

УДК 537.531:532.74

**Влияние комплекса кверцетина с Fe<sup>2+</sup> на фосфолипидные мембраны**  
**The impact of quercetin complex with Fe<sup>2+</sup> on the phospholipid membranes**

Махмутов Б.Б.<sup>1</sup>, Абдрасилов Б.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кызылординский государственный университет им. Коркыт Ата (E-mail: Bolat200@rambler.ru);

<sup>2</sup>Министерство образования и науки Республики Казахстан, Астана

Макалада флавоноидтардың фосфолипидті қос қабат арқылы өздігінен өту мүмкіндіктері қарастырылған. Темірмен бірге комплекстердің түзілуі процеске кедергі келтірмейді, керісінше, ықпал тудырады. «Флавоноидтар тасымалдаушы белоктардың қатысуымен немесе өздігінен жасушаға өтуге бейім бе?» деген сұрақ осы уақытқа дейін ашық күйде қалып отыр. Осыған ұқсас жағдай жасушаға ақуыздардың қатысуымен ғана емес, өздігінен өтуге бейім еркін түрдегі май қышқылдарын зерттеу мысалынан да белгілі. Осы құбылыстың мүмкін болатын биологиялық мәнін бағалау үшін флавоноидтардың диффузиясының жылдамдығын, олардың фосфолипидті қос қабат және жасушалық мембрана арқылы өтуін анықтау қажет. Алынған нәтижелер темірмен бірге кверцетин кешенінің құрылуы флавоноидтың фосфолипидті қос қабатпен өзара әрекеттесуін көрсетеді. Мұндай кешендер көптеген қос қабатты құрылымдар арқылы өтуге бейім.

The given work represents the possibility of independent penetration of flavonoids through the phospholipid bilayer. The formation of complexes containing iron does not prevent but promotes this process. The problem concerning the fact whether the flavonoids can penetrate into the cell independently or with the help of transport proteins remains unsolved. The similar situation is already known on the example of researching free fatty acids that are capable of penetrating into a cell not only by means of proteins but independently. For evaluation of the possible biological significance of this phenomenon, it is necessary to determine the rate of diffusion of flavonoids and their complexes with the metals through the phospholipids bilayer and through the cellular membranes. The data, we have obtained, testify that the formation of quercetin complex with iron does not impede the interaction of this flavonoid with the phospholipid bilayer. Such complexes are able to penetrate through the numerous bilayer structures.

*Введение*

Флавоноиды являются широко распространенными в природе фенольными веществами растительного происхождения. Они присутствуют в различных частях растения, включая плоды, листья, цветы. Высоко их содержание в различных растительных экстрактах, используемых в пище, особенно в чае и красном вине [1, 2]. В последние годы были обнаружены важные фармакологические свойства растительных флавоноидов, такие как антиопухолевая активность, способность подавлять размножение патогенных бактерий, нормализация функционирования сердечно-сосудистой системы, благоприятное действие в лечении психо-эмоциональных расстройств. Физико-химической основой биологического действия флавоноидов на организм является его антиоксидантная активность, способность защищать организм от окислительного стресса [3–8]. Например, кверцетин, присутствующий в различных пищевых продуктах, обладает способностью удалять свободные радикалы из организма и связывать катионы металлов переменной валентности, которые иницируют процессы перекисного окисления. Среди металлов, иницирующих перекисное окисление в организме животных и человека, наибольшее значение имеет железо, способствующее появлению радикалов гидроксила в реакции Фентона [9, 10]. В этом случае флавоноиды связывают ионы железа и депротонируют гидроксильные группы с образованием феноксильных радикалов. Связывание свободных ионов железа

предотвращает возможность протекания реакции Фентона и, благодаря этому, препятствует протеканию окислительного стресса. Способность связывать катионы металлов зависит от числа и расположения гидроксильных групп в кольцах полифенолов [11, 12]. Недавние исследования показали [13], что наиболее вероятными сайтами связывания ионов железа в молекуле кверцетина являются 3-я гидроксильная и 4-я карбонильная группы (рис. 1а). За ними следуют 4-я карбонильная и 5-я гидроксильная группы (рис. 1б), а также 3'-я и 4'-я гидроксильные группы (рис. 1в). Возможно также образование комплексов железа с двумя (рис. 1г-е) и тремя (рис. 1ж) молекулами кверцетина. В комплексах железа с двумя молекулами кверцетина возможно образование симметричных форм трех видов. Молекулы кверцетина могут находиться в одной плоскости и иметь отражательную симметрию  $P_R$  (рис. 1з), инверсионную симметрию  $P_I$  (рис. 1д) или в ортогонально расположенных плоскостях  $O$  (рис. 1е).

