

*На правах рукописи*

**ЧУЛКОВ**  
**Евгений Георгиевич**

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА  
КАНАЛООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ НИСТАТИНА**

**03.01.03 — молекулярная биология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург**  
**2015**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, доцент  
**Ольга Сергеевна Остроумова**  
Институт цитологии РАН

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
**Денис Борисович Тихонов**  
заведующий Лабораторией биофизики  
синаптических процессов Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
Санкт-Петербург

кандидат биологических наук  
**Елена Аврамовна Котова**  
старший научный сотрудник Отдела фотосинтеза  
и флуоресцентных методов исследований  
Научно-исследовательского института физико-  
химической биологии имени А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова, Москва

**Ведущая организация:**

Институт биоорганической химии им.  
академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,  
Москва

Защита состоится « 25 » декабря 2015 года в 13 ч на заседании  
Диссертационного совета Д.002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4  
Адрес электронной почты института: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru)  
Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>  
Факс института (812) 297-35-41  
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте  
института <http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан «      »                  2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Противогрибковые макролидные полиеновые антибиотики широко используются в медицине. Их фунгицидное действие обусловлено образованием в плазматической мембране патогенной клетки пор, через которые происходит неконтролируемая утечка компонентов цитоплазмы [1,2]. Несмотря на многолетние интенсивные исследования полиеновых антибиотиков, характер их взаимодействия с липидными мембранами остается недостаточно изученным. Токсичность полиенов является серьезным ограничением их применения в клинической практике [3–5]. Востребованной задачей молекулярной биологии является поиск соединений, увеличивающих активность антибиотика по отношению к болезнетворным микроорганизмам и снижающих его токсичность для человека.

Потенциальными синергистами действия полиенов могут выступать полифенольные растительные метаболиты — флавоноиды, известные своим широким спектром биологической активности в клетках млекопитающих [6,7]. Благодаря своей амфифильной природе флавоноиды способны встраиваться в липидные мембраны и модифицировать их физико-химические свойства: характер фазовой сегрегации, дипольный потенциал [8–10], температуру плавления углеводородных цепей липидов [11], локальную кривизну, профиль латерального давления, текучесть [12] и проницаемость [13] бислоя.

Среди модельных систем, использующихся для изучения взаимодействия полиенов с плазмолеммой, особый интерес представляют те, в которых антибиотик находится только с одной стороны мембраны, так как *in vivo* экзогенный агент взаимодействует только с внешней стороной клеточной мембраны [14,15].

В экспериментах на мембранах живых организмов интерпретация получаемых данных затруднена влиянием множества факторов на наблюдаемые величины. При работе с искусственными модельными мембранами появляется возможность избежать сложностей подобного рода и с высокой точностью контролировать состав мембраны и омывающих ее растворов, концентрацию

мембраноактивных соединений, регистрировать ионные потоки и движущие силы потоков через мембрану. Поэтому использование искусственных липидных бислоев представляется актуальным методическим подходом для изучения взаимодействия мембраноактивных соединений с клеточными мембранами.

**Цели и задачи исследования.** Цель работы — выявление механизмов действия флавоноидов на мембранную активность полиенового антибиотика нистатина. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучение влияния различных флавоноидов на трансмембранный ток, индуцированный введением нистатина с одной стороны мембраны.
2. Определение характера действия флавоноидов на физико-химические свойства мембраны (фазовую сегрегацию в гигантских однослойных липосомах различного состава, дипольный потенциал, проницаемость для кальцеина, температуру плавления углеводородных цепей липидов).
3. Выяснение связи между увеличением нистатин-индуцированного трансмембранного тока и изменениями физико-химических свойств бислоя.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Двусторонняя добавка флавоноидов (таксифолина, кверцетина, биоханина А, мирицетина, флоретина, флорицина, генистеина и генистина) увеличивает трансмембранный ток, индуцированный односторонней добавкой нистатина.
2. Способность флавоноидов дестабилизировать мембрану зависит от их гидрофобности и конформации.
3. Рост каналообразующей активности нистатина при добавке флавоноидов обусловлен изменением эластических свойств мембраны *транс*-монослоя, в котором находится липидное устье полиеновой поры.

**Научная новизна.** Среди флавоноидов обнаружены соединения, увеличивающие каналообразующую активность нистатина, введенного с одной стороны мембраны. Установлено, что полифенольные соединения влияют на липидное устье полиеновой поры. С помощью конфокальной микроскопии впервые визуализированы твердые упорядоченные гелеобразные домены,

индуцированные добавкой нистатина в мембранах гигантских однослойных липосом из пальмитолеилфосфатидилхолина или смеси диолеилфосфатидилхолина и холестерина. Показано, что флоретин и биоханин А способны растворять эти домены. Выявлен синергизм действия флоретина и нистатина на утечку флуоресцентного маркера кальцеина из больших однослойных липосом.

**Теоретическое и практическое значение.** Полученные результаты расширяют представления о молекулярных механизмах мембранной активности полиеновых антибиотиков и флавоноидов. Результаты работы могут способствовать разработке новых, в том числе липосомальных, лекарственных форм на основе полиеновых антибиотиков. Впервые продемонстрировано образование гелеобразных доменов в присутствии нистатина в бислоях, содержащих липиды с низкой температурой плавления ацильных цепей, что может быть применено для модернизации методик, использующих нистатин в качестве флуоресцентного маркера стерин-обогащенных упорядоченных доменов в клеточных мембранах. Обнаруженное влияние флавоноидов на фазовую сегрегацию бислоев позволит полнее характеризовать спектр их воздействия на липидные мембраны.

Результаты работы могут быть использованы в учебных курсах по молекулярной биологии, биофизике, липидомике и биомембранологии в высших учебных заведениях.

**Апробация работы.** Основные положения работы были представлены на III и IV конференциях молодых ученых ИНЦ РАН (Санкт-Петербург, 2012, 2014), 38 конгрессе Европейского биохимического общества (Санкт-Петербург, 2013), III Международной научной Интернет-конференции “На стыке наук. Физико-химическая серия” (Казань, 2015), V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием “Молодая фармация — потенциал будущего” (Санкт-Петербург, 2015), X научно-практической конференции молодых ученых и студентов “Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику” ТГМУ им. Абуали ибни Сино с

международным участием (Душанбе, 2015). Материалы докладывались на научных семинарах Лаборатории ионных каналов клеточных мембран Института цитологии РАН.

По результатам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, содержащего 141 наименование. Работа изложена на 105 страницах и иллюстрирована 41 рисунками и 8 таблицами.

**Личный вклад автора.** Все экспериментальные процедуры и обработка результатов выполнены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Материалы.** В работе использовали следующие реактивы: хлорид калия (KCl), хлорид натрия (NaCl), НЕРЕС, ЭДТА, пентан, этанол, хлороформ, гексадекан, флоретин, флорицин, биоханин А, мирицетин, кверцетин, таксифолин, генистин, генистеин, даидзеин, катехин, 2,4,6-тригидроксиацетофенон (ТГАФ), диметилсульфоксид (ДМСО), тритон X-100 (ТХ-100), нонактин, валиномицин, нистатин, кальцеин, N-(лиссамин родамин В сульфонил) дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (ЛР-ДПФЭ) производства фирмы “Sigma”, США. Фосфолипиды и стерин: 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), холестерин (Хол) и сфингомиелин из мозга свиней (СМ) (“Avanti Polar Lipids”, США). Структурные формулы нистатина и использованных в работе флавоноидов приведены на **Рис. 1**.

