

СВОЙСТВА ИОННЫХ КАНАЛОВ В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ АРОМАТИЧЕСКИМ АНТИБИОТИКОМ ЛЕВОРИНОМ A_2

© 2020 г. Т.П. Таги-заде, Х.М. Касумов

Отдел медико-биологических наук Азербайджанской государственной академии физической культуры и спорта, AZ107272, Баку, просп. Фатали Хана Хойского, 98, Азербайджан

E-mail: khalil.gasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2019 г.

После доработки 08.04.2020 г.

Принята к публикации 17.04.2020 г.

Показано, что основные компоненты леворина A с ароматической группировкой – A_0 , A_1 , A_2 , A_3 увеличивают проводимость мембран в ряду: $A_3 > A_2 > A_1 > A_0$, когда находятся с одной стороны мембраны. Все компоненты леворина обладают катионной селективностью. Наиболее изученный в работе леворин A_2 создает в мембранах практически идеальную проницаемость для ионов калия. Потенциал на десятикратный градиент изменения концентрации KCl составляет 56 ± 2 мВ. Модификация мембран при одной и той же концентрации леворина A_2 сначала с одной стороны мембраны, а затем, после установления стационарной проводимости, с другой стороны мембраны показывает, что суммарная проводимость мембран при этом удваивается. Это означает, что с каждой стороны мембраны формируются независимые левориновые проводящие полупоры. Установлено, что при одностороннем введении леворина A_2 к мембранам увеличивается проницаемость мембран для моносахаров и других нейтральных молекул. В присутствии леворина A_2 на мембранах из фосфолипидов с холестерином, эргостерином и стигмастерином обнаружены одиночные ионные каналы с проводимостью 0.2–0.5 пСм и изучены их свойства. Левориновые каналы имеют два основных состояния – открытое и закрытое. В растворе КВг-канал большую долю времени находится в открытом состоянии. В растворах разных солей, но одинаковой молярности, величина проводимости левориновых каналов примерно одинакова 0.4–0.5 пСм. Увеличение концентрации диметилсульфоксида в водном растворе способствует переходу молекул полиеновых антибиотиков из дисперсной в мономолекулярную форму. Молекулы полиеновых антибиотиков, находясь в ассоциированной форме, обладают высокой мембранной активностью.

Ключевые слова: макролидные полиеновые антибиотики, леворин A_2 , липидные мембраны, проницаемость мембран, ионные каналы, диметилсульфоксид.

DOI: 10.31857/S0006302920040110

Исследование молекулярного механизма избирательной проницаемости клеточных мембран для ионов и органических соединений является одной из ключевых проблем биофизики мембранного транспорта. Прогресс, достигнутый в изучении механизма транспорта ионов через липидные мембраны, связан с веществами антибиотической природы. Чтобы подойти к решению молекулярного механизма переноса ионов через мембраны, необходимо знать структуру молекул, образующих независимые системы проницаемости, а также иметь возможность изучить отдельные функциональные группы, определяющие

биологическую активность молекул, с широким варьированием внешних и внутренних параметров. В связи с этим большое внимание уделяется изучению структуры и мембранной активности каналообразующих соединений. В отличие от каналообразующих соединений грамицидина A и аламетицина, полиеновые антибиотики (ПА) являются классическими структурными каналоформерами с известной структурой молекул [1]. ПА представляют собой большую группу природных соединений, продуцируемых микроорганизмами *Streptomyces (Actinomyces)* [2]. Большинство ПА продуцируются грамположительными микроорганизмами [2]. ПА обладают высокой противогрибковой активностью [3, 4]. В основе биологического действия ПА лежит формирование ими в липидных и клеточных мембранах в комплексе

Сокращения: ПА – полиеновые антибиотики БЛМ – бислойные липидные мембраны, ДМСО – диметилсульфоксид.

со стеринами структурных ионных каналов молекулярных размеров с определенной проводимостью [1, 5]. Из всех изученных ПА наибольшей биологической активностью обладают гептаеновые антибиотики амфотерицин В и леворин [1]. Леворин – основной представитель антибиотиков с ароматической группировкой. Леворин продуцируется микроорганизмами *Actinomyces levogis* [6]. В отличие от неароматических антибиотиков амфотерицина В, нистатина и микогептина, антибиотик леворин эффективно действует с одной стороны бислойных липидных мембран (БЛМ) [1]. Несмотря на большое количество публикаций, касающихся механизма взаимодействия ПА с БЛМ, до сих пор остается неясной связь между структурой молекул антибиотиков и свойствами образованных ими каналов. В химической структуре всех ПА имеется макролидное кольцо, содержащее то или иное число сопряженных двойных связей, которые определяют хромофорные свойства данного вещества [6]. Биологическая активность ПА зависит от числа двойных связей в гидрофобной части молекул. Ароматический гептаеновый антибиотик леворин, в отличие от неароматического гептаенового антибиотика амфотерицина В, содержит в своей структуре два атома азота (один входит в состав аминокислоты, второй – в состав N-метил-*n*-аминоацетофенона [6]). Наибольший интерес представляет изучение мембранных свойств леворина как катионного каналоформера. Леворин неоднороден по составу и включает два близких, но не идентичных по своим свойствам ароматических гептаенов – леворин А и леворин В [7, 8]. Леворин А более активен, чем леворин В [8]. Наиболее изученный из них – леворин А – оказался комплексным, как и многие из известных ПА гептаенового ряда: кандицидин, трихомицин, гамидин и другие [8, 9]. Исходный леворин А представляет собой смесь нескольких компонентов – A_0 , A_1 , A_2 , A_3 [8, 9]. Установлена структура основного компонента антибиотического комплекса – леворина A_2 [10] и частичная структура других компонентов [11]. Структурные отличия между компонентами леворина А показаны на рис. 1. Как видно из рис. 1, компоненты леворина отличаются друг от друга расположением и числом карбонильных и гидроксильных групп в структуре их молекул. В отличие от амфотерицина В ароматический антибиотик леворин А увеличивает проницаемость липидных и клеточных мембран для катионов щелочных металлов, когда находится с одной стороны мембраны [1, 12]. Наличие комплексной природы леворина А и известная структура составляющих его компонентов предопределили необходимость их более глубокого сравнительного изучения. К настоящему времени в литературе отсутствуют данные о механизме одностороннего действия леворина А на БЛМ. С

