ISSN 0233-7657. Biopolymers and Cell. 2010. Vol. 26. N 5

Комплексообразование 7,3',4'-триоксифлавонола с клеточным фосфатидилхолином

Р. С. Насибуллин, Е. Р. Фахретдинова, В. М. Нусратуллин, Р. И. Галеева

Башкирский государственный медицинский университет
Ул. Ленина, 3, Уфа, Республика Башкортостан, 450000

nusratullinvm@mail.ru

Цель. *Исследовать комплексообразование молекулы группы флавоноидов 7,3',4'-триоксифлавонола с клеточным фосфатидилхолином.* ***Методы***. *Структуру комплекса определяли методами полуэмпирической квантовой химии и спектроскопии ЯМР.* ***Результаты***. *Установлено изменение конформационных состояний 7,3',4'-триоксифлавонола при комплексообразовании.* ***Выводы***. *Формирование данного комплекса вызывает конформационные изменения фосфатидилхолина.*

Ключевые слова: комплексообразование, триоксифлавонол, фосфатидилхолин, ЯМР-спектроскопия, эффект Оверхаузера, полуэмпирическая квантовая химия.

Введение. Флавоноиды являются биоактивными соединениями растительного происхождения, обладающими широким спектром активности. В настоящее время выделено и идентифицировано свыше 6000 молекул этого класса, причем количество их непрерывно увеличивается [1–3].

В литературе описано более 40 видов биологической активности флавоноидов [4–6]. Флавоноиды обладают противовоспалительным, противоаллергическим, противовирусным и противоопухолевым действием. Кроме того, им присущи сильные антиоксидантные свойства, обеспечивающие защиту от окисления и повреждения клеток свободными радикалами. Тем не менее, существует мало сведений о молекулярном механизме воздействия этой группы соединений на клеточные мембраны, а место их локализации в последних является предметом дискуссий. Одновременно сложное строение упомянутых молекул, обусловливающее многочисленные внутримолекулярные взаимодействия и конформационную подвижность, вызывает большой интерес [7].

В данной работе представлены результаты исследований воздействия 7,3',4'-триоксифлавонола, обладающего ярко выраженным противоаллергическим эффектом (рис. 1), на клеточный фосфатидилхолин (ФХ).

Ранее показано, что сопряженные системы [8, 9], в частности, молекулы группы флавоноидов рутин и кверцетин образуют комплексы с клеточными фосфолипидами посредством системы π-электронов [10]. Такой механизм комплексообразования дает возможность объяснить сохранение биологической активности при значительных изменениях заместителей, когда возникают стерические препятствия для сближения активных центров на расстояние, необходимое для образования водородной связи.

Материалы и методы. Взаимодействие триоксифлавонола с ФХ (лецитином) изучали методами

