

Могут ли каналообразующие антибиотики в комплексе с носителями обеспечить усиление мышечной активности?

Т. П. ТАГИ-ЗАДЕ^{1*}, Х. М. КАСУМОВ²

¹ Азербайджанская Государственная Академия Физической Культуры и Спорта, Баку, Азербайджан

² Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

Can Channel-Forming Antibiotics In Complex with Carriers Provide Enhanced Muscle Activity?

T. P. TAGHI-ZADA^{1*}, KH. M. KASUMOV²

¹ Azerbaijan State Academy of Physical Education and Sport, Department of Medical and Biological Sciences, Baku, Azerbaijan

² Institute of Botany of Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan

Представлена обзорно-экспериментальная работа, в которой изложены данные, касающиеся избирательной проницаемости липидных и клеточных мембран для ионов и органических соединений под действием каналообразующих полиеновых соединений с известной структурой молекул. Показано, что полиеновый антибиотик леворин A_2 с ароматической структурой влияет на ряд физико-химических параметров липидных мембран. Установлено, что под действием леворина A_2 увеличивается проницаемость липидных и клеточных мембран для одновалентных катионов, а также для моносахаров и других нейтральных молекул. Биологическая активность леворина A_2 и скорость доставки молекул к мембранам зависят от поверхностного натяжения и субстратного окружения мембран. Показано, что в комплексе с леворином, диметилсульфоксидом и цитралем в два раза снижается поверхностное натяжение водных растворов, окружающих мембрану. Представлены сравнительные данные действия леворина A_2 на липидные мембраны и на мембраны мышечных клеток. Предполагается, что леворин A_2 , являясь каналообразующим соединением, может индуцировать в мембранах мышечных клеток формирование дополнительных каналов проницаемости и при интенсивной мышечной активности усилить перенос катионов и энергозависимых субстратов через мембраны.

Ключевые слова: леворин A_2 , диметилсульфоксид, липидные мембраны, проницаемость мембран, ионные каналы, поверхностное натяжение.

The presented review and experimental work provides the data regarding the selective permeability of lipid and cell membranes for ions and organic compounds under the influence of channel-forming polyene compounds with a known molecule structure. It has been shown that the polyene antibiotic levorin A_2 with an aromatic structure affects a number of physicochemical parameters of lipid membranes. It was established that the permeability of lipid and cellular membranes for monovalent cations, as well as for monosugar and other neutral molecules increases under the influence of a levorin of A_2 . The biological activity of levorin A_2 and the rate of delivery of molecules to the membranes depend on the surface tension and substrate environment of the membranes. It has been shown that in combination with levorin, dimethyl sulfoxide, and citral, the surface tension of the aqueous solutions surrounding the membrane decreases by half. Comparative data on levorin A_2 effects on lipid membranes and muscle cell membranes are presented. It is assumed that levorin A_2 , being a channel-forming compound, can induce the formation of additional permeability channels in the membranes of muscle cells and, with intense muscle activity, enhance the transfer of cation and energy-dependent substrates through the membranes.

Keywords: levorin A_2 , dimethyl sulfoxide, lipid membrane, membrane permeability, ionic channels, surface tension.

Введение

Известно, что каналы, функционирующие в мембранах мышечных клеток, избирательно транспортируют ионы Na^+ , K^+ , Ca^{++} , а также определённые субстраты, в частности моносахара, для поддержания процесса гликолиза и окислительного фосфорилирования с целью синтеза богатых химической энергией макроэргических со-

единений, таких как АТФ, креатин-фосфат и т. д. [1–3]. Установлено, что при мышечной деятельности в 5–10 раз увеличивается ионная проницаемость мембран мышечных клеток по сравнению с состоянием покоя [4]. При этом ускоряется выход ионов K^+ и некоторых субстратов из клеток во внеклеточное пространство. При мышечной активности усиливается процесс поглощения глюкозы скелетными мышцами и повышается активность мембраносвязанных ферментов [5, 6]. Становится ясно, что в период интенсивной мышечной деятельности потребность организма в

© Т. П. Таги-Заде, Х. М. Касумов, 2020

*Адрес для корреспонденции: Патамдартское шоссе, 40, Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, AZ-1004

