

ДИПОЛЬМОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СТИРИЛПИРИДИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ И ФЛАВОНОИДОВ НА МОДЕЛЬНЫЕ МЕМБРАНЫ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

© С. С. Ефимова,¹ Л. В. Щагина, О. С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹электронный адрес: ssefimova@mail.ru

Работа посвящена оценке величин изменения дипольного потенциала (φ_d) липидных бислоев различного состава, в том числе имитирующих мембраны живых клеток, под действием низкомолекулярных амфифилов, флавоноидов (флоретина и кверцетина) и стирилпиридиновых красителей (RH 421 и RH 237). Оценка действия модификаторов на дипольный потенциал мембран проведена методом измерения ионофориндуцированного трансмембранного тока. Количественное описание модулирующего действия тестируемых флавоноидов представлено в виде характеристических параметров изотермы адсорбции Ленгмюра: максимального уменьшения дипольного потенциала мембран при бесконечно большой концентрации флавоноида и его константы десорбции, отражающей сродство агента к мембране. Определены коэффициенты наклона линейных зависимостей увеличения дипольного потенциала липидных бислоев от концентрации в мембраноомывающих растворах стирилпиридиновых красителей. Установлено, что дипольмодифицирующее действие флоретина зависит от заряда мембранообразующих липидов, в то время как способность кверцетина снижать дипольный потенциал мембран определяется исходной гидратацией бислоя. Полученные результаты указывают на различие механизмов уменьшения дипольного потенциала под действием тестируемых флавоноидов. Показано, что изменение дипольного потенциала липидных мембран при адсорбции стирилпиридиновых красителей определяется их взаимодействием с компонентами мембраны.

Ключевые слова: липидные бислои, фосфолипиды, стерин, сфинголипиды, дипольный потенциал мембраны, флавоноиды, стирилпиридиновые красители, рафты.

Принятые сокращения: ДФФХ — 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ДФФС — 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин, ДОФХ — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ДОФС — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин, ДОФЭ — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин, СМ — сфингомиелин из мозга свиней, СФС — N-стеароил-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae*, СЭС — N-стеароил-D-эритро-сфинганин, ХС — холестерин, ЭС — эргостерин.

Плазматическая мембрана является первичной мишенью действия токсинов и лекарственных веществ на клетку. Во многих случаях взаимодействие экзогенных соединений с мембраной приводит к нарушению ее барьерных функций за счет образования ионпроницаемых трансмембранных пор и к последующему разрушению мембраны и гибели клетки.

К физико-химическим свойствам мембраны, способным влиять на работу встроенных в нее ионных каналов, в первую очередь следует отнести граничный потенциал мембраны. Падение потенциала на каждой из границ мембраны может быть представлено в виде суммы диффузной и дипольной компоненты электрического поля (Ермаков, Sokolov, 2003). Плотность заряженных групп и их экранирование противоионами электролита отражает величину поверхностного потенциала мембраны. Поверхность мембраны почти во всех случаях несет отрицательный заряд, поскольку катионные липиды в составе биологических мембран представлены крайне слабо. Поэтому потенциал на поверхности мембран обычно отрицателен и достигает десятков милливольт для большинства биологических мембран. Однако потенциал внутри мембраны,

в ее гидрофобной части, отличается от поверхностного и оказывается положительным. Этот скачок потенциала в полярной области мембраны называют дипольным потенциалом (φ_d), поскольку его появление связано не с разделением зарядов, а с ориентацией дипольных моментов. Считается, что φ_d наблюдаемого знака возникает в результате ориентации гиперполяризованных молекул воды на границе раздела (Нестеренко, Ермаков, 2012). Величина φ_d определяется структурой мембраны, степенью ее гидратации, способом упаковки липидов и достигает сотен милливольт для мембран разного состава (Gawrisch et al., 1992). Роль дипольного потенциала в регуляции различных мембранных процессов, в том числе в функционировании ионных каналов, до сих пор недостаточно изучена.

Ряд биологически активных низкомолекулярных соединений амфифильной природы, называемых дипольными модификаторами, способен при их связывании с липидным бислоем менять величину φ_d и тем самым влиять на работу ионных каналов (Sun, Garlid, 1992; Rokitskaya et al., 2002; Hwang et al., 2003; Luchian, Mereuta, 2006; Ostroumova et al., 2007a, 2007b, 2010, 2011, 2012a, 2012b,

2014; Asandei et al., 2008; Mereuta et al., 2008, 2011; Apetrei et al., 2009; Lundbaek et al., 2010; Efimova et al., 2014). Наибольший интерес в этом отношении представляют полифенолы растительного происхождения — флавоноиды. Перспективы их изучения определяются большим структурным разнообразием (идентифицировано несколько тысяч соединений), малой токсичностью и широким спектром биологического действия. К настоящему моменту также известно, что дипольмодифицирующими свойствами обладает ряд биологических красителей, в частности красители стирилпиридинового ряда (Malkov, Sokolov, 1996; Efimova, Ostroumova, 2012; Ефимова, Остроумова, 2015). Более того, стоит учитывать, что биологические мембраны гетерогенны по структуре из-за фазового разделения образующих их липидов (Sevc, 1991; Brown, 2002; Aresta-Branco et al., 2011). По этой причине моделирование неоднородного распределения φ_d видится важным параметром при изучении влияния физико-химических характеристик мембран на встроенные в них ионные каналы.

