

Ю. Г. Афанасьева, Е. Р. Фахретдинова, Л. В. Спирихин,
Р. С. Насибуллин

О МЕХАНИЗМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ ФЛАВОНОИДОВ С ФОСФАТИДИЛХОЛИНОМ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа;
ИОХ УНЦ РАН, Башкортостан, Уфа

Методами квантовой химии и спектроскопии ЯМР ^{13}C исследовано образование комплексов клеточного фосфолипида с 3,5,7,4'-тетраоксифлавонолом (кемпферол); 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонолом (кверцетин) и 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлавонолом (мирицетин). Пока - зано образование комплексов посредством π -системы электронов. Определены значения химических сдвигов от ядер ^{13}C различных циклов флавоноидов и холиновой группы фосфатидилхолина, возникающие при их формировании. Установлено, что наиболее вероятным комплексом является комплекс, когда кольцо С взаимодействует с холиновой, а кольцо А, одновременно, с фосфатной группой фосфатидилхолина.

Флавоноиды представляют широкий класс фенольных соединений растительного происхождения. В настоящее время выделено и идентифицировано свыше 6000 соединений данного класса и это количество непрерывно увеличивается [1 – 3]. Флавоноиды обладают широким спектром биологической активности. Они проявляют противомикробную, противоаллергическую, противовирусную и другие виды активности [4, 5]. При проведении опытов с животными отмечены противораковые свойства флавоноидов [6]. Отмечается положительное влияние этой группы соединений на здоровье человека при различных эпидемиях [7]. В качестве антиоксидантов флавоноиды предлагаются для защиты от окислительного воздействия на клеточные мембраны, в том числе они проявили способность нейтрализовать гидроксильные радикалы [7].

В литературе содержится мало сведений о молекулярном механизме действия этой группы соединений, а вопрос о месте локализации молекул флавоноидов в клеточной мембране является дискуссионным.

В предыдущих работах было показано, что сопряженные системы, какими являются флавоноиды, образуют комплексы с клеточными фосфолипидами через систему π -электронов [8, 9]. Такой механизм комплексобразования дает возможность объяснить сохранение биологической активности при значительных изменениях структуры заместителей, когда возникают стерические препятствия для сближения активных центров на расстояние, необходимое для образования водородной связи.

В настоящей работе представлены результаты исследований взаимодействия некоторых производных флавоноидов (3,5,7,4'-тетраоксифлавонол (кемпферол), 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонол (кверцетин), 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлавонол (мирицетин), отличающихся числом гидроксильных групп в кольце С и клеточного фосфатидилхолина (лецитина) (рисунок). Исследование взаимодействия флавоноидов с лецитином проводилось методом ЯМР ^{13}C , а также квантово-химическими расчетами.

В работе использовался фосфатидилхолин, выделенный из куриных яиц [10]. Очистку лецитина проводили методом колоночной хроматографии. Чистота его контролировалась по ЯМР-спектрам и методами тонкослойной хроматографии. Для работы были использованы стандартные образцы 3,5,7,4'-тетраоксифлавонола, 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола, 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлавонола (Сигма-Алдрич, 11,481-2; К 0133; Q 0125). Исследовали растворы с концентрацией лецитина 0,005 М с различным содержанием флавоноидов. Спектры снимали при относительно низких концентрациях лецитина и флавоноидов. В качестве растворителя использовался хлороформ.

Хотя малые концентрации приводят к возрастанию времени накопления сигналов, увеличение концентрации вызывает расширение линии поглощения из-за образования мицелл, что приводит к снижению точности измерения химических сдвигов (ХС). Одновременно с этим при увеличении концентрации уменьшается число точек связывания флавоноидов, так как они оказываются внутри мицелл, что приводит к уменьшению интенсивности спектральных линий и по этой причине концентрация флавоноидов также должна быть достаточно низкой. При увеличении концентрации они образуют цепочечные структуры посредством водородных связей, усложняющие анализ спектров. При принятых концентрациях плато кривой титрования не достигалось.

