

УДК 577.352.26

МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ СЛИЯНИЯ ЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ ЭКСТРАКТАМИ ЧАГИ И ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ

© 2022 г. С. С. Ефимова^а, *, П. Д. Злодеева^а, Е. В. Шекунов^а, О. С. Остроумова^а

^аИнститут цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*e-mail: efimova@incras.ru

Поступила в редакцию 16.04.2022 г.

После доработки 01.06.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

В работе оценена способность экстрактов семян грейпфрута (ЭСГ), листьев облепихи (ЭЛО) и чаги (ЭЧ) ингибировать слияние мембран. Установлено, что ЭЛО и ЭЧ подавляют слияние фосфатидил-глицерин-обогащенных липидных везикул под действием кальция: индекс ингибирования составляет около 90 и 100% соответственно. ЭСГ не характеризуется способностью ингибировать слияние отрицательно заряженных липосом, индуцированное введением кальция. Помимо кальций-опосредованного слияния липосом ЭЧ ингибирует и слияние везикул из смеси фосфатидилхолина и холестерина под действием полиэтиленгликоля с молекулярной массой 8000 Да (индекс ингибирования равен 80%). Два других экстракта на полимер-индуцированное слияние незаряженных мембран не действуют. Проведена оценка влияния на слияние везикул некоторых мажорных компонентов тестируемых экстрактов. Показано, что флавонолы кверцетин и мирицетин, являющиеся мажорными компонентами ЭЛО, ингибируют слияние отрицательно заряженных мембран под действием кальция (индекс ингибирования составляет около 85 и 60% соответственно). Другой флавонол ЭЛО, гликозид кверцетина рутин, такого действия не оказывает. Полученные данные позволяют связывать подавление ЭЛО кальций-индуцированного слияния липидных везикул с наличием в его составе кверцетина и мирицетина. Эти флавонолы практически не влияют на полиэтиленгликоль-индуцированное слияние везикул, что согласуется с отсутствием действия ЭЛО на слияние липосом под действием полимера. Пр продемонстрирована способность кверцетина и мирицетина уменьшать температуру плавления фосфатидилглицерина с насыщенными углеводородными цепями и увеличивать полуширину соответствующего плаванию пика. Наблюдаемая корреляция между параметрами, характеризующими термотропное поведение липида в присутствии кверцетина и мирицетина, и индексом ингибирования этими соединениями кальций-опосредованного слияния липосом может указывать на взаимосвязь между способностью флавонолов влиять на упаковку мембранных липидов и подавлять слияние везикул. Пентациклические тритерпеноиды бетулин и люпеол, входящие в состав ЭЧ, не подавляют слияние везикул под действием как кальция, так и полиэтиленгликоля, и их присутствие в составе ЭЧ не может быть ответственно за антифюзогенную активность ЭЧ.

Ключевые слова: природные экстракты, ингибиторы слияния мембран, липосомы, флавонолы, сапонины

DOI: 10.31857/S0233475522050048

ВВЕДЕНИЕ

Природные экстракты широко используются в медицине как самостоятельные лекарственные препараты, так и в комбинации с другими биологически активными соединениями. Кроме того, экстракты активно используют в составе косметических средств, поскольку они оказывают выраженный

ный противовоспалительный и антимикробный эффекты.

Литературные данные указывают на высокую противовирусную активность экстракта семян грейпфрута (ЭСГ). Установлено, что ЭСГ имеет значительный потенциал применения в птицеводстве в качестве дезинфектанта, поскольку существенно снижает титр вирусов, вызывающих инфекционные заболевания у домашних птиц, в частности, птичьего гриппа и болезни Ньюкасла [1]. Результаты недавно опубликованных работ показали, что коммерчески доступный назальный спрей, содержащий экстракт семян грейпфрута (ЭСГ), может быть использован в качестве

Принятые сокращения: ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ДОФГ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин), ХОЛ – холестерин, ДПФГ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин), ПЭГ-8000 – полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000 Да, ЭСГ – экстракт семян грейпфрута, ЭЛО – экстракт листьев облепихи, ЭЧ – экстракт чаги.

дополнительной терапии COVID-19 легкой и средней степени тяжести [2].

Известно, что облепиха проявляет противовирусные свойства в отношении вируса денге [3, 4]. Так, экстракт листьев облепихи (ЭЛО) оказался столь же эффективен в поддержании жизнеспособности клеток, инфицированных вирусом денге, как и известный противовирусный препарат рибавирин [5]. Показано, что ЭЛО также проявляет сравнимую с осельтамивиром активность против вирусов гриппа А и Б [6].

В последнее время широко обсуждается противовирусная активность березового гриба или чаги, в том числе в отношении SARS-CoV-2 [7, 8]. Результаты проведения молекулярного докинга показали, что компоненты экстракта чаги (ЭЧ) (бета-глюкан, галактоманнан и бетулиновая кислота) связываются с С-концевым фрагментом рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2 [9]. ЭЧ также ингибирует слияние вируса простого герпеса 1 типа с клеточной мембраной [10]. Обнаружено, что ЭЧ проявляет противовирусную активность в отношении большого числа вирусов, вызывающих заболевания у кошек: калицивируса, герпеса 1 типа, гриппа H3N2 и H5N6, панлейкопении, инфекционного перитонита и иммунодефицита [11, 12]. Исследование механизма противовирусного действия ЭЧ в отношении кошачьего калицивируса показало, что ингибирующее действие экстракта связано с блокированием связывания/абсорбции вируса [11]. Протестирована активность ЭЧ и против вируса иммунодефицита человека [13].