этой целью изучен механизм одностороннего действия компонентов леворина А, изучены свойства ионных каналов при введении леворина A_2 как идеального катионного каналоформера в состав БЛМ с одной стороны мембраны, представлены данные экспериментальных исследований об избирательности при формировании односторонних проводящих каналов и величине проводимости каналов, образуемых леворином A_2 .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бислойные мембраны получали из общих фосфолипидов, выделенных из белого вещества бычьего мозга. Общие фосфолипиды очищали от нейтральных липидов ацетоновой промывкой и хранили при 0°C в хлороформ-метанольном растворе (2 : 1) в концентрации 20 мг/мл. Затем к этим липидам добавляли необходимое количество перекристаллизованного холестерина в соответствующих концентрациях. Мембраны формировали на отверстиях в тефлоновой ячейке диаметром 0.3 мм. В работе были использованы ПА, любезно предоставленные нам проф. В.А. Вайнштейном (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия). Известно, что ПА в воде нерастворимы, лучшим растворителем для них является диметилсульфоксид (ДМСО). ДМСО получают путем окисления диметилсульфида [13], в состав его молекулы входят две метильные группы, соединенные через серу двойной связью с кислородом. Молекуле ДМСО присущи такие свойства как амфифильность, полярность, высокая резорбция и быстрое проникновение в органы и ткани [13]. Мы использовали в работе ДМСО фирмы Sigma-Aldrich (США). Леворин растворяли в ДМСО в концентрации 1–10 мг/мл, полученный раствор затем использовали в качестве маточного и хранили его в течение недели. Из маточного раствора микрошприцом антибиотики вводили в водный раствор, окружающий мембрану. Электрические характеристики БЛМ измеряли с помощью метода фиксации мембранного потенциала и тока, используя электрометрический усилитель постоянного тока Keithley-301 (США) и двухкоординатный самописец Endim (Германия). Число левориновых каналов зависит от концентрации леворина. При образовании БЛМ мембраноформирующие растворы готовили из фосфолипидов с холестерином. В работе были использованы перекристаллизованный холестерин, фосфатидилсерин, эргостерин, стигмастерин, мочевины, ацетамид, глицерин, рибоза, арабиноза, глюкоза, сахароза – все от компании Sigma (США). Для стабилизации рН водных растворов использовали буферные системы в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М.

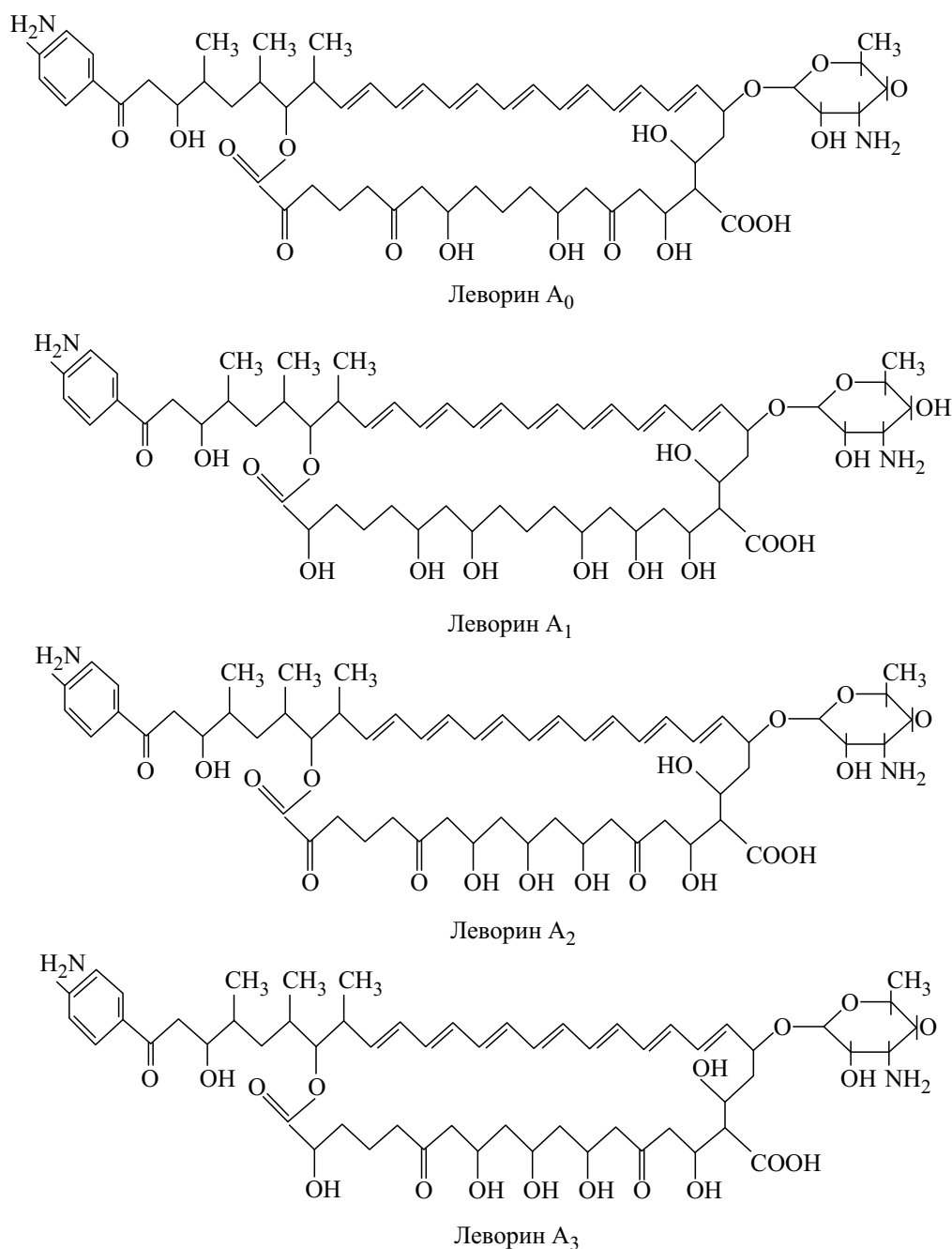


Рис. 1. Химическая структура индивидуальных компонентов леворина А (согласно работе [11]).

Проводимость немодифицированной мембраны составляла 2–3 пС в растворах 0.1 М и 2 М КСl.

Транспорт неэлектролитов определяли осмотическим методом [14]. С наружной стороны мембраны вводили неэлектролит в сравнительно высокой концентрации так, чтобы осмотическое давление (тоничность) раствора возросло по сравнению с осмотическим давлением с противоположной стороны мембраны. Если исследуемый неэлектролит проникает во внутренний отсек, то по мере его перехода осмотическое давление по

обе стороны мембраны будет выравниваться. Вода начнет входить во внутренний отсек, выравнивая химические потенциалы воды в разных отделениях системы. По скорости выравнивая химических потенциалов воды в разных отделениях системы можно судить о скорости поступления исследуемого неэлектролита во внутренний отсек мембраны. Коэффициент проницаемости для данного вещества определялся из уравнения $P_d = D/d$, где D – коэффициент диффузии прони-

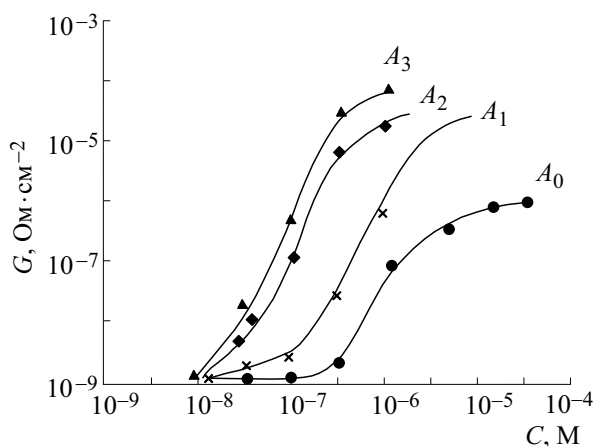


Рис. 2. Зависимости проводимости бимолекулярных мембран от концентрации индивидуальных компонентов леворина А (A_0 , A_1 , A_2 , A_3) с одной стороны мембраны в растворе 2 М КСl, рН 6.5 при $t = 25^\circ\text{C}$. Потенциал на мембране +100 мВ («+» со стороны антибиотиков). Мембраны получали из раствора фосфолипидов бычьего мозга с холестерином в соотношении 2 : 1.

кающего вещества, d — толщина мембраны ($\sim 50 \text{ \AA}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все индивидуальные компоненты леворина А увеличивают ионную проницаемость мембран, содержащих холестерин, для моновалентных катионов. В отличие от неароматических гептаеновых антибиотиков амфотерицина В, нистатина и микогептина компоненты леворина увеличивают проводимость мембран при введении их с одной стороны мембраны. На рис. 2 представлена зависимость проводимости мембран от их концентрации с одной стороны мембраны. Видно, что наибольшей эффективностью обладает леворин A_3 , а наименьшей — A_0 . По степени изменения проводимости мембран левориновые компоненты располагаются в следующий ряд с возрастающей эффективностью: $A_0 < A_1 < A_2 < A_3$. В аналогичный ряд располагаются антибиотики по мере увеличения их биологической активности [8].

Компоненты леворина А обладают важными свойствами. Влияние антибиотиков на проводимость мембраны зависит не только от их концентрации, но и от величины и направления приложенного к мембране потенциала. Изменение потенциала вдвое (от 100 до 200 мВ) при постоянной концентрации антибиотика приводит к росту проводимости в 2^4 раза. Удвоение же концентрации антибиотика при постоянной величине мембранного потенциала приводит к росту проводимости в четыре раза. Следует обратить внимание

на тот факт, что обнаружены два типа сборки проводящих структур при введении антибиотиков с одной стороны мембраны: потенциалзависимый и концентрационный. Первый тип сборки наблюдается при концентрациях компонентов леворина А от 10^{-8} до $5 \cdot 10^{-7}$ М и зависит от величины приложенного к мембране электрического поля. При концентрациях антибиотиков больше $5 \cdot 10^{-7}$ М проявляется второй тип сборки при постоянной величине мембранного потенциала. Этот процесс необратим. Величина мембранного потенциала на десятикратный градиент проникающего иона варьирует в зависимости от числа гидроксильных групп в гидрофильной части молекулы антибиотика. Молекула леворина в отличие от неароматических антибиотиков содержит в своем составе ароматическую группировку, благодаря которой молекула приобретает дополнительный положительный заряд: один расположен у входа в канал, другой — с гидрофобного конца молекулы. Следовало ожидать, что компоненты леворина будут создавать в мембранах анионную избирательность. Однако в экспериментах наблюдается катионная селективность. Этот эффект подтверждает предположение о том, что система селективности локализована на гидрофильной части лактонного кольца молекулы леворина. Отсюда следует, что ионная избирательность мембран в присутствии леворина связана со структурой молекулярных групп, выстилающих внутреннюю полость канала. Изучение механизма избирательности проницаемости мембран для ионов и органических молекул в присутствии леворина является важным аспектом проводимых исследований. Из рис. 1 видно, что индивидуальные компоненты леворина А по структуре одинаковы, но отличаются только числом гидроксильных и карбонильных групп в гидрофильной части молекул.

Исследования проводимости мембран при одностороннем действии левориновых компонентов в растворах различных проникающих катионов показали, что проводимость мембран зависит от степени гидратации проникающих ионов, как и в случае симметричной модификации мембран левориновыми компонентами. Ионы лития, обладая меньшим размером кристаллического радиуса в ряду катионов щелочных металлов, гидратируются в значительно большей степени, чем, например, ионы цезия. Вследствие этого резко уменьшается скорость перемещения ионов Li^+ в канале, и это, в свою очередь, обуславливает меньшую проводимость канала в растворах хлористого лития по сравнению с проводимостью леворинового канала в растворах хлористого цезия. Полученные данные при исследовании одностороннего действия левориновых компонентов показывают, что прохождение ионов Li^+ че-

рез левориновые каналы более затруднено, чем ионов Cs^+ . Это позволяет предположить, что односторонний левориновый канал представляет собой канал, заполненный водой. Исходя из этого предположения, следовало ожидать, что при одинаковой молярной концентрации проводимость мембран с леворином в растворе NaCl будет примерно равной проводимости мембран в растворе LiCl . Однако проводимость мембран с леворином в растворах NaCl оказалась на порядок выше проводимости мембран в растворе CsCl . По-видимому, здесь имеет место более сложный характер переноса ионов через левориновые каналы.

Из всех компонентов леворина А только леворин A_2 обладает практически идеальной катионной селективностью. Исходя из этого, наибольший интерес представляет исследование свойств леворина A_2 при взаимодействии с мембранами. Модификация мембран при одной и той же концентрации леворина A_2 сначала с одной стороны мембраны, а затем, после установления стационарной проводимости, с другой стороны мембраны показывает, что суммарная проводимость мембран при этом удваивается. Эти данные показывают, что с каждой стороны мембраны формируются независимые левориновые проводящие каналы. С другой стороны, известно, что амфотерицин В не действует с одной стороны мембраны даже при очень высоких концентрациях ($1 \cdot 10^{-4}$ М). Добавление амфотерицина В с другой стороны мембраны в той же концентрации резко усиливает проводимость мембран. В этом случае происходит взаимодействие амфотерицина В, находящегося по разные стороны мембраны, при котором проводимость мембран увеличивается в 2^4 раза [1]. Это доказывает взаимодействие двух амфотерициновых полупор с образованием проводящего канала. При односторонней модификации бислоиных мембран леворином A_2 при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М и при мембранном потенциале $+100$ мВ (плюс – со стороны антибиотика) наблюдается резкий рост проводимости с выходом спустя 15 мин на стационарный уровень. После достижения стационарной проводимости мембран была исследована проницаемость левориновых каналов для моносахаров и других нейтральных молекул. Объем раствора во внутренней ячейке составлял 0.3 мл, а объем наружного раствора – 1 мл. В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что при модификации мембран леворином A_2 наблюдается увеличение проводимости липидных мембран для моносахаров и других нейтральных молекул. Ниже в скобках указаны значения радиуса молекул (r_i , Å) и коэффициент проницаемости (P_d ,

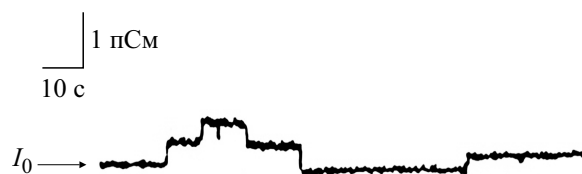


Рис. 3. Дискретные изменения проводимости мембран в присутствии леворина A_2 при потенциале 100 мВ («+» со стороны антибиотика). Концентрация антибиотика с одной стороны мембраны составляла $5 \cdot 10^{-8}$ М. Водные растворы с обеих сторон мембраны содержали 2 М KCl , pH 6.5, $t = 22^\circ\text{C}$. Мембраны получали в смеси фосфолипида с эргостерином в соотношении 20 : 1. Стрелкой обозначен уровень проводимости немодифицированной мембраны.

