

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АМИЛОИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПОЛИФЕНОЛАМИ

© 2019 г. С. С. Ефимова^{1, *}, О. С. Остроумова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

*E-mail: efimova@incras.ru

Поступила в редакцию 05.11.2018 г.

После доработки 06.12.2018 г.

Принята к публикации 10.12.2018 г.

Работа посвящена изучению процессов формирования и функционирования амилоидогенными пептидами ионных каналов, патологическая агрегация и накопление которых является причиной различных нейродегенеративных расстройств. Исследовано влияние растительных полифенолов флоретина, бетеина, ресвератрола, изоликуритигенина, 4'-гидроксисалкона и кардамона на порообразующую активность фрагмента 25-35 β -амилоидного пептида в бислоиных липидных мембранах из пальмитоилфосфохолина. Показано, что введение в мембраноомывающие растворы флоретина, бетеина или изоликуритигенина до концентрации 20 мкМ приводит к росту макроскопического трансмембранного тока, индуцированного пептидом. При этом кардамонин, 4'-гидроксисалкон и ресвератрол не оказывают влияния на активность фрагмента 25-35 β -амилоидного пептида. Сопоставление результатов изучения влияния тестируемых полифенолов на электрические и эластические свойства модельных мембран и порообразующую способность фрагмента 25-35 β -амилоидного пептида позволило сделать вывод об отсутствии связи потенцирующего действия флоретина, бетеина и изоликуритигенина с изменениями физико-химических свойств липидных бислоев. Результаты, полученные с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии, указывают на возможную роль доменной организации липидного бислоя в порообразующей активности амилоидогенного пептида. Результаты электрофизиологических измерений, полученные для α -синуклеина (другого белка, формирующего β -складчатые ион-проницаемые поры), не противоречат предположению о связывании гидроксированных в 7 положении А-цикла и в 4'-положении В-цикла полифенолов с открытым пропановым фрагментом с β -слоями, образованными амилоидными пептидами.

Ключевые слова: фрагмент 25-35 β -амилоидного пептида, ионные каналы, бетеин, флоретин, липидные бислои, липосомы

DOI: 10.1134/S0041377119030040

Распространенной гипотезой, связывающей нейротоксичность β -амилоидов и их мембранное действие, является предположение о формировании пептидами олигомерных ионных каналов (Arispe et al., 1993a, 1993b; Mirzabekov et al., 1994, 1996; Hirakura et al., 2000; Prangko et al., 2012). Кольцевые структуры β -амилоидных агрегатов, обнаруженные с помощью атомно-силовой микроскопии, также свидетельствуют в пользу возможности формирования трансмембранных пор (Lin et al., 2001; Lal et al., 2007; Jang et al., 2009). Электрофизиологическими методами

показано, что различные фрагменты β -амилоидного пептида способны формировать в модельных липидных мембранах потенциал-независимые ионные каналы преимущественно катионной селективности (Arispe et al., 1993a, 1993b; Mirzabekov et al., 1994, 1996; Hirakura et al., 2000; Quist et al., 2005; Zakharov et al., 2007; Nelson et al., 2007; Demuro et al., 2011). Считается, что наибольшей порообразующей и токсической активностью обладают олигомеры среднего размера, около 3–5 нм (Kayad et al., 2004; Prangko et al., 2012). Компьютерное моделирование предполагает большое разнообразие каналов, которые могут быть образованы β -структурами (Tofoleanu, Buchete, 2012). Данные молекулярной динамики указывают на формирование подсосоний проводимости каналов за счет изменения степени олигомеризации амилоидных пептидов (Durell et al., 1994). Многообразие размеров таких структур (Lashuel et al., 2003; Kayad et al., 2004; Diociaiuti et al., 2006) может определять много-

Принятые сокращения: A β ₂₅₋₃₅ – фрагмент 25-35 β -амилоидного пептида, ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ДПОФХ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, СМ – сфингомиелин из мозга свиней, I_{∞} – стационарный трансмембранный ток, индуцированный A β ₂₅₋₃₅ или α -синуклеином, $\Delta\varphi_d$ – изменение дипольного потенциала мембран.

уровневую проводимость и различную катионную селективность β -амилоидных каналов (Arispe et al., 1993a, 1993b; Mirzabekov et al., 1994; Hirakura et al., 1999; Kourie et al., 2002). Теоретическое моделирование допускает и участие мембранных липидов в формировании трансмембранных пор β -амилоиды (Durell et al., 1994; Tofoleanu, Buchete, 2012).

Установление молекулярных механизмов образования амилоидами ионных каналов может стать недостающим ключом к пониманию патофизиологической роли порообразования этими пептидами. Первоочередным вопросом, который может быть решен в рамках работы с модельными липидными системами, является выявление механизмов регуляции мембранной активности амилоидных пептидов, в частности, фрагмента 25-35 β -амилоидного пептида ($A\beta_{25-35}$). Удобным и успешно применяемым инструментом для изучения формирования и функционирования различных каналов являются растительные полифенолы (Rokitskaya et al., 2002; Hwang et al., 2003; Luchian, Mereuta, 2006; Ostroumova et al., 2010, 2011, 2012a, 2012b, 2014; Mereuta et al., 2008, 2011; Lundbaek et al., 2010; Efimova et al., 2014, 2016, 2018a, 2018b). Их использование позволило определить роль липидного микроокружения в функционировании различных каналов и выдвинуть предположение об их строении.

