

УДК 577.112

Е.В. БОНДАРЮК, В.В. СЕНЧУК

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛАВОНОЛОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА.

Fluorescent properties of flavonoles (quercetin, fisetin, morin and rutin) are investigated with the purpose of studying possible interaction with serum albumin. Significant change of fluorogenic properties of all flavonoles (except for rutin) after addition of serum albumin is revealed. Interrelations between structure of related flavonoles and their fluorescent properties are revealed upon interaction with protein.

Флавонолы (кверцетин, рутин и др.) относятся к числу биологически активных природных соединений, которые обладают антиоксидантной, антирадикальной, ангиопротекторной и другими видами активности [1]. Эти свойства флавоноидов послужили основой для разработки и создания целого ряда эффективных лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище [1, 2], поскольку, как показывают результаты фармакокинетических исследований, флавонолы эффективно всасываются в пищеварительном тракте и поступают в системный кровоток, распространяясь по органам и тканям [1, 3]. В связи с этим значительный интерес представляет изучение возможности взаимодействия флавонолов с сывороточным альбумином, который, как известно, выполняет роль транспортера для очень многих природных и синтетических биологически активных соединений [4]. Этот вопрос к началу выполнения данной работы оставался малоисследованным. В литературе имеются сведения об изменении флуоресценции кверцетина при взаимодействии с сывороточным альбумином [5-8]. В отношении других флавонолов опубликованы лишь единичные, зачастую отрывочные сведения [7, 8]. Нами предпринято исследование флуоресцентных свойств ряда структурно-родственных флавонолов как в свободном состоянии, так и в присутствии сывороточного альбумина с целью изучения возможного взаимодействия между ними.

Для работы были взяты наиболее распространенные природные флавонолы с хорошо известной биологической активностью: кверцетин, рутин (3-рутинозид кверцетина), физетин (5-дезоксикверцетин) и морин (структурный изомер кверцетина). Предполагалось установить взаимосвязи между структурой родственных флавонолов и их флуоресцентными свойствами при взаимодействии с сывороточным альбумином.

Материал и методика

Для исследования были использованы реактивы фирмы «Sigma» (США): бычий сывороточный альбумин (БСА), флавонолы - кверцетин, физетин, морин, рутин. Флуориметрические измерения проводились на спектрофлуориметре Cary Eclipse фирмы «Varian» (Австралия) в соответствии с общепринятыми методическими рекомендациями [9].

Параметры собственной флуоресценции флавонолов определяли в 50 мкМ растворах в Na-фосфатном буфере (рН 7,4) или в диметилформамиде (ДМФА).

Для определения изменений в спектрах флуоресценции флавонолов при взаимодействии с БСА к указанным растворам добавляли раствор БСА до конечной концентрации 15 мкМ с шагом 1,875 мкМ. Использовали следующие па-

раметры измерения флуоресценции. Для кверцетина: $\lambda_{\text{ex}}=370$ нм, ширина щели 10 нм, $\lambda_{\text{em}}=544$ нм, ширина щели 20 нм; для физетина: $\lambda_{\text{ex}}=390$ нм, ширина щели 5 нм, $\lambda_{\text{em}}=515$ нм, ширина щели 5 нм; для морина: $\lambda_{\text{ex}}=380$ нм, ширина щели 10 нм, $\lambda_{\text{em}}=515$ нм, ширина щели 10 нм.

Результаты и их обсуждение

Флуоресцентный анализ кверцетина. На рис. 1 представлены эмиссионные спектры флавонолов в присутствии сывороточного альбумина в различных концентрациях в физиологических условиях среды.