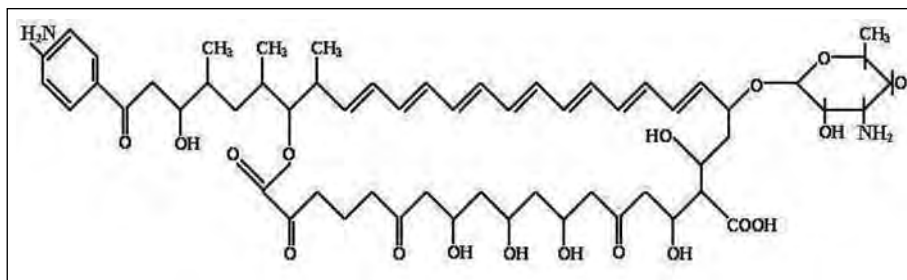


Рис. 1. Химическая структура леворина A_2 [12].

ионах, углеводах и других органических субстратах резко возрастёт. В этот момент каналы мышечных клеток начинают работать с большей интенсивностью. Однако удельная активность работы нативных каналов лимитирована, и поэтому они не обладают способностью в единицу времени поставлять мышечным клеткам органические соединения в необходимом количестве. Энергетика мышечной деятельности постепенно слабеет и быстро наступает период утомления. Здесь возникает необходимость активизации работы нативных клеточных каналов с помощью экзогенных соединений, способных дополнительно формировать в мембранах мышечных клеток катионселективные каналы. Отсюда понятно, что одной из важнейших задач является создание новых систем транспорта, способных избирательно переносить в клетки ионы и энергозависимые субстраты. Здесь необходим был комплексный подход к решению данной задачи с позиции поиска соединений с известным молекулярным механизмом действия, имеющих высокое сродство к мембранам и образующих в них ионные каналы. Речь идет об использовании соединений с установленным механизмом действия в условиях напряженной мышечной активности. К таким веществам относятся мембраноактивные каналобразующие полиеновые антибиотики (ПА) [7, 8]. ПА являются единственным в природе классом соединений, формирующих в липидных и клеточных мембранах структурные каналы молекулярных размеров [9, 10]. Основными представителями класса ПА являются неароматические антибиотики — амфотерицин В, нистатин, микрогептин и антибиотики с ароматической группировкой — леворин, трихомицин, кандицидин и их аналоги, химически модифицированные в различных частях полиеновой молекулы [11, 12]. В работе исследован ароматический антибиотик леворин A_2 , химическая структура которого показана на рис. 1 [12]. Различают леворин А и леворин В [12]. Леворин А обладает высокой биологической активностью [13]. При анализе оказалось, что леворин А представляет собой смесь нескольких компонентов — A_0 , A_1 , A_2 , A_3 , A_4 [13, 14]). Леворин A_2 является одним из основных компонен-

тов антибиотической смеси леворина А.

Общим в химической структуре ПА является наличие лактонного кольца, содержащего гидрофобную цепочку с определённым числом двойных связей и гидрофильную цепь, в состав которой входят несколько гидроксильных и карбонильных групп [12]. В

основе биологического действия ПА лежит формирование ими в мембранах в комплексе со стеринами ионных каналов с определённой проводимостью [8]. В отличие от неароматических антибиотиков, антибиотики с ароматической группировкой резко увеличивают проницаемость липидных и клеточных мембран для катионов щелочных металлов [8, 15]. С помощью леворина A_2 , который является каналобразующим соединением, можно индуцировать в клеточных мембранах мышечных волокон образование дополнительных каналов проницаемости.

Основная цель данной работы состоит в сравнительном исследовании действия гептаенового антибиотика леворина A_2 с ароматической группировкой на ионную проницаемость мембран, проницаемость мембран для органических молекул, поверхностное натяжение водных растворов как в бислойных липидных мембранах (БЛМ), так и в клеточных мембранах.