Целью работы являлось установление особенностей влияния низкомолекулярных амфифилов, флавоноидов и стирилпиридиновых красителей на φ_d липидных бислоев различного состава, в том числе имитирующих биологические мембраны.

Материал и методика

В работе использовали следующие реактивы: хлорид калия (КСl), НЕРЕС, пентан, этанол, гексадекан, нонактин, валиномицин, флоретин, кверцетин и RH 421 (Sigma, США); RH 237 (Molecular Probes, США); 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДОФЭ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДФФС), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), холестерин (ХС), эргостерин (ЭС), сфингомиелин из мозга свиней (СМ), N-стеариол-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae* (СФС) и N-стеариол-D-эритро-сфинганин (СЭС) (Avanti Polar Lipids, США).

Измерение изменения величины φ_d бислоев. Формирование бислоевых липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера (Montal, Muller, 1972) путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстия 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 — около 50 мкм. Перед началом процесса формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Монослои формировали на границе вода—воздух из раствора 2 мг/мл липида в пентане. Для образования монослоев использовали индивидуальные фосфолипиды (ДОФХ, ДФФС и ДОФС) и стерин — холестерин (ХС), эргостерин (ЭС) и их смеси — ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 моль %), ДФФХ : ХС (или ЭС) (67 : 33 моль %), ДОФС : ДОФЭ : стерин (33 : 33 : 33 моль %), ДОФС : ДОФЭ : стерин (ХС или ЭС) : сфинголипид (СМ, СФС или СЭС) (26.7 : 26.7 : 26.7 : 20.0 моль %). Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе водных растворов электролита в обоих отделениях камеры (0.1 М КСl), кислотность растворов (рН 7.4) поддерживали буферной смесью 5 мМ НЕРЕС с КОН.

Ионофоры — нонактин или валиномицин — из спиртового (7 мкг/мл) или метанолового (0.8 мг/мл) раствора соответственно добавляли к водной фазе обоих отделений камеры до конечной концентрации 10^{-7} — 10^{-5} М.

Модификаторы вводили в оба отделения камеры из 20 мМ растворов в этаноле до конечной концентрации в околосмембранных растворах в диапазоне от 2.5 до 150 мкМ для флавоноидов и от 1 до 10 мкМ для стирилпиридиновых красителей. Конечная концентрация растворителя в камере не превышала 0.1 %. В такой концентрации растворитель не нарушал целостности и стабильности липидных бислоев.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Для подачи трансмембранного потенциала V и отведения сигнала с мембраны использовали хлор-серебряные электроды (Ag/AgCl), соединенные с растворами камеры через мостики с 1.5%-ной агарозой в растворе 2 М КСl. Измерения проводили при комнатной температуре.

Для обработки данных использовали 8-полярный фильтр Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) и частоту фильтрации 1 кГц. Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (OriginLab, США).

Проводимость мембраны G определяли как отношение равновесного тока I , протекающего через бислоевую липидную мембрану, к трансмембранной разности потенциалов V , равной 50 мВ. Изменение φ_d ($\Delta\varphi_d$) при введении модификаторов определяли с использованием статистики Больцмана:

$$\Delta\varphi_d = \frac{kT}{e} \ln \left(\frac{G_m}{G_m^0} \right), \quad (1)$$

где G_m^0 и G_m — значения равновесной K^+ -проводимости бислоя, обусловленной ионофором, до и после введения модификатора, e — заряд электрона, k — постоянная Больцмана ($1.38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К), T — термодинамическая температура ($T = 294$ К) (Andersen et al., 1976).

Средние величины изменения дипольного потенциала мембран определяли как средние арифметические значения $\Delta\varphi_d$ в каждой из экспериментальных систем при измерениях от 3 до 5 бислоев и их среднестатистические отклонения.