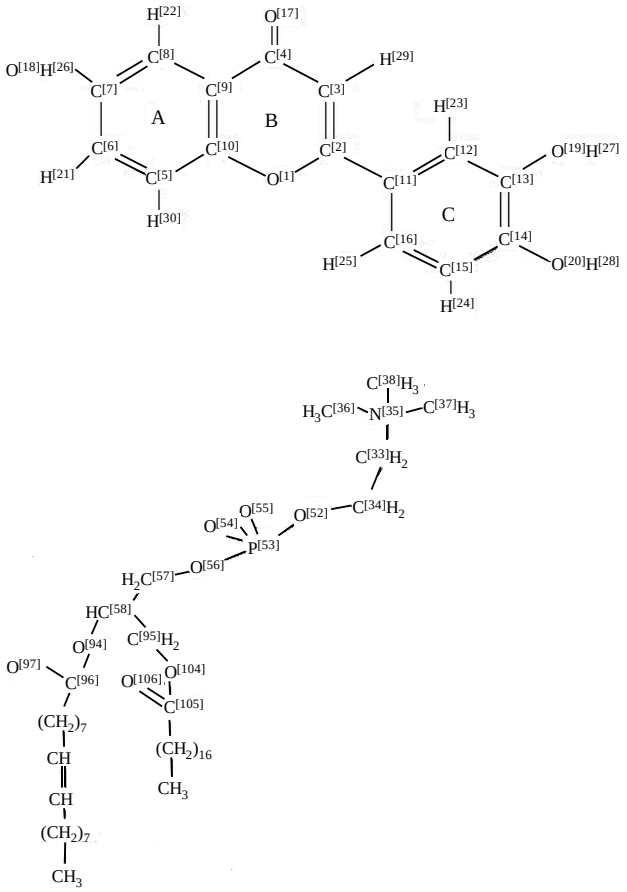

Рис.1. Взаимодействие кольца С 7,3',4'-триоксифлавонола с фосфатидилхолином

полуэмпирической квантовой химии и ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{13}C и ^{1}H.

Для установления геометрии комплексов при начальных конфигурациях расположения центров молекул, составляющих комплекс, многократно проводили квантово-химические расчеты по сетке с последующей оптимизацией геометрии методом молекулярной механики [11]. Далее структуры и электронное строение молекул уточняли методами MNDO и AM1, используя программный пакет HyperChem 7.0.

В экспериментах использовали ФХ, выделенный из куриных яиц [12], и стандартные образцы триоксифлавонола («Aldrich», США). Лецитин очищали методом колоночной хроматографии. Чистоту контролировали по спектру ЯМР и методами тонкослойной хроматографии. При исследовании применяли растворы с концентрацией лецитина 0,005 М, изменяя при этом концентрацию 7,3',4'-триоксифлавонола. В качестве растворителя использовали дейтерозамещающий хлороформ фирмы «Deutero GMBH» (ФРГ). Очистка хлороформа не требовалась.

Спектры снимали при относительно низких концентрациях лецитина и флавоноидов. Это обусловлено тем, что хотя небольшая концентрация приводит к возрастанию времени накопления сигналов, ее увеличение из-за образования мицелл вызывает уширение линии поглощения, приводящее к снижению точности измерения химических сдвигов (ХС). Одновременно при повышении концентрации уменьшается количество точек связывания флавоноидов, так как они оказываются внутри мицелл, что уменьшает интенсивность спектральных линий. При этом флавоноиды образуют цепочечные структуры через водородные связи, вследствие чего усложняется анализ спектров ЯМР. Плато кривой титрования при принятых концентрациях не достигалось.

Значение pD среды поддерживали равным 7,1, контролировали его прибором ОР-156/3 с точностью до 0,01. При указанном значении pD зависимость ХС спектра ЯМР ^{13}C от pD является наиболее слабой [13].

Взаимодействие 7,3',4'-триоксифлавонола с ФХ приводит к образованию нескольких видов комплексов, некоторые из которых формируются при связывании лецитина с различными кольцами 7,3', 4'-триоксифлавонола. Флавоноиды, в свою очередь, локализуются на отдельных точках лецитина, образуя комплексы посредством водородных связей. Именно поэтому спектры снимали в условиях, когда концентрация флавоноидов превышала таковую ФХ и достигала 0,08 М. Повышение концентрации лецитина относительно флавоноидов не оказывало заметного влияния на значение ХС.

Спектры ЯМР ^{13}C флавоноидов, ФХ и их смесей записывали стандартными методами при температуре 30 °С на спектрометре АМ-300 («Bruker», ФРГ) с рабочей частотой 75 МГц на ядрах ^{13}C. Температуру исследуемых образцов поддерживали с точностью 0,2 °С. В качестве внутреннего стандарта использован тетраметилсилан.

Использовали 45°-импульсы, задержка между которыми составляет 1,5 с. Количество накоплений

доводили до 20000, обеспечивая соотношение сигнал/шум не меньше 60. Накопление проводили 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, при котором значение ХС определяется с точностью до 0,001 м. д. На основании усреднения, сделаннного по нескольким измерениям ХС, можно заключить, что достигнутая точность составляет не менее 0,005 м. д.