Материал и методы

Бислойные мембраны получали из общих фосфолипидов, выделенных из белого вещества бычьего мозга [16]. Общие фосфолипиды очищали от нейтральных липидов ацетонной промывкой и хранили при 0°C в хлороформ–метанольном растворе (2:1) в концентрации 20–10 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 был использован леворин A_2 , любезно предоставленный нам проф. Вайнштейном В. А. из Санкт-Петербургского Государственного химико-фармацевтического университета. ПА в воде нерастворимы. Лучшим растворителем ПА является диметилсульфоксид (ДМСО) [17]. ДМСО и цитраль были получены от фирмы «Sigma-Aldrich (Merck)». Леворин A_2 растворяли в ДМСО в концентрации 1 мг/мл, который затем использовали в качестве маточного раствора. Из маточного раствора микрошприцом антибиотик вводили в водные растворы, окружающие мембрану. Маточный раствор антибиотика хранили в течение недели. Электрические характеристики БЛМ измеряли с помощью метода фиксации мембранного потенциала и тока, используя электрометрический усилитель постоянного тока Keithley-301 (США) и двухкоординатный самописец «Endim». Методика формирования БЛМ показана на рис. 2.

Потенциалзависимое формирование левориновых каналов наблюдается при потенциале на мембране выше 100 мВ и, поэтому, измерения электрических характеристик мембран проводились при 100 мВ. При образовании БЛМ мембраноформирующие растворы готовились из разных соотношений

фосфолипидов с холестерином. Были использованы перекристаллизированный холестерин, мочевины, ацетамид, глицерин, рибоза, арабиноза, глюкоза, сахароза фирмы Sigma, Saint louis, США. Для стабилизации pH водных растворов использовали буферные системы в концентрации 5×10^{-3} М. Проводимость немодифицированной мембраны составляла величину 2–3 пС в растворах 10^{-1} М и 2 М KCl.

Транспорт незлектролитов определялся осмотическим методом [18]. С одной стороны мембраны-1 вводился незлектролит в сравнительно высокой концентрации, так, чтобы осмотическое давление (тоничность) раствора возросло по сравнению с осмотическим давлением с противоположной стороны мембраны-2. В результате этого происходил перенос молекул воды из мембраны 2 в 1 и объём воды в 2 уменьшался. Если исследуемый незлектролит проникает на сторону 2, то по мере его перехода осмотическое давление по обе стороны мембраны будет выравниваться: вода начнет входить на 2-ю сторону мембраны, уравнивая объём воды по обе стороны мембраны. По скорости восстановления объёма воды в отсеке 2 можно судить о скорости поступления исследуемого незлектролита в отсек 2. Коэффициент проницаемости для данного вещества определялся из уравнения $P_d = D/x$, где D — коэффициент диффузии вещества в мембране, который для данного типа вещества имеет величину порядка $(2-9) \times 10^{-10}$ см²/с, x — толщина мембраны ~ 100 Å = 10^{-6} см.

Поверхностное натяжение растворов измеряли методом счёта капель при помощи сталагмометра [19]. Образующаяся на конце капиллярной трубки сталагмометра капля удерживается силой поверхностного натяжения. Отрывается капля в тот момент, когда её масса становится равной или превышает силу поверхностного натяжения, удерживающую каплю. Для жидкостей с большим поверхностным натяжением отрыв капель затруднён, и образующиеся капли будут более крупными, чем у жидкостей с меньшим поверхностным натяжением, поэтому и число их будет меньше. Сначала сталагмометр заполняют исследуемой жидкостью и считают число капель n , вытекающих из объёма V . Затем его заполняют дистиллированной водой и считают число капель воды n_0 , вытекающих из этого же объёма V . В момент отрыва капли её масса равна силе поверхностного натяжения. Если из объёма V вытекает n капель жидкости, имеющей плотность ρ , то вес капли определяют по уравнению $P = V \rho g / n$, где g — ускорение свободного падения. Сила поверхностного натяжения, удерживающая каплю, равна $2\pi\sigma$, где 2π — длина окружности отверстия капилляра, от которого отрывается капля. Для исследуемой жидкости $V \rho g / n = 2\pi\sigma$ (1), а для воды $V \rho_0 g / n_0 = 2\pi\sigma_0$ (2), где σ_0 — поверхностное натяжение воды; ρ_0 — её плотность; n_0 — число капель воды. Поделив уравнение (1) на (2) получим $\rho n_0 / \rho_0 n = \sigma / \sigma_0$, откуда $\sigma = \sigma_0 \rho n_0 / \rho_0 n$ (3). Плотность воды ρ_0 и его поверхностное натяжение σ_0 определяется при соответствующей температуре, при которой производится измерение. В работе было исследовано изменение величины поверхностного натяжения водных растворов в сочетании с леворином A_2 , ДМСО и цитралем. ДМСО и цитраль являются дополнительными компонентами, оказывающими влияние на поверхностное натяжение водных растворов.