Ранее (Ефимова и др., 2015) было показано, что введение полифенола флоретина в мембраноомывающие растворы до концентрации 20 мкМ вызывает рост стационарного трансмембранного тока, индуцированного $A\beta_{25-35}$, в бислоях из эквимольной смеси диолеилфосфосерина и диолеилфосфоэтаноламина. При этом флоретин, генистеин и кверцетин не оказывают эффекта, подобного флоретину. Сравнение химических структур использованных полифенолов и результатов их действия на порообразующую активность $A\beta_{25-35}$ позволило установить, что важную роль во взаимодействии $A\beta_{25-35}$ и растительных полифенолов играет заряд пептида и наличие открытого пропанового фрагмента в молекуле полифенола.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния растительных полифенолов с открытым пропановым фрагментом — бутеина, изоликуритигенина, 4'-гидроксихалкона, кардамона и ресвератрола — на порообразующую активность $A\beta_{25-35}$ в модельных липидных мембранах. Были поставлены следующие задачи: определить величины изменений количественных характеристик физико-химических свойств модельных липидных мембран при адсорбции полифенолов (дипольного потенциала мембран, фазового разделения компонентов липосом и термотропного поведения липидов); установить механизмы влияния полифенолов на порообразующую способность $A\beta_{25-35}$.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

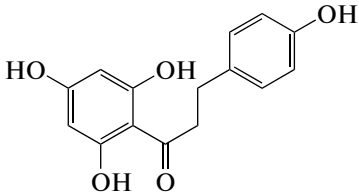
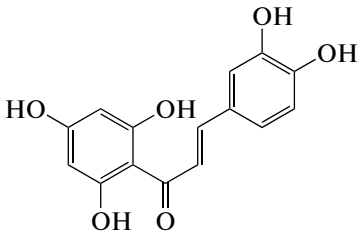
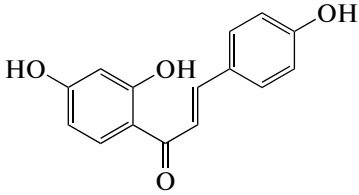
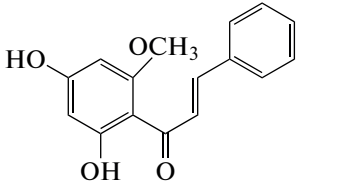
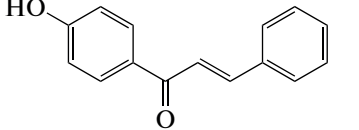
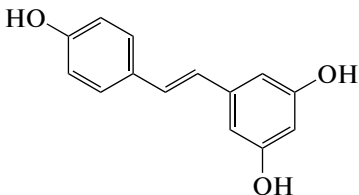
В работе использовали следующие реагенты: 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосхолин (ДОФХ), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ), сфингомиелин из мозга свиней (СМ) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамин) (ЛР-ДПФЭ) (Avanti Polar Lipids, США); флоретин, бутеин, ресвератрол, изоликуритигенин, 4'-гидроксихалкон, кардамонин, KCl, КОН, NEPES, пентан, этанол, гексадекан, нонактин, сорбитол, фрагмент 25-35 β -амилоидного пептида ($A\beta_{25-35}$), α -синуклеин (Sigma, США). Химические структуры полифенолов представлены в табл. 1.

Реконструкция ионных каналов в липидные бислои. Формирование мембран проводили по методу Монтала и Мюллера путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстиях в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два отделения (Montal, Mueller, 1972). Монослои формировали из ПОФХ в 0.1 М KCl (pH 7.4). $A\beta_{25-35}$ и α -синуклеин добавляли к водной фазе одного отделения камеры из водного раствора до определенной концентрации в диапазоне 30–60 и 1–3 мкМ соответственно. Полифенолы (флоретин, бутеин, изоликуритигенин, 4'-гидроксихалкон, ресвератрол, кардамонин) вводили в оба отделения камеры, используя маточные (20 мМ) растворы в диметилсульфоксиде, до конечной концентрации 20 мкМ. В условиях эксперимента часть молекул (от 16 до 55%) всех тестируемых полифенолов имеет отрицательный заряд. Поскольку действие полифенола на $A\beta_{25-35}$ -индуцированный ток не зависит от состава мембраны, вместо эквимольной смеси диолеилфосфосерина и диолеилфосфоэтаноламина (Ефимова и др., 2015) в настоящей работе использовали однокомпонентные мембраны из ПОФХ. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с применением программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Использовали 8-полярный фильтр Бесселя (Model 9002, Frequency Devices, США) и частоту фильтрации 1 кГц. Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (OriginLab, США).

Среднее отношение (I_{∞}/I_{∞}^0) стационарного интегрального трансмембранного тока, индуцированного каналобразующим пептидом в присутствии (I_{∞}) и отсутствие полифенола (I_{∞}^0), определяли как среднее арифметическое значение и стандартное отклонение.

Таблица 1. Основные характеристики влияния полифенолов на свойства модельных липидных мембран и порообразующую активность амилоидогенных пептидов и белков

Полифенол	Химическая структура	I_{∞}/I_{∞}^0	I_{∞}/I_{∞}^0	$-\Delta\Phi_d$, мВ	$-\Delta T_m$, °C	$\Delta T_{1/2}$, °C
		A β_{25-35}	α -синуклеин			
Флоретин		3.1 ± 0.7	4.6 ± 0.8	140 ± 7^a	4.4 ± 0.4	0.9 ± 0.2
Бутеин		1.7 ± 0.5	1.6 ± 0.4	150 ± 12^a	4.8 ± 0.5	2.5 ± 0.3
Изоликуртитигенин		2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.3	41 ± 12	6.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2
Кардамонин		1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.2	38 ± 9^a	5.2 ± 0.3	0.9 ± 0.1
4'-Гидроксикалкон		1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	35 ± 10^a	5.7 ± 0.2	2.5 ± 0.1
Ресвератрол		1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	9 ± 7^a	3.3 ± 0.4	1.5 ± 0.1

Примечание. Для каждой из экспериментальных систем представлено среднее значение и его ошибка. С вероятностью 0.68 среднее значение генеральной совокупности находится в указанном интервале.