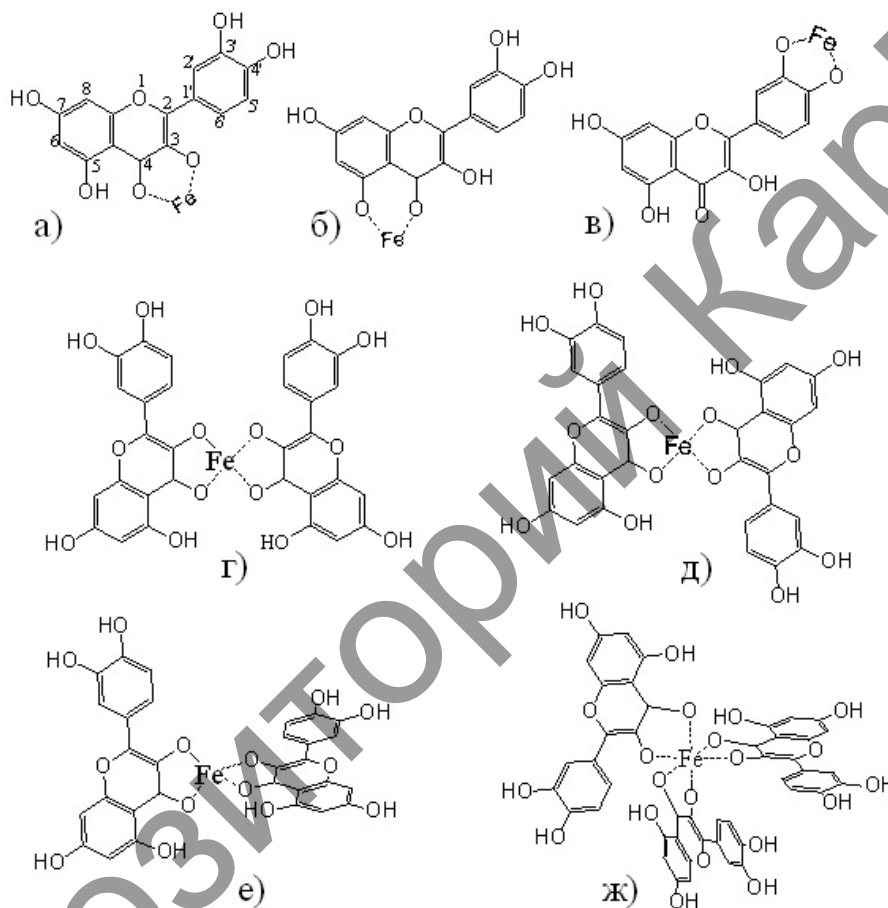


Рис. 1. Различные формы комплексов кверцетина с железом [13]

При образовании комплексов железа с тремя молекулами кверцетина последние, наиболее вероятно, могут располагаться в 3-х ортогонально расположенных плоскостях (рис. 1ж). Расчеты показывают, что наиболее устойчивыми являются комплексы железа с двумя молекулами кверцетина. При этом стабильность комплексов снижается в ряду:  $O > P_R > P_I$ . Несмотря на то, что флавоноиды обладают значительным числом гидроксильных групп, их растворимость в воде весьма ограничена. Напротив, имеются многочисленные свидетельства их способности взаимодействовать с биологическими мембранами и проникать в фосфолипидный бислой, о чем свидетельствуют данные ЯМР и флуоресцентной спектроскопии [14, 15]. Флавоноиды могут располагаться как на периферии бислоя в интерфазной области, так и в более глубоких гидрофобных областях бислоя фосфолипидов [16]. С помощью дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что флавоноиды способны также существенно влиять на процесс плавления фосфолипидного бислоя и, предположительно, на фазовое поведение и структурную организацию биологических мембран [17]. Однако взаимодействие металлокомплексов флавоноидов с биологическими мембранами практически не изучено.