Результаты

В контрольных опытах было показано, что 1–5% раствор ДМСО практически не влияет на проводимость БЛМ, калиевую проводимость изолированного мышечного волокна и на константу скорости выхода ионов калия из целой мышцы [20, 21].

Введение леворина A_2 и его алкильных производных в водную среду с одной стороны мембраны приводит к резкому увеличению проводимос-

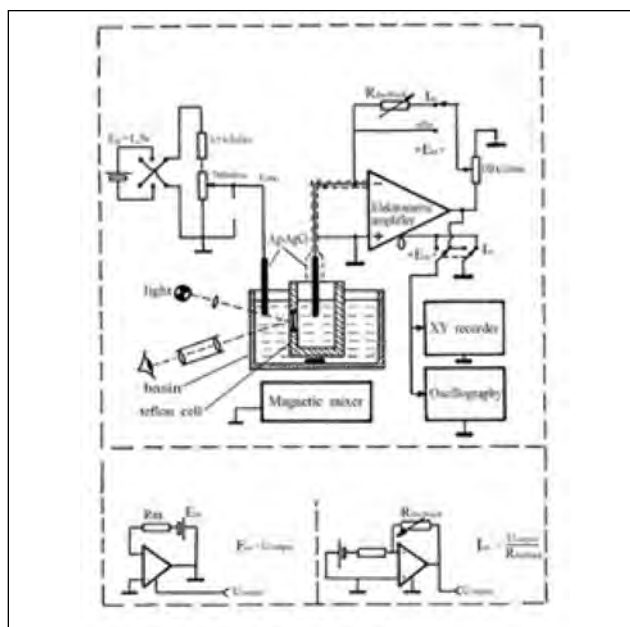


Рис. 2. Принципиальная комбинированная схема измерения электрических характеристик липидных мембран в режиме фиксации тока и напряжения мембраны.

Внизу изображены варианты подключения мембраны к измерительному электрометрическому усилителю. Слева — режим измерения потенциала мембраны (E_m); справа — измерения тока (I_m) мембраны в режиме фиксации напряжения.

ти мембран. На рис. 3 показана зависимость проводимости мембран от концентрации исходного леворина A_2 при односторонней модификации мембран.

Как видно из рис. 3 зависимость проводимости мембран от концентрации леворина A_2 степенная. В отличие от амфотерицина В и нистатина, наблюдается менее крутая зависимость проводимости мембран от концентрации указанных выше антибиотиков. Зависимость проводимости мембран от концентрации леворина A_2 при односторонней модификации имеет тот же угол наклона, что и при симметричной модификации мембран этим антибиотиком. Проводимость мембран при этом пропорциональна 3–4-й степени концентрации антибиотика. Односторонне-модифицированные леворином A_2 мембраны обладают идеальной катионной селективностью. Потенциал на десятикратный градиент проникающего иона 100 KCl:10мМ KCl (100 мМ KCl со стороны антибиотика) составляет величину +54–58 мВ (знак + находится в свободном от антибиотика растворе). Это означает, что мембраны практически идеально проницаемы для ионов калия. Модификация мембран при одной и той же концентрации леворина A_2 сначала с одной стороны мембраны и затем после установления стационарной проводимости с другой стороны мем-