Очевидно, что противовирусная активность природных экстрактов должна быть обусловлена их специфическим химическим составом. Известно, что в состав ЭСГ в большом количестве входят гликозиды флавононов: нарингин, гесперидин и нарирутин [14]. Нарингин и нарирутин являются гликозидами нарингенина, а гесперидин — гликозидом близкого аналога нарингенина, гесперетина. Анализ литературных данных показывает, что ЭЛО богаты флавонолами: кверцетином, мирицетином и кемпферолом, а также различными гликозидами кверцетина, в частности, рутином (кверцетин-3-рутинозидом) [15–17]. К настоящему моменту в составе ЭЧ идентифицировано около сорока ланостановых тритерпеноидов, прежде всего, ланостерин и его производное, инотодиол. В несколько раз меньших концентрациях, чем тетрациклические тритерпеноиды, в составе чаги обнаруживаются пентациклические тритерпеноиды, такие как, бетулин и люпеол, а также другие стеринны, в частности, эргостерин [18].

В работе проведена оценка способности ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ ингибировать слияние отрицательно заряженных и незаряженных липидных везикул под действием кальция и высокомолекулярного

полиэтиленгликоля соответственно. Определена роль некоторых компонентов экстрактов в ингибировании слияния липосом, а также установлено, модуляция каких физико-химических свойств бислоя ответственна за ингибирование слияния мембран компонентами экстрактов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие реактивы: хлорид натрия (NaCl), HEPES, NaOH, этанол, диметилсульфоксид (ДМСО), тритон X-100, сефадекс G-50, кальцеин, сорбитол, хлорид кальция (CaCl_2), полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000 Да (ПЭГ-8000), кверцетин, мирицетин, рутин, бетулин, люпеол, 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин) (ДОФГ), холестерин (ХОЛ), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин) (ДПФГ) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиссамин родамин) производства фирмы Sigma (США).

Экстракт семян грейпфрута (ЭСГ), экстракт листьев облепихи (ЭЛО) и экстракт чаги (ЭЧ) предоставлены ЗАО “Эвалар”. Тестирование проводилось для трех образцов каждого экстракта, представляющих собой независимые серии экстрагирования.

Исследование способности тестируемых экстрактов и их компонентов ингибировать слияние липидных везикул, опосредованное различными индукторами. Одноламеллярные липидные везикулы из смесей ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %), нагруженные флуоресцентным маркером кальцеином, формировали с помощью мини-экструдера производства Avanti Polar Lipids (США). Исходный раствор липидов в хлороформе помещали в вials, после чего растворитель удаляли потоком азота. Полученную липидную пленку гидратировали буфером (35 mM кальцеина, 10 mM HEPES-NaOH, 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 геле-фильтрацией на колонке, заполненной сефадексом G-50. В качестве элюента использовали свободный от кальцеина буфер (150 mM NaCl, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4). Кальцеин внутри липосом в концентрации 35 mM испытывал самотушение. Для индукции слияния ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ и ДОФХ/ХОЛ липосом использовали кальций (40 mM CaCl_2) и полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000 Да (ПЭГ-8000 в концентрации 20 вес. %) соответственно [19–22].

Образцы экстрактов из исходных растворов в воде или ДМСО вводили в суспензию липосом до концентрации 100 мкг/мл.

Интенсивность свечения кальцеина, вытекающего в окружающий липидные везикулы раствор при их слиянии, измеряли с помощью спектрофлуориметра Флюорат Панорама-02 (при длине волны возбуждения 490 нм, эмиссии 520 нм). В конце каждого эксперимента в раствор вводили тритон X-100. При концентрации 10 мМ этот детергент разрушает все липосомы в суспензии, высвобождая захваченный везикулами маркер.

Индекс ингибирования слияния липидных везикул (*ИИ*) тестируемыми экстрактами рассчитывали как:

$$ИИ = \frac{RF_{Ind} - RF_{Inh}}{RF_{Ind}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где RF_{Ind} и RF_{Inh} представляют собой среднюю максимальную утечку флуоресцентного маркера из везикул, индуцированную введением хлорида кальция или ПЭГ-8000 в отсутствие и в присутствии тестируемого экстракта соответственно.

Величины утечки RF (%) (RF_{Ind} и RF_{Inh}) определяли по формуле:

$$RF = \frac{I_i - I_0}{1.1 I_{max} - I_0} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где I_i и I_0 — интенсивности флуоресценции раствора в присутствии и отсутствие тестируемого экстракта, I_{max} — интенсивность флуоресценции раствора после добавки тритона X-100 (множитель 1.1 введен для учета разбавления образца водным раствором детергента). Оценка RF_{Inh} выполнена с учетом возможного собственного влияния экстрактов на проницаемость липосом для маркера (утечки кальцеина вследствие разупорядочения липидов под действием экстрактов).

Кинетику высвобождения маркера под действием индукторов слияния до и после введения тестируемых экстрактов характеризовали временем удвоения относительной флуоресценции в e раз.

Для каждого вида экстракта было выполнено девять независимых повторений с образцами из трех различных партий. Параметры, характеризующие действие отдельных компонентов экстрактов на слияние мембран, определены путем вычисления среднего арифметического величин, полученных в 2–3 независимых экспериментах.

Чтобы доказать статистическую значимость обнаруженных различий средних величин RF до и после введения экстрактов или их компонентов, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни–Уилкоксона (* $p \leq 0.01$).

Конфокальная флуоресцентная микроскопия гигантских липосом. Визуализацию изменений в поведении везикул до и после введения в суспензию

ПЭГ-8000 и экстракта чаги проводили с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии. Гигантские однослойные везикулы готовили из смеси ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и 1 мол. % флуоресцентного липидного зонда 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамина) методом электроформации (стандартный протокол, 3 В, 10 Гц, 1 ч, 25°C) с использованием коммерчески доступного прибора Nanion vesicle prep pro (Германия). Полученная суспензия липосом содержала 0.5 мМ липида в 1 М растворе сорбитола. Для индукции слияния везикул в суспензию вводили ПЭГ-8000 до концентрации 10 вес. % и инкубировали в течение 5–10 мин при комнатной температуре ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). В экспериментальные образцы последовательно вводили 35 мкг/мл ЭЧ и 10 вес. % ПЭГ-8000 с инкубацией на каждом этапе 10 мин. Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив $100.0 \times /1.4$ HCX PL в Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Аро (Leica Microsystems, Германия). Наблюдение препаратов проводили при температуре 25°C. Свечение 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамина) возбуждали светом с длиной волны 543 нм (гелий-неоновый лазер).