Данная работа посвящена исследованию взаимодействия комплексов кверцетина с железом с липосомами из фосфолипидов.

*Материалы и методы*

В работе использовали синтетический фосфолипид ДМФХ (Avanti Polar Lipids, США); яичный лецитин отечественного производства; кверцетин (Sigma, США); Трис-НСI (Serva, США).

*Приготовление липосом*

Для приготовления моноламеллярных липосом спиртовой раствор яичного лецитина высушивали в струе аргона и вакуумировали в течение ночи. Сухую пленку гидратировали в бидистиллированной воде на шейкере в течение часа. Полученную суспензию мультиламеллярных липосом экстрадировали через поликарбонатные фильтры (диаметр пор 100 нм) с помощью миниэкструдера производства Avanti Polar Lipids (США) по стандартной методике [18, 19].

Мультиламеллярные липосомы из димиристоил фосфатидилхолина производства Sigma (США) получали высушиванием в струе аргона раствора липида в хлороформе и последующим вакуумированием в течение ночи. Полученную пленку гидратировали путем встряхивания при 37 °С в течение часа.

*Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия (ДСК)*

Температурную зависимость избыточного удельного теплопоглощения препаратов липосом регистрировали с помощью дифференциального адиабатного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (ИБП РАН, г. Пущино, Россия). Скорость прогрева составляла 1 К/мин. Для измерений использовали препараты с концентрацией липида 0,10–0,15 мг/мл.

*Спектральные измерения*

Спектры поглощения растворов кверцетина и его комплекса с ионами железа измеряли на спектрофотометре Specord M 40.

*Результаты и обсуждение*

Адсорбционная спектрофотометрия водного раствора кверцетина показывает наличие нескольких максимумов поглощения, среди которых основными являются максимумы 255 нм и 374 нм (рис. 2а). При образовании комплекса кверцетина с железом (2:1) происходит bathochromный сдвиг максимумов поглощения к значениям 267 и 383 нм соответственно (рис. 2б), а также некоторое снижение интенсивности поглощения длинноволнового спектра (383 нм). В присутствии липосом наблюдаются существенные искажения спектра (рис. 2в), связанные со светорассеянием, что выражается в увеличении поглощения, особенно в коротковолновой области.

Вычитание спектра рассеяния исходных липосом из спектра поглощения комплексов не позволяет полностью устранить данный дефект, поскольку после добавления к липосомам комплекса кверцетина с железом происходит дополнительный рост светорассеяния (данные не представлены). В присутствии липосом положение максимумов поглощения комплекса изменяется мало. Расположенный в центральной части спектра максимум при 383 нм остается неизменным. Максимум при 267 нм сдвигается к 263 нм, очевидно, вследствие подъема коротковолнового плеча спектра. Полученные данные позволяют считать, что влияние липосом на спектральные характеристики комплекса кверцетина с железом незначительно.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (рис. 3) показывает наличие существенного влияния кверцетина и его комплекса с железом на плавление бислоя, образованного димиристоил фосфатидилхолином (ДМФХ). Мультиламеллярные липосомы, образованные ДМФХ, плавятся при температуре 24 °С, что на представленной термограмме (рис. 3а) можно наблюдать в виде узкого пика, полуширина которого менее одного градуса (табл. 1).

Концентрация липида:  $1 \cdot 10^{-4}$  М, кверцетина —  $5 \cdot 10^{-6}$  М,  $\text{Fe}^{2+}$  —  $2,5 \cdot 10^{-6}$  М. Все препараты находятся в 10 мМ Трис-НСI, рН 7,5.

Из спектра (3) вычтен спектр поглощения липосом, полученный перед добавлением комплекса.

Добавление в суспензию липосом кверцетина (липид : кверцетин  $\approx 5:1$  моль/моль) снижает температуру плавления липида на 0,5 град., а также приводит к уменьшению высоты и увеличению полуширины пика (рис. 3б). Этот эффект существенно усиливается при добавлении таких же количеств комплекса кверцетина с железом (рис. 3в).