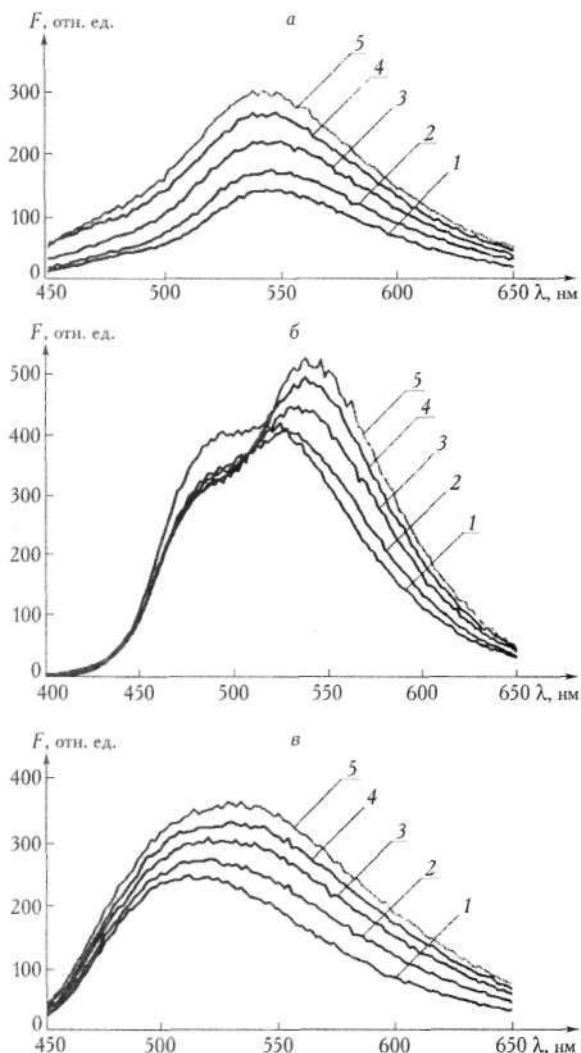


Рис. 1. Спектры флуоресценции кверцетина (а), физетина (б) и морина (в) без добавок БСА (1) и в присутствии бычьего сывороточного альбумина (2–5) в среде Na-фосфатного буфера (pH 7,4).

Концентрация флавонолов во всех пробах равна 50 мкМ. Концентрация БСА в пробах: 1 – без БСА; 2 – 3,75 мкМ БСА; 3 – 7,5; 4 – 11,25; 5 – 15 мкМ БСА

Из этих данных видно (рис. 1 а), что при увеличении концентрации сывороточного альбумина наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции F кверцетина ($\lambda_{\text{ex}}=370$ нм; $\lambda_{\text{em}}=544$ нм) без сдвига эмиссионного максимума. На рис. 2 прослеживается линейная зависимость интенсивности собственной флуоресценции кверцетина от концентрации БСА. Можно сделать вывод о том, что кверцетин имеет способность к взаимодействию с БСА, что соответствует данным литературы, согласно которым обнаружено резкое усиление флуоресценции кверцетина в присутствии БСА [8]. Однако следует отметить, что в работе [8] не исследованы спектры флуоресценции, а лишь выполнены ее измерения для ряда флавоноидов при фиксированных параметрах ($\lambda_{\text{ex}}=485$ нм; $\lambda_{\text{em}}=45$ нм).

Дополнительно было установлено, что собственная флуоресценция кверцетина без образования комплекса с сывороточным альбумином зависит от физико-химических свойств среды (рис. 3 а). Так, в водной среде (диэлектрическая проницаемость $\epsilon=80$) $\lambda_{\text{em}}=544$ нм, в то время как в ДМФА ($\epsilon=37,6$) $\lambda_{\text{em}}=490$ нм. Кроме коротковолнового сдвига максимума флуоресценции, в менее полярном растворителе приблизительно в 3 раза уменьшается интенсивность эмиссии флавонола. Эти данные могут служить основанием для предположения об участии полярных групп в гидрофобных сайтах молекулы БСА во взаимодействии с кверцетином. Аналогичное предположение высказано на основании изучения электронных спектров поглощения и молекулярного моделирования кверцетина в условиях взаимодействия с сывороточным альбумином человека [10].

Флуоресцентный анализ рутина. Установлено, что рутин как в свободном состоянии (в водных растворах и в ДМФА), так и в присутствии сывороточного альбумина в различных концентрациях не обладает заметной собственной флуоресценцией. Таким образом, замещение подвижного атома водорода гидроксильной группы при С-3 γ -пирронового кольца кверцетина на объемный олигосахаридный заместитель полностью устраняет флуоресцентные свойства. Эти данные не позволяют сделать определенный вывод о взаимодействии рутина и БСА.