Для проверки изменения конформационного состояния флавоноидов при комплексообразовании использовали метод Оверхаузера. Эксперименты проводили на том же спектрометре. Метод ЯЭО в настоящее время является единственным пригодным для определения межъядерных расстояний в растворах и имеет особое значение при исследовании биоактивных молекул, действие которых проявляется в водных растворах. В основе метода лежит прямое взаимодействие магнитных ядер, выражающееся в изменении интенсивности одной спектральной линии при облучении другой из-за изменения населенности энергетических уровней, в результате чего возникает дополнительный канал релаксации.

Если интенсивность спектральной линии при отсутствии насыщения другой линии обозначить I_0, то при насыщении I эффект ЯЭО $\eta(S)$ можно представить в виде

$$\eta(S) = \frac{I - I_0}{I_0}\ 100\%.$$

Прямое диполь-дипольное взаимодействие между ядрами, зависимое от межъядерного расстояния r, описывается выражением [14]

$$\frac{1}{\eta} = \frac{p^{\times}}{\tau_c} r^6,$$

где $p^{\times}$ – дополнительная релаксация; τ_c – время корреляции.

В экспериментах ЯЭО требуется высокая точность измерения интенсивности линии. Для ее повышения применяют метод разностных спектров, при котором производится сложение нескольких разверток спектра без насыщения и такого же числа прохождений с насыщением. Усреднение, происходящее при этом методе, позволяет уменьшить эффект случайных изменений температуры, фаз и частот сигналов на точность измерений и улучшает соотношение сигнал/шум. На результаты измерений влияют парамагнитные примеси, в частности кислород. Удаление газа проводили барботированием через осушенный гелий. Осуществляли до 24 накоплений, повторяя этот процесс 32 раза. Время релаксации выбирали в интервале T_1 = 1–2 с. Для декаплера использовали импульс 90° .

Результаты и обсуждение. Значения энергий комплексообразования (кДж/моль) за счет формирования π-связи полярной головки ФХ с кольцами А, В и С 7,3',4'-триоксифлавонола, рассчитанные методом АМ1, представлены ниже:

Кольцо А	18
Кольцо В	21
Кольцо С	30

Как видно, при связи лецитина с кольцом С 7,3',4'-триоксифлавонола энергия комплексообразования максимальна. Необходимо отметить, что энергия комплексообразования в расчетах получается как малая разность больших величин и поэтому определяется со значительной погрешностью. Представленные данные носят качественный характер, однако такое соотношение величин энергий сохраняется при расчетах и другими полуэмпирическими методами. В частности, методом DFT.

Если сравнить значения энергии комплексообразования 7,3',4'-триоксифлавонола и бензилпенициллина (аллергетик) с лецитином, то можно заметить, что комплекс с 7,3',4'-триоксифлавонолом является более устойчивым. Следовательно, одним из возможных механизмов противоаллергетической активности может быть блокировка точек связывания бензилпенициллина с лецитином.

Формирование комплексов лецитина с кольцом С флавоноидов сопровождается изменением ХС ядер ^{13}C кольца С. При образовании комплекса с участием π-системы электронов ХС углеродов ароматического цикла сближаются [15, 16]. В данном случае при введении ФХ в 0,008 М растворы триоксифлавонола ХС для $C_{[16]}$ уменьшается на 0,116 м. д., а для $C_{[15]}$ – на 0,019 м. д. увеличивается. Одно-

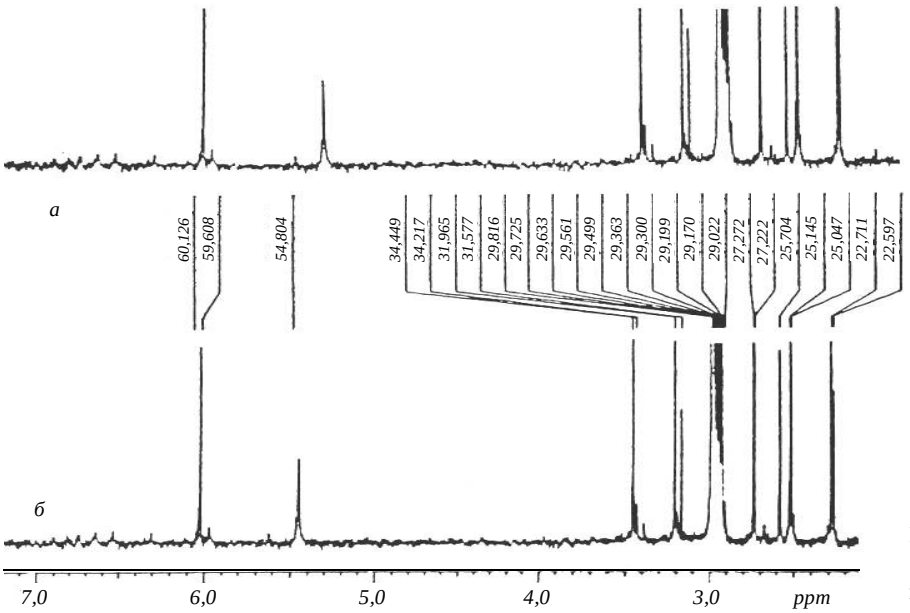

Рис. 2. Фрагменты спектров ЯМР ^{13}C 7,3',4'-триоксифлавонола: *а* – свободного; *б* – в комплексе с лецитином

Таблица 1

Распределение электронной плотности на атомах свободного фосфатидилхолина и в комплексе с 7,3',4'-триоксифлавонолом методами AM1 и MNDO

Атом	AM1		MNDO	
	Свободный	Связанный	Свободный	Связанный
$P^{[53]}$	2,468	2,457	2,465	2,455
$N^{[35]}$	4,956	4,955	4,951	4,955

Таблица 2

Электронное строение свободного фосфатидилхолина и в комплексе с 7,3',4'-триоксифлавонолом методами AM1 и MNDO

Атом	Тип орбитали и заряд	AM1		MNDO	
		Свободный	Связанный	Свободный	Связанный
$P^{[53]}$	S	0,911	0,906	0,913	0,904
	P_x	0,510	0,501	0,505	0,501
	P_y	0,524	0,522	0,521	0,521
	P_z	0,521	0,526	0,524	0,525
	q	2,466	2,455	2,463	2,451
$N^{[35]}$	S	1,486	1,486	1,486	1,485
	P_x	1,125	1,123	1,120	1,119
	P_y	1,170	1,171	1,174	1,176
	P_z	1,180	1,177	1,176	1,178
	q	4,961	4,957	4,956	4,958

временно двойная связь $C_{[11]}$–$C_{[12]}$ кольца С возрастает на 0,002 Å, а одиночная $C_{[16]}$–$C_{[11]}$ – уменьшается на 0,004 Å.

При образовании комплексов ХС изменяется и для углеродов холиновой группы ФХ. ХС $C_{[1]}$, $C_{[2]}$, $C_{[3]}$, равный 53,23 м. д. для свободного лецитина, смещается в слабое поле при формировании комплекса с триоксифлавонола на 1,574 м. д (рис. 2).

Образование комплекса сопровождается изменением линейных углов фосфатидилхолина. Угол $O_{[56]}$–$P_{[53]}$–$O_{[52]}$ уменьшается на 10°, а $C_{[34]}$–$C_{[33]}$–$N_{[35]}$ – увеличивается на 12°.

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

Во взаимодействующей системе 7,3',4'-триоксифлавонол–лецитин формируется значительное количество комплексов, между которыми происходит быстрый обмен в шкале времени ЯМР. Поэтому метод ЯМР при указанной температуре регистрирует усредненные величины ХС. Рассчитанные структуры комплекса, образующиеся при связывании 7,3',4'-триоксифлавонола и лецитина, близки к описанным в работе [17].

Расчеты показывают, что рассмотренные комплексы образуются за счет кулоновского взаимо-

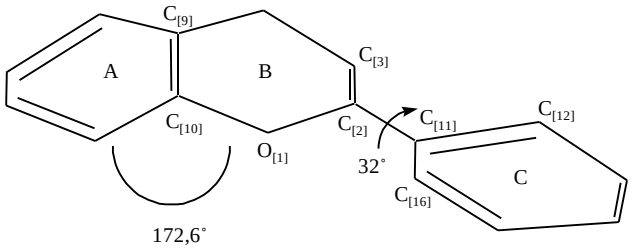

Рис. 3. Конформационные изменения 7,3',4' – триоксифлавонола

действия, характеризующегося перераспределением заряда между компонентами комплекса. Величина переносимого заряда меняется и максимальное его значение отмечается в комплексе ФХ с циклом С 7,3',4'-триоксифлавонола и составляет 0,12 а. е. Расстояния между центром ароматического кольца и атомом азота лецитина, а также между атомами $H_{[30]}$–$O_{[54]}$ составляют 6,31 и 5,35 Å соответственно. Заметим, что при использовании методов MNDO и AM1 для расчетов подобных комплексов происходит систематическое завышение длины межмолекулярных связей [14]. Следует подчеркнуть, что структурные данные и распределение электронной плотности, полученные этими методами, практически совпадают (табл. 1).

Анализ спектров ЯМР на ядрах ^{13}C позволяет предположить, что для исследованной группы молекул наиболее вероятными являются взаимодействия с π-системой электронов цикла с одновременным формированием водородной связи –ОН-группы кольца А с фосфатной группой ФХ. Такой комплекс является достаточно прочным и блокирует активные центры ФХ.

В табл. 2 приведены результаты квантово-химических расчетов изменения заряда для комплексов триоксифлавонола с ФХ.

Расчеты показывают также, что при формировании комплексов происходит деформация плоскости флавоноидов. Структура из колец А и В становится неплоской и угол между их плоскостями составляет 172,6°. Кольцо С поворачивается вокруг одиночной связи $C_{[2]}$–$C_{[11]}$ на 32° относительно плоскости кольца А (рис. 3).

Исследование конформационных состояний флавоноидов, измеренных с использованием эффекта Оверхаузера, демонстрирует, что при облучении $H_{[29]}$ раствора 7,3',4'-триоксифлавонола интегральная интенсивность спектральной линии протонов $H_{[25]}$ и $H_{[23]}$ возрастает на 2,8 и 3,2 % соответственно с погрешностью 0,2 % (рис. 4).

Подобное изменение интенсивности сигнала указывает на сближение атомов водорода за счет вращения кольца С 7,3',4'-триоксифлавонола вок-