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия липидных везикул, модифицированных компонентами экстрактов. Гигантские одноламеллярные липосомы формировали из ДПФГ методом электроформации с помощью прибора Nanion vesicle prep pro (Германия). На стекла подавали переменное напряжение с амплитудой 3 В и частотой 10 Гц в течение 1 ч при температуре 55°C. Концентрация липида составляла 3 мМ. В экспериментальные образцы вводили кверцетин, мирисетин и рутин до достижения соотношения липид : флавонол, равного 10 : 1. Термограммы липосомальных 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°C/мин. Пики на термограммах характеризовали максимальной температурой основного фазового перехода (T_m) ДПФГ и шириной основного пика на полувысоте ($T_{1/2}$). Изменение указанных параметров позволяет судить о влиянии флавонолов на плотность упаковки мембранных липидов.

Параметры, характеризующие действие флавонолов на термотропное поведение липидов, определены путем вычисления среднего арифметического величин, полученных для 2 независимых серий приготовления липосом.

Величины RF , t , $ИИ$, ΔT_m , и $\Delta T_{1/2}$ представлены в виде среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (среднее $\pm$ SE).

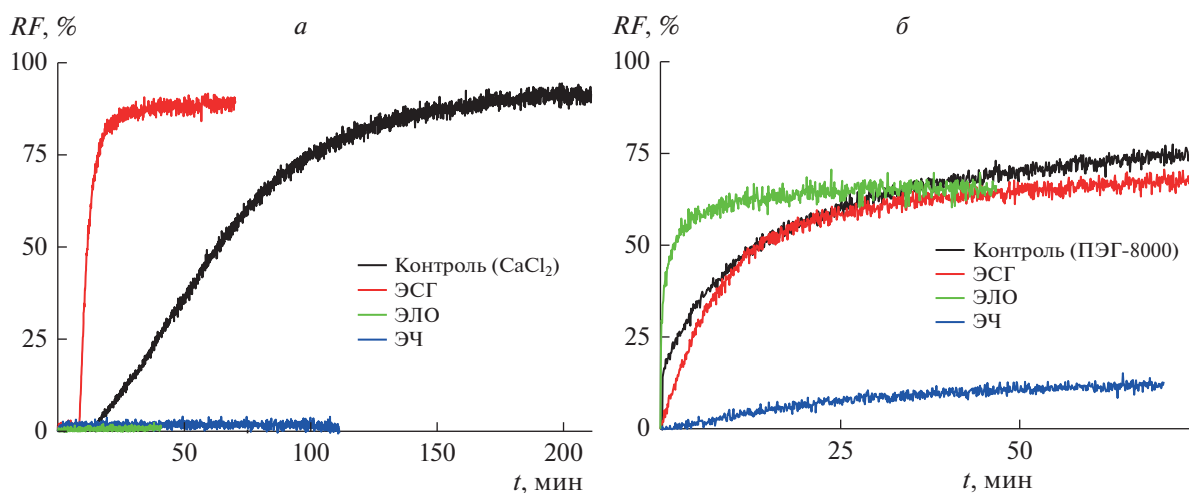


Рис. 1. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции кальцеина (RF , %), вытекшего при (а) кальций-опосредованном слиянии ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) липосом или (б) ПЭГ-8000-индуцированном слиянии ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) везикул в отсутствие (контроль, черная линия) или после инкубации с 100 мкг/мл ЭСГ (красная линия), ЭЛО (зеленая линия) и ЭЧ (синяя линия), от времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1а представлены временные зависимости относительной интенсивности флуоресценции кальцеина (RF , %), вытекающего из ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) липосом при слиянии везикул, индуцированном введением в суспензию 40 мМ CaCl_2 до и после инкубации с ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ при концентрации 100 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре. В табл. 1 приведены средние значения максимальной утечки кальцеина (RF) при слиянии ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ везикул под действием кальция в отсутствие и в присутствии различных экстрактов. Средняя максимальная утечка флуорофора

при слиянии немодифицированных экстрактами липидных везикул при введении хлорида кальция составляет около 90%. Снижение или рост этой величины указывает на ингибирование или активацию кальций-опосредованного слияния отрицательно заряженных везикул в присутствии соответствующего экстракта. Из рис. 1а и табл. 1 видно, что ЭЛО и ЭЧ существенно подавляют слияние ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ везикул, вызванное введением в суспензию хлорида кальция: соответствующие величины RF составляют 8 и 2% соответственно. Для сравнения антифюзогенной активности экстрактов на основании значений RF в соответствии с формулой (1) были рассчитаны их индексы ингибирования ($ИИ$) (табл. 1). $ИИ$ ЭЛО

Таблица 1. Параметры, характеризующие влияние экстрактов в концентрации 100 мкг/мл на утечку кальцеина при слиянии везикул, сформированных из смеси ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) или ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), при введении 40 мМ CaCl_2 или 20 вес. % ПЭГ-8000 соответственно

Экстракт	RF , %	t , мин	$ИИ$, %	RF , %	t , мин	$ИИ$, %
	CaCl_2			ПЭГ-8000		
—	90 ± 6	61 ± 6	—	75 ± 5	46 ± 8	—
ЭСГ	92 ± 5	9 ± 5	-3 ± 2	73 ± 6	33 ± 5	-10 ± 5
ЭЛО	$8 \pm 3^*$	— [#]	90 ± 3	72 ± 7	4 ± 2	-8 ± 9
ЭЧ	$2 \pm 1^*$	— [#]	97 ± 3	$13 \pm 5^*$	— [#]	79 ± 3

Примечание. RF — максимальная утечка флуоресцентного маркера при слиянии липосом, сформированных из смеси ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) и ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), при добавлении в суспензию 40 мМ CaCl_2 или 20 вес. % ПЭГ-8000 в отсутствие (—) и в присутствии тестируемых экстрактов в концентрации 100 мкг/мл; t — константа времени, характеризующая кинетику высвобождения маркера при слиянии везикул (зависимость вытекания маркера от времени аппроксимирована одноэкспоненциальной функцией); $ИИ$ — индекс ингибирования экстрактами кальций- и ПЭГ-8000-опосредованного слияния липидных везикул различного состава.