Для описания адсорбции флавоноидов на поверхности липидных бислоев использовали выражение, близкое по форме к изотерме адсорбции Ленгмюра:

$$\Delta\varphi_d(C) = \frac{\Delta\varphi_d(\infty)C}{C+K}, \quad (2)$$

где $\Delta\varphi_d(C)$ — изменение дипольного потенциала мембран при концентрации (C) флавоноида в омывающем растворе, $\Delta\varphi_d(\infty)$ — максимальное изменение дипольного потенциала мембран при $C \rightarrow \infty$, K — константа десорбции флавоноида, характеризующая его сродство к липидной фазе (Reyes et al., 1983; Cseh et al., 2000). Величину $\Delta\varphi_d(\infty)$ определяли по графику зависимости $\Delta\varphi_d(C)$ как среднюю величину, соответствующую насыщению: неизменности φ_d мембран при дальнейшем

увеличении концентрации флавоноида. Величину K находили как тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей зависимость $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$ от $1/C$. Погрешность $\Delta\varphi_d(\infty)$ определяли как максимальную экспериментальную погрешность при измерении $\Delta\varphi_d(C)$, а погрешность определения параметра K — как максимальную погрешность частного: $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$.

В пределах измеряемых концентраций стирилпиридиновых красителей (до 10 мкМ) эффекта насыщения не наблюдали. Дальнейшее увеличение концентрации красителя приводило к разрушению липидного бислоя. По указанным причинам для описания адсорбции на бислое стирилпиридиновых красителей применяли выражение, являющееся результатом линеаризации уравнения (2) при малых концентрациях дипольного модификатора ($C \ll K$):

$$\Delta\varphi_d(C) = \beta C, \quad (3)$$

где $\beta = \Delta\varphi_d(\infty)/K$ — коэффициент наклона прямой зависимости увеличения дипольного потенциала бислоев от концентрации красителя в омывающем растворе (Mal'kov, Sokolov, 1996).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены зависимости увеличения φ_d сфинголипидсодержащих отрицательно заряженных бислоев от концентрации в мембраноомывающих растворах стирилпиридиновых красителей серии RH. Количественное описание модулирующего действия биологических красителей представлено в виде коэффициентов наклона β линейных зависимостей увеличения φ_d липидных бислоев от концентрации модификаторов в мембраноомывающих растворах. Результаты линейной аппроксимации представленных на рис. 1 зависимостей, а также изучения влияния тестируемых красителей на бислои, не включающие в себя сфинголипидов, обобщены в таблице. Анализируя данные, можно сделать следующие заключения.

1. Коэффициент β , характеризующий способность RH 421 увеличивать φ_d , уменьшается в 2—3 раза при введении в состав ДФФХ-мембран 33 моль % стерина (ХС или ЭС). С учетом того, что бислои указанного состава подвержены фазовой сегрегации компонентов, этот факт можно рассматривать как указание на большее сродство стирилпиридинового красителя к стериносодержащим упорядоченным доменам по сравнению с неупорядоченной ДФФХ-фазой. Вероятно, боковые цепи углеводородных хвостов ДФФХ препятствуют гидрофобным взаимодействиям модификатора с липидами, а наличие неразветвленной цепи и двойной(ых) связи(ей) у стерина, наоборот, способствует их взаимодействию с красителями. В результате краситель преимущественно встраивается в упорядоченные домены, но его ориентация оказывается более отдаленной от нормали к поверхности бислоя по сравнению с той, которую он приобретает в фазе, насыщенной ДФФХ. В мембранах, включающих в себя стерин, проекция дипольного момента молекулы RH 421 на нормаль уменьшается и вклад модификатора в изменение дипольного потенциала падает. Несовпадение величин β для ДФФХ-мембран и бислоев ДФФХ: стерин в случае RH 237 также свидетельствует о большем сродстве красителя к стериносодержащим упорядоченным доменам, однако, по всей вероятности, в отличие от RH 421 ориентация RH 237 вдоль нормали характерна не для жидкой неупорядоченной фазы, образованной ДФФХ, а для упорядоченных ХС- или ЭС-включающих доменов. Разница ориентации красителей может быть вызвана как различием длин углеводородных цепей, так и размерами полиенового фрагмента между кольцами.

2. Близость значений β для бислоев, сформированных из ДОФС : ДОФЭ и ДОФС : ДОФЭ : ХС, под действием RH 421 указывает на то, что в этом случае краситель предпочитает упорядоченным стериносодержащим доменам неупорядоченную фазу, образованную фосфолипидами с ненасыщенными ацильными цепями, с которыми могут сильнее взаимодействовать молекулы красителя. Относительная малость величин β свидетельствует об отличии ориентации модификатора от нормальной в мембранах указанного состава.

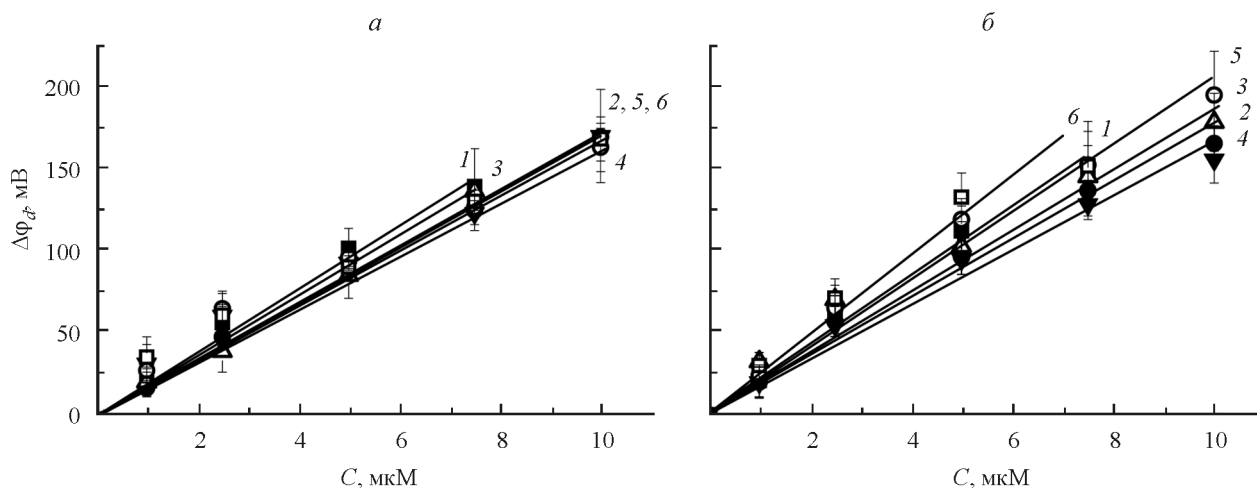


Рис. 1. Зависимость увеличения дипольного потенциала ($\Delta\varphi_d$) мембран, сформированных с участием фосфолипидов, стерина и сфинголипидов, от концентрации (C) в омывающих бислои растворах стирилпиридиновых красителей, RH 421 (а) и RH 237 (б).

Мембраны сформированы из ДОФС : ДОФЭ : ХС : СМ (1), ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СМ (2), ДОФС : ДОФЭ : ХС : СФС (3), ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СФС (4), ДОФС : ДОФЭ : ХС : СЭС (5) и ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СЭС (6) (26.7 : 26.7 : 26.7 : 20.0 моль %) и омываются 0.1 М раствором KCl (pH 7.4). Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Характеристические параметры изотермы адсорбции Ленгмюра ($-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ; K , мкМ) для флавоноидов и коэффициент наклона (β , мВ/мкМ) линейной зависимости увеличения дипольного потенциала мембран для стирилпиридиновых красителей серии RH

Состав мембраны	Стирилпиридиновый краситель		Флавоноид			
	RH 421	RH 237	флоретин	кверцетин	флоретин	кверцетин
	β		$-\Delta\varphi_d(\infty)$		K	
ДОФХ	10.6 ± 0.5^a	—	140 ± 8^b	100 ± 9^b	0.7 ± 0.2^b	2.5 ± 0.6^b
ДФФС	8.2 ± 0.4	—	88 ± 8	—	3.7 ± 0.7	—
ДФФХ ^б	26.1 ± 4.2	9.2 ± 0.7	147 ± 7	104 ± 7	2.0 ± 0.5	3.3 ± 0.5
ДФФХ : ХС ^б	8.7 ± 0.9	14.6 ± 1.8	125 ± 18^r	102 ± 7	3.4 ± 0.8^r	3.6 ± 0.5
ДФФХ : ЭС ^б	12.9 ± 2.2	15.4 ± 2.3	152 ± 9	118 ± 7	0.7 ± 0.3	1.5 ± 0.5
ДОФС	2.8 ± 0.2^a	16.2 ± 1.6	90 ± 6^b	54 ± 9^b	2.7 ± 0.8^b	2.3 ± 1.1^b
ДОФЭ	11.3 ± 0.6^a	—	128 ± 8^b	60 ± 11^b	2.2 ± 0.4^b	7.5 ± 1.7^b
ДОФС : ДОФЭ	9.1 ± 0.4	19.2 ± 1.5	94 ± 10	46 ± 6	2.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1
ДОФС : ДОФЭ : ХС	11.8 ± 0.4	—	80 ± 10	—	3.3 ± 0.8	—
ДОФС : ДОФЭ : ХС : СМ	19.6 ± 0.9	20.9 ± 0.9	93 ± 13	61 ± 13	1.7 ± 0.7	1.4 ± 0.5
ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СМ	17.4 ± 0.4	17.7 ± 0.9	75 ± 10	73 ± 5	1.9 ± 0.4	1.5 ± 0.2
ДОФС : ДОФЭ : ХС : СФС	17.9 ± 0.4	19.1 ± 1.2	89 ± 9	68 ± 11	3.2 ± 0.2	1.2 ± 0.4
ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СФС	16.9 ± 0.9	16.8 ± 0.8	76 ± 14	62 ± 8	2.8 ± 0.4	1.6 ± 0.4
ДОФС : ДОФЭ : ХС : СЭС	17.5 ± 0.8	20.6 ± 0.9	95 ± 8	79 ± 6	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1
ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СЭС	17.7 ± 0.9	22.8 ± 1.9	86 ± 9	75 ± 9	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.2