$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^{-4}$) для нейтральных молекул в порядке возрастания гидродинамического радиуса молекул. По степени уменьшения проницаемости молекул они располагаются в следующем ряду: вода ($r_i = 1.4$, $P_d = 16.7 \pm 2.2$) > мочевины ($r_i = 1.8$, $P_d = 11.2 \pm 0.7$) > ацетамид ($r_i = 2.5$, $P_d = 6.64 \pm 1.34$) > глицерин ($r_i = 3.1$, $P_d = 4.36 \pm 1.03$) > рибоза ($r_i = 3.6$, $P_d = 1.42 \pm 0.12$) > арабиноза ($r_i = 3.8$, $P_d = 1.38 \pm 0.11$) > глюкоза ($r_i = 4.2$, $P_d = 1.23 \pm 0.04$) > сахароза ($r_i = 5.2$, $P_d = 0.08 \pm 0.02$). Через левориновые каналы способны проникать нейтральные молекулы вплоть до молекул глюкозы. Эти данные говорят о том, что эффективный диаметр леворинового канала составляет величину ~ 8 Å.

Введение леворина A_2 к липидным мембранам вызывает увеличение проводимости мембран по каналному механизму. Работа одиночных каналов, формируемых леворином A_2 , показана на рис. 3, из которого видно, что проводимость канала составляет величину ~ 0.4 – 0.5 пСм. Мембраны, модифицированные леворином A_2 , обладают катионной селективностью. Потенциал на десятикратный градиент проникающего иона 100 мМ : 10 мМ (100 мМ – со стороны антибиотика) составляет величину $+56 \pm 2$ мВ (знак + находится в свободном от антибиотика растворе). Это означает, что мембраны практически идеально проницаемы для катионов.

Проводимость каналов, образуемых леворином A_2 , примерно на порядок меньше проводимости амфотерициновых каналов и в 100 раз меньше проводимости грамицидиновых каналов при той же концентрации электролита. Обнаружение одиночных каналов в присутствии леворина A_2 подтвердило предположение о наличии в мембранах комплексов, инициирующих катионную проницаемость. Левориновые каналы совершают переходы между двумя состояниями: открытым и закрытым. В таблице представлены ве-

Параметры ионного канала в присутствии леворина A_2 в растворах KCl и KBr

	2 М KCl	2 М KBr
$g_m, \text{Ом}^{-1} \cdot 10^{12}$	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Леворин $A_2, \text{М} \cdot 10^{-9}$	5.0	10.0
$T_0, \text{с}$	2.5 ± 0.3	5.2 ± 0.4
$T_3, \text{с}$	3.5 ± 0.2	0.86 ± 0.05

Примечание. g_m — Проводимость одиночного канала при мембранном потенциале 200 мВ; леворин A_2 — концентрация, необходимая для получения одиночных каналов (в течение 15 мин); T_0 — время жизни канала в открытом состоянии; T_3 — время жизни канала в закрытом состоянии. Мембраны формировали из смеси фосфатидилсерина с эргостерином в весовом соотношении 20 : 1.

личина проводимости канала и времена жизни каналов в открытом и закрытом состояниях.

Как видно из таблицы, в растворах разных солей, но одинаковой молярности, величина проводимости каналов примерно одинакова и не за-

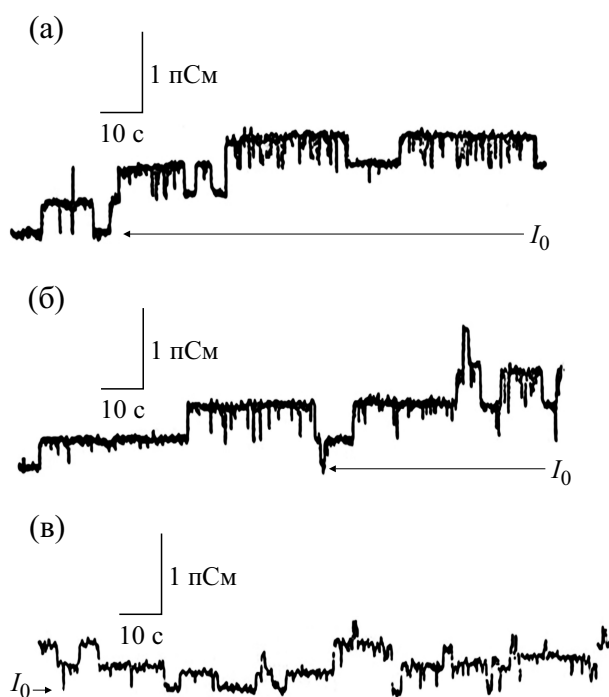


Рис. 4. Дискретные изменения проводимости мембран в присутствии леворина A_2 при потенциале 200 мВ, рН 6.5; $t = 22^\circ\text{C}$. (а) — Концентрация антибиотика в растворе 2 М KCl — $5 \cdot 10^{-9}$ М; мембраны получали из смеси фосфатидилсерина с холестерином в соотношении 2 : 1. (б) — Концентрация антибиотика в растворе 2 М KBr — $5 \cdot 10^{-8}$ М; мембраны получали из смеси фосфатидилсерина с эргостерином в соотношении 20 : 1. (в) — Концентрация антибиотика в растворе 2 М KBr — $5 \cdot 10^{-9}$ М; мембраны получали из смеси фосфатидилсерина со стигмастерином в соотношении 2 : 1.

висит от концентрации антибиотика. В разных солях времена жизни канала в открытом и закрытом состояниях отличаются. В растворе KCl леворинный канал большую долю времени проводит в закрытом состоянии, однако в растворе KBr канал большую долю времени находится в открытом состоянии. Отсюда можно сделать вывод, что анионы оказывают влияние на переключающую систему молекулярного канала.

На рис. 4 показана работа одиночных каналов леворина A_2 на мембранах из фосфатидилсерина с холестерином, эргостерином и стигмастерином. При низких концентрациях антибиотика можно наблюдать работу одиночных ионных каналов. Введение леворина A_2 в концентрации $5 \cdot 10^{-9}$ М с обеих сторон мембран, приготовленных из фосфатидилсерина с холестерином, приводит к дискретному нарастанию мембранного тока, флуктуирующего относительно среднего значения (см. рис. 4а). Флуктуация тока связана с дискретной работой отдельных проводящих единиц — каналов. Анализ флуктуаций тока показывает, что проводимость каналов лежит в интервале 0.2–0.5 пСм в растворах 2 М KCl при мембранном потенциале 200 мВ. В присутствии леворина A_2 в концентрации $5 \cdot 10^{-8}$ М с обеих сторон мембран, образованных из раствора фосфатидилсерина с эргостерином, впервые наблюдали дискретные скачки проводимости (рис. 4б). Дискретные изменения проводимости мембран с леворином наблюдаются также на мембранах со стигмастерином (рис. 4в). Как видно на рис. 4, проводимости каналов примерно одинаковы и не зависят от состава электролита. В асимметричных условиях концентрации электролита (2М KCl : 0.2 М KCl) потенциал нулевого тока равен $+54 \pm 4$ мВ на мембранах с большим числом каналов. Знак потенциала говорит об избирательной проницаемости мембран для ионов K^+ . Ионная селективность канала не зависит от полиеновой цепи. По всей видимости система, ответственная за селективность ионного канала, локализована на гидрофильной стороне молекулы полиена. Изучая селективные свойства мембраны с большим числом полиеновых каналов, можно однозначно определить избирательность одиночного канала. Такой экспериментальный подход обусловлен тем, что систематическое изучение селективности непосредственно одиночного канала методически достаточно сложно ввиду ее малой проводимости. В растворах KCl частота переходов канала из открытого в закрытое состояние несколько больше, и это связано, по-видимому, со сложным характером взаимодействия иона с полярными группами, выстилающими внутреннюю пору в канале.

Чувствительность мембран к ПА зависит от концентрации ДМСО в водном растворе, окружающей мембрану [15, 16]. При соотношении вода : ДМСО = 20 : 1 проводимость мембран с антибиотиками была высокой и становилась сравнимой с проводимостью самих электродов. При соотношении вода : ДМСО = 10 : 1 проводимость мембран с антибиотиками была также высока. Постепенное увеличение концентрации ДМСО в водном растворе уменьшало чувствительность ПА к мембранам. Проводимость мембран в солевом растворе, содержащем 50% ДМСО и ПА, оказалась очень низкой. Та же картина наблюдалась в растворе с соотношением вода : ДМСО, равным 1 : 10. Приведенные данные показывают, что постепенное увеличение концентрации ДМСО в водном растворе способствует переходу молекул ПА из дисперсной, т.е. ассоциированной формы, в мономолекулярную форму, и в этой форме молекулы ПА оказываются биологически неактивными. Отсюда следует, что молекулы ПА, находясь в ассоциированной форме, обладают очень высокой мембранной активностью, а распад проводящего комплекса в мембране означает переход канала из олигомерной структуры в мономерно-димерную и потере им проводимости. Чувствительность ПА к мембранам означает, что увеличивается число проводящих каналов, а проводимость индивидуальных одиночных каналов не изменяется. Под чувствительностью ПА к мембранам понимается минимальная концентрация антибиотика, под действием которого образуются одиночные каналы в единицу времени. По мере увеличения концентрации ДМСО чувствительность мембран к антибиотикам уменьшается, хотя угол наклона зависимости проводимости мембран от концентрации антибиотиков при этом не меняется.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наибольший интерес представляют сравнительные исследования, связанные с особенностями взаимодействия ПА с БЛМ и клеточными мембранами. На изолированном мышечном волокне травяной лягушки *Rana temporaria* был изучен индуцированный полиенами ионный транспорт. Было показано, что амфотерицин В, метиловый эфир амфотерицина В, нистатин, микогеπτин и леворин усиливают проводимость мышечного волокна для катионов щелочных металлов [12, 17–19]. Как было показано в нашей работе, леворин также усиливает проводимость бислойных мембран для катионов щелочных металлов. Избирательная проницаемость липидных мембран зависит от структуры гидрофильной цепи полиеновой молекулы. Так, амфотерицин В, нистатин и микогеπτин эффективно увеличивают проводимость БЛМ для одновалентных анио-

нов только при наличии их с обеих сторон мембраны [1]. Было показано, что указанные выше антибиотики эффективно увеличивают проницаемость мембран эритроцитов, лимфоцитов, тимоцитов и мышечных клеток при наличии их с одной стороны мембраны, при этом на мембранах наблюдается усиление потока не для анионов, а для катионов щелочных металлов [17–20]. Антибиотики с ароматической группировкой, в частности левориновые компоненты, оказались эффективны с одной стороны клеточных мембран и БЛМ. Леворин действует на липидные и клеточные мембраны, создавая избирательную проницаемость для катионов щелочных металлов [12, 21]. В молекуле микогеπτина на одну карбонильную группу больше, чем в молекулах амфотерицина В и нистатина. Через микогеπτиновые каналы анионы и катионы проникают примерно одинаково [21]. В молекуле леворина на две карбонильные группы больше, чем в молекулах амфотерицина В и нистатина, и в присутствии леворина уже наблюдается избирательная проницаемость мембран для катионов [21]. Наши исследования показали, что мембраны, модифицированные леворином с одной стороны мембраны, обладают такой же селективностью, как и при двухстороннем введении антибиотика. Проводимость одиночных полупор примерно такая же, как и проводимость канала, возникающая при двухстороннем введении антибиотика. Для расшифровки молекулярной природы катионной селективности левориновых каналов требуется синтез новых молекул с измененной химической структурой молекул. Биологический синтез и химическая трансформация молекул ПА – вот реальный путь получения новых производных ПА с новыми физико-химическими свойствами [22–24]. Наибольший интерес представляет модификация полиеновой молекулы по гидрофильной цепи, изменяющая внутреннюю полость канала, и, как показывают исследования, только эта система в молекулах полиенов отвечает за избирательную проницаемость мембран для ионов и органических соединений. Эксперименты, проведенные с алкильными производными леворина, модифицированными по полярным карбоксильным и аминным группам, показали, что подобная модификация не влияет на избирательную проницаемость мембран, а только определяет время пребывания антибиотика в мембране. Модифицируя мембраны алкильными производными с разной длиной углеводородной цепи (R-CH₃ – метил, R-C₂H₅ – этил, R-C₃H₇ – пропилен, R-C₄H₉ – бутил; R-C₅H₁₁ – амил), можно точно контролировать время нахождения антибиотика в мембране [1]. Проведенные эксперименты на липидных мембранах показали, что с увеличением длины алкильной цепи производных леворина время нахождения их в мембране

по сравнению с исходным леворином уменьшается [1]. Время пребывания антибиотика в мембране определялось по постоянной времени релаксации проводимости мембран после отмывки антибиотика из окружающего мембрану раствора.

Биологическая активность ПА зависит не только от структуры молекул полиенов, но и от выбора растворителя. Водорастворимые формы ПА примерно в десять раз менее эффективны, чем при введении в водную фазу антибиотиков в растворах ДМСО [21]. При введении смеси ДМСО с ПА в водную среду происходит формирование самоагрегированных ассоциатов ПА в водных растворах [25–27]. Полиены в комплексе с ДМСО формируют в водных растворах ассоциаты, состоящие из нескольких молекул антибиотиков, и только в такой форме они обладают высокой мембранной активностью [28]. Частота образования и размер агрегированных ассоциатов возрастает с увеличением концентрации ПА [29]. Диаметр левориновой полупоры составляет 8 Å, что согласуется с данными работы [30]. Использование ПА в комплексе с ДМСО усиливает эффективность биологического действия ПА на липидные мембраны [15, 16]. Здесь с большой вероятностью можно говорить о том, что увеличение числа молекул антибиотика, встроенного в мембрану, связано с совершением работы силами поверхностного натяжения. Благодаря тому, что значение диэлектрической проницаемости ДМСО ($\epsilon = 48.9$) находится между величинами для воды и жиров, происходит уменьшение коэффициента распределения ПА между мембраной и водой. Исходя из изложенных данных, можно высказать предположение о том, что леворин, являясь каналобразующим соединением, может индуцировать в мембранах формирование дополнительных каналов проницаемости и при интенсивной мышечной активности усилить перенос катионов и энергозависимых субстратов в клетки.

ВЫВОДЫ

Изложенные выше результаты проведенных экспериментов позволяют высказать предположение о том, что путем встраивания в мембраны гептаенового антибиотика леворина A_2 с установленной химической структурой молекул можно моделировать процесс формирования каналов в клеточных мембранах и экспериментально осуществить трансмембранный перенос ионов и углеводов в клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики (грант № EIF-BGM-3-BRFTF-2+/2017-15/12).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. X. M. Kasumov, *Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков* (Наука, М., 2009).
2. S. B. Zotchev, *Curr. Med. Chem.* **10**, 211 (2003).
3. K. C. Gray, D. S. Palacios, I. Dailey, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 2234 (2012).
4. E. Grela, A. Zdybicka-Barabas, B. Pawlikowska-Pawlega, et al., *Sci. Rep.* **9** (1), 17029 (2019).
5. Y. Nakagawa, Y. Umegawa, T. Takano, et al., *Biochemistry* **53** (19), 3088 (2014).
6. E. Borowski, *Farmaco* **55**, 206 (2000).
7. E. Borowski, M. Malyshkina, S. Soloviev, and T. Ziminski, *Chemotherapia* **10**, 178 (1966).
8. А. И. Филипова и Ю. Д. Шенин, *Антибиотики* **19** (1), 32 (1974).
9. P. Szczeblewski, T. Laskowski, B. Kubacki, et al., *Sci. Rep.* **7**, 40158 (2017).
10. J. Zielinski, J. Gumieniak, J. Golik, et al., In *Proc. Int. Symp. on Antibiotics* (Weimar, GDR, 1979), B16.
11. J. Zielinski, H. Borowy-Borowski, J. Golik, et al., *Tetrahedron Lett.* **20** (20), 1791 (1979).
12. N. Shvinka, *Proc. Latv. Acad. Sci.* **56**, 57 (2001).
13. Zh.-W. Yu and P. J. Quinn, *Biosci. Rep.* **14**, 259 (1994).
14. В. В. Зенин, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (РАН, Л., 1979).
15. В. Х. Ибрагимова, Д. И. Алиев и И. Н. Алиева, *Биофизика* **47** (5), 833 (2002).
16. V. Ibragimova, I. Alieva, Kh. Kasumov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 29 (2006).
17. N. Shvinka and G. Caffner, *Biophys. J.* **67**, 143 (1994).
18. N. Shvinka and G. Caffner, *Eur. Biophys. J.* **24**, 23 (1995).
19. Н. Э. Швинка и Г. Кафнер, *Биол. мембраны* **6**, 1216 (1989).
20. S. C. Hartsel, S. K. Benz, W. Ayenew and J. Bolard, *Eur. Biophys. J.* **23**, 125 (1994).

21. A. A. Samedova, T. P. Taghi-zade, and Kh. M. Kasumov, *Rus. J. Bioorg. Chem.* **44** (3), 337 (2018)
22. J. F. Aparicio, P. Caffrey, J. A. Gil, and S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 179 (2003).
23. M. N. Preobrazhenskaya, E. N. Olsufyeva, S. E. Solovieva, et al., *J. Med. Chem.* **52**, 189 (2009).
24. D. S. Palacios, L. Dailey, D. M. Siebert, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (17), 6733 (2011).
25. W. I. Gruszecki, M. Gagoś, and M. Hereć, *J. Photochem. Photobiol.* **69**, 49 (2003).
26. J. Starzyk, M. Gruszecki, K. Tutaj, et al., *J. Phys. Chem.* **118** (48), 13821 (2014).
27. W. Grudzinski, J. Sagan, R. Welc, et al., *Sci. Rep.* **13** (6), 32780 (2016).
28. E. Grela, M. Wierzchowski, R. Luchowski, et al., *Mol. Pharm.* **15** (9), 4202 (2018).
29. J. Mazerski and E. Borowski, *Biophys. Chem.* **57**, 205 (1996).
30. С. А. Ф. Ел-Суфи, Автореф. канд. ... дис. биол. наук (Ташкент, Ин-т биохимии АН Узбекистана, 1992).

Properties of Ion Channels in Lipid Membranes Modified by Levorin A₂, an Aromatic Antibiotic

T.P. Taghi-zada and Kh.M. Kasumov

Department of Medical and Biological Sciences, Azerbaijan State Academy of Physical Education and Sport, prosp. Fatali Khan Khoyski, 98, Baku, AZ 1072 Azerbaijan

It is shown that the main components of levorin A complex consisting of antibiotics of the aromatic group designated as A₀, A₁, A₂, A₃ increase the permeability of membranes for: A₃ > A₂ > A₁ > A₀ when added to one side of the membrane. All components of levorin produce a cation-selective conductance. Levorin A₂, which has been extensively studied in our research, promotes increased permeability of membranes to potassium ions. The membrane potential for a tenfold change in KCl concentration gradient is 56 ± 2 mV. It has been shown that injection of the same concentration of levorin A₂ to one side and then, after determining typical membrane permeability, to the other side of the membrane generates a two-fold increase in total membrane permeability. This means that independent levorin-induced conductive semi-pores are formed on each side of the membrane. It has been found that injection of levorin A₂ only to one-side of the membranes enhances membrane permeability for monosaccharides and other neutral molecules. In the presence of levorin A₂ on membranes of phospholipids with cholesterol, ergosterol and stigmasterol, the single-channel conductance of typical ion channels was 0.2–0.5 pS and the properties of these channels were studied. Levorin channels exist in two states: open and closed. In KBr solution the channel remains most of the time in the open state. In solutions containing different salts, but with the same molarity, the conductance value of levorin channels is approximately the same (0.4–0.5 pS). Increasing the concentration of dimethyl sulfoxide in aqueous solution facilitates the transition of molecules of polyene antibiotics from dispersed to monomolecular form. The molecules of polyene antibiotics, formed by association, exhibit high membrane activity.

Keywords: polyene macrolide antibiotics, levorin A₂, lipid membrane, membrane permeability, ion channels, dimethyl sulfoxide