Флуоресцентный анализ физетина. Структурный гомолог кверцетина - физетин (5-дезоксикверцетин) имеет весьма специфические флуоресцентные свойства. В его водном растворе наблюдается широкий максимум эмиссии с $\lambda_{em}=515$ нм, а в среде ДМФА - узкий пик с максимумом $\lambda_{em}=550$ нм (рис. 3 б). При этом интенсивность эмиссии в менее полярном растворителе (ДМФА) приблизительно в 2 раза больше, чем в более полярной водной среде. Следует отметить, что в случае кверцетина имеет место обратное соотношение. Возможно, такие свойства физетина обусловлены тушением его собственной флуоресценции диполями воды и агрегацией молекул физетина в его водном растворе из-за относительно низкой растворимости. В более гидрофобной среде, такой как диметилформамид, эти влияния отсутствуют.

На рис. 1 б показаны спектры собственной флуоресценции физетина в присутствии БСА в возрастающих концентрациях, причем установлено увеличение интенсивности флуоресценции с одновременным сдвигом максимума эмиссии от 515 до 546 нм при возрастании концентрации альбумина в смеси. Зависимость интенсивности собственной флуоресценции физетина от

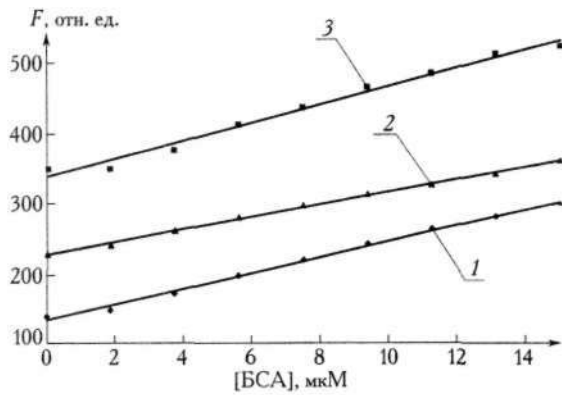


Рис. 2. Зависимость интенсивности собственной флуоресценции кверцетина с $\lambda_{em}=544$ нм (1), морина с $\lambda_{em}=515$ нм (2) и физетина с $\lambda_{em}=515$ нм (3) от концентрации сывороточного альбумина в среде Na-фосфатного буфера (рН 7,4) при 20 °С

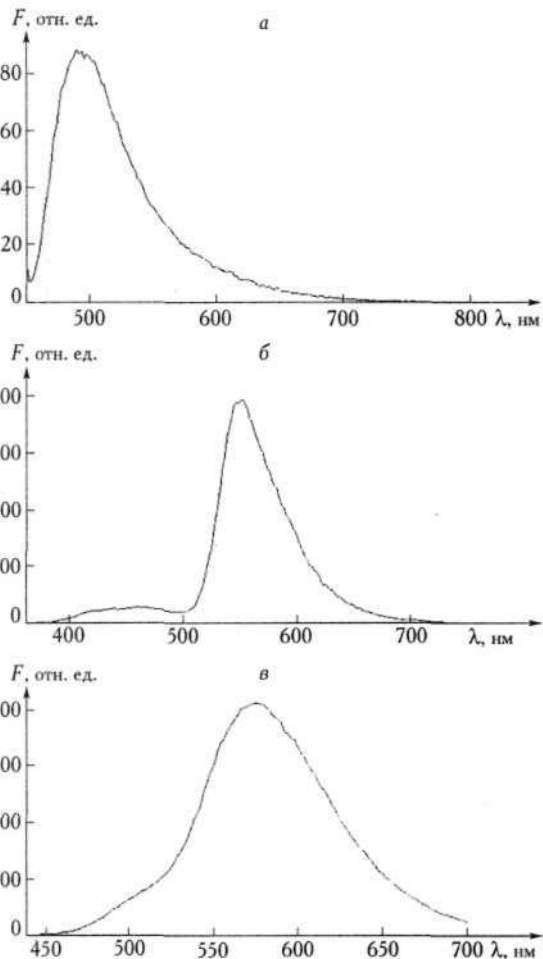


Рис. 3. Спектры флуоресценции кверцетина (а), физетина (б) и морина (в) в ДМФА без добавок БСА. Концентрация флавонолов во всех пробах равна 50 мкМ

концентрации БСА линейная (см. рис. 2). При этом в спектре проявляется коротковолновое плечо, что, по-видимому, является следствием сложного взаимодействия физетина с БСА. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о непосредственном взаимодействии физетина и сывороточного альбумина, которое, вероятно, реализуется при участии гидрофобных сайтов молекулы белка.