Примечание. Мембраны сформированы из фосфолипидов (ДФФХ, ДОФХ, ДОФС, ДОФЭ или ДФС) и смесей: ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 моль %), ДФФХ : стерин (ХС или ЭС, 67 : 33 моль %), ДОФС : ДОФЭ : ХС (33 : 33 : 33 моль %), ДОФС : ДОФЭ : стерин : сфинголипид (26.7 : 26.7 : 26.7 : 20.0 моль %) и омываются 0.1 М раствором КСl (рН 7.4). Трансмембранное напряжение равно 50 мВ. Источники литературы: ^aЕфимова, Остроумова, 2015; ^бЕфимова, Ostroumova, 2012; ^вОстроумова и др., 2013; ^гприведена средняя величина для концентраций ХС в мембране от 5 до 67 моль %.

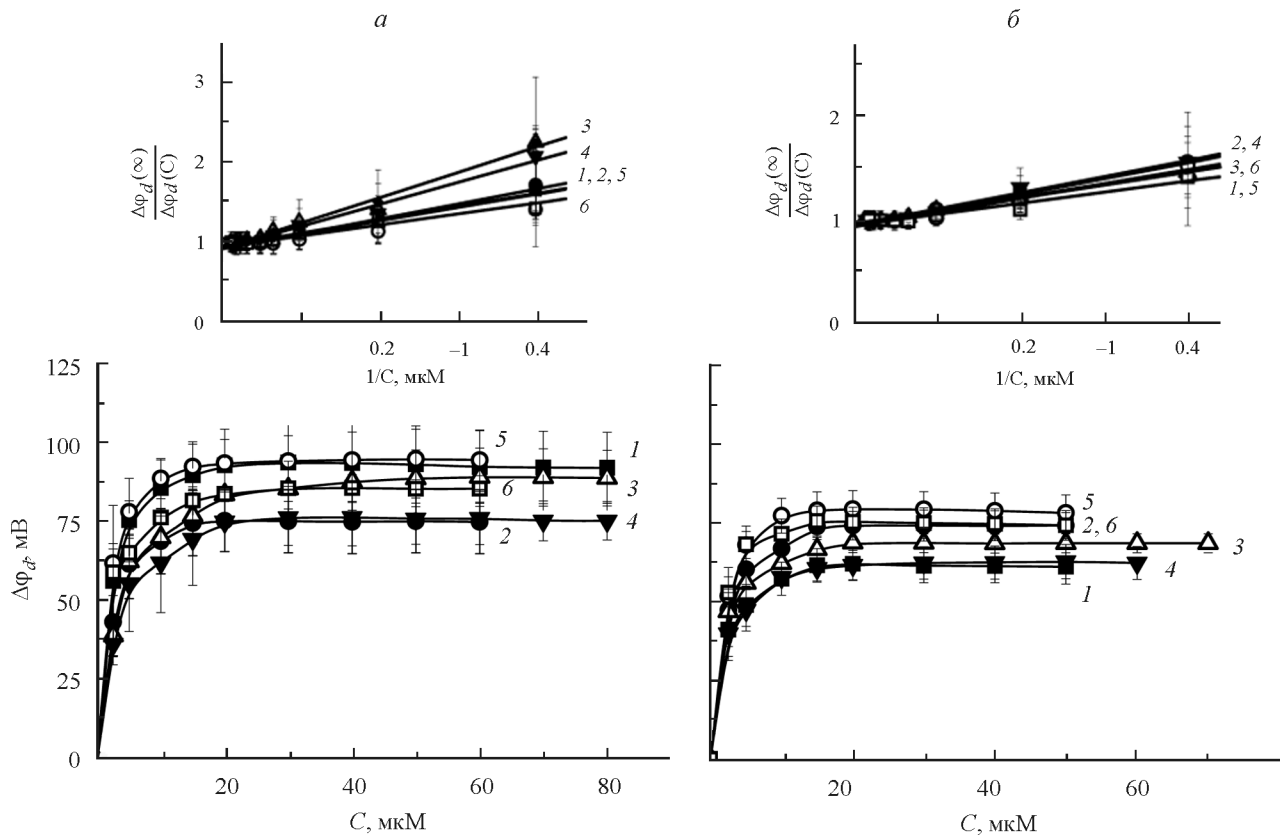


Рис. 2. Зависимость уменьшения дипольного потенциала ($-\Delta\varphi_d$) липидных бислоев, сформированных с участием фосфолипидов, стерина и сфинголипидов, от концентрации в мембраноомывающих растворах флавоноидов, флоретина (а) и кверцетина (б).

Мембраны сформированы из ДОФС : ДОФЭ : ХС : СМ (1), ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СМ (2), ДОФС : ДОФЭ : ХС : СФС (3), ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СФС (4), ДОФС : ДОФЭ : ХС : СЭС (5) и ДОФС : ДОФЭ : ЭС : СЭС (6) (26.7 : 26.7 : 26.7 : 20.0 моль %) и омываются 0.1 М растворами КСl (рН 7.4). Трансмембранное напряжение равно 50 мВ. На вставке — зависимость $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$ от $1/C$.

3. Дипольмодифицирующая способность RH 421 зависит от наличия заряда у мембранообразующих липидов. Замена нейтральных ДОФХ и ДОФЭ на отрицательно заряженный ДОФС или ДФФХ на ДФФС сопровождается падением величины β . Логично предположить, что электростатическое отталкивание сериновых групп липидов и сульфогрупп молекул красителя влияет на ориентацию последнего в бислое.

4. Рост коэффициента β при включении сфинголипидов в состав мембран ДОФС : ДОФЭ : стерин свидетельствует о том, что RH 421 характеризуется большим сродством к сфинголипидосодержащим доменам по сравнению с неупорядоченной фазой, обогащенной этими фосфолипидами. Причиной должно быть более сильное гидрофобное взаимодействие ацильных хвостов красителя с обладающими относительно малой подвижностью углеводородными цепями сфинголипидов. Учитывая близость величин β , определяющих наклон зависимостей $\Delta\varphi_d(C)$ для всех протестированных комбинаций (рис. 1), можно полагать, что вид входящего в состав бислоя стерина и сфинголипида мало влияет на ориентацию RH 421 и RH 237 в упорядоченных доменах.

Дипольмодифицирующую способность флавоноидов принято описывать двумя величинами — максимальным уменьшением φ_d бислоя ($-\Delta\varphi_d(\infty)$) и константой десорбции K , характеризующей сродство модификатора к липидной фазе. Следует учесть, что чем больше коэффициент K , тем меньше аффинность флавоноида к мембране. Обе характеристики можно определить из зависимости $\Delta\varphi_d(C)$ при ее аппроксимации изотермой адсорбции Ленгмюра. На рис. 2 представлен пример зависимостей уменьшения φ_d многокомпонентных бислоев, включающих в себя фосфолипиды, стерин и сфинголипиды, от концентрации флоретина и кверцетина в омывающих растворах. Вставки на рис. 2 показывают соответствующие зависимости $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$ от $1/C$. Определенные таким образом характеристические параметры изотермы адсорбции Ленгмюра для флавоноидов на мембранах различного состава представлены в таблице. Анализируя результаты полученные при изучении дипольмодифицирующего действия флавоноидов, можно заметить следующее.

1. Для всех модельных мембран, включающих в себя ДОФС или ДОФЭ, уменьшение φ_d под действием кверцетина оказывается меньше (порядка 60 мВ) по сравнению с мембранами, содержащими фосфохолины (ДОФХ или ДФФХ). Полученные данные указывают на то, что дипольмодифицирующее действие кверцетина зависит от исходного состояния гидратации мембраны. Благодаря компланарности расположения колец в молекуле кверцетина и относительно большому числу функциональных гидроксильных групп этот модификатор может взаимодействовать с головками сразу нескольких соседних фосфолипидов (Ollila et al., 2002) и, вероятно, влиять на φ_d мембраны, в основном посредством изменения состояния гидратации мембраны — количества и(или) ориентации гидратной воды. Меньший эффект кверцетина в отношении ДОФЭ-мембран может быть обусловлен меньшей гидратацией этих бислоев по сравнению с ДОФХ-мембранами (McIntosh, 1996; Koynova, Caffrey, 1998). Аналогичное объяснение можно предложить и для случая ДОФС-бислоев (Jendrasiak, Nasty, 1974).

2. Подобной зависимости не наблюдается в случае флоретина. Максимальное уменьшение φ_d мембран под действием флоретина прежде всего зависит от заряда

мембранообразующих молекул. Липидные бислои, включающие в себя отрицательно заряженные фосфосерины (ДФФС или ДОФС), характеризуются меньшими абсолютными значениями $\Delta\varphi_d(\infty)$ по сравнению с остальными мембранами, содержащими только незаряженные липиды. Поскольку коэффициент K , отражающий сродство флоретина к липидной фазе, практически не зависит от заряда мембранообразующих липидов, причиной наблюдаемых различий является не электростатическое отталкивание фосфосеринов и отрицательно заряженной формы модификатора, а различие в ориентации дипольных моментов незаряженных молекул модификатора в отрицательно заряженных и нейтральных бислоях. Это позволяет связывать уменьшение φ_d мембраны со встраиванием полярных молекул флоретина в гидрофильную область мембраны. Таким образом, можно говорить о различии механизмов уменьшения φ_d под действием флоретина и кверцетина. В случае флоретина падение φ_d мембраны является результатом инкорпорирования его молекул (обладающих существенным дипольным моментом) в гидрофильную область мембраны, а в случае кверцетина уменьшение φ_d мембраны происходит за счет изменения гидратации липидных головок при их взаимодействии с молекулами модификатора.

Полученные в работе результаты необходимы не только для понимания механизмов изменения φ_d мембран при адсорбции низкомолекулярных амфифилов, но и для использования дипольных модификаторов в качестве инструмента изучения влияния φ_d бислоя на процессы функционирования ионных каналов в биологических мембранах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00565: данные по сфинголипидосодержащим мембранам), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (данные по фосфолипидным бислоям). С. С. Ефимова отмечена именной стипендией президента РФ (СП-69.2015.4).

Список литературы

- Ефимова С. С., Остроумова О. С. 2015. Модификаторы дипольного потенциала липидных бислоев. Акта Натура. 7 (4) : 73—82. (Efimova S. S., Ostromova O. S. 2015. Modifiers of the dipole potential of lipid bilayers. Acta Naturae. 7 (4) : 73—82.)
- Нестеренко А. М., Ермаков Ю. А. 2012. Молекулярная динамика фосфолипидных мембран: распределение ионов вблизи границы нейтрального и заряженного жидкокристаллического бислоя. Биол. мембраны. 29 (5) : 374—384. (Nesterenko A. M., Ermakov Yu. A. 2012. Molecular dynamics of phospholipid membranes: ion distribution near the boundary of the neutral and charged liquid crystal bilayer. Biol. Membrany (Moscow). 29 (5) : 374—384.)
- Остроумова О. С., Ефимова С. С., Щагина Л. В. 2013. Изменение дипольного потенциала фосфолипидных мембран при адсорбции флавоноидов. Биофизика. 58 (3) : 474—480. (Ostromova O. S., Efimova S. S., Schagina L. V. 2013. Changes of dipole potential of phospholipid membranes resulted from flavonoid adsorption. Biophysics (Moscow). 58 (3) : 366—372.)
- Andersen O. S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. 1976. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. J. Gen. Physiol. 67 : 749—771.
- Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. 2009. The RH 421 styryl dye induced, pore model-dependent modulation of antimicrobial peptides activity in reconstituted planar membranes. Biochim. biophys. acta. 1790 : 809—816.

- Aresta-Branco F., Cordeiro A. M., Marinho H. S., Cyrne L., Antunes F., de Almeida R. F. 2011. Gel domains in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: highly ordered, ergosterol-free, and sphingolipid-enriched lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 286 : 5043—5054.
- Asandei A., Mereuta L., Luchian T. 2008. Influence of membrane potentials upon reversible protonation of acidic residues from the OmpF eyelet. *Biophys. Chem.* 135 : 32—40.
- Brown D. 2002. Structure and function of membrane rafts. *Int. J. Med. Microbiol.* 291 : 433—437.
- Cevc G. 1991. Isothermal lipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids.* 57 : 293—307.
- Cseh R., Hetzer M., Wolf K., Kraus J., Bringmann G., Benz R. 2000. Interaction of phloretin with membranes: on the mode of action of phloretin at the water-lipid interface. *Eur. Biophys. J.* 29 : 172—183.
- Efimova S. S., Ostroumova O. S. 2012. Effect of dipole modifiers on the magnitude of the dipole potential of sterol-containing bilayers. *Langmuir.* 28 : 9908—9914.
- Efimova S. S., Schagina L. V., Ostroumova O. S. 2014. Channel forming activity of cecropins in lipid bilayers. Effect of agents modifying the membrane dipole potential. *Langmuir.* 30 : 7884—7892.
- Ermakov Yu. A., Sokolov V. S. 2003. Boundary potentials of bilayer lipid membranes: method and interpretations. In: *Planar lipid bilayers and applications*. Amsterdam: Elsevier. 109—141.
- Gawrisch K., Ruston D., Zimmerberg J., Parsegian V. A., Rand R. P., Fuller N. 1992. Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophys. J.* 61 : 1213—1223.
- Hwang T. C., Koeppe R. E., Andersen O. S. 2003. Genistein can modulate channel function by a phosphorylation-independent mechanism: importance of hydrophobic mismatch and bilayer mechanics. *Biochemistry.* 42 : 13 646—13 658.
- Jendrsiak G. L., Hasty J. H. 1974. The hydration of phospholipids. *Biochim. biophys. acta.* 337 : 79—91.
- Koynova R., Caffrey M. 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. biophys. acta.* 1376 : 91—145.
- Luchian T., Mereuta L. 2006. Phlorizin- and 6-ketocholestanol-mediated antagonistic modulation of alamethicin activity in phospholipid planar membranes. *Langmuir.* 22 : 8452—8457.
- Lundbaek J. A., Koeppe R. E., Andersen O. S. 2010. Amphiphile regulation of ion channel function by changes in the bilayer spring constant. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107 : 15 427—15 430.
- Malkov D. Y., Sokolov V. S. 1996. Fluorescent styryl dyes of the RH series affect a potential drop on the membrane/solution boundary. *Biochim. biophys. acta.* 1278 : 197—204.
- McIntosh T. J. 1996. Hydration properties of lamellar and non-lamellar phases of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids.* 81 : 117—131.
- Mereuta L., Asandei A., Luchian T. 2011. Meet me on the other side: trans-bilayer modulation of a model voltage-gated ion channel activity by membrane electrostatics asymmetry. *PLoS ONE.* 6 : e25276.
- Mereuta L., Luchian T., Park Y., Hahn K. S. 2008. Single-molecule investigation of the interactions between reconstituted planar lipid membranes and an analogue of the HP(2-20) antimicrobial peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 : 467—472.
- Montal M., Muller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 65 : 3561—3566.
- Ollila F., Halling K., Vuorela P., Vuorela H., Slotte J. P. 2002. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 399 : 103—108.
- Ostroumova O. S., Efimova S. S., Chulkov E. G., Schagina L. V. 2012a. The interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes. *PLoS ONE.* 7 : e45135.
- Ostroumova O. S., Efimova S. S., Mikhailova E. V., Schagina L. V. 2014. The interaction of dipole modifiers with amphoterin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition. *Eur. Biophys. J.* 43 : 207—215.
- Ostroumova O. S., Efimova S. S., Schagina L. V. 2012b. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. *PLoS ONE.* 7 : e30261.
- Ostroumova O. S., Gurnev P. A., Schagina L. V., Bezrukov S. M. 2007a. Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning. *FEBS Lett.* 581 : 804—808.
- Ostroumova O. S., Kaulin Y. A., Gurnev A. P., Schagina L. V. 2007b. Effect of agents modifying the membrane dipole potential on properties of syringomycin E channels. *Langmuir.* 23 : 6889—6892.
- Ostroumova O. S., Malev V. V., Ilin M. G., Schagina L. V. 2010. Surfactin activity depends on the membrane dipole potential. *Langmuir.* 26 : 15 092—15 097.
- Ostroumova O. S., Schagina L. V., Mosevitsky M. I., Zakharov V. V. 2011. Ion channel activity of brain abundant protein brain acid-soluble protein-1 in planar lipid bilayers. *FEBS J.* 278 : 461—469.
- Reyes J., Greco F., Motais R., Latorre R. 1983. Phloretin and phloretin analogs: mode of action in planar lipid bilayers and monolayers. *J. Membr. Biol.* 72 : 93—103.
- Rokitskaya T. I., Kotova E. A., Antonenko Y. N. 2002. Membrane dipole potential modulates proton conductance through gramicin channel: movement of negative ionic defects inside the channel. *Biophys. J.* 82 : 865—873.
- Sun X., Garlid K. D. 1992. On the mechanism by which bupivacaine conducts protons across the membranes of mitochondria and liposomes. *J. Biol. Chem.* 267 : 19 147—19 154.

Поступила 17 XI 2016

DIPOLE-MODIFYING EFFECT OF STYRYLPYRIDINIUM DYES AND FLAVONOIDS ON THE MODEL MEMBRANES OF DIFFERENT LIPID COMPOSITIONS

S. S. Efimova,¹ L. V. Schagina, O. S. Ostroumova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: ssefimova@mail.ru

The changes in the dipole potential of lipid bilayers (φ_d) mimicking cell membranes induced by the adsorption of low molecular weight amphiphiles, flavonoids (phloretin and quercetin) and styrylpyridinium dyes (RH 421 and RH 237) were measured. The method based on the determination of ionophore-induced transmembrane current was used to evaluate the changes in φ_d after the addition of the modifiers. The characteristic parameters of the Langmuir adsorption isotherm, the maximum changes in φ_d at an infinitely large concentration of flavonoid and its desorption constant, which reflects the affinity of the flavonoid to the lipid phase, were

determined. The slopes of linear dependencies of increasing in φ_d on the concentration of the styrylpyridinium dyes in membrane bathing solution were defined. It was found that the dipole-modifying effect of phloretin depends on the charge of the lipids forming the membranes, while the ability of quercetin to reduce φ_d turned on the initial hydration of the bilayers. The results indicated on the different mechanisms of the decrease in φ_d at the adsorption of tested flavonoids. It was shown that the changes in φ_d at the incorporation of styrylpyridinium dyes into bilayers is determined by the interaction of the modifiers with the membrane components.

Key words: lipid bilayers, phospholipids, sterols, sphingolipids, dipole potential of membrane, styrylpyridinium dyes, flavonoids, lipid rafts.