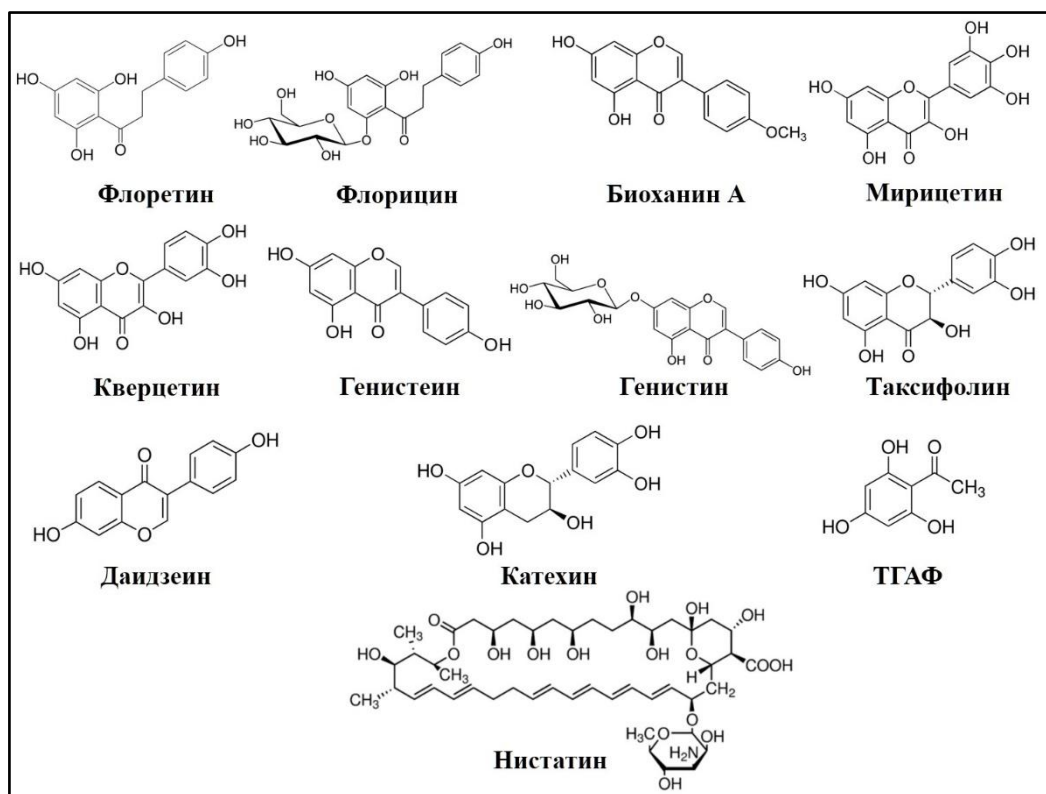


Рис. 1. Структурные формулы нистатина и использованных в работе флавоноидов.

**Формирование и измерение электрических параметров липидных бислойных мембран.** Формирование бислойных липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера [16] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстиях в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки — 10 мкм, диаметр отверстия — 30 мкм. Перед началом процесса формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Монослои формировали на границе раздела воды и воздуха из раствора смеси ДОФХ с Хол и СМ в пентане с концентрацией 1 мкг/мкл путем нанесения исходного раствора на поверхность водной фазы. После испарения пентана на поверхности водного раствора оставался конденсированный липидный монослой. Подъем уровней жидкости в обоих отсеках камеры выше отверстия приводил к образованию бислойной мембраны с проводимостью менее 1 пСм. Измерения тока, протекающего через бислойную липидную мембрану, осуществляли в режиме фиксации потенциала. Для подачи напряжения на мембрану и отведения сигнала использовали хлор-серебряные электроды (Ag/AgCl), соединенные с растворами камеры через агарозные мостики (1.5 %-ный гель агарозы, 2 М KCl). Положительным считали напряжение, вызывающее поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре. Усиление и аналогово-цифровое преобразование трансмембранных токов проводили при помощи Axopatch 200B и Digidata 1440A ("Axon Instruments", США). Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 10.2 ("Axon Instruments", США).

Нистатин добавляли в водный раствор (2 М KCl, 5 мМ HEPES-KOH, pH 7.0) *цис*-отсека камеры из 20 мМ раствора в ДМСО до концентрации 20 мкМ. По достижении стационарного значения трансмембранного тока в мембраноомывающий раствор вводили флавоноиды до концентрации 20 мкМ с одной или двух сторон мембраны. После повторного достижения стационарного состояния находили отношение токов до и после добавки модификатора ( $I_m/I_m^0$ ) и вычисляли натуральный логарифм этого отношения ( $\ln(I_m/I_m^0)$ ). Полученные для 4–9 бислов значения усредняли и приводили со стандартным отклонением.

Измерение изменений дипольного потенциала мембран проводили в растворе 0.1 М KCl, 5 мМ HEPES-KOH, pH 7.0. В мембраноомывающий раствор вводили нонактин (переносчик  $K^+$ ) и, после достижения стационарного значения трансмембранного тока, в оба отсека камеры добавляли флавоноиды до концентрации 20 мкМ. Напряжение на мембране составляло 50 мВ. Для вычисления изменений дипольного потенциала ( $\Delta\varphi_d$ ) под действием соответствующих модификаторов использовали статистику Больцмана:

$$\Delta\varphi_d = -\frac{kT}{q_e} \ln\left(\frac{I_m}{I_m^0}\right), \quad (1)$$

где  $k$ ,  $T$ ,  $q_e$  — постоянная Больцмана, абсолютная термодинамическая температура и элементарный заряд, соответственно.

**Конфокальная микроскопия гигантских однослойных липосом.** Гигантские моноламеллярные липосомы изготавливали методом электроформации с помощью прибора Nanion vesicle prep pro (“Nanion Technologies”, Германия) на покрытых проводящей смесью оксидов индия и титана стеклах. На проводящую поверхность стекла помещали резиновое кольцо диаметром 15 мм, в центр которого вносили 20 мкл исходного 10 мг/мл раствора липида в хлороформе. После испарения растворителя липидную пленку гидратировали 0.5 М раствором сорбитола и подвергали воздействию переменного электрического поля с частотой 10 Гц и напряжением 3 В в течение 1 ч. Полученную суспензию, содержащую 0.8 мМ липида в виде однослойных липосом диаметром 1–30 мкм, разделяли на аликвоты объемом 50 мкл и инкубировали с полиеном или флавоноидом. Латеральную гетерогенность визуализировали с помощью конфокального микроскопа 100×/1.4 HCX PL Leica TCS SP5 (“Leica Microsystems”, Мангейм, Германия) при введении ЛР-ДПФЭ в исходный раствор липида. Известно, что в бислое ЛР-ДПФЭ включается преимущественно в жидкую неупорядоченную ( $ld$ ) фазу, в результате чего она становится окрашенной и доступной для микроскопического наблюдения [17]. Жидкая упорядоченная ( $lo$ ) и твердая ( $so$ ) фазы остаются неокрашенными. Дискриминацию  $lo$  и  $so$  фаз проводили по морфологическим признакам: жидкая упорядоченная  $lo$  фаза за счет сил натяжения, стремящихся минимизировать длину границы гетерогенного участка, имеет форму круглых доменов правильной формы — “рафтов”, в отличие от твердой  $so$  фазы, представленной дендритическими доменами неправильной формы [18]. Количественно фазовое разделение в изучаемых системах характеризовали частотой встречаемости ( $p_k$ ):

$$p_k = \frac{N_k}{N} \cdot 100 \%, \quad (2)$$



где  $N_k$  — число везикул с определенным характером фазового разделения в препарате,  $k$  — тип фазового разделения: однородно окрашенные липосомы ( $ld$ ), липосомы с круглыми ( $ld+lo$ ) и дендритическими ( $ld+so$ ) доменами,  $N$  — общее число везикул в препарате (не менее 50 в каждом образце).