Значение рD среды поддерживалось равным 7,1, которое контролировалось прибором ОР-156/3 (МОМ, Венгрия) с точностью измерений 0,01. При указанном значении рD зависимость ХС спектра ЯМР ^{13}C от рD является наиболее слабой [11].

При взаимодействии флавоноидов с фосфатидилхолином формируются комплексы разного состава: лецитин связывается с различными кольцами флавоноидов. Они, в свою очередь, локализуются на разных точках лецитина посредством водородных связей. Поэтому спектры снимались в условиях, когда концентрация флавоноидов превышала концентрацию фосфа-

тидилхолина и достигала 0,008 М. Повышение концентрации фосфатидилхолина относительно флавоноидов не оказывало влияния на значение ХС.

Для установления структуры комплексов проводились многократные расчеты с начальными конфигурациями расположения центров молекул, составляющих комплексов по сетке с последующей оптимизацией геометрии. Проведенные расчеты из различных исходных точек локализации показали, что указанные молекулы образуют с клеточным фосфатидилхолином многочисленные комплексы.

В данной работе приводятся результаты, касающиеся комплексов, образующихся за счет взаимодействия системы π -электронов ароматических циклов флавоноидов и холиновой группы фосфатидилхолина.

Молекула фосфатидилхолина образует комплекс с кольцами А, В и С всех исследованных в этой работе флавоноидов. Предварительные расчеты проводились методом молекулярной механики [12]. Полученные структуры и электронное строение комплексов уточнялись методами MNDO и AM I.

Спектры ЯМР ^{13}C флавоноидов, фосфатидилхолина и их смесей записывались при температуре 30 °С на спектрометре AM-300 ("Bruker" ФРГ) с рабочей частотой на ядрах ^{13}C — 75 МГц.

Температура исследуемых препаратов поддерживалась с точностью 0,2 °С. Спектры ^{13}C регистрировались с помощью стандартных методик, имеющих в спектрометре AM-300.

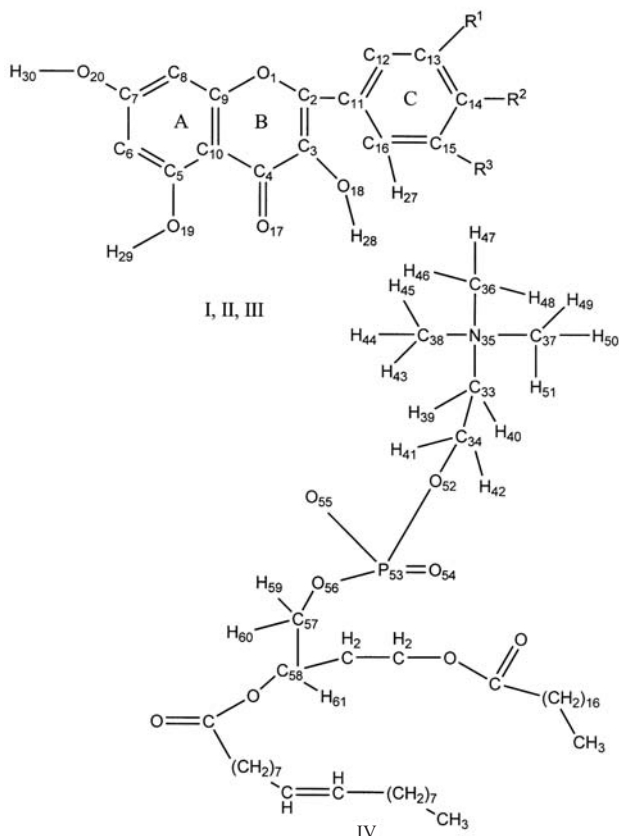
Длительность импульса составляла 45 °, задержка между ними — 1,5 с. Число накоплений достигало 20000. Такое количество накоплений обеспечивало соотношение сигнал/шум не меньше 60. Накопление проводилось на 64 – 128 к точек с шириной развертки 100 – 150 м.д.