[#] Оценка не проведена ввиду малости величины RF , %.

* $p \leq 0.01$ (критерий Манна–Уитни–Уилкоксона, сравнение кальций- или ПЭГ-8000-индуцированной утечки красителя из везикул в отсутствие и в присутствии экстрактов).

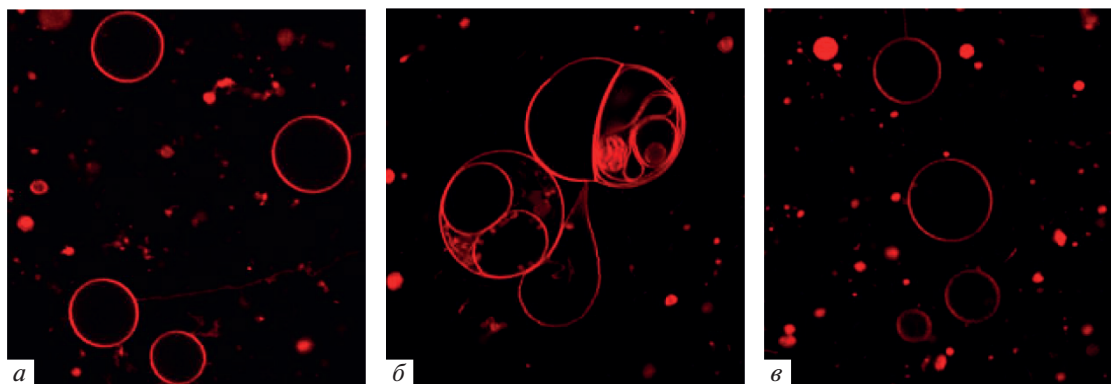


Рис. 2. Примеры флуоресцентных микрофотографий гигантских везикул, сформированных из смеси ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и 1 мол. % флуоресцентного липидного зонда, дипальмитоилфосфатидилэтаноламина-N-(лиссамина родамин В сульфонила), в отсутствие каких-либо агентов (а), в присутствии 10% ПЭГ-8000 (б) и после введения 10 вес. % ПЭГ-8000 в суспензию липосом, предварительно обработанных 35 мкг/мл ЭЧ (в). Размер каждой микрофотографии составляет 65 × 65 мкм.

составляет около 90%, а в случае ЭЧ достигает практически 100% (табл. 1). ЭСГ способностью ингибировать кальций-опосредованное слияние отрицательно заряженных липосом не характеризуется (рис. 1а и табл. 1).

На рис. 1б представлены временные зависимости относительной интенсивности флуоресценции кальцеина (*RF*, %), вытекающего при слиянии ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) везикул после введения 20 вес. % ПЭГ-8000 до и после инкубации с 100 мкг/мл ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ. Средняя максимальная утечка при слиянии немодифицированных экстрактами липосом при введении ПЭГ-8000 в отсутствие экстрактов составляет 75% (табл. 1). Из рис. 1б и табл. 1 видно, что ЭСГ и ЭЛО не способны подавлять ПЭГ-индуцированное слияние незаряженных везикул: соответствующие величины *RF* (79 и 72% соответственно) близки к контрольному значению. При этом как и в случае кальций-индуцированного слияния отрицательно заряженных липосом, ЭЧ подавляет слияние незаряженных везикул под действием ПЭГ-8000: *RF* составляет около 10%, а *ИИ* превышает 70% (табл. 1).

В табл. 1 также представлены характеристические времена высвобождения маркера при слиянии липосом в отсутствие и в присутствии экстрактов. Из представленных данных видно, что константа времени, характеризующая кинетику высвобождения маркера при слиянии ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) и ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) везикул под действием кальция и ПЭГ, составляет около 60 и 50 мин соответственно. Обращает на себя внимание ускорение кинетики слияния ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) везикул под действием кальция в присутствии ЭСГ и ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) липосом под действием ПЭГ-8000 в присутствии ЭЛО в несколько раз. Эти различия можно объяснить ускорением ад-

сорбции соответствующих индукторов слияния на мембранах, модифицированных тестируемыми экстрактами.

Для визуализации слияния везикул под действием ПЭГ-8000 и его ингибирования ЭЧ была проведена конфокальная флуоресцентная микроскопия гигантских однослойных везикул, сформированных из смеси ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %). На рис. 2 представлены флуоресцентные микрофотографии ДОФХ/ХОЛ липосом в отсутствие каких-либо агентов (рис. 2а), в присутствии 10 вес. % ПЭГ-8000 (рис. 2б) и после введения 10 вес. % ПЭГ-8000 к липосомам, предварительно модифицированным 35 мкг/мл ЭЧ (рис. 2в). ПЭГ-8000 вызывает увеличение размера липосом, их деформацию и индуцирует образование многослойных и мультивезикулярных везикул (рис. 2б), что указывает на высокую эффективность слияния липидных везикул под действием полимера. При этом из рис. 2в видно, что ПЭГ-8000 не оказывает подобного эффекта на обработанные ЭЧ липидные везикулы: вероятность появления мультислойных структур мала, в суспензии в большом количестве обнаруживаются одиночные одноламеллярные везикулы. Эти данные подтверждают вывод о подавлении ЭЧ слияния везикул под действием ПЭГ-8000.