Флуоресцентный анализ морина. Сходные с физетином флуоресцентные свойства обнаружены при изучении морина и его взаимодействия с сывороточным альбумином. В полярной среде - водном растворе - наблюдается широкий эмиссионный пик с максимумом, как и у физетина, при 515 нм. У морина максимум эмиссии в менее полярном растворителе ДМФА (рис. 3 в) зафиксирован при 573 нм (для сравнения: у физетина - при 550 нм), причем интенсивность флуоресценции в 6-8 раз больше, чем в водном растворе, тогда как у физетина - всего лишь в 2 раза. При взаимодействии морина с БСА также наблюдается стоксов сдвиг, однако в эмиссионных спектрах отсутствует плечо, как в случае физетина. Зависимость интенсивности собственной флуоресценции морина, как кверцетина и физетина, от концентрации БСА имеет линейный характер (см. рис. 2). Эти данные позволяют предположить участие гидрофобных сайтов молекулы БСА во взаимодействии с физетином.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы. Флавонолы (агликоны) кверцетин, физетин и морин обладают собственной флуоресценцией в водных растворах и в ДМФА, тогда как рутин (гликозид кверцетина, содержащий дисахарид рутинозу) заметной собственной флуоресценцией не обладает. Результаты работы показывают существенное влияние полярности среды, соударений и агрегации молекул флавонолов на проявление ими флуоресцентных свойств. Обнаружено значительное изменение флуоресцентных свойств всех флавонолов (кроме рутина) в присутствии сывороточного альбумина. По степени усиления интенсивности эмиссии флавонолы располагаются следующим образом: физетин > морин > кверцетин. На основании изучения их флуоресцентных свойств можно заключить, что кверцетин, физетин и морин (но не рутин) способны взаимодействовать с сывороточным альбумином при участии гидрофобных сайтов белковой молекулы. Этот вывод находит подтверждение в литературе. Аналогичный вывод сделан по результатам исследований тушения флуоресценции триптофанилов БСА в присутствии флавонолов [7].

Выявлены взаимосвязи между структурой родственных флавонолов и их флуоресцентными свойствами при взаимодействии с сывороточным альбумином. Блокирование функции подвижного атома водорода гидроксильной группы при С-3 γ -пиронового кольца флавонола (замещение на объемный олигосахаридный заместитель) полностью подавляет флуоресцентные свойства как в свободном состоянии, так и в присутствии БСА. Наличие гидроксиллов при С-3, С-7, С-4' и *o*-гидроксibenзолное кольцо определяют проявление кислотных свойств флавонолами (как у кверцетина) [10]. Эти структурные особенности могут служить основанием для участия полярных групп в гидрофобных сайтах молекулы БСА при взаимодействии с флавонолами.

1. Williams R.J., Spenger J.P.E., Rice-Evans C. // *Free Radical Biology & Medicine*. 2004. Vol. 36. No. 7. P. 838.
2. *Flavonoids in Health and Disease* / Eds. C.A. Rice-Evans, L. Packer. New York, 1997.
3. Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J. et al. // *Clin. Cancer Res*. 1996. № 2. P. 659.
4. Peter T. // *Adv. Protein Chem*. 1985. Vol. 37. P. 161.
5. Guharay J., Sengupta B., Sengupta P. K. // *Proteins*. 2001. P. 75.
6. Sengupta B., Sengupta P. K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002. Vol. 299. P. 400.
7. Papadopoulou A., Green R.J., Frazier R.A. // *J. Agric. Food Chem*. 2005. Vol. 53. P. 158.
8. Gutzeit H.O., Henker Y., Kind B., Franz A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. Vol. 318. P. 490.
9. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
10. Zsila F., Bikadi Z., Simonyi M. // *Biochem. Pharmacol*. 2003. Vol. 65. P. 447.

Поступила в редакцию 22.09.05.

Евгений Васильевич Бондарюк - аспирант кафедры биохимии.
Вадим Валентинович Сенчук - кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии.