С, PBS, pH 7.4; эффекторы инкубировали с липосомами в течение 5 мин при 25 °С после встраивания зондов; $\lambda_{\text{возб}} = 348$ нм, $\lambda_{\text{изл}} = 426$ нм; $p < 0.05$ по сравнению с липосомальными мембранами в отсутствие эффекторов

Не растворимый в воде менадион также изменяет организацию липидного бислоя, повышает жесткость на границе вода-бислой, уменьшая жесткость внутренней области мембраны при малых (5–10 мкМ) и повышая жесткость при больших (50 мкМ) концентрациях. Сопоставляя молекулярные параметры апигенина, нарингенина и менадиона и их влияние на структуру и динамику мембран, можно предположить, что взаимодействие с липидным бислоем определяется геометрией молекулы, объемом, полярностью, дипольным моментом.

Влияние флавоноидов и менадиона на параметры флуоресценции DPH и ТМА-DPH сравнивали с влиянием на параметры флуоресценции зонда лаурдана, встроенного в липосомальные мембраны. Флуорофор лаурдан локализован в мембране на уровне глицеринового остова фосфолипидов. Известно, что изменения GP лаурдана связаны с изменениями дипольного момента и отражают степень гидратации липидов на границе раздела вода-липид липосомальных мембран [13]. Как видно из рис. 2, в, влияние исследуемых флавоноидов и менадиона различно: нарингенин, как и менадион, увеличивает GP лаурдана, что указывает на дегидратацию липидного бислоя, апигенин значительно уменьшает, вероятно, из-за возрастания степени гидратации липидного бислоя мембраны и перехода мембраны из твердой упорядоченной фазы в жидкую неупорядоченную в присутствии данного флавоноида [15].

Встраивание молекул эффекторов (флавоноидов апигенина и нарингенина, хинона менадиона) в мембраны оценивали также по эффективности тушения исследуемыми эффекторами флуоресценции зондов DPH и ТМА-DPH, встроенных в липосомы. Зависимости тушения апигенином, нарингенином и менадином флуоресценции зондов DPH и ТМА-DPH, встроенных в липосомальные мембраны, представлены в координатах Штерна—Фольмера на рис. 3. Константы Штерна—Фольмера K_{SV} значительно выше в случае тушения флуоресценции апигенином по сравнению с нарингенином и менадином (табл. 2). Наиболее эффективно проникает в липидный бислой флавоноид апигенин, обладающий наибольшим дипольным моментом и планарной структурой. При этом эффективность тушения зонда, встроенного в мембраны, на границе вода-липидный бислой (ТМА-DPH) выше по сравнению с зондом, локализованным во внутренних областях мембраны (DPH), для всех исследуемых молекул тушителей.

Т а б л и ц а 2. Константы Штерна—Фольмера K_{SV} тушения нарингенином, апигенином и менадином флуоресценции зондов ТМА-DPH и DPH, встроенных в липосомальные мембраны, и растворимость нарингенина, апигенина и менадиона

K_{SV}, M^{-1}	Нарингенин	Апигенин	Менадион
Зонд DPH	$(0.13 \pm 0.01) \cdot 10^5$	$(1.62 \pm 0.05) \cdot 10^5$	$(0.04 \pm 0.01) \cdot 10^5$
Зонд ТМА-DPH	$(0.28 \pm 0.03) \cdot 10^5$	$(2.12 \pm 0.06) \cdot 10^5$	$(0.13 \pm 0.02) \cdot 10^5$
Растворимость в воде, мг/л	4.38 [16]	2.16 [17]	нерастворимый [18]

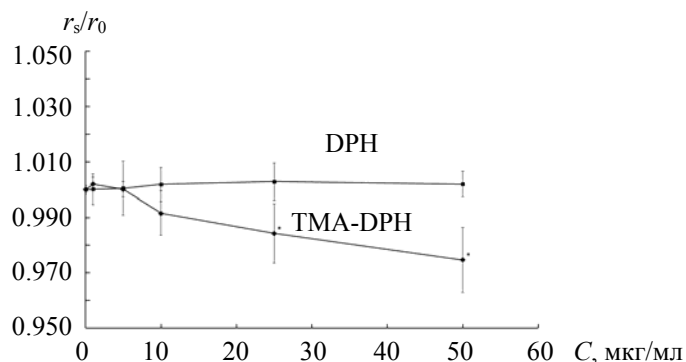


Рис. 4. Зависимости анизотропии флуоресценции зондов DPH и TMA-DPH, встроенных в липосомальные мембраны, от содержания флавоноидов плодов клюквы; липосомы (100 мкг/мл) инкубировали с DPH и TMA-DPH (1 мкМ) в течение 20 мин при 25 °С, PBS, pH 7.4; флавоноиды инкубировали с липосомами в течение 5 мин при 25 °С после встраивания зондов; $\lambda_{\text{возб}} = 348$ нм, $\lambda_{\text{изл}} = 426$ нм; $p < 0.05$ по сравнению с липосомальными мембранами в отсутствие флавоноидов

Оценены параметры взаимодействия с липосомальными мембранами комплекса флавоноидов, изолированных из плодов клюквы. Флавоноиды преимущественно в форме гликозидов в концентрации 25—50 мкг/мл незначительно уменьшают параметр r_s/r_0 в случае зонда TMA-DPH, локализованного на границе раздела вода-бислой, и не влияют на этот параметр в случае зонда DPH, расположенного в гидрофобной части мембраны (рис. 4). Известно, что сродство флавоноидов к мембране, их мембранная проницаемость определяются степенью гидроксирования, молекулярной конфигурацией, длиной боковой цепи флавоноидов [19]. Одним из механизмов благоприятных терапевтических эффектов полифенолов растений может быть их модулирующее действие на состояние и динамику липидного бислоя мембран. Включение и распределение полифенолов и хинона в мембране в нашем эксперименте приводит к изменению биофизических характеристик мембраны, что отражается в выраженных изменениях флуоресцентных характеристик зондов, встроенных в мембрану. Ранее было показано [20], что взаимодействие флавоноида кверцетина с липидным бислоем демонстрирует двойной механизм действия: полифенол распределяется в жидких доменах мембраны, более уязвимых для окислительной атаки, одновременно кверцетин индуцирует сильное возмущение обогащенных холестерином/сфинголипидом доменов, в которых происходит сборка сигнальных платформ. Измерения анизотропии флуоресценции зондов TMA-DPH и DPH показывают, что липофильный флавоноид апигенин и в меньшей степени нарингенин и менадион непосредственно взаимодействуют с липосомальными мембранами и дозозависимо уменьшают микротекучесть (повышают жесткость) на различной глубине липидного бислоя мембраны. Влияние флавоноидов на жесткость гидрофобной зоны мембраны значительно более выражено по сравнению с эффектом на границе вода-мембрана. Ранее [21] было предположено, что полифенолы взаимодействуют в основном с глицериновым остовом и областью ацильных цепей мембран. В [22] продемонстрировано, что встраивание флавоноидов в мембрану может имитировать действие холестерина в мембране и способствовать образованию мембранных микродоменов. В нашем эксперименте комплекс флавоноидов плодов клюквы, представленный преимущественно гликозилированными формами, в отличие от агликонов нарингенина и апигенина незначительно повышает подвижность фосфолипидов в поверхностном слое и не влияет на организацию внутренней области мембран.

Заключение. Изменения параметров флуоресценции зондов TMA-DPH, DPH, лаурдана, встроенных в липидный бислой мембран, позволили оценить влияние полифенолов (апигенина и нарингенина) и хинона (менадиона) на структуру и физико-химические характеристики мембран. Методом квантовой химии оценены геометрия и электронные свойства апигенина, нарингенина и менадиона. Зонды DPH, TMA-DPH и лаурдан различаются локализациями в мембранном бислое. Анизотропия флуоресценции зондов DPH и TMA-DPH отражает изменения подвижности зондов и пропорциональна жесткости липидного бислоя и его упорядоченности. Генерализованная поляризация лаурдана отражает степень гидратации липидов на границе раздела вода-липид липосомальных мембран. Внедрение флавоноидов и хинонов в бислой униламеллярных липосом изменяет упорядоченность упаковки молекул фосфолипидов, степень подвижности фосфолипидов и содержание воды в бислое.

Липофильный флавоноид апигенин дозозависимо (5—50 мкМ) увеличивает упорядоченность и жесткость липидного бислоя как на границе раздела вода-мембрана, так и в области углеводородных цепей липидов. Нарингенин в гораздо меньшей степени увеличивает жесткость мембраны на границе вода-липидный бислой. Не растворимый в воде менадион повышает жесткость на границе вода-бислой, уменьшает жесткость внутренней области мембраны при малых концентрациях и повышает при больших. При этом влияние хинона менадиона менее выражено по сравнению с полифенолами. Сопоставляя молекулярные параметры апигенина, нарингенина и менадиона и их влияние на структуру и динамику мембран, можно предположить, что взаимодействие с липидным бислоем определяется геометрией молекулы, объемом, полярностью, дипольным моментом. Таким образом, высокая биологическая активность флавоноидов и менадиона связана с модуляцией биофизических и биохимических параметров биологических мембран.

- [1] A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra. *J. Nutr. Sci.*, **5**, (2016) e47
- [2] F. Shahidi, P. Ambigaipalan. *J. Funct. Foods*, **18** (2015) 820—897
- [3] D. M. Kopustinskiene, V. Jakstas, A. Savickas, J. Bernatoniene. *Nutrients*, **12**, N 2 (2020) 457
- [4] Y. Xie, W. Yang, F. Tang, X. Chen, L. Ren. *Current Med. Chem.*, **22**, N 1 (2015) 132—149
- [5] V. Buko, I. Zavodnik, O. Kanuka, E. Belonovskaya, E. Naruta, O. Lukivskaya, S. Kirko, G. Budryn, D. Żyżelewicz, J. Oracz, N. Sybirna. *Food Funct.*, **9**, N 3 (2018) 1850—1863
- [6] V. Buko, E. Belonovskaya, T. Kavalenia, T. Ilyich, S. Kirko, I. Kuzmitskaya, V. Moroz, E. Lapshina, A. Romanchuk, I. Zavodnik. *Eur. Pharm. J.*, **69**, N 2 (2022) 5—16
- [7] A. G. Veiko, E. Olchowik-Grabarek, S. Sekowski, A. Roszkowska, E. A. Lapshina, I. Dobrzynska, M. Zamaraeva, I. B. Zavodnik. *Molecules*, **28**, N 3 (2023) 1252
- [8] A. Marozienė, A. Nemeikaitė-Čėnienė, R. Vidžiūnaitė, N. Čėnas. *Acta Biochim. Polonica*, **59**, N 2 (2012) 299—305
- [9] J. P. Monteiro, A. F. Martins, C. Nunes, C. M. Morais, M. Lúcio, S. Reis, T. J. T. Pinheiro, C. F. G. C. Geraldes, P. J. Oliveira, A. S. Jurado. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Biomembranes*, **1828**, N 8 (2013) 1899—1908
- [10] S. R. Tintino, V. C. A. de Souza, J. M. A. da Silva, C. D. de M. Oliveira-Tintino, P. S. Pereira, T. C. Leal-Balbino, A. Pereira-Neves, J. P. Siqueira-Junior, J. G. M. da Costa, F. F. G. Rodrigues, I. R. A. Menezes, G. C. A. da Hora, M. C. P. Lima, H. D. M. Coutinho, V. Q. Balbino. *Membranes*, **10**, N 6 (2020) 130
- [11] E. A. Lapshina, M. Zamaraeva, V. T. Cheshchevik, E. Olchowik-Grabarek, S. Sekowski, I. Zukowska, N. G. Golovach, V. N. Burd, I. B. Zavodnik. *Cell Biochem. Funct.*, **33**, N 4 (2015) 202—210
- [12] A. G. Veiko, S. Sekowski, E. A. Lapshina, A. Z. Wilczewska, K. H. Markiewicz, M. Zamaraeva, H. Zhao, I. B. Zavodnik. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Biomembranes*, **1862**, N 11 (2020) 183442
- [13] S. A. Sanchez, M. A. Tricerri, E. Gratton. *Proc. NAS*, **109**, N 19 (2012) 7314—7319
- [14] A. Arora, T. M. Byrem, M. G. Nair, G. M. Strasburg. *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, N 1 (2000) 102—109
- [15] S. V. Verstraeten, G. K. Jagers, C. G. Fraga, P. I. Oteiza. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Biomembranes*, **1828**, N 11 (2013) 2646—2653
- [16] J. Wen, B. Liu, E. Yuan, Y. Ma, Y. Zhu. *Molecules*, **15**, N 6 (2010) 4401—4407
- [17] W. Alam, C. Rocca, H. Khan, Y. Hussain, M. Aschner, A. De Bartolo, N. Amodio, T. Angelone, W. S. Cheang. *Antioxidants*, **10**, N 10 (2021) 1643
- [18] https://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=CatalogSearch&SearchString=menadione (accessed on 07.03.2023)
- [19] P. Tammela, L. Laitinen, A. Galkin, T. Wennberg, R. Heczko, H. Vuorela, J. P. Slotte. *Arch. Biochem. Biophys.*, **425**, N 2 (2004) 193—199
- [20] A. de Granada-Flor, C. Sousa, H. A. L. Filipe, M. S. C. S. Santos, R. F. M. de Almeida. *Chem. Commun.*, **55**, N 12 (2019) 1750—1753
- [21] O. Wesolowska, J. Gąsiorowska, J. Petrus, B. Czarnik-Matusiewicz, K. Michalak. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Biomembranes*, **1838**, N 1 (2014) 173—184
- [22] Y. S. Tarahovsky, E. N. Muzafarov, Y. A. Kim. *Mol. Cell Biochem.*, **314**, N 1 (2008) 65—71