Для выяснения механизмов ингибирования кальций- и ПЭГ-индуцированного слияния везикул ЭЛО и ЭЧ нами проведена оценка влияния на этот процесс некоторых мажорных компонентов экстрактов: флавонолов, входящих в состав ЭЛО, кверцетина, рутина и мирицетина, а также пентациклических тритерпеноидов, обнаруживаемых в составе ЭЧ, бетулина и люпеола. Химические структуры перечисленных соединений представлены на рис. 3.

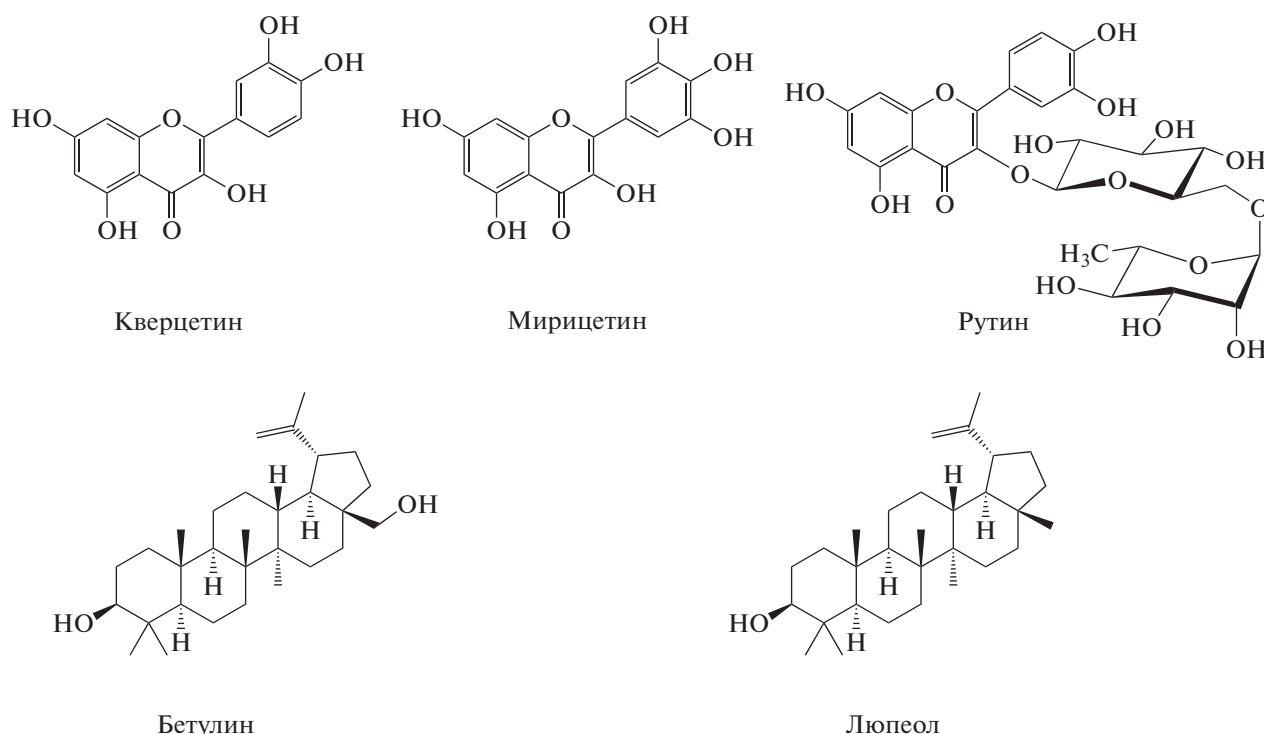


Рис. 3. Химическая структура некоторых компонентов ЭЛО и ЭЧ: кверцетина, мирицетина, рутина, бетулина и люпеола.

Рисунок 4 и табл. 2 суммируют данные, полученные при исследовании антифюзогенной активности тестируемых компонентов ЭЛО и ЭЧ. Из рис. 4а и табл. 2 видно, что флавонолы ЭЛО, кверцетин и мирицетин, ингибируют слияние отрицательно заряженных мембран под действием кальция (ИИ составляет около 85 и 60% соответственно), другой компонент ЭЛО, гликозид кверцетина, рутин, таким эффектом не характеризуется. Таким образом, подавление кальций-индуцированного слияния липидных везикул под действием ЭЛО можно связывать с наличием в его составе кверцетина и мирицетина. Неспособность флавонолов ингибировать слияние незаряженных липосом под действием ПЭГ-8000 (рис. 4б и табл. 2) хорошо согласуется с отсутствием влияния ЭЛО на этот процесс (табл. 1).

Для понимания взаимосвязи между влиянием компонентов ЭЛО на слияние отрицательно заряженных липосом, обогащенных фосфатидилглицерином, и их способностью модифицировать физические свойства фосфатидилглицерин-содержащих мембран было изучено термотропное поведение ДПФГ до и после введения в липосомальную суспензию кверцетина, мирицетина и рутина. В отсутствие флавонолов температура главного фазового перехода ДПФГ, T_m , составляет 41.3°C, ширина пика на полувысоте, $T_{1/2}$, равна 0.6°C (рис. 5). Основные параметры, характеризующие плавление

ДПФГ в присутствии флавонолов, представлены в табл. 2. Кверцетин и мирицетин при соотношении липид : флавонол 10 : 1 вызывают падение T_m на 1.2 и 1.1°C соответственно. При этом кверцетин увеличивает $T_{1/2}$ на 0.8°C, а мирицетин — на 0.6°C (табл. 2). Введение рутина в такой же концентрации не сопровождается изменением термотропного поведения ДПФГ (табл. 2). Наблюдаемая корреляция между параметрами, характеризующими плавление ДПФГ в присутствии флавонолов, и их антифюзогенной активностью в отношении кальций-индуцированного слияния фосфатидилглицерин-содержащих везикул (табл. 2) указывает на взаимосвязь между их способностью влиять на плотность упаковки мембранообразующих липидов и ингибировать слияние липосом. Аналогичное заключение было сделано нами при сопоставлении влияния алкалоидов на кальций-опосредованное слияние везикул и термотропное поведение липидов [23].