I_{∞}/I_{∞}^0 – отношение стационарного трансмембранного тока, индуцированного A β_{25-35} или α -синуклеином в ПОФХ-мембранах, после (I_{∞}) и до (I_{∞}^0) введения полифенола в конечной концентрации концентрации 20 мкМ; $\Delta\Phi_d$ – изменение дипольного потенциала мембран в присутствии 20 мкМ полифенола в растворах, омывающих ДОФХ-мембраны; ΔT_m , $\Delta T_{1/2}$ – изменение температуры максимума и полуширины пика, соответствующего главному фазовому переходу ДПФХ при соотношении липид : полифенол 2 : 1. ^a по: Efimova et al., 2018.

нение от среднего. Усреднение I_{∞}/I_{∞}^0 проведено для 3–5 независимых экспериментов.

В каждой из экспериментальных систем в случае всех методов результат выражали как среднее значение и его ошибка. С вероятностью 0.68 среднее значение генеральной совокупности находится в указанном интервале.

Определение изменения дипольного потенциала мембран ($\Delta\phi_d$). При измерении $\Delta\phi_d$ мембраны формировали из ДОФХ в 0.1 М растворах KCl при pH 7.4 (5 мМ HEPES). Изоликуритигенин вводили в оба отделения камеры до конечной концентрации 20 мкМ. Поскольку при нейтральных значениях pH доля заряженных молекул изоликуритигенина составляет менее 16%, то считали, что рост нонактин-индуцированного тока обусловлен падением дипольной компоненты граничного потенциала мембран.

При введении изоликуритигенина $\Delta\phi_d$ определяли с использованием статистики Больцмана (Andergen et al., 1976). Среднее значение изменения дипольного потенциала мембран при адсорбции изоликуритигенина определяли как среднее арифметическое значение $\Delta\phi_d$ и ошибку среднего при измерении от 4 бислов, как описано ранее в (Ефимова и Остроумова, 2015; Ефимова и др., 2017; Efimova et al., 2018b).

Конфокальная флуоресцентная микроскопия липосом. Гигантские одноламеллярные липосомы формировали из смеси ПОФХ/СМ (80/20 мол. %) с введенным в нее флуоресцентным липидным зондом ЛР-ДПФЭ (0.1 мол. %) в электрическом поле с помощью прибора “Nanion vesicle prep pro” (Германия), как описано ранее (Ефимова и Остроумова, 2017). В экспериментальные аликвотированные образцы вводили фрагмент $\text{A}\beta_{25-35}$ до концентрации 7 мкМ без или вместе с полифенолами (400 мкМ флоретина, 4'-гидроксихалкона или ресвератрола). Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив 100 $\times$ /1.4 НСХ РЛ микроскопа Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Аро (Leica Microsystems, Германия) при комнатной температуре. Свечение ЛР-ДПФЭ регистрировали при длине волны возбуждения 543 нм (гелий-неоновый лазер). Согласно данным из литературы, ЛР-ДПФЭ в бислов с фазовым разделением встраивается в жидкую неупорядоченную фазу (l_d), формируемую ПОФХ (Juhász et al., 2010). При этом твердая упорядоченная фаза (s_o), обогащенная СМ, остается неокрашенной (Muddana et al., 2012).

Образец характеризовали частотой встречаемости (p_i , %) гомогенных и гетерогенных везикул:

$$p_i = \frac{N_i}{N} \times 100\%, \quad (1)$$

где i – тип фазового разделения липосом (l_d или $l_d + s_o$); N_i – число везикул в образце с определенным сценарием фазового разделения (0–50), N – общее число липосом в образце (не менее 50 в каждой системе).

Для каждой системы проводили 5 независимых экспериментов.

Сильное тушение флуоресценции ЛР-ДПФЭ в присутствии битеина, изоликуритигенина и кардамона не позволило исследовать влияние полифенолов на доменную организацию везикул.

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия модифицированных везикул. Гигантские одноламеллярные липосомы изготавливали из ДПФХ методом электроформации с помощью “Nanion vesicle prep pro” (напряжение 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, 55°C). Концентрация липида составляла 3 мМ. В экспериментальные образцы вводили полифенолы в соотношении липид : полифенол равном 2 : 1. Термограммы липосомных суспензий получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра μDSC7 (Setaram, Франция). Воспроизводимости температурной зависимости теплоемкости достигали путем повторного нагревания образца сразу после охлаждения с постоянной скоростью 0.2 К/мин. Пики на термограммах характеризовали температурой максимума (T_m) и шириной на полувысоте ($T_{1/2}$), отвечающей кооперативности фазового перехода ДПФХ. Измерение указанных выше параметров позволяет судить о термотропном поведении липидов при адсорбции растительных полифенолов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рис. 1 демонстрирует действие флоретина, битеина и изоликуритигенина на стационарный трансмембранный ток, индуцированный фрагментом $\text{A}\beta_{25-35}$ (I_{∞}) в ПОФХ-бислоях при трансмембранном напряжении 50 мВ. Видно, что указанные полифенолы вызывают рост I_{∞} . В табл. 1 представлены средние отношения трансмембранного тока, индуцированного $\text{A}\beta_{25-35}$, после и до введения различных полифенолов (I_{∞}/I_{∞}^0). Можно заключить, что флоретин, битеин и изоликуритигенин потенцируют мультисистемную активность фрагмента $\text{A}\beta_{25-35}$ (трансмембранный ток, протекающий через бислов, увеличивается более чем в два раза), в то время как другие протестированные полифенолы (4'-гидроксихалкон, кардамонин и ресвератрол) практически не влияют на индуцированный фрагментом трансмембранный ток (табл. 1).

В табл. 1 также представлены средние значения падения дипольного потенциала ($\Delta\phi_d$) фосфолипидных мембран, вызванного адсорбцией изоликуритигенина. Для остальных тестируемых полифенолов показаны величины, полученные нами ранее (Efimova et al., 2018b). Можно заметить, что флоретин и битеин вызывают значительное снижение дипольного потенциала мембран (около 150 мВ), уменьшение ϕ_d вследствие добавки изоликуритигенина, кардамона и 4'-гидроксихалкона составляет не более

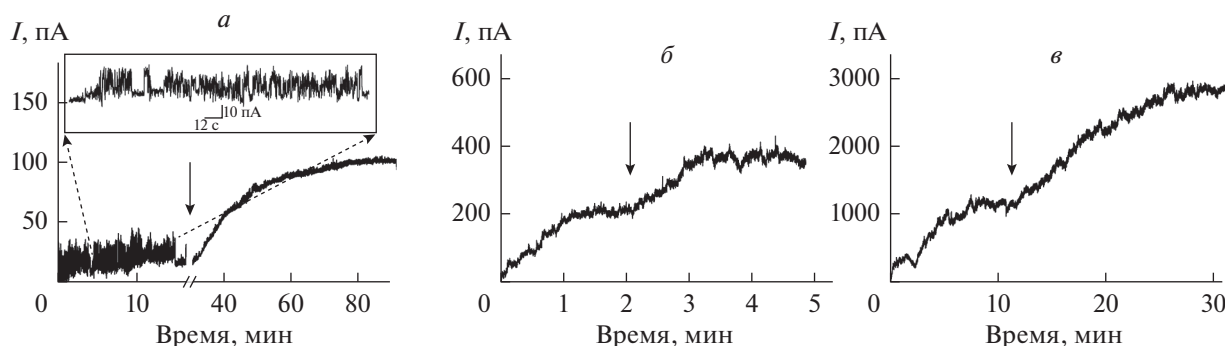


Рис. 1. Влияние полифенолов флоретина (а), бутеина (б) и изоликуритигенина (в) на стационарный ток I , индуцированный фрагментом $A\beta_{25-35}$ в липидных бислоях из ПОФХ. Мембраны омываются 0.1 М КСl (рН 7.4). Моменты введения полифенолов в мембраноомывающие растворы до концентрации 20 мкМ указаны стрелками. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ. На вставке (а): пример записи трансмембранных токов, протекающих через $A\beta_{25-35}$ каналы.

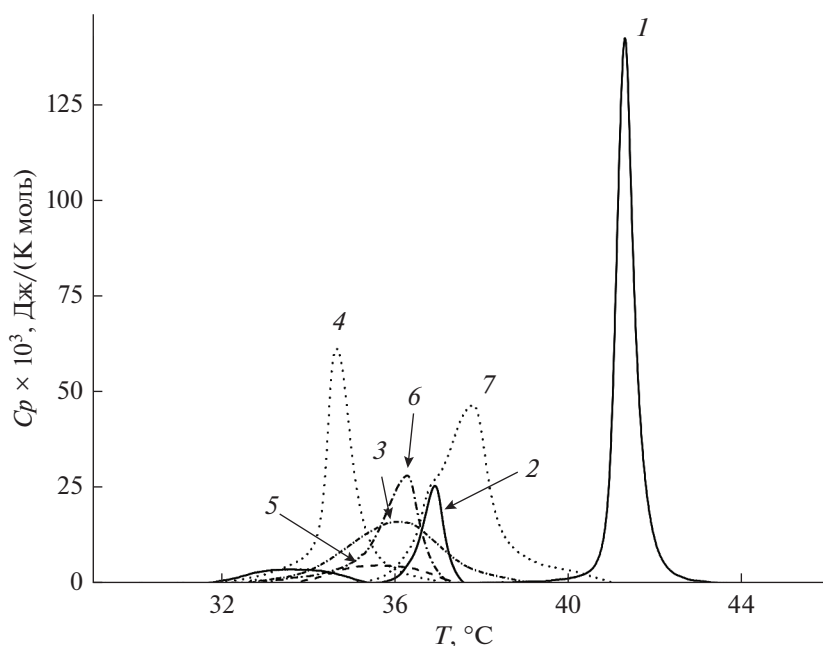


Рис. 2. Термограммы плавления ДПФХ ($C_p(T)$) в отсутствие (1, контроль) и в присутствии флоретина (2), бутеина (3), изоликуритигенина (4), 4'-гидроксиалкона (5), кардамона (6) и ресвератрола (7) при соотношении с липидом 1 : 2.

40 мВ, при этом ресвератрол диполь-модифицирующим действием в отношении фосфохолиновых бислоев не обладает.

Рис. 2 показывает термограммы липосом из ДПФХ в отсутствие (контроль) и в присутствии флоретина, бутеина, изоликуритигенина, 4'-гидроксиалкона, кардамона и ресвератрола при соотношении липид : полифенол, равном 2 : 1. Изменения термодинамического поведения насыщенного фосфохолина можно оценить на основании параметров, характеризующих главный фазовый переход, в частности, температуры плавления (T_m) и ширины соответствующего пика на полувысоте, которая отвечает коопе-

ративности фазового перехода ($T_{1/2}$). В отсутствие модификаторов T_m ДПФХ составляет 41.4°C, а $T_{1/2}$ равна 0.5°C. В табл. 1 представлены соответствующие величины изменения температуры и полуширины пика при фазовом переходе ДПФХ в липосомах, модифицированных полифенолами. Можно заметить, что все тестируемые полифенолы вызывают падение T_m и рост $T_{1/2}$. Способность вызывать падение T_m возрастает в ряду ресвератрол $\leq$ флоретин $\leq$ бутеин $\approx$ кардамонин $\leq$ 4'-гидроксиалкон $\leq$ изоликуритигенин. Кооперативность перехода падает в ряду флоретин $\approx$ кардамонин $\approx$ изоликуритигенин $\leq$ ресвератрол $<$ бутеин $\approx$ 4'-гидроксиалкон.

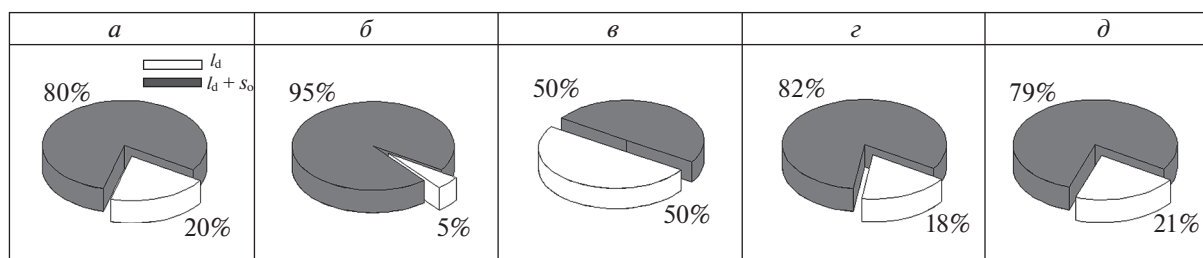


Рис. 3. Круговые диаграммы, демонстрирующие вероятность обнаружения в суспензии липидных везикул с фазовым разделением: в отсутствие каких-либо мембраноактивных агентов (а), в присутствии 7 мкМ $A\beta_{25-35}$ (б) или при одновременной добавке 7 мкМ $A\beta_{25-35}$ и флоретина (в), 4'-гидроксиалкона (г) или ресвератрола (д) в концентрации 400 мкМ.

На каждой диаграмме сектор, отвечающий процентному соотношению везикул с твердыми упорядоченными доменами ($I_d + s_o$), окрашен в *темно-серый цвет*, сектор *белого цвета* характеризует относительное число гомогенно окрашенных липосом, пребывающих в жидком неупорядоченном состоянии (I_d) и не демонстрирующих видимого фазового разделения. Липосомы сформированы из ПОФХ/СМ (80/20 мол. %) методом электроформации.

На рис. 3 представлены круговые диаграммы, построенные согласно формуле 1, которые демонстрируют вероятность обнаружения липосом с фазовым разделением в суспензии в отсутствие каких-либо агентов, в присутствии 7 мкМ $A\beta_{25-35}$ или при одновременном введении того же количества $A\beta_{25-35}$ и флоретина, 4'-гидроксиалкона или ресвератрола в конечной концентрации 400 мкМ. В отсутствие мембраноактивных соединений число везикул с твердыми упорядоченными доменами, обогащенными СМ ($I_d + s_o$), равно 80% (рис. 3, а). Из сравнения рис. 3, а и 3, б видно, что инкубация ПОФХ/СМ (80/20 мол. %) липосом с $A\beta_{25-35}$ (7 мкМ) приводит к 15%-ному росту числа везикул с доменами s_o . Введение флоретина к липосомам, обработанным амилоидным пептидом, вызывает 45%-ное уменьшение числа липосом с видимым фазовым разделением (рис. 3, в). При этом добавка 4'-гидроксиалкона (рис. 3, г) или ресвератрола (рис. 3, д) к везикулам, модифицированным $A\beta_{25-35}$, не оказывает влияния на сценарий фазового разделения в мембранах липосом.

В табл. 1 представлены результаты влияния полифенолов на порообразующую активность α -синуклеина в ПОФХ-мембранах. Из табл. 1 видно, что, как и в случае $A\beta_{25-35}$, флоретин, битеин и изоликуритигенин вызывают рост I_∞ приблизительно в 5, 1.5 и 2 раза соответственно. Добавка кардамона, 4'-гидроксиалкона или ресвератрола практически не влияет на I_∞ (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Растительные полифенолы известны своей способностью уменьшать дипольный потенциал мембран (Efimova, Ostroumova, 2012; Остроумова и др., 2013; Efimova et al., 2018b). На основании сравнения приведенных в табл. 1 величин I_∞/I_∞^0 и $-\Delta\phi_d$ при адсорбции тестируемых полифенолов можно говорить о том, что потенцирование порообразующей способ-

ности $A\beta_{25-35}$ флоретином, битеином и изоликуритигенином не является результатом изменения дипольного потенциала мембран этими полифенолами.

Согласно литературным данным некоторые полифенолы способны влиять на порообразующую способность антимикробных агентов посредством изменения трансмембранного распределения латеральной компоненты давления (Hwang et al., 2003; Chulkov, Ostroumova, 2016; Efimova et al., 2018a, 2018b). О модификации профиля латерального давления можно судить по изменению термотропного поведения мембранообразующих липидов, в частности, величин T_m и $T_{1/2}$ в присутствии полифенолов. Наблюдаемое уменьшение T_m и увеличение $T_{1/2}$ при введении полифенолов (табл. 1) можно объяснить их встраиванием между полярными "головками" ДПФХ. В результате увеличения площади, приходящейся на одну молекулу липида, подвижность углеводородных цепей липидов возрастает, $T_{1/2}$ возрастает, а T_m падает. Отсутствие корреляции между способностью полифенолов потенцировать порообразующую активность $A\beta_{25-35}$ и влиять на термотропное поведение ДПФХ (табл. 1) свидетельствует о том, что эффект флоретина, битеина и изоликуритигенина не связан с модификацией эластических свойств мембраны этими полифенолами.

Результаты, полученные методом флуоресцентной конфокальной микроскопии липосом (рис. 3), указывают на существенную роль доменной организации липидного бислоя в мембранной активности амилоидных пептидов. Считается, что липидные упорядоченные домены могут выступать точками концентрации и нуклеации амилоидных пептидов (Sasahara et al., 2013). Как показано нами ранее, растительные полифенолы способны влиять на величину несоответствия толщины углеводородного кора между доменами, находящимися в упорядоченном и неупорядоченном состоянии (Efimova, Ostroumova, 2017). Можно думать, что под действием флоретина изменяется размер амилоид-индуцированных упорядоченных доменов: домены макроскопиче-

ских размеров трансформируются в более мелкие, имеющие нанометровый размер и не определяемые методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Благодаря разделению в присутствии полифенолов крупных обогащенных амилоидами доменов на более мелкие, может увеличиваться длина границы между упорядоченной и неупорядоченной фазой. Если предположить, что амилоидные каналы локализуются на границе упорядоченных доменов, в зоне несоответствия толщины углеводородного остова мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии, то введение полифенола приведет к росту интегрального $A\beta_{25-35}$ -индуцированного трансмембранного тока в виду увеличения возможности встраивания амилоидных каналов в область раздела липидных фаз.

Ранее в работе было показано, что добавка флоретина до концентрации 20 мкМ в мембраноомывающие растворы вызывает рост стационарного трансмембранного тока, индуцированного $A\beta_{25-35}$ (Ефимова и др., 2015). При этом флоридин, генистеин и кверцетин подобного флоретину эффекта не оказывают. С использованием других амилоидогенных пептидов, характеризующихся различным интегральным зарядом, было установлено, что одним из механизмов, ответственным за рост амилоид-индуцированного тока, является электростатическое взаимодействие между положительно заряженным каналообразующим агентом и отрицательно заряженным полифенолом. Учитывая что кверцетин и генистеин, несмотря на отрицательный заряд, не оказывали действия на $A\beta_{25-35}$ -индуцированный трансмембранный ток, было сделано заключение, что это условие необходимо, но недостаточно для наблюдаемого эффекта. Важным фактором оказалось наличие открытого пропанового фрагмента у молекул полифенола, то есть его конформация.

Это может свидетельствовать в пользу того, что наблюдаемый рост стационарного трансмембранного тока, индуцированного $A\beta_{25-35}$, в присутствии флоретина, бутеина и изоликуритигенина, может быть результатом непосредственного взаимодействия молекул полифенола с β -структурами. Сравнительный анализ структур тестируемых полифенолов и их эффектов в отношении $A\beta_{25-35}$ -индуцированного трансмембранного тока, позволяет предположить существование определенного структурного мотива в молекулах полифенолов, который ответственен за взаимодействие полифенолов с β -структурами. Все полифенолы, потенцирующие активность амилоидов, имеют ОН-группы в 7 положении А-цикла и в 4'-положении В-цикла и открытый трехуглеродный фрагмент, связывающий кольца А и В. Оценка расстояния между ОН-группами в положениях 7- и 4' молекул флоретина, бутеина и изоликуритигенина была проведена нами путем геометрической оптимизации эллипсоидами с использованием NurgChem 7.0. Полученные результаты указывают на то,

расстояние между указанными гидроксильными группами в молекулах флоретина, бутеина и изоликуритигенина составляет порядка 1.0–1.1 нм. При этом аппроксимация эллипсоидом молекул других тестируемых полифенолов (кардамона и 4'-гидроксихалкона), не имеющих ОН-группы в 4'-положении кольца В или характеризующимися меньшим размером углеродного фрагмента между кольцами А и В, в частности, ресвератрола, дает максимальный размер молекул 0.7–0.8 нм. Согласно литературным данным расстояние между соседними β -листами равно 1.0–1.2 нм (Hamley, 2007; Groenning, 2010). Вероятно, благодаря открытому углеродному фрагменту гидроксильрованных в положениях 7 и 4' молекул полифенолов и их высокой конформационной подвижности обеспечивается тонкая подстройка при их встраивании и связывании с соседними β -листами.

Для проверки предположения о специфическом взаимодействии некоторых полифенолов с β -структурами в работе был использован другой амилоидогенный белок α -синуклеин, N-концевой домен которого положительно заряжен. Согласно литературным данным, α -синуклеин способен образовывать небольшие олигомеры, характеризующиеся высоким процентом β -складчатости (Pfefferkorn et al., 2012) и способные формировать в модельных и клеточных мембранах ион-проницаемые поры (Zakharov et al., 2007; van Rooijen et al., 2010). Результаты наших измерений показали, что в присутствии флоретина, бутеина и изоликуритигенина, аналогично случаю с $A\beta_{25-35}$, наблюдается рост α -синуклеин-индуцированного трансмембранного тока, в то время как другие тестируемые полифенолы величину I_{∞} не изменяют (табл. 1). Таким образом, полученные результаты не противоречат предположению о непосредственном взаимодействии молекул полифенолов с β -структурами.

Таким образом, полученные в работе результаты позволяют сделать вывод о связывании гидроксильрованных в положении 7 А-цикла и в положении 4' В-цикла полифенолов с открытым пропановым фрагментом с β -структурами амилоидогенных белков и пептидов. Вызываемый флоретином, бутеином и изоликуритигенином рост порообразующей активности амилоидогенных пептидов и белков с одной стороны, и нейропротекторное действие полифенолов с другой, ставят под сомнение участие амилоидных пор в патогенезе нейродегенеративных расстройств.

Авторы выражают благодарность Ф.А. Гурневу за предоставление α -синуклеина и обсуждение результатов работы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00806) (результаты по влиянию халконов на мембранную активность амилоидогенных пептидов) и Российского научного фонда (проект 17-74-10137) (результаты по влиянию

полифенолов на термотропное поведение липидов). С.С. Ефимова отмечена именной стипендией Президента РФ (СП-484.2018.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ефимова С.С., Захаров В.В., Остроумова О.С. 2015. Влияние дипольных модификаторов на каналообразующую активность амилоидных и амилоидоподобных пептидов в липидных бислоях. Цитология. 57 (2) : 144–152. (Efimova S.S., Zakharov V.V., Ostroumova O.S. 2015. Effects of dipole modifiers on the channel-forming activity of amyloid and amyloid-like peptides in lipid bilayers. Cell Tiss. Biol. 9 (3) : 250–259.)
- Ефимова С.С., Остроумова О.С. 2017. Дипольные модификаторы — регуляторы латеральной гетерогенности липидных мембран. Акта Натура. 9 (2) : 67–75. (Efimova S.S., Ostroumova O.S. 2017. Dipole modifiers are regulators of the lateral heterogeneity of lipid membranes. Acta Naturae. 9 (2) : 67–74.)
- Ефимова С.С., Остроумова О.С. 2015. Модификаторы дипольного потенциала липидных бислоев. Акта Натура. 7 (4) : 73–82. (Efimova S.S., Ostroumova O.S. 2015. Modifiers of the dipole potential of lipid bilayers. Acta Naturae. 7 (4) : 70–79.)
- Ефимова С.С., Шагина Л.В., Остроумова О.С. 2017. Диполь-модифицирующее действие стирилпиридиновых красителей и флавоноидов на модельные мембраны различного состава. Цитология. 59 (3) : 229–235. (Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. 2017. Dipole-modifying effect of styrylpyridinium dyes and flavonoids on the model membranes of different lipid compositions. Cell Tiss. Biol. 11 (4) : 335–341.)
- Остроумова О.С., Ефимова С.С., Шагина Л.В. 2013. Изменения дипольного потенциала фосфолипидных мембран при адсорбции флавоноидов. Биофизика. 58 (3) : 474–480. (Ostroumova 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.)
- Arispe N., Pollard H.B., Rojas E. 1993a. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 10573–10577.
- Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. 1993b. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 567–571.
- Chulkov E.G., Ostroumova O.S. 2016. Phloretin modulates the rate of channel formation by polyenes. Biochim. Biophys. Acta. 1858 (2) : 289–294.
- Demuro A., Smith M., Parker I. 2011. Single-channel Ca(2+) imaging implicates Aβ1-42 amyloid pores in Alzheimer's disease pathology. J. Cell. Biol. 195 : 515–524.
- Diociaiuti M., Polzi L.Z., Valvo L., Malchiodi-Albedi F., Bombelli C., Gaudiano M.C. 2006. Calcitonin forms oligomeric pore-like structures in lipid membranes. Biophys. J. 91 : 2275–2281.
- Durell S.R., Guy H.R., Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. 1994. Theoretical models of the ion channel structure of amyloid beta-protein. Biophys. J. 67 : 2137–2145.
- 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.
- Efimova S.S., Zakharova A.A., Ismagilov A.A., Schagina L.V., Malev V.V., Bashkoriv P.V., Ostroumova O.S. 2018a. Lipid-mediated regulation of pore-forming activity of syringomycin E by thyroid hormones and xanthene dyes. Biochim. Biophys. Acta.-Biomembr. 1860 : 691–699.
- Efimova S.S., Zakharova A.A., Medvedev R.Ya., Ostroumova O.S. 2018b. Ion channels induced by antimicrobial agents in model lipid membranes are modulated by plant polyphenols through surrounding lipid media. J. Membr. Biol. 251 : 551–562.
- Efimova S.S., Zakharova A.A., Schagina L.V., Ostroumova O.S. 2016. Two types of syringomycin E channels in sphingomyelin-containing bilayers. Eur. Biophys. J. 45 : 91–98.
- Groenning M. 2010. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. J. Chem. Biol. 3 : 1–18.
- Hamley I.W. 2007. Peptide fibrillization. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 46 : 8128–8147.
- Hirakura Y., Lin M.C., Kagan B.L. 1999. Alzheimer amyloid abeta1-42 channels: effects of solvent, pH, and Congo Red. J. Neurosci. Res. 57 : 458–466.
- Hirakura Y., Yiu W.W., Yamamoto A., Kagan B.L. 2000. Amyloid peptide channels: blockade by zinc and inhibition by Congo red (amyloid channel block). Amyloid. 7 : 194–199.
- 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 : 13646–13658.
- Jang H., Arce F.T., Capone R., Ramachandran S., Lal R., Nussinov R. 2009. Misfolded amyloid ion channels present mobile beta-sheet subunits in contrast to conventional ion channels. Biophys. J. 97 : 3029–3037.
- Juhasz J., Davis J.H., Sharom F.J. 2010. Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of 'lipid raft' mixtures. Biochem. J. 430 : 415–423.
- Kayed R., Sokolov Y., Edmonds B., McIntire T.M., Milton S.C., Hall J.E., Glabe C.G. 2004. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. J. Biol. Chem. 279 : 46363–46366.
- Kourie J.I., Culverson A.L., Farrelly P.V., Henry C.L., Lao-hachai K.N. 2002. Heterogeneous amyloid-formed ion channels as a common cytotoxic mechanism: implications for therapeutic strategies against amyloidosis. Cell Biochem. Biophys. 36 : 191–207.
- Lal R., Lin H., Quist A.P. 2007. Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. Biochim. Biophys. Acta. 1768 : 1966–1975.
- Lashuel H.A., Hartley D.M., Petre B.M., Wall J.S., Simon M.N., Walz T., Lansbury P.T. 2003. Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abeta40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores. J. Mol. Biol. 332 : 795–808.