**Дифференциальная сканирующая калориметрия.** Термограммы получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра  $\mu$ DSC7 (“Setaram”, Франция) при скорости нагрева 0.2 К/мин и давлении 1 атм. Образцы липида приготавливали при температуре 50 °С методом электроформации. 0.5 мкмоль ДПФХ гидратировали 800 мкл буфера (5 мМ HEPES-KOH, pH 7.4). Флавоноиды добавляли из 20 мМ раствора в этаноле или ДМСО до соотношения липида к флавоноиду 1 к 9. Размер кооперативной единицы мембраны ( $n$ ) находили согласно выражению [19,20]:

$$n = RT_m^2 \left( \int_0^\infty C(\tau) d\tau \right)^{-1} \frac{d}{dT} \left( \ln \frac{\int_0^T C(\tau) d\tau}{\int_T^\infty C(\tau) d\tau} \right) \Big|_{T=T_m}, \quad (3)$$

где  $C$  — удельная теплоемкость,  $R$  — универсальная газовая постоянная (8.3 Дж·К<sup>-1</sup>·моль<sup>-1</sup>),  $T_m$  — температура фазового перехода бислоя,  $\tau$  — переменная интегрирования.

**Измерение проницаемости мембран больших моноламеллярных липосом при помощи флуоресцентного маркера кальцеина.** Проницаемость мембран больших однослойных липосом определяли путем измерения утечки флуоресцентного красителя кальцеина, имеющего пренебрежимо малую интенсивность флуоресценции в миллимолярных концентрациях [21]. Большие однослойные липосомы получали с использованием мини-экструдера (“Avanti Polar Lipids”, США). Исходный раствор липида в хлороформе помещали в виалу, после чего растворитель удаляли потоком азота. Полученную липидную пленку гидратировали буфером (35 мМ кальцеина, 10 мМ HEPES-NaOH, 1 мМ ЭДТА, pH 7.4) и после пятикратного замораживания-размораживания 13 раз пропускали через поликарбонатную мембрану (“Nucleopore TM”, США) с диаметром пор 100 нм для получения гомогенной популяции больших однослойных липосом. Не захваченный липосомами кальцеин удаляли гель-фильтрацией на колонке, заполненной сефадексом G-75. В качестве элюента использовали свободный от кальцеина буфер (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7.4). Концентрацию липида в суспензии определяли методом фосфорного анализа [22] и доводили разбавлением свободным от кальцеина буфером до 10<sup>-5</sup> М.

Суспензию инкубировали с флавоноидами или нистатином 1 ч в темноте при комнатной температуре, после чего измеряли интенсивность флуоресценции высвобожденного кальцеина. Затем в суспензию добавляли ТХ-100 до концентрации 10 мМ из водного раствора в концентрации 100 мМ, что приводило к лизису липосом и полному высвобождению всего захваченного кальцеина.

Флуоресценцию суспензии измеряли на спектрофлуориметре Флюорат Панорама-02 (при длине волны возбуждения 490 нм, эмиссии 520 нм). Величину утечки ( $I_r$ , %) определяли по формуле [21]:

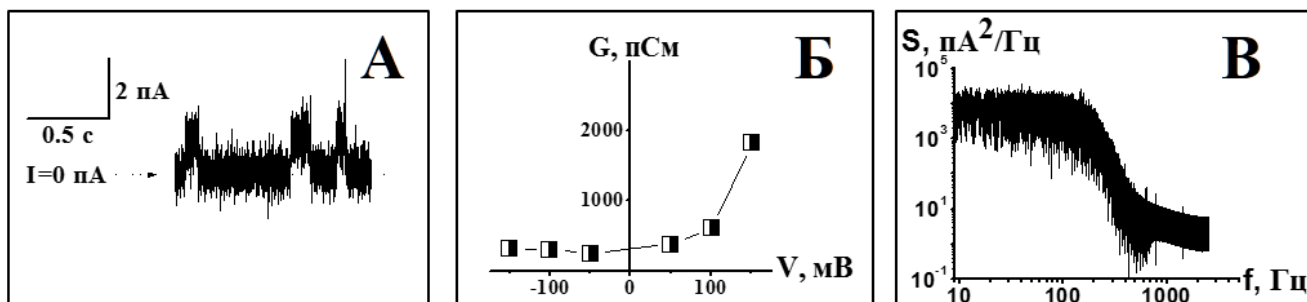
$$Ir = \frac{(F - F_0)}{\left(\frac{F_{max}}{0.9} - F_0\right)} \cdot 100\%, \quad (4)$$

где  $F$  и  $F_0$  — интенсивность флуоресценции раствора в присутствии и отсутствие флавоноида или антибиотика, соответственно,  $F_{max}$  — интенсивность флуоресценции раствора после добавки ТХ-100 (множитель 0.9 введен для учета разбавления образца раствором ТХ-100). Для установления влияния флавоноидов на индуцированную нистатином утечку кальцеина суспензию, приготовленную согласно описанной выше методике, предварительно инкубировали с флавоноидом в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем с нистатином, также в течение 1 ч, после чего определяли  $Ir$ .

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

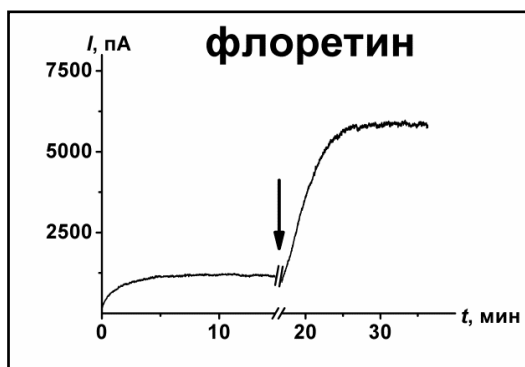
**Асимметричные нистатиновые каналы.** Нистатин, добавленный в омывающий раствор с одной стороны мембраны, значительно увеличивает ее проводимость за счет формирования асимметричных тороидальных пор [15]. В зависимости от экспериментальных условий (состава липидного бислоя, омывающего раствора) нистатиновые асимметричные каналы имеют различные характеристики. Например, в сильно кислых омывающих растворах (при pH меньше 3) стабильность полиеновой поры высока [23], что позволяет регистрировать ступенеобразные скачки трансмембранного тока, которые можно ассоциировать с открыванием и закрыванием ионных каналов (**Рис. 2А**). В ДОФХ:Хол:СМ бислое в нейтральной среде подобных ступенеобразных изменений проводимости мембраны не обнаруживается. О канальной природе тока свидетельствует асимметричная зависимость проводимости мембраны, модифицированной односторонним введением нистатина, от напряжения (**Рис. 2Б**). При положительном напряжении проводимость мембраны значительно выше, чем при отрицательном. Подобная зависимость свойственна асимметричным каналам, имеющим в своем составе группы, чувствительные к электрическому полю [15]. Спектральная плотность шума тока имеет S-образный вид и спад, пропорциональный  $1/f^m$ , где  $m \geq 2$  (**Рис. 2В**). Это позволяет говорить о том, что в мембране протекает стохастический лоренцевский процесс, характерный для работы множества независимых элементарных единиц проводимости — ионных каналов. По экстремуму второй производной

огибающей плотности шума можно оценить характерное время жизни асимметричного нистатинового канала как  $1/400$  с [A3].