В этих условиях при ширине развертки 100 м.д. на 128 к точек и времени выборки 8,65 с получается цифровое разрешение 0,06 Гц. В этих условиях значение ХС определяется с точностью до 0,001 м.д. На основании усреднения полученных по нескольким измерениям ХС можно сделать вывод о том, что точность достигает не более 0,05 м.д.

Расчеты показывают, что все 3 исследованные молекулы формируют 3 комплекса связывания по кольцам А, В, С. Энергии комплексообразования представлены в таблице.

Как видно из таблицы, энергия комплексообразования максимальна при связи лецитина с кольцом С 3,5,7,4'-тетраоксифлавонола, где одна гидроксильная группа, и минимальна для 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлавонола, где гидроксильных групп три. Необходимо заметить, что энергия комплексообразования получается как малая разность больших величин и определяется со значительной погрешностью. Представленные данные носят качественный характер, однако такое соотношение величин энергий сохраняется при расчетах другими полуэмпирическими методами.

Формирование комплексов холина с кольцом С флавоноидов сопровождается изменением ХС от ядер ^{13}C



Комплекс некоторых флавоноидов с фосфатидилхолином клеточных мембран

I: 3,5,7,4'-тетраоксифлавонол (R¹ = H, R² = OH, R³ = H);

II: 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонол (R¹ = OH, R² = OH, R³ = H);

III: 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлавонол (R¹ = OH, R² = OH, R³ = OH);

IV: фосфатидилхолин.

кольца С. При образовании комплекса с участием системы π -электронов ХС углеродов ароматического цикла выравниваются [13, 14].

В данном случае при введении фосфатидилхолина в 0,008 М растворы 3,5,7,4'-тетраоксифлавонола, 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола, 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлавонола ХС у С(16) уменьшается соответственно на 0,24; 0,19 и 0,17 м.д., а у С(15) увеличивается на 0,116; 0,093 и 0,019.

При изменении числа гидроксильных групп в кольце С меняется ХС углеродов холиновой группы. Изменение ХС уменьшается по мере возрастания числа гидроксильных групп и энергии комплексообразования. Преобладающее число комплексов лецитина с мерицитином формируется за счет кольца В.

При образовании комплексов возникает изменение ХС и от углеродов холиновой группы фосфатидилхо-

Энергия комплексообразования (кДж/моль)

Кольца флавоноидов	3,5,7,4'-Тетраоксифлавонол	3,5,7,3',4'-Пентаоксифлавонол	3,5,7,3',4',5'-Гексаоксифлавонол
Кольцо А	7,3	7,7	7,8
Кольцо В	8,2	7,6	7,8
Кольцо С	9,1	7,4	7,8

лина. ХС от С(36), С(37), С(38), равный 53,23 м.д., у свободного лецитина смещается в слабое поле при формировании комплекса с 3,5,7,4'-тетраоксифлавонолом на 1,781 м.д. с 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонолом на 1,585 м.д. и с 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлавонолом на 1,574 м.д. Одновременно наблюдается изменение ХС от С(34), примыкающего к фосфатной группе лецитина, в сторону сильного поля на ~20 м.д. у всех комплексов.

Полученные величины изменений ХС качественно согласуются с рассчитанными значениями изменения электронной плотности, если учитывается одновременно взаимодействие системы π -электронов флавоноидов с холиновой и фосфатной группами лецитина.

Во взаимодействующей системе флавоноиды – лецитин возникает значительное число комплексов, между которыми происходит быстрый обмен в шкале времени ЯМР. Поэтому метод ЯМР при исследованной температуре регистрирует усредненные величины ХС. Рассчитанные структуры, образующиеся с исследованными флавоноидами, приблизительно одинаковы и описаны в работе [15].

Расчеты показали, что данные комплексы формируются за счет кулоновского взаимодействия, которое характеризуется перераспределением части заряда между компонентами комплекса. Величина переносимого заряда меняется и максимальное значение отмечается у комплекса фосфатидилхолина с циклом С 3,5,7,4'-тетраоксифлавонола и составляет 0,12 е. Расстояние между центром ароматического кольца и атомом азота фосфатидилхолина составляет 6,34 Å. При использовании метода MNDO для расчетов подобных комплексов происходит систематическое завышение длины связей [13].

Результаты квантово-химических расчетов изменения заряда, возникающие при взаимодействии

3,5,7,4'-тетраоксифлавонола, 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола и 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлавонола с фосфолипидом, а также спектры ЯМР на ядрах ^{13}C позволяют предположить, что для исследованной группы молекул наиболее вероятными являются комплексы с системой π -электронов цикла и одновременным формированием водородной связи –ОН группы кольца А с фосфатной группой фосфатидилхолина. Такой комплекс является достаточно прочным и блокирует активные центры фосфатидилхолина.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Kahl, *Protective and Adverse Biological Actions of Phenolic Antioxidants* (H. Sies), London (1991), pp. 245 – 273.
2. S. A. van Acker, D. J. van den Berg, M. N. Tromp, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 331 (1996).
3. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 933 (1996).
4. R. T. Dawies, I. Moodley, *Pharmacol. Ther.*, **17**, 279 (1982).
5. E. Jr. Middleton and C. Kandaswami, *The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer*, J. B. Harbone (ed.), London (1993), pp. 619 – 652.
6. F. V. So, N. Guthrie, A. F. Chambers, et al., *Nutr. Cancer*, **26**, 167 (1996).
7. P. G. Pietta, *J. Nat. Prod.*, **63**, 1035 (2000).
8. Р. С. Насибуллин, Л. В. Спирихин, В. А. Пономарева, *Биофизика*, **36**(4), 594 – 598 (1991).
9. Р. С. Насибуллин, Т. Н. Никитина, Ю. Г. Афанасьева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **36**(9), 33 – 36 (2002).
10. R. M. C. Dawson, *Biochim.*, **88**(3), 414 – 423 (1993).
11. E. Breitmaier, K. N. Spohn, *Tetrahedron*, **29**(8), 1145 – 1152 (1973).
12. M. P. Allen, D. J. Tidesley, *Computer simulation of liquids*, Clarendon Press, Oxford (1987).
13. R. S. Nasibullin, D. I. Kosareva and L. V. Spirichin, *Biophysics*, **5**, 761 (2002).
14. А. В. Иогансен, *Водородная связь*, Наука, Москва (1981).
15. Р. С. Насибуллин, Р. Р. Шарафутдинова, Ю. Г. Афанасьева, *Структура и динамика молек. систем*, **10**(2), 194 – 196 (2003).

Поступила 29.03.05

MECHANISM OF INTERACTION OF SOME FLAVONOIDS WITH PHOSPHATIDYLCHOLINE OF CELLULAR MEMBRANES

Y. G. Afanas'eva, E. R. Fakhretdinova, L. V. Spirikhin, and R. S. Nasibullin

Bashkir State Medical University, Ufa, Bashkortostan, Russia;

Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, Russia

The formation of complexes between cell phospholipid and 3,5,7,4'-tetraoxyflavonol (kaempferol), 3,5,7,3',4'-pentaoxyflavonol (quercetin), and 3,5,7,3',4',5'-hexaoxyflavonol (myricetin) has been studied by methods of quantum chemistry and NMR ^{13}C spectroscopy. Evidence for the formation of these complexes by means of electronic π -system is presented. The chemical shifts for ^{13}C nuclei in various cycles of flavonoids and choline group of phosphatidylcholine, which appear upon their complexation, were determined. It is established that the most probable complex is that in which ring C interacts with the choline group and ring A simultaneously interacts with the phosphatidylcholine phosphate group.