Ранее нами показано, что кверцетин и мирицетин оказывают менее выраженное действие на термотропное поведение дипальмитоилфосфолина (ДПФХ), чем ДПФГ: при соотношении ДПФХ : флавонол 10 : 1 кверцетин и мирицетин вызывают падение T_m на 0.3°C и рост $T_{1/2}$ на 0.7 и 0.2°C соответственно [24]. Как и в случае ДПФГ, рутин не оказывает влияния на плавление ДПФХ [24]. С учетом данных о значительном по-

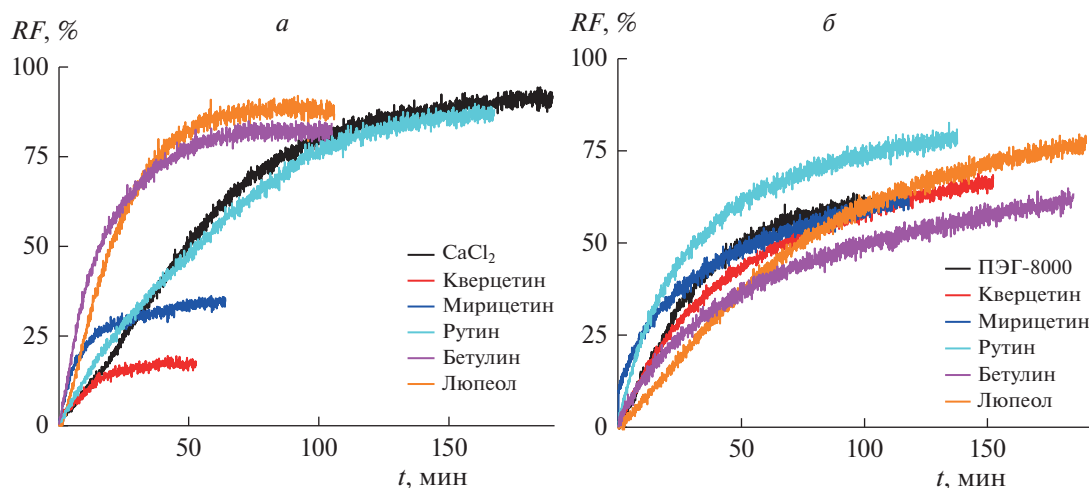


Рис. 4. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (RF , %) кальцеина, вытекшего при (а) кальций-опосредованном слиянии ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) липосом или (б) ПЭГ-8000-индуцированном слиянии ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) везикул в отсутствие (контроль, черная линия) и после инкубации с 20 мкМ флавонолов (кверцетина (красная линия), мирицетина (синяя линия) и рутина (циановая линия)) или 10 мкМ пентациклических тритерпеноидов (бетулина (фиолетовая линия) и люпеола (оранжевая линия)).

давлении кальций-опосредованного слияния фосфатидилглицерин-содержащих везикул в присутствии кверцетина и мирицетина и отсутствием ингибирующей способности этих флавонолов в отношении ПЭГ-8000-индуцированного слияния фосфатидилхолин-обогащенных везикул (табл. 2), выраженное действие кверцетина и мирицетина на плавление ДПФГ (табл. 2) и снижение эффектов в случае ДПФХ [24] позволяют полагать, что антифюзогенная активность этих флавонолов обусловлена их способностью разупорядочивать мембраны из фосфатидилглицеринов. При этом менее выраженное влияние кверцетина и мирицетина на

плотность упаковки бислоев из фосфатидилхолинов приводит к неспособности флавонолов подавлять слияние фосфатидилхолин-обогащенных везикул.

На рис. 4 видно, что пентациклические тритерпеноиды, входящие в состав ЭЧ, бетулин и люпеол, практически не подавляют слияния ни отрицательно заряженных везикул под действием кальция (рис. 4а), ни незаряженных липосом в присутствии ПЭГ-8000 (рис. 4б). Таким образом, ввиду невыраженной антифюзогенной активности этих тритерпеноидов в обеих системах (табл. 2), бетулин и люпеол не могут быть компонентами,

Таблица 2. Параметры, характеризующие влияние компонентов тестируемых экстрактов, на утечку кальцеина при слиянии везикул, сформированных из смеси ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) или ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), под действием 40 мМ CaCl_2 или 20 вес. % ПЭГ-8000 соответственно

Компонент, мкМ	RF , %	$ИИ$, %	RF , %	$ИИ$, %	$-\Delta T_m$, °C	$\Delta T_{1/2}$, °C
	CaCl_2		ПЭГ-8000		ДПФГ	
—	90 ± 6	—	75 ± 5	—	—	—
Кверцетин, 20	$9 \pm 1^*$	85 ± 2	77 ± 11	-2 ± 5	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Мирицетин, 20	$31 \pm 3^*$	58 ± 4	76 ± 12	3 ± 10	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Рутин, 20	88 ± 1	-5 ± 2	80 ± 3	-7 ± 6	0	0
Бетулин, 10	90 ± 2	1 ± 1	67 ± 5	11 ± 2	0.1 ± 0.1^a	0.1 ± 0.1^a
Люпеол, 10	82 ± 9	7 ± 8	70 ± 4	8 ± 2	0.1 ± 0.1^a	0.2 ± 0.1^a

Примечание. ^a согласно [25]; RF — максимальная утечка флуоресцентного маркера при слиянии липосом; $ИИ$ — индекс ингибирования мажорными компонентами тестируемых экстрактов кальций- и ПЭГ-8000-опосредованного слияния везикул; ΔT_m , $\Delta T_{1/2}$ — изменение температуры и полуширины пика главного фазового перехода ДПФГ (соотношение липид : флавонол и липид : тритерпеноид составляет 10 : 1 и 50 : 1, соответственно).