**Рис. 2.** Электрические характеристики ДОФХ: Хол:СМ мембраны в присутствии нистатина с *цис*-стороны: запись флуктуаций трансмембранного тока в 3 М КСl при pH 2.5 и напряжении 100 мВ (А); зависимость проводимости мембраны от напряжения в 2 М КСl при pH 7.0 (Б) и спектральная плотность шума тока при 100 мВ в 2 М КСl при pH 7.0 (В).

**Действие флавоноидов на трансмембранный ток, индуцированный односторонней добавкой нистатина.** На Рис. 3 показана зависимость трансмембранного тока, индуцированного односторонней добавкой нистатина от времени. В начальный момент в омывающий мембрану раствор с *цис*-стороны вводился нистатин, после чего наблюдали рост тока до некоторого стационарного значения, по достижении которого в омывающий раствор с обеих сторон добавляли флоретин до концентрации 20 мкМ, что приводило к росту тока до нового, более высокого, стационарного значения. Увеличение проводимости, по всей видимости, обусловлено ростом числа асимметричных полиеновых каналов в мембране [A3, A9].



**Рис. 3.** Временная зависимость трансмембранного тока, индуцированного односторонним введением нистатина, до и после добавки флоретина до концентрации 20 мкМ в *цис*- и *транс*-отсеки камеры. ДОФХ:Хол:СМ мембрана омывалась 2 М КСl (pH 7.0), трансмембранное напряжение составляло 50 мВ. Момент добавки флоретина указан стрелкой.

Остроумова и др. показали, что добавка флоретина увеличивает трансмембранный ток, индуцированный двухсторонней добавкой нистатина [24]. Авторы предположили специфическое связывание молекул флавоноида с полиен-стериновыми комплексами. Для проверки применимости этой модели влияния флавоноидов на

ток, индуцированный односторонним введением нистатина, были протестированы структурные аналоги флоретина.

**Табл. 1** представляет значения натурального логарифма отношения токов до и после введения флавоноидов ( $\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$ ). В случае таксифолина, кверцетина, биоханина А, мирицетина, флоретина, флорицина это значение находится в диапазоне от 2 до 4, что соответствует увеличению тока примерно на 1–2 порядка, в случае генистина и генистеина величина  $\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$  недалеко от 1, что соответствует увеличению тока приблизительно в 3 раза, а для даидзеина, катехина и ТГАФ она близка к нулю и характеризует неизменность тока [A3].

Проведенное сравнение химического строения (**Рис. 1**) и эффектов протестированных флавоноидов не позволило выявить общий структурный мотив, ответственный за взаимодействие флавоноидов с асимметричными нистатиновыми каналами. Следует также отметить, что кверцетин не увеличивает ток, индуцированный двусторонней добавкой нистатина [A4], что указывает на различие механизмов регуляции асимметричных и симметричных каналов.

| Флавоноид  | $\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$ | $\Delta\varphi_d$ , мВ |
|------------|--------------------------------|------------------------|
| Таксифолин | $3.4 \pm 1.7$                  | $-17 \pm 2$            |
| Кверцетин  | $3.3 \pm 0.4$                  | $-152 \pm 12$          |
| Биоханин А | $2.9 \pm 1.1$                  | $-97 \pm 7$            |
| Мирицетин  | $2.7 \pm 1.4$                  | $-125 \pm 10$          |
| Флоретин   | $2.5 \pm 1.2$                  | $-153 \pm 18$          |
| Флорицин   | $2.4 \pm 1.6$                  | $-104 \pm 5$           |
| Генистеин  | $1.3 \pm 0.6$                  | $-48 \pm 10$           |
| Генистин   | $1.1 \pm 0.5$                  | $-1 \pm 1$             |
| Даидзеин   | $0.1 \pm 0.2$                  | $-8 \pm 1$             |
| Катехин    | $0.1 \pm 0.1$                  | $-10 \pm 7$            |
| ТГАФ       | $-0.1 \pm 0.0$                 | $-19 \pm 5$            |

**Табл. 1.** Среднее значение и стандартное отклонение логарифма отношения токов, индуцированных односторонней добавкой нистатина, до и после двусторонней добавки флавоноидов ( $\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$ ) и изменения дипольного потенциала ДОФХ:Хол:СМ мембран ( $\Delta\varphi_d$ ) после двусторонней добавки модификатора.

### Проверка электростатической гипотезы регуляции активности асимметричных нистатиновых каналов.

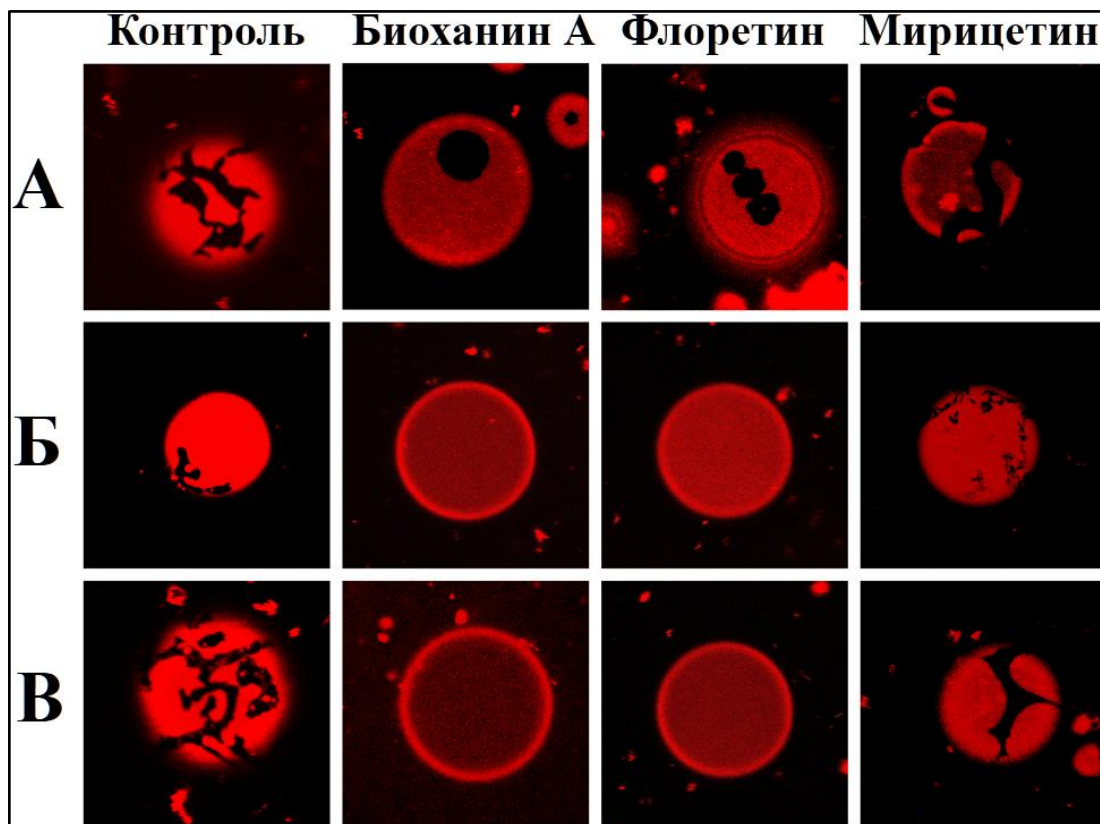
Известно, что некоторые флавоноиды способны увеличивать ионофор-индуцированный транспорт моновалентных катионов [8,10], что указывает на снижение дипольного

потенциала. Положительный полюс диполя полиеновой молекулы глубже погружен в мембрану, чем отрицательный [25], что объясняет рост проводимости

мембраны при подаче положительного напряжения. Вероятно, снижение дипольного потенциала приводит к уменьшению свободной энергии полиен-липидных комплексов и росту каналообразующей активности. Данные **Табл. 1** показывают, что флоретин, флорицин, биоханин А, мирицетин, кверцетин и генистеин снижают  $\varphi_d$  на 50–150 мВ, в то время как таксифолин, генистин, даидзеин, катехин и ТГАФ мало изменяют  $\varphi_d$ . Сравнение  $\Delta\varphi_d$  и  $\ln(I_\infty/I_\infty^0)$  показывает, что четкой корреляции между увеличением тока и изменением дипольного потенциала не наблюдается. В случае кверцетина и таксифолина  $\Delta\varphi_d$  существенно различаются, в то время как значения  $\ln(I_\infty/I_\infty^0)$  близки. При этом генистеин, снижающий дипольный потенциал на 50 мВ, и его гликозид генистин, не меняющий  $\varphi_d$ , одинаково влияют на каналообразующую активность нистатина. Следовательно, изменение внутримембранного электрического поля под действием флавоноидов не является определяющим фактором регуляции нистатин-индуцированного тока. Учитывая, что холестерин- и сфингомиелин-содержащие мембраны подвержены латеральной сегрегации компонентов бислоя [18,26], можно думать, что влияние флавоноидов опосредовано их действием на фазовое состояние мембран [А3].

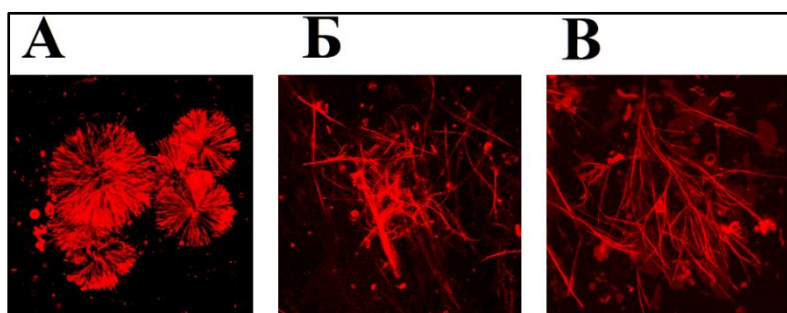
**Влияние флавоноидов на свойства мембраны.** На **Рис. 4** показаны типичные микрофотографии гигантских однослойных липосом, сформированных из 80 мол % ДОФХ и 20 мол % СМ, 50 мол % ДОФХ и 50 мол % ДМФХ, 50 мол % ДОФХ и 50 мол % ДПФХ, в отсутствие и в присутствии 400 мкМ биоханина А, флоретина или мирицетина в суспензии. На **Рис. 4 (Контроль)** видно, что липосомы из смеси ДОФХ с тугоплавкими липидами (ДМФХ, ДПФХ, СМ) содержат две несмешивающиеся фазы — окрашенную ЛР-ДПФЭ и неокрашенную. Неокрашенные домены имеют неправильную форму и представляют *so* фазу, а окрашенные — *ld* фазу, окружающую *so* области мембраны [26,27]. Биоханин А и флоретин способствуют образованию в ДОФХ:СМ липосомах круглых доменов, а мирицетин не изменяет характер фазовой сегрегации (**Рис. 4**). В липосомах, приготовленных из эквимольных смесей ДОФХ:ДМФХ или ДОФХ:ДПФХ, добавка биоханина А и флоретина

способствует разрушению видимых *so* доменов и гомогенизации мембраны. Как и в случае ДОФХ:СМ липосом, мирицетин эффекта не оказывает [A1, A5, A7].



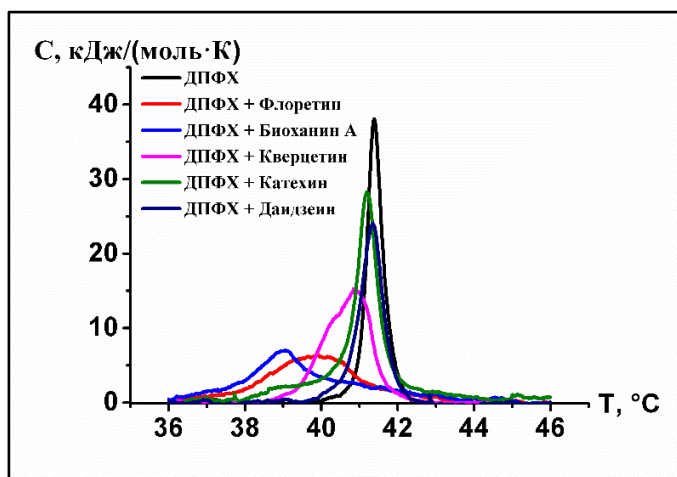
**Рис. 4.** Микрофотографии гигантских однослойных липосом, сформированных из ДОФХ:СМ (80:20 мол %) (**А**), ДОФХ:ДМФХ (50:50 мол %) (**Б**) и ДОФХ:ДПФХ (50:50 мол %) (**В**), в отсутствие (**контроль**) и в присутствии 400 мкМ биоханина **А**, флоретина или мирицетина в суспензии. Размер каждой микрофотографии составляет 26 × 26 мкм.

Наблюдаемое изменение латеральной гетерогенности липидных бислоев можно интерпретировать как разжижающее действие биоханина **А** и флоретина в отношении *so* фазы мембран. Мирицетин подобного эффекта не оказывает. Более того, в отличие от биоханина **А** и флоретина, мирицетин интенсивно тушит флуоресценцию ЛР-ДПФЭ, что свидетельствует о различном погружении этих флавоноидов в мембрану [A1].



**Рис. 5.** Небислойные липидные структуры в системе ДОФХ:ДПФХ в присутствии 400 мкМ флоретина (**А**), биоханина **А** (**Б**) и мирицетина (**В**). Размер каждого изображения 100 × 100 мкм.

На **Рис. 5** показаны микрофотографии небислоидной липидной фазы, также обнаруженной в суспензиях гигантских липосом, обработанных флоретином, биоханином А и мирицетином, соответственно. По всей видимости, флавоноиды встраиваются в область гидрофильных головок фосфолипидов, приводя к увеличению кривизны внешнего монослоя везикул, что способствует образованию гексагональной фазы [A1, A6].



**Рис. 6.** Зависимость теплоемкости ( $C$ ) ДПФХ липосом от температуры ( $T$ ) в отсутствие и в присутствии флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина.

Дополнительные сведения о влиянии флавоноидов на фазовое поведение бислойа дает дифференциальная сканирующая

микрокалориметрия. На **Рис. 6** приведены термограммы ДПФХ липосом в отсутствие и в присутствии флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина. Видно, что катехин и даидзеин практически не меняют положение и форму пика плавления насыщенных цепей ДПФХ, в то время как флоретин и биоханин А способствуют уширению пика и снижают температуру фазового перехода ДПФХ. Влияние кверцетина на фазовый переход ДПФХ менее выражено [A11].