- Lin H.A.I., Bhatia R., Lal R. 2001. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* 13 : 2433–2444.
- 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 : 15427–15430.
- 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., Hahm 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.
- Mirzabekov T.A., Lin M.C., Kagan B.L. 1996. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J. Biol. Chem.* 271 : 1988–1992.
- Mirzabekov T., Lin M.C., Yuan W.L., Marshall P.J., Carman M., Tomaselli K., Lieberburg I., Kagan B.L. 1994. Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 : 1142–1148.
- Montal M., Muller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *PNAS USA.* 65 : 3561–3566.
- Muddana H.S., Chiang H.H., Butler P.J. 2012. Tuning membrane phase separation using nonlipid amphiphilicities. *Biophys. J.* 102 : 489–497.
- Nelson O., Tu H., Lei T., Bentahir M., de Strooper B., Bezprozvanny I. 2007. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1. *J. Clin. Invest.* 117 : 1230–1239.
- Ostroumova O.S., Efimova S.S., Mikhailova E.V., Schagina L.V. 2014. The interaction of dipole modifiers with amphotericin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition. *Eur. Biophys. J.* 43 : 207–215.
- Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. 2012a. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. *PLoS One.* 7: e30261. doi 10.1371/journal.pone.0030261
- Ostroumova O.S., Efimova S.S., Chulkov E.G., Schagina L.V. 2012b. The interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes. *PLoS One.* 7, e45135. doi 10.1371/journal.pone.0045135
- Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. 2011. 5- and 4'-hydroxylated flavonoids affect voltage gating of single alpha-hemolysin pore. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* 1808 : 2051–2058.
- Ostroumova O.S., Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. 2010. Surfactin activity depends on the membrane dipole potential. *Langmuir.* 26 : 15092–15097.
- Pfefferkorn C.M., Jiang Z., Lee J.C. 2012. Biophysics of α -synuclein membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1818 : 162–171.
- Prangkio P., Yusko E.C., Sept D., Yang J., Mayer M. 2012. Multivariate analyses of amyloid-beta oligomer populations indicate a connection between pore formation and cytotoxicity. *PLoS One.* 7 : e47261. doi 10.1371/journal.pone.0047261
- Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B., Kagan B., Ghiso J., Lal R. 2005. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 10427–10432.
- Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N. 2002. Membrane dipole potential modulates proton conductance through gramicidin channel: movement of negative ionic defects inside the channel. *Biophys. J.* 82 (2) : 865–873.
- Sasahara K., Morigaki K., Shinya K. 2013. Effects of membrane interaction and aggregation of amyloid β -peptide on lipid mobility and membrane domain structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 : 8929–8939.
- Tofoleanu F., Buchete N.V. 2012. Alzheimer A β peptide interactions with lipid membranes: fibrils, oligomers and polymorphic amyloid channels. *Prion.* 6: 339–345.
- Van Rooijen B.D., Claessens M.M.A.E., Subramaniam V. 2010. Membrane permeabilization by oligomeric α -synuclein: in search of the mechanism. *PLoS One.* 5 : e14292. doi 10.1371/journal.pone.0014292
- Zakharov S.D., Hulleman J.D., Dutseva E.A., Antonenko Y.N., Rochet J.C., Cramer W.A. 2007. Helical α -synuclein forms highly conductive ion channels. *Biochem.* 46 : 14369–14379.

MECHANISMS OF POLYPHENOL REGULATION OF AMYLOID-INDUCED PERMEABILITY OF PLANAR LIPID MEMBRANE

S. S. Efimova^{a,*} and O. S. Ostroumova^a

^aInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg 194064, Russia

*E-mail: efimova@incras.ru

The work is devoted to the study of the processes of formation and functioning of ion channels induced by amyloidogenic peptides. The effect of plant polyphenols, phloretin, butein, resveratrol, isoliquiritigenin, 4'-hydroxychalcone and cardamonin, on the pore-forming activity of fragment 25–35 of amyloid β -peptide (A β_{25-35}) in the palmitooleoylphosphocholine bilayers was studied. It has been shown that an addition of phloretin, butein or isoliquiritigenin in the membrane-bathing solution up to 20 μ M led to significant increase in the macroscopic transmembrane current induced by the peptide. Cardamonin, 4'-hydroxychalcone and resveratrol, did not affect the membrane activity of the A β_{25-35} . A comparison of the effects of polyphenols on the electrical and elastical properties of the mem-

branes and on the pore-forming ability of the A β ₂₅₋₃₅ demonstrated that the observed effects is not related to the changes in the physical parameters of lipid bilayers. The results obtained using confocal fluorescence microscopy indicated the role of the domain structure of the lipid bilayer in the membrane activity of amyloidogenic peptides. The results of electrophysiological measurements with α -synuclein, another protein that forms ion-permeable β -sheets structures in lipid bilayers, do not contradict the assumption that polyphenols hydroxylated in the 7-position of A-cycle and 4'-position of B-cycle with open propane fragments between the rings specifically interacts with the β -structures of amyloid proteins and peptides.

Keywords: fragment 25–35 of β -amyloid peptide, ion channels, butein, phloretin, resveratrol, lipid bilayers, liposomes, permeability, lipid phase separation