* $p \leq 0.01$ (критерий Манна–Уитни–Уилкоксона, сравнение кальций- или ПЭГ-8000-индуцированной утечки красителя из везикул в отсутствие и в присутствии компонентов экстрактов).

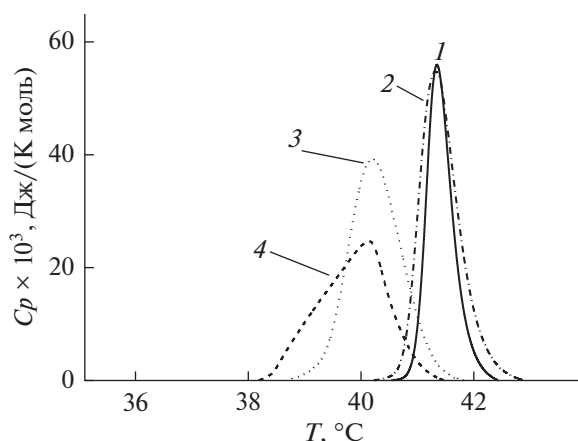


Рис. 5. Термограммы плавления ДПФГ ($C_p(T)$) в отсутствие (1) и в присутствии рутина (2), мирицетина (3) и кверцетина (4). Соотношение липид : флавонол составляет 10 : 1.

ответственными за подавление ЭЧ слияния везикул под действием как кальция, так и ПЭГ-8000 (табл. 1). Следует отметить, что тестируемые три-терпеноиды характеризуются невыраженным действием на термотропное поведение ДПФГ (T_m уменьшается менее чем на 0.3°C , а $T_{1/2}$ увеличивается на 0.1°C (табл. 2)) и ДПФХ [25]. Это хорошо согласуется с предположением о связи разупорядочивающей способности тестируемых соединений с их антифюзогенной активностью: слабое влияние бетулина и люпеола на плавление ДПФГ (табл. 2) и ДПФХ [25] выражается в неспособности этих тритерпеноидов ингибировать слияние фосфатидилглицерин- и фосфатидилхолин-обогатщенных везикул (табл. 2).

Маловероятно, что антифюзогенная способность ЭЧ обусловлена присутствием в его составе стерин, поскольку они известны своей способностью увеличивать отрицательную спонтанную кривизну липидных монослоев при адсорбции [26] и тем самым могут скорее индуцировать слияние мембран. Наличие гидроксильной группы в боковой цепи гидрофильного производного ланостерина, инотодиола, может препятствовать его погружению в углеводородный осто́в бислоя и изменять трансмембранный профиль латерального давления таким образом, чтобы увеличивать энергию образования промежуточных интермедиатов слияния и подавлять процесс объединения мембран. Ингибирование экстрактом чаги слияния незаряженных липидных везикул может указывать на противовирусное действие этого экстракта.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ЗАО “Эвалар”. Исследования влияния флавонолов на сли-

яние мембран и термотропное поведение липидов выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00417).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Komura M., Suzuki M., Sangsritatanakul N., Ito M., Takahashi S., Alam M.S., Ono M., Daio C., Shoham D., Takehara K. 2019. Inhibitory effect of grapefruit seed extract (GSE) on avian pathogens. *J. Vet. Med. Sci.* **81**, 466–472.
2. Go C.C., Pandav K., Sanchez-Gonzalez M.A., Ferrer G. 2020. Potential role of xylitol plus grapefruit seed extract nasal spray solution in COVID-19: Case series. *Cureus*. **12**, e11315.
3. Monika J.A., Sudipta C., Malleswara R.E., Lilly G. 2016. Effect of hippophae rhamnoides leaf extract against dengue virus infection in U937 cells. *Virol.-Mycol.* **5**, 157.
4. Singh P.K., Rawat P. 2017. Evolving herbal formulations in management of dengue fever. *J. Ayurveda Integr. Med.* **8**, 207–210.
5. Jain M., Ganju L., Katiyal A., Padwad Y., Mishra K.P., Chanda S., Karan D., Yogendra K.M.S., Sawhney R.C. 2008. Effect of *Hippophae rhamnoides* leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. *Phytomedicine*. **15**, 793–799.
6. Enkhtaivan G., Maria John K.M., Pandurangan M., Hur J.H., Leutou A.S., Kim D.H. 2017. Extreme effects of Seabuckthorn extracts on influenza viruses and human cancer cells and correlation between flavonol glycosides and biological activities of extracts. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 1646–1656.
7. Shahzad F., Anderson D., Najafzadeh M. 2020. The antiviral, anti-inflammatory effects of natural medicinal herbs and mushrooms and SARS-CoV-2 infection. *Nutrients*. **12**, 2573.
8. Arunachalam K., Sasidharan S., Yang X. 2022. A concise review of mushrooms antiviral and immunomodulatory properties that may combat against COVID-19. *Food Chem. Advances*. **1**, 100023.
9. Eid J.I., Das B., Al-Tuwaijri M.M., Basal W.T. 2021. Targeting SARS-CoV-2 with Chaga mushroom: An in silico study toward developing a natural antiviral compound. *Food. Sci. Nutr.* **9**, 6513–6523.
10. Pan H.H., Yu X.T., Li T., Wu H.L., Jiao C.W., Cai M.H., Li X.M., Xie Y.Z., Wang Y., Peng T. 2013. Aqueous extract from a Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher Basidiomycetes), prevents herpes simplex virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion. *Int. J. Med. Mushrooms*. **15**, 29–38.
11. Tian J., Hu X., Liu D., Wu H., Qu L. 2017. Identification of *Inonotus obliquus* polysaccharide with broad-spectrum antiviral activity against multi-feline viruses. *Int. J. Biol. Macromol.* **95**, 160–167.
12. Seetaha S., Ratanabunying S., Tabtimmai L., Choowongkorn K., Rattanasrisomporn J., Choengpanya K. 2020. Anti-feline immunodeficiency virus reverse transcriptase properties of some medicinal and edible mushrooms. *Vet. World*. **13**, 1798–1806.