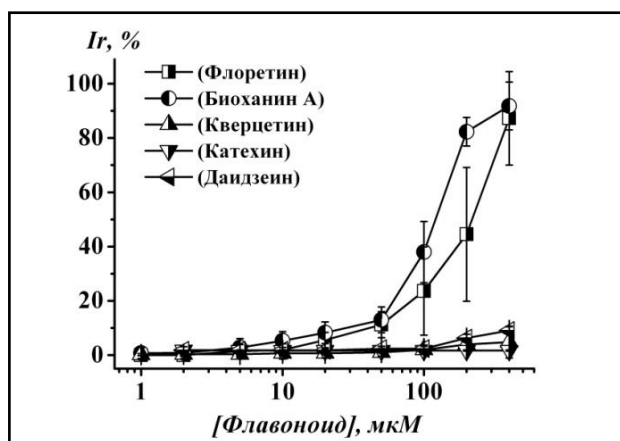
**Табл. 2** демонстрирует величины температур фазовых переходов ( $T_m$ ) и размеры кооперативных единиц ( $n$ ) мембран ДПФХ липосом в отсутствие и в присутствии флоретина, биоханина, кверцетина, катехина и даидзеина. Можно отметить корреляцию между значениями  $n$  и  $T_m$ , с одной стороны, и гидрофобностью флавоноидов, с другой: более гидрофобные флавоноиды (флоретин и биоханин А) сильнее разжижают липидную фазу мембран, чем менее гидрофобные (кверцетин, катехин и даидзеин), глубина погружения которых, по всей вероятности, невелика. Приведенные данные микрокалориметрии согласуются с результатами, полученными методом конфокальной микроскопии,

которые свидетельствуют о способности флавоноидов разрушать гелеобразные домены [A1, A5, A7, A11].

|            | $T_m$ , °C | $n$ |
|------------|------------|-----|
| ДПФХ       | 41.4       | 224 |
| Флоретин   | 39.9       | 48  |
| Биоханин А | 39.6       | 33  |
| Кверцетин  | 40.8       | 101 |
| Катехин    | 41.2       | 120 |
| Даидзеин   | 41.4       | 170 |

**Табл. 2.** Температура фазового перехода ( $T_m$ ) и размер кооперативной единицы ( $n$ ) мембран ДПФХ липосом в отсутствие и в присутствии флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина.

На **Рис. 7** представлена зависимость утечки флуоресцентного маркера кальцеина из ДОФХ:Хол липосом от концентрации флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина или даидзеина. Можно видеть, что флоретин и биоханин А увеличивают утечку кальцеина, в то время как кверцетин, катехин и даидзеин практически не влияют на проницаемость мембран для захваченного везикулами маркера. По всей видимости, механизмы увеличения проницаемости мембран липосом для кальцеина и уменьшения  $T_m$  и  $n$  под действием флавоноидов имеют одинаковую природу. Полученные результаты свидетельствуют о том, что биоханин А и флоретин встраиваются в область головок фосфолипидов и увеличивают площадь, приходящуюся на одну липидную молекулу [A11]. Последнее приводит к увеличению подвижности углеводородных цепей и проницаемости мембраны для кальцеина. Возможно также, что флавоноиды способствуют образованию больших липидных пор в бислое [28].



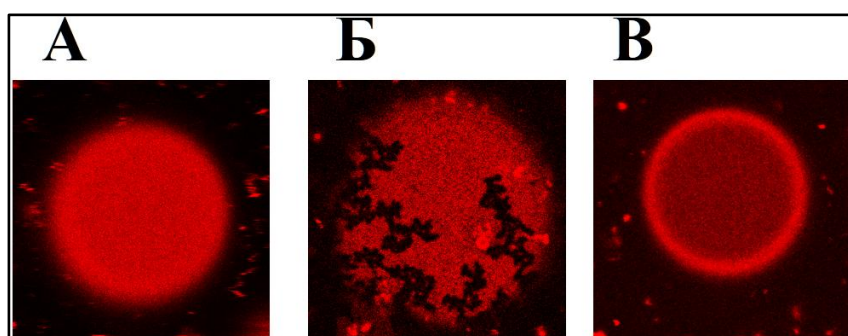
**Рис. 7.** Зависимость величины утечки ( $I_r$ , %) кальцеина из ДОФХ:Хол (67:33 мол %) липосом от концентрации флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина.

Данные калориметрии (**Табл. 2**) свидетельствуют о влиянии флавоноидов на фазовые превращения липидов. Встает вопрос о возможности действия флавоноидов на упорядоченную фазу, индуцированную самим полиеновым антибиотиком. Ток, протекающий через мембрану, в случае сосуществования в



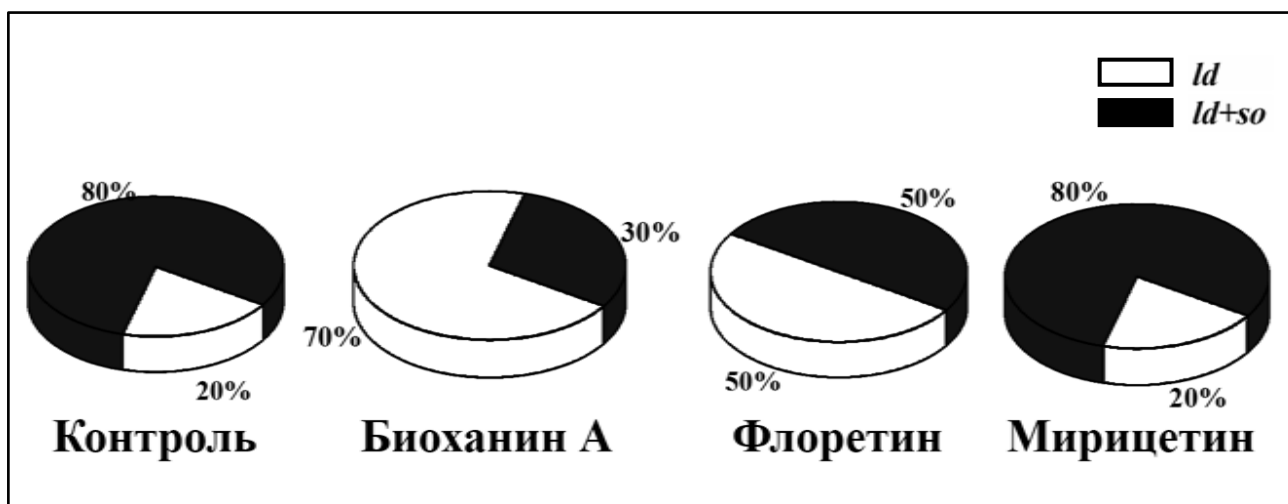
бислое различных фаз можно рассматривать как сумму независимых компонент, связанных с отдельными фазами. Флавоноиды способны разжижать бислои [12,29] и, следовательно, они могут менять соотношения между различными фазами, что может приводить к изменению тока, индуцированного нистатином.

**Влияние флавоноидов на нистатин-индуцированную *so* фазу.** Несмотря на многочисленные косвенные свидетельства формирования полиенами в бислое отдельной фазы [30,31], результаты непосредственного визуального наблюдения этого явления неизвестны. На **Рис. 8** показаны микрофотографии гигантских однослойных липосом, сформированных из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 мол %). В отсутствие нистатина липосомы были гомогенно окрашены (**Рис. 8А**). Введение 300 мкМ нистатина сопровождалось появлением хорошо выраженных *so* доменов, представленных на **Рис. 8Б** [A2, A8]. Добавка 400 мкМ флоретина к модифицированным 300 мкМ нистатина липосомам приводила к исчезновению видимых *so* доменов (**Рис. 8В**) [A3].



**Рис. 8.** Микрофотографии гигантских однослойных ДОФХ:Хол:СМ липосом в отсутствие модификаторов (А), в присутствии 300 мкМ нистатина (Б), 200 мкМ нистатина и 400 мкМ флоретина (В). Размер каждого изображения 26 × 26 мкм.