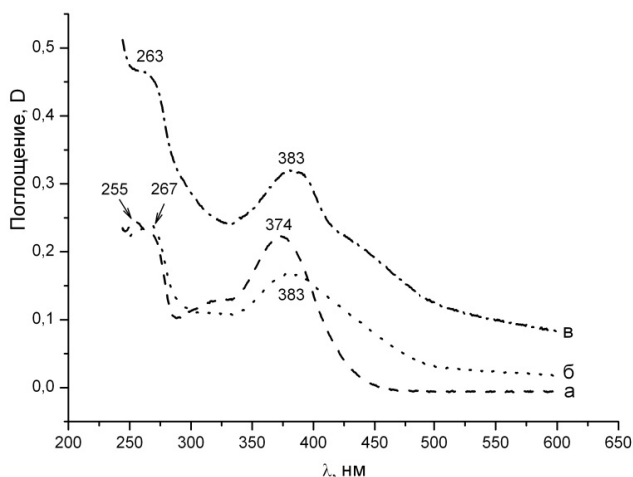


Рис. 2. Спектры поглощения кверцетина и его комплексов в УФ- и видимой области: *а* — спектр кверцетина ( $10^{-5}$  M); *б* — спектр поглощения комплекса кверцетина с железом (2:1 моль/моль); *в* — спектр комплекса кверцетина с железом в присутствии моноламеллярных везикул из яичного лецитина диаметром 100 нм

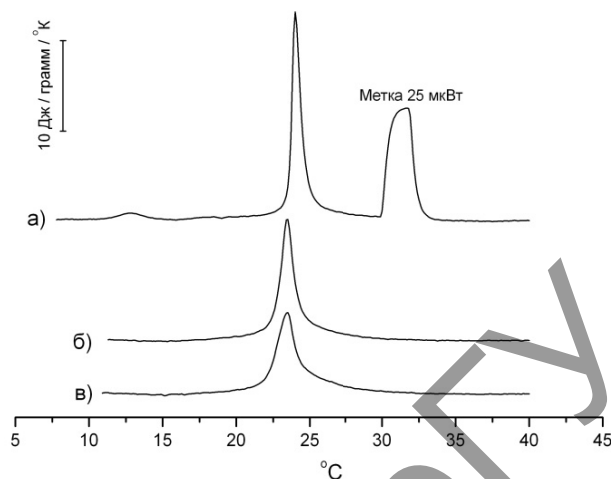


Рис. 3. Термограммы мультисамеллярных липосом из димиристоил фосфатидилхолина: *а* — исходные липосомы (концентрация липида 0,16 мг/мл, что составляет  $23,6 \cdot 10^{-5}$  M); *б* — к липосомам добавлен кверцетин ( $5 \cdot 10^{-5}$  M); *в* — к липосомам добавлен комплекс кверцетин + железо (2:1 моль/моль)

Таблица 1

**Влияние кверцетина и его комплекса с железом (кверцетин:железо = 2:1) на термодинамические характеристики мультисамеллярных липосом из димиристоил фосфатидилхолина**

Препарат	Энтальпия, $\Delta H$ , кДж/моль	Максимум $T_m$ , °C	Высота, кДж/грамм/К	Полуширина, град.
ДМФХ	26,0	24	22,7	0,68
ДМФХ + кверцетин	28,4	23,5	13,4	1,1
ДМФХ + комплекс	27,1	23,5	9,0	1,4

При этом энтальпия процесса плавления липида, пропорциональная площади пика плавления, изменяется на величину  $< 10\%$  от исходной и находится в пределах ошибки измерения, связанной с трудностью точного определения нулевой линии, относительно которой вычисляется площадь пика. Таким образом, можно предполагать, что уменьшение высоты пиков компенсировалось увеличением их ширины, при этом их площадь существенно не изменялась.

Следует отметить, что кверцетин и его комплекс с железом были добавлены к уже сформированным мультисамеллярным липосомам. При этом только внешний монослой липида непосредственно мог соприкасаться с водным раствором, в который был добавлен кверцетин. Для изменения термодинамических характеристик плавления всего объема липида, наблюдаемого на представленной термограмме, необходимо проникновение кверцетина или его комплекса с железом через все бислои структуры липида внутрь мультисамеллярных липосом. Подобное явление уже было описано нами в экспериментах с флавоноидом таксифолином, который также был добавлен к предварительно сформированным мультисамеллярным липосомам из ДМФХ и был способен проникать через бислой липида без нарушения целостности липосом [20]. В настоящей работе мы впервые показали, что кверцетин, а также его комплекс с железом способны проникать через фосфолипидный бислой.

Известно, что флавоноиды способны погружаться в фосфолипидный бислой и их действие на процесс плавления липидов сходен с действием холестерина [21], которое заключается в описанном выше снижении температуры плавления липида и увеличении полуширины перехода. Предполагается, что молекула кверцетина находится в интерфазной области и частично погружена в гидрофобную область углеводородных цепей. При этом ее длинная ось направлена перпендикулярно плоскости бислоя [17].

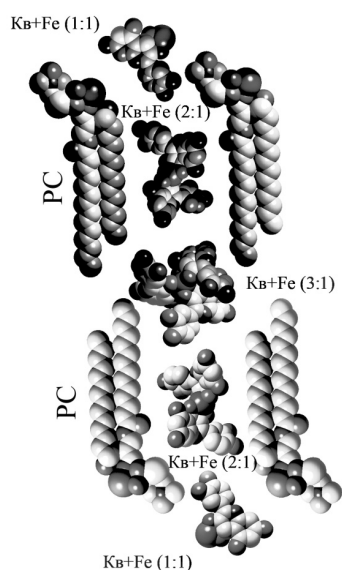


Рис. 4. Схематическое изображение фосфолипидного бислоя, образованного молекулами фосфатидилхолина (PC). (Комплексы кверцетина с железом способны взаимодействовать и погружаться на разную глубину в бислой, в зависимости от соотношения кверцетина и железа (кверцетин + Fe))

Мы предполагаем, что при суммарном соотношении кверцетина к железу 2:1, используемому в наших экспериментах, возможно образование комплексов с различной стехиометрией:



Эти комплексы могут в различной степени погружаться в бислой, при этом наиболее гидрофильный комплекс (кверцетин + 1Fe) находится на периферии бислоя, более гидрофобный комплекс (кверцетин + 2Fe) может погружаться в область углеводородных цепей, тогда как наиболее гидрофобный комплекс способен проникать в центральную часть бислоя. Переход из одной формы комплекса в другую может способствовать их проникновению через бислой (рис. 4).

Способность проникновения флавоноидов через плазматическую мембрану клеток может не только определять биологическое действие на живые клетки, но также и возможность усвоения этих веществ организмом из растительных пищевых источников. В настоящее время обнаружено большое разнообразие белков, служащих для транспортировки различных веществ через мембраны клеток, что может быть сопряжено с расходом энергии [22]. Обнаружено много различных белков, которые могут участвовать в транспорте флавоноидов [23]. Флавоноиды могут транспортироваться через плазматическую мембрану с участием белков, принадлежащих к семейству транспортеров ABC (ATP binding cassette). Существуют также транспортеры, способствующие трансмембранному переносу веществ по градиенту концентрации и без использования энергии. Некоторые транспортеры глюкозы способны участвовать в транспорте гликозидов кверцетина. Среди транспортеров можно также назвать полипептиды, участвующие в транспорте органических анионов. Даже специфические транспортеры нуклеотидов, органических катионов, церамидов и т.д. также могут быть вовлечены в транспорт флавоноидов. В кишечном эпителии существенное значение в транспорте флавоноидов может играть билирубин транслоказа [23].

## References

1. *Kris-Etherton P.M., Lefevre M. et al.* Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis // *Annu. Rev. Nutr.* — 2004. — Vol. 24. — P. 511–538.
2. *Kuhnau J.* The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition // *World Rev. Nutr. Diet.* — 1976. — Vol. 24. — P. 117–191.

Образование комплексов кверцетина с железом может оказывать существенное влияние на гидрофобность молекулы и ее взаимодействие с фосфолипидным бислоем. Так, расчеты коэффициента распределения молекул в системе октанол–вода ( $\log P$ ) показывают, что комплекс кверцетин–железо (1:1) менее гидрофобен, чем молекула кверцетина, однако гидрофобность существенно возрастает в комплексах кверцетин–железо 2:1 и 3:1 (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Коэффициент распределения кверцетина и его комплексов с железом в системе октанол/вода

Вещество	$\log P$
Кверцетин	1,30757
Кверцетин–железо (1:1)	0,86626
Кверцетин–железо (2:1)	3,47752
Кверцетин–железо (3:1)	6,08878

*Примечание.* Данные получены с использованием программы Chem3D Ultra 9.0 (программный пакет Chemical Office, производитель Cambridge Soft).

В соответствии с расчетами данное взаимодействие может усиливаться в комплексах с соотношением кверцетин–железо 2:1 или 3:1.

3. *Folts J.D.* Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2002. — Vol. 505. — P. 95–111.
4. *Halliwel B., Rafter J., Jenner A.* Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2005. — Vol. 81. — P. 268–276.
5. *Hertog M.G.* Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids // *Proc. Nutr. Soc.* — 1996. — Vol. 55. — P. 385–397.
6. *Lee E.R., Kang G.H., Cho S.G.* Effect of flavonoids on human health: old subjects but new challenges // *Recent Pat Biotechnol.* — 2007. — Vol. 1. — P. 139–150.
7. *Stangl V., Lorenz M., Stangl K.* The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health // *Mol. Nutr. Food Res.* — 2006. — Vol. 50. — P. 218–228.
8. *Yao L.H., Jiang Y.M. et al.* Flavonoids in food and their health benefits // *Plant Foods Hum. Nutr.* — 2004. — Vol. 59. — P. 113–122.
9. *Sutton H.C., Winterbourn C.C.* On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions // *Free Radic. Biol. Med.* — 1989. — Vol. 6. — P. 53–60.
10. *Winterbourn C.C.* Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction // *Toxicol. Lett.* — 1995. — Vol. 82–83. — P. 969–974.
11. *Cornard J.P., Merlin J.C.* Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al (III) // *J. Inorg. Biochem.* — 2002. — Vol. 92. — P. 19–27.
12. *Leopoldini M., Russo N. et al.* Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin // *J. Agric. Food Chem.* — 2006. — Vol. 54. — P. 6343–6351.
13. *Ren J., Meng S. et al.* Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures // *J. Phys. Chem. B.* — 2008. — Vol. 112. — P. 1845–1850.
14. *Scheidt H.A., Pampel A. et al.* Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2004. — Vol. 1663. — P. 97–107.
15. *van Dijk C., Driessen A.J., Recourt K.* The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles // *Biochem. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 60. — P. 1593–1600.
16. *Klymchenko A.S., Duportail G. et al.* Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers // *Biophys. J.* — 2004. — Vol. 86. — P. 2929–2941.
17. *Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A.* Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity // *Mol. Cell Biochem.* — 2008. — Vol. 314. — P. 65–71.
18. *MacDonald R.C., MacDonald R.I. et al.* Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — Vol. 1061. — P. 297–303.
19. *Subbarao N.K., MacDonald R.I. et al.* Characteristics of spectrin-induced leakage of extruded, phosphatidylserine vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — Vol. 1063. — P. 147–154.
20. *Tarahovsky Yu.C., Kuznetsova C.M. et al.* Taxifollin (dihydroquercetin) interaction with multilamellar liposomes from dimyristoylphosphatidylcholine // *Biophysics.* — 2008. — Vol. 53. — Iss. 1. — P. 78–83.
21. *Tsuchiya H., Nagayama M. et al.* Membrane-rigidifying effects of anti-cancer dietary factors // *Biofactors.* — 2002. — Vol. 16. — P. 45–56.
22. *Braun V., Endriss F.* Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins // *Biometals.* — 2007. — Vol. 20. — P. 219–231.
23. *Passamonti S., Terdoslavich M. et al.* Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of bilipid translocase in animal and plant organisms // *Curr. Drug Metab.* — 2009. — Vol. 10. — P. 369–394.