13. Choengpanya K., Ratanabunyong S., Seetaha S., Tabtimmai L., Choowongkamon K. 2021. Anti-HIV-1 reverse transcriptase property of some edible mushrooms in Asia. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 2807–2815.
14. Avula B., Sagi S., Wang Y.H., Wang M., Gafner S., Manthey J.A., Khan I.A. 2016. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of limonoids and flavonoids in seeds of grapefruits, other citrus species, and dietary supplements. *Planta Med.* **82**, 1058–1069.
15. Yogendra Kumar M.S., Tirpude R.J., Maheshwari D.T., Bansal A., Misra K. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves in vitro. *Food Chem.* **141**, 3443–3450.
16. Pop R.M., Socaciu C., Pintea A., Buzoianu A.D., Sanders M.G., Gruppen H., Vincken J.-P. 2013. UHPLC/PDA-ESI/MS analysis of the main berry and leaf flavonol glycosides from different carpathian *Hippophae rhamnoides* L. varieties. *Phytochem. Anal.* **24**, 484–492.
17. Criste A., Urcan A.C., Bunea A., Pripon Furtuna F.R., Olah N.K., Madden R.H., Corcionivoschi N. 2020. Phytochemical composition and biological activity of berries and leaves from four romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Molecules.* **25**, 1170.
18. Nikitina S.A., Khabibrakhmanova V.R., Sysoeva M.A. 2016. Composition and biological activity of triterpenes and steroids from *Inonotus obliquus* (chaga). *Biochem. (Moscow) Supplement Series B.* **62**, 369–375.
19. Chicka M.C., Hui E., Liu H., Chapman E.R. 2008. Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca^{2+} . *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 827–835.
20. Lai A.L., Millet J.K., Daniel S., Freed J.H., Whitaker G.R. 2017. The SARS-CoV fusion peptide forms an extended bipartite fusion platform that perturbs membrane order in a calcium-dependent manner. *J. Mol. Biol.* **429**, 3875–3892.
21. Yang Q., Guo Y., Li L., Hui S.W. 1997. Effects of lipid headgroup and packing stress on poly(ethylene glycol)-induced phospholipid vesicle aggregation and fusion. *Biophys. J.* **73**, 277–282.
22. Lentz B.R. 2007. PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Europ. Biophys. J.* **36**, 315–326.
23. Shekunov E.V., Efimova S.S., Yudin N.M., Muryleva A.A., Zarubaev V.V., Slita A.V., Ostroumova O.S. 2021. Plant alkaloids inhibit membrane fusion mediated by calcium and fragments of MERS-CoV and SARS-CoV/SARS-CoV-2 fusion peptides. *Biomedicine.* **9**, 1434.
24. Ефимова С.С., Захарова А.А., Чернышова Д.Н., Остроумова О.С. 2022. Особенности действия экстрактов семян грейпфрута, листьев облепихи и чаги на свойства модельных липидных мембран. *Цитология.* В печати.
25. Efimova S.S., Ostroumova O.S. 2021. Is the membrane lipid matrix a key target for action of pharmacologically active plant saponins? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3167.
26. Chlanda P., Mekhedov E., Waters H., Schwartz C.L., Fischer E.R., Ryham R.J., Cohen F.S., Blank P.S., Zimmerberg J. 2016. The hemifusion structure induced by influenza virus haemagglutinin is determined by physical properties of the target membranes. *Nat. Microbiol.* **1**, 16050.

Mechanisms of Inhibition of Lipid Vesicles Fusion by Extracts of Chaga and Buckthorn Leaves

S. S. Efimova^{1,*}, P. D. Zlodeeva¹, E. V. Shekunov¹, O. S. Ostroumova¹

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

*e-mail: efimova@incras.ru

The ability of extracts of grapefruit seeds (ESG), sea buckthorn leaves (ESBL), and chaga (EC) to inhibit membrane fusion was evaluated. It was established that ESBL and EC inhibited the fusion of phosphatidylglycerol-enriched lipid vesicles under the action of calcium: the inhibition index was about 90 and 100%, respectively. ESG did not inhibit the fusion of negatively charged liposomes induced by the introduction of calcium. EC also inhibited the fusion of vesicles made from a mixture of phosphatidylcholine and cholesterol under the action of polyethylene glycol with a molecular weight of 8000 Da (inhibition index was 80%). ESG and ESBL had no effect on the polymer-induced fusion of uncharged liposomes. The effects of some major components of the tested extracts on the fusion of vesicles were also evaluated. It was shown that the major flavonols of ESBL, quercetin and myricetin, inhibited the fusion of negatively charged membranes under the action of calcium (the inhibition index was about 85 and 60%, respectively), while rutin had no effect. The ability of quercetin and myricetin to decrease the melting temperature of phosphatidylglycerol and to increase the half-width of the main peak was demonstrated. The observed correlation between the parameters characterizing the lipid thermotropic behavior in the presence of quercetin and myricetin and their antifusogenic activity may indicate the relationship between the ability of flavonols to influence the lipid packing and to inhibit vesicle fusion. Pentacyclic triterpenoids of EC, betulin and lupeol, did not suppress the fusion of vesicles under the action of either calcium or polyethylene glycol, and their presence in EC could not be responsible for the antifusogenic activity of the extract. The ability of EC to suppress membrane fusion may indicate a possible antiviral activity of these extracts against enveloped viruses.

Keywords: natural extracts, membrane fusion inhibitors, liposomes, flavonols, saponins