Сфингомиелин, благодаря высокой температуре плавления цепей, способен самостоятельно образовывать *so* домены, но в концентрации 10 мол % они имеют небольшой размер и встречаются довольно редко. В присутствии нистатина субмикроскопические СМ домены могут выступать точками инициации, на которых начинается рост гелеобразных доменов после добавки нистатина.

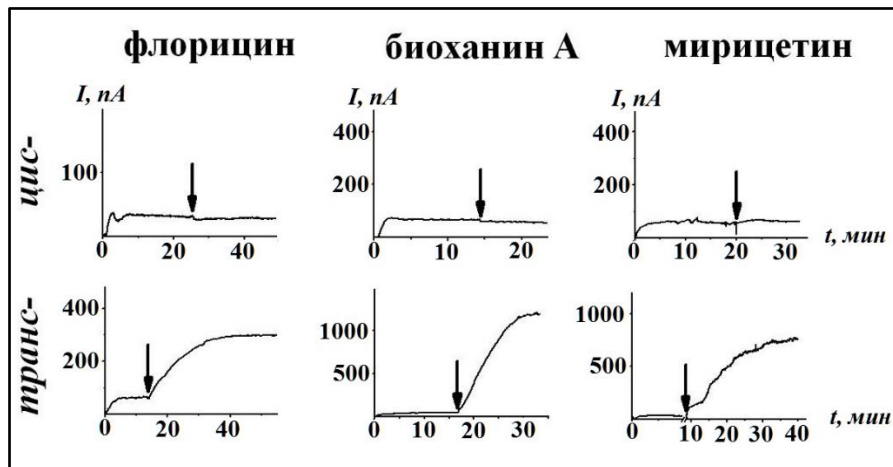


**Рис. 9.** Распределение относительного числа ДОФХ:Хол:СМ липосом, обработанных 200 мкМ нистатина, не имеющих (ld) и имеющих твердые упорядоченные домены (ld+so) в отсутствие (контроль) и в присутствии 400 мкМ флоретина, биоханина А или мирицетина.

Количественное описание влияния флавоноидов на фазовое разделение в мембране дано на **Рис. 9**: 80 % липосом, проинкубированных с 200 мкМ нистатина, имеют so домены. Введение флоретина или биоханина А снижает число везикул с твердыми упорядоченными областями до 30 и 50 %, соответственно. Наличие мирицетина в суспензии не приводит к исчезновению индуцированных нистатином so доменов. Флоретин, биоханин А и мирицетин в одинаковой степени увеличивают нистатин-индуцированный трансмембранный ток (**Табл. 1**), но по-разному влияют на фазовое состояние модифицированной нистатином мембраны (**Рис. 9**). Этот факт позволяет полагать, что изменение соотношения между площадями различных фаз в мембране не является определяющим фактором нистатин-индуцированной проводимости бислоя [А3].

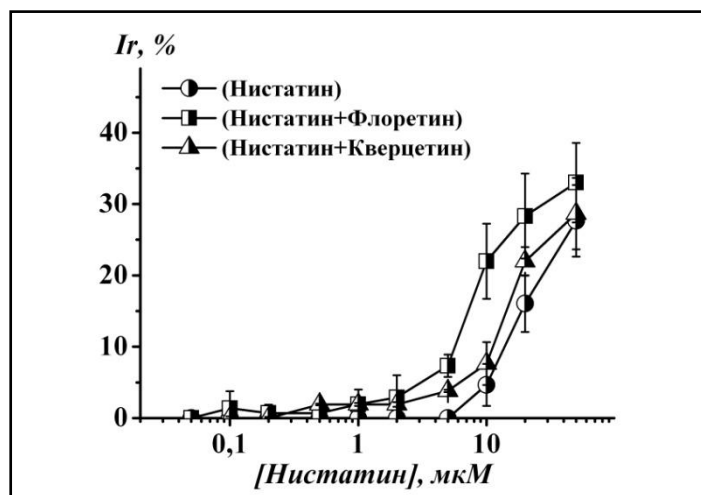
**Мишень флавоноидов — липидное устье асимметричного нистатинового канала.** Наличие у нистатинового канала липидного устья со стороны, противоположной стороне добавки антибиотика, может определять чувствительность поры к амфифилам, увеличивающим кривизну *транс*-монослоя. Формирование под действием флавоноидов небислойной липидной фазы свидетельствует об увеличении латерального давления в области гидрофильных головок фосфолипидов флавоноидами. Таким образом, можно предположить, что влияние флавоноидов на трансмембранный ток, индуцированный нистатином, будет зависеть от того, с какой стороны мембраны будет находиться

модификатор. На **Рис. 10** показано, что при добавке с *цис*-стороны бислоя не проникающих через мембрану флавоноидов, флорицина, биоханина А и мирицетина, не происходит увеличения трансмембранного тока, в то время как добавка этих флавоноидов с *транс*-стороны приводит росту тока. Эти результаты подтверждают тезис о том, что мишенью флавоноидов является липидное устье полиеновой поры [А3, А9].



**Рис. 10.** Влияние *цис*- и *транс*-добавки флавоноидов на трансмембранный ток, индуцированный *цис*-добавкой нистатина. Моменты введения 20 мкМ флорицина, биоханина А и мирицетина указаны стрелками. ДОФХ:Хол:СМ мембраны омывались 2 М КСl, рН 7.0, напряжение на мембране 50 мВ.

Однослойные липосомы, нагруженные меткой, могут выступать в качестве удобной экспериментальной модели мембраны живой клетки. Увеличение индуцированной нистатином утечки маркера под действием флавоноидов можно связать с увеличением активности полиена. На **Рис. 11** показана зависимость утечки кальцеина через нистатиновые каналы из больших однослойных липосом (ДОФХ:Хол) в отсутствие и в присутствии флоретина и кверцетина.



**Рис. 11.** Зависимость утечки кальцеина из ДОФХ:Хол больших однослойных липосом от концентрации нистатина в отсутствие и в присутствии 50 мкМ флоретина или кверцетина (рН 7.4).

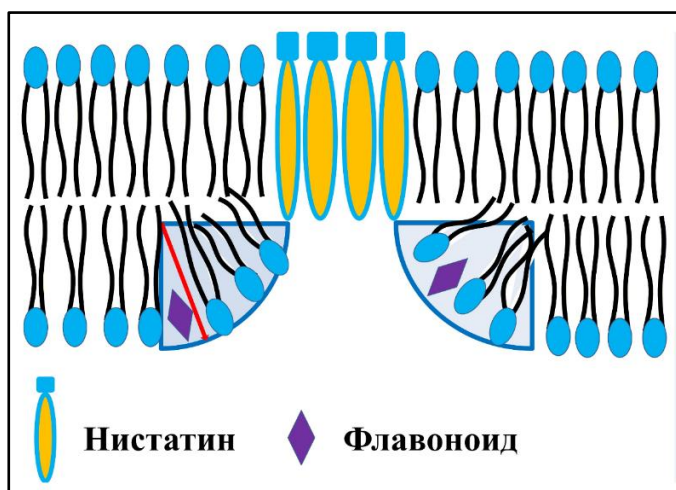
Флоретин способен проникать сквозь липидный бислой [32], поэтому его концентрации внутри и вне липосом быстро выравниваются.