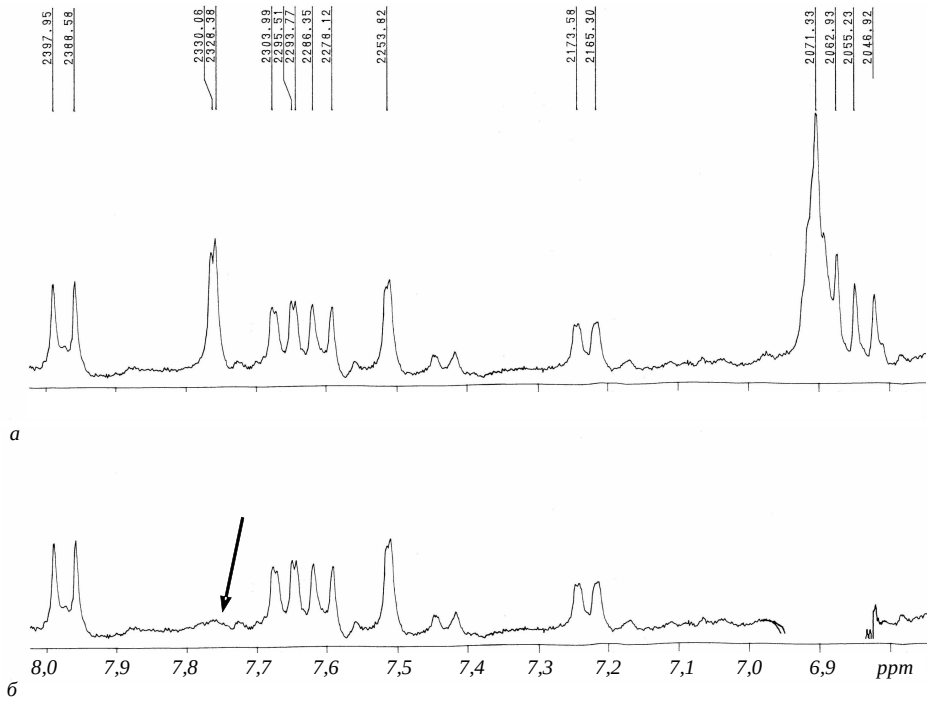

Рис. 4. Спектр ЯМР ^1H 7,3',4'-триоксифлавонола (*а*) и фрагмент спектра ЯМР ^1H NOE-dif 7,3',4'- триоксифлавонола (*б*)

руг связи $C_{[2]}$–$C_{[11]}$. При введении раствора лецитина образуется комплекс цикла С и холиновой группы лецитина, тормозящий это вращение. При этом линии протона $H_{[25]}$ в тех же условиях не наблюдается, а на спектральной линии протона $H_{[23]}$ отмечено небольшое возрастание интенсивности сигналов при облучении сигнала от протона $H_{[29]}$. Эти данные качественно подтверждают расчетные результаты о повороте кольца С относительно плоскости молекулы 7,3',4'-триоксифлавонола.

Выводы. Методами неэмпирической квантовой химии и спектроскопии ЯМР ^{13}C установлено образование комплекса 7,3',4'-триоксифлавонол–лецитин.

При формировании данного комплекса происходят конформационные изменения 7,3',4'-триоксифлавонола.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 40/18-П 2009 г.

R. S. Nasibullin, E. R. Fahretdinova, V. M. Nusratullin, R. I. Galeeva

Complexing 7,3',4'-tryoxiflavonol with cell phosphatidylcholine

Bashkir State Medical University

3, Lenine Str., Ufa, Bashkortostan, Russian Federation, 450000

Summary

Aim. *To investigate the complex formation of 7,3',4'-tryoxyflavonol of flavonoids group with cellular phosphatidylcholine.* ***Methods***. *Semi-empirical quantum chemistry, spectroscopy NMR.* ***Results***. *The changes in conformational status of 7,3',4'-tryoxyflavonol at complex formation have been shown.* ***Conclusions***. *The conformational changes in phosphatidylcholine take place under the 7,3',4'-tryoxyflavonol/phosphatidylcholine complex formation.*

Keywords: comlexing, tryoxyflavonol, phosphatidylcholine, NMR-spectroscopy, Overhauser effects, semi-empirical quantum chemistry.

Р. С. Насібуллін, Е. Р. Фахретдинова, В. М. Нусратуллін, Р. І. Галєєва

Комплексоутворення 7,3',4'-триоксифлавонолу з клітинним фосфатидилхоліном

Резюме

Мета. *Дослідити комплексоутворення молекули групи флавоноїдів 7,3',4'-триоксифлавонолу з клітинним фосфатидилхоліном.* ***Методи***. *Структуру комплексу встановлено методами напівемпіричної квантової хімії і спектроскопії ЯМР.* ***Результати***. *Визначено зміни конформаційних станів 7,3',4'-триоксифлавонолу при комплексоутворенні.* ***Висновки***. *При формуванні цього комплексу відбуваються конформаційні зміни фосфатидилхоліну.*

Ключові слова: комплексоутворення, триоксифлавонол, фосфатидилхолін, ЯМР-спектроскопія, ефект Оверхаузера, напівемпірична квантова хімія.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kahl R.* Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidants // Oxidative stress: Oxidants and antioxidants / Ed. H. Sies.–London: Acad. press, 1991.–P. 245–273.
2. *van Acker S. A., van den Berg D. J., Tromp M. N., Griffioen D. H., van Bennekom W. P., van der Vijgh W. J., Bast A.* Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids // Free Radic. Biol. Med.–1996.–**20**, N 3.–P. 331–342.
3. *Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G.* Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids // Free Radic. Biol. Med.–1996.–**20**, N 11.–P. 933–937.
4. *Davies R. J., Moodley I.* Antiallergic compounds // Pharmacol. Ther.–1982.–**17**, N 3.–P. 279–297.
5. *Middleton E. Jr., Kandaswami C.* The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer // The Flavonoids. Advances in research since 1986 / Ed. J. B. Harbone.–London: Chapman & Hall, 1993.–P. 619–652.
6. *So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., Moussa M., Carroll K. K.* Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices // Nutr. and Cancer.–1996.–**26**, N 2.–P. 167–181.
7. *Potyahaylo A. L., Pylypchuk L. B., Hovorun D. M.* Cooperative intramolecular H-bonds in quercetine: MNDO/H quantum chemical investigation // Biopolym. Cell.–2001.–**17**, N 3.–P. 256–258.
8. *Nasibullin R. S., Spirihin L. V., Ponomareva V. A.* Formation of complexes of a molecule pyrazole with phospholipids // Biophysics.–1991.–**36**, N 4.–P. 594–598.
9. *Nasibullin R. S., Nikitin T. I., Afanaseva J. G., Nasibullin T. R., Spirihin L. V.* Complex 3,5,7,3',4'-pentaoxyflavonol with phosphatidylcholine // Chem. Pharm. J.–2002.–**36**, N 9.–P. 33–36.
10. *Setchenkov M. S., Usmanova S. I., Afanaseva J. G., Nasibullin R. S.* Comlexing of some biologically active molecules with phosphatidylcholine // Russ. Phys. J.–2009.–**52**, N 4.–P. 417–420.
11. *Allen M. P., Tidesley D. J.* Computer simulation of liquids.–Oxford: Clarendon press, 1987.–230 p.
12. *Nasibullin R. S., Serebrinik M. A.* Study on the structure of phosphatidylcholine-pyrazole and phosphatidylcholine-pyridine complexes // Biopolym. Cell.–2002.–**18**, N 1.–P. 76–80.
13. *Breitmaier E., Spohn K. N.* The pH-dependence of carbon-13 chemical shifts of six-membered nitrogen heteroaromatics // Tetrahedron.–1973.–**29**, N 8.–P. 1145–1152.
14. *Derome E.* Modern NMR techniques for chemistry research.–London: Pergamon press, 1992.–401 p.
15. *Nasibullin R. S., Kosareva D. I., Spirichin L. V.* Pyridine-phosphatidylcholine complex // Biophysics.–2002.–**47**, N 5.–P. 820–824.
16. *Iogansen A. V.* The hydrogen bond.–Moscow: Nauka, 1981.–220 p.
17. *Nasibullin R. S, Sharafutdinova R. R., Afanaseva J. G.* Conformational condition miricetin in the conditions of the interaction with cellular membranes // Struct. and Dynam. Mol. Syst.–2003.–**10**, N 2.–P. 194–196.

UDC 539.1.07:577.127.4.33:547.972.38
Received 28.01.10