Кверцетин эффективно проникает через липидную мембрану только в незаряженной форме в кислой среде (рН ниже 3) [33], при рН 7.4 диффузия кверцетина ограничена. Поэтому флоретин, находящийся по обе стороны

липосомальной мембраны, увеличивает индуцированную нистатином утечку кальцеина [A10], в отличие от кверцетина, локализованного с внешней стороны липосомальной мембраны и не меняющего утечку в пределах погрешности, что и наблюдается на **Рис. 11**. Данные, приведенные на **Рис. 10** и **Рис. 11**, подтверждают идею о том, что только флавоноиды, находящиеся в монослое, противоположном стороне добавки полиена, оказывают влияние на нистатин-индуцированный трансмембранный ток.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты позволяют построить модель взаимодействия флавоноидов с *транс*-устьем асимметричного полиенового канала (**Рис. 12**). Флавоноид, встраиваясь в область головок фосфолипидов, снижает радиус локальной кривизны и изменяет профиль латерального давления в *транс*-монослое, потенцируя образование асимметричных нистатиновых каналов.



**Рис. 12.** Схема действия флавоноидов на липидное *транс*-устье асимметричного нистатинового канала. Модификатор встраивается в область гидрофильных головок фосфолипидов и способствует образованию пор посредством увеличения кривизны *транс*-монослоя вблизи устья канала.

### ВЫВОДЫ

1. Таксифолин, кверцетин, биоханин А, мирицетин, флоретин, флорицин, генистеин и генистин при добавке со стороны, противоположной стороне введения антибиотика, увеличивают индуцированный полиеном трансмембранный ток.
2. Уменьшение дипольного потенциала и изменение латеральной гетерогенности мембраны под действием флавоноидов не являются факторами, определяющими рост нистатин-индуцированного трансмембранного тока под действием флавоноидов.

3. Упорядоченные липидные домены, в том числе, индуцированные нистатином, разрушаются под действием флоретина и биоханина А.
4. Росту каналообразующей активности нистатина при введении флавоноидов способствует изменение эластических свойств *транс*-монослоя, в котором находится липидное устье полиеновой поры.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### СТАТЬИ

- A1. 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.
- A2. **Chulkov E.G.**, Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Direct visualization of solid ordered domains induced by polyene antibiotics in giant unilamellar vesicles. // Chem. Phys. Lipids. 2014. Vol. 183. P. 204–207.
- A3. **Chulkov E.G.**, Schagina L.V., Ostroumova O.S. Membrane dipole modifiers modulate single-length nystatin channels via reducing elastic stress in the vicinity of the lipid mouth of a pore. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848. P. 192–199.

### ТЕЗИСЫ

- A4. **Чулков Е.Г.**, Остроумова О.С. Эффект дипольных модификаторов на стационарный трансмембранный ток, индуцированный полиеновым антимикотиком нистатином, в содержащих эргостерин бислоях. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на III конференцию молодых ученых (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 15–16 мая 2012 г.). Цитология. 2012. Т. 54, №4. С. 363.
- A5. **Chulkov E.G.**, Ostroumova O.S. The influence of the plant flavonoids on the domain shape in unilamellar vesicles. // 38th FEBS Congress. FEBS Journal. 2013. Vol. 280, Suppl. 1. P. 205.
- A6. **Чулков Е.Г.**, Степаненко О.В., Щагина Л.В., Остроумова О.С. Полиморфизм липидов, индуцированный флоретином, биоханином А и мирицетином. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на IV конференцию молодых ученых (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 18–20 марта 2014 г.). Цитология. 2014. Т. 56, №5. С. 387–388.
- A7. **Чулков Е.Г.**, Щагина Л.В., Остроумова О.С. Исследование влияния флавоноидов на фазовое разделение в гигантских однослойных липосомах. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на IV конференцию молодых ученых (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 18–20 марта 2014 г.). Цитология. 2014. Т. 56, №5. С. 388.

А8. **Чулков Е.Г.**, Остроумова О.С. Исследование влияния полиеновых антибиотиков на фазовое разделение в гигантских моноламеллярных липосомах. // На стыке наук. Физико-химическая серия. III Международная научная Интернет-конференция. Казань. 2015. Т. 2. С. 115–117.

А9. **Чулков Е.Г.** Флавоноиды увеличивают мембранную активность нистатина. // Сборник материалов V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием “Молодая фармация — потенциал будущего”. СПб: Изд-во СПХФА. 2015. С. 228–230.

А10. **Чулков Е.Г.** Растительный полифенол флоретин увеличивает мембранную активность нистатина и амфотерицина Б. // Сборник материалов X годичной научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием “Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику”. Душанбе. 2015. С. 326.

А11. **Чулков Е.Г.**, Остроумова О.С. Влияние флавоноидов на утечку кальцеина из липосом. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на II Всероссийскую конференцию “Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет” (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 20–22 октября 2015 г.). Цитология. 2015. Т. 57, №9. С. 664–665.

#### СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holz and Finkelstein, 1970, *J. Gen. Physiol.* 56: 125–145; 2. de Kruijff and Demel, 1974, *J. Gen. Physiol.* 56: 125–145; 3. Zotchev, 2003, *Curr. Med. Chem.* 10: 211–223; 4. Laniado-Laborín and Cabrales-Vargas, 2009, *Rev. Iberoam. Micol.* 26: 223–227; 5. Bagnis and Deray, *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 13: 481–491; 6. Yamamoto and Gaynor, 2001, *J. Clin. Invest.* 107: 135–142; 7. Hendrich, 2006, *Acta Pharmacol. Sin.* 27: 27–40; 8. Andersen et al., 1976, *J. Gen. Physiol.* 67: 749–771; 9. Melnik et al., 1977, *J. Gen. Physiol.* 69: 243–257; 10. Efimova and Ostroumova, 2012, *Langmuir* 28: 9908–9914; 11. Tarahovsky et al., 2008, *Mol. Cell. Biochem.* 314: 65–71; 12. Arora et al., 2000, *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 102–109; 13. Środa et al., 2008, *Biophys. Chem.* 138: 78–82; 14. Marty and Finkelstein, 1975, *J. Gen. Physiol.* 65: 515–526; 15. Kleinberg and Finkelstein, 1984, *J. Membr. Biol.* 80: 257–269; 16. Montal and Mueller, 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69: 3561–3566; 17. Juhasz et al., 2010, *Biochem. J.* 430: 415–423; 18. Samsonov et al., 2001, *Biophys. J.* 81: 1486–1500; 19. Sturtevant, 1982, *Biochemistry* 79: 3963–3967; 20. Sturtevant, 1987, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38: 463–488; 21. Heerklotz and Seelig, 2007, *Eur. Biophys. J.* 36: 305–314; 22. Fiske and Subbarow, 1925, *J. Biol. Chem.* 66: 375–400; 23. Asandei and Luchian, 2008, *Colloid. Surf. B* 67: 99–106; 24. Ostroumova et al., 2012, *PLoS One* 7: e45135; 25. Baginski et al., 2006, *Chem. Rec.* 6: 320–332; 26. Bagatolli and Gratton, 2000, *Biophys. J.* 78: 290–305; 27. García-Sáez et al., 2007, *J. Biol. Chem.* 282: 33537–33544; 28. Антонов, 1998, *Соросовский Образовательный Журнал* 10: 10–17; 29. Cseh et al., 2000, *Eur. Biophys. J.* 29: 172–183; 30. Milhaud et al., 1997, *Biochim. Biophys. Acta* 1326: 54–66; 31. Paquet et al., 2002, *Chem. Phys. Lipids* 119: 1–11; 32. Verkman and Solomon, 1982, *J. Gen. Physiol.* 80: 557–581; 33. Movileanu et al., 2000, *Int. J. Pharm.* 205: 135–146.