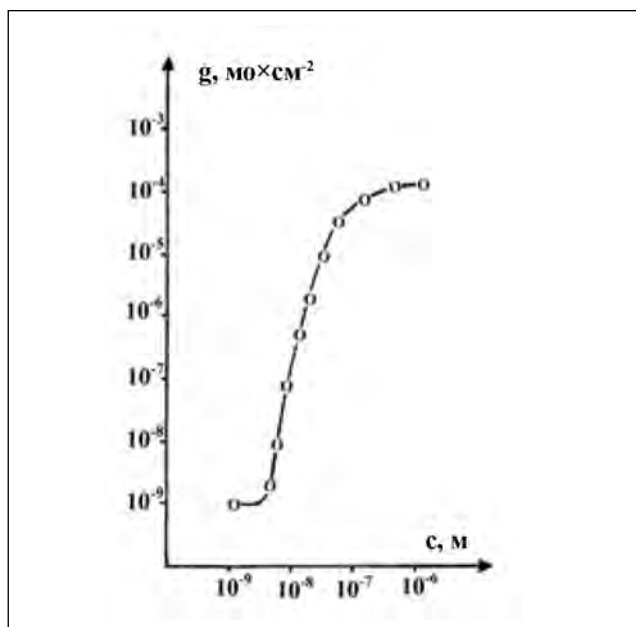


Рис. 3. Зависимость проводимости липидных мембран от концентрации ароматического антибиотика леворина A_2 с одной стороны мембраны.

По оси Y отмечена проводимость мембраны — g в единицах $\text{Ом}^{-1} (\text{МО}) \times \text{см}^{-2}$; а по оси X отмечена концентрация антибиотика (C) в молях (M). Мембраны формировались из смеси фосфолипид:холестерин 20:1 в водных солевых растворах, содержащих 2 М KCl при pH 6,5, $t = 22^\circ\text{C}$.

браны показывает, что суммарная проводимость мембран при этом удваивается. Эти данные говорят о том, что с каждой стороны мембраны формируются независимые левориновые проводящие полупоры. Работа одиночных полупор, формируемых с одной стороны мембраны леворином A_2 , показана на рис. 4, из которого видно, что проводимость каждой полупоры составляет величину $\sim 0,4\text{--}0,5$ пС. Эта величина соответствует проводимости одиночных левориновых каналов, формируемых в мембранах при симметричном введении антибиотика.

Было обнаружено, что при односторонней модификации мембран леворином A_2 наблюдается увеличение проводимости липидных мембран для моносахаров и других нейтральных молекул.

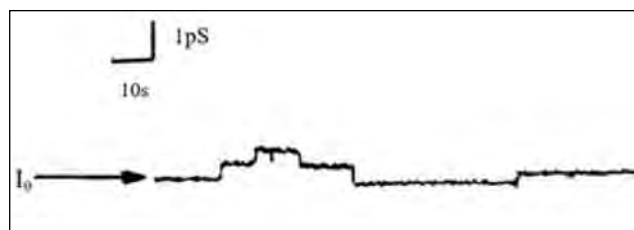


Рис. 4. Запись флуктуаций тока, протекающего через мембрану, при односторонней модификации леворином A_2 при потенциале 100 мВ (+ со стороны антибиотика).

Концентрация антибиотика с одной стороны мембраны 5×10^{-8} М. Водные растворы с обеих сторон мембраны содержат 2М KCl, pH 6,5, $t=22^\circ\text{C}$. Мембраны получали в смеси фосфолипид с холестерином в весовом соотношении 20:1. Стрелкой обозначен уровень проводимости немодифицированной мембраны.

В табл. 1 приведены значения коэффициента проницаемости липидных мембран для различных неэлектролитов в присутствии леворина A_2 с одной стороны мембраны.

Из табл. 1 видно, что проницаемость мембран, модифицированных леворином, увеличивается для нейтральных молекул в порядке возрастания гидродинамического радиуса молекул (r_i) и располагается в порядке проницаемости: вода > мочевины > ацетамид > глицерин > рибоза > арабиноза > глюкоза > сахароза. Через левориновые каналы способны проникать нейтральные молекулы вплоть до молекул глюкозы. Эти данные говорят о том, что эффективный диаметр леворинового канала составляет величину ~ 8 А.

Установлено, что внутривенное введение натриевой соли леворина в дозе 4 000–6 000 ЕД / кг вызывает увеличение коронарного кровотока в среднем на $33 \pm 4\%$ [22]. Эти эксперименты были проведены на кошках, на которых регистрировалось количество крови, оттекающей из коронарного синуса за единицу времени, количество потребляемого сердцем кислорода и определялся тонус венечных сосудов. Показано, что количество потребляемого сердцем кислорода и объём протекающей крови по сосудам за единицу времени возрастал на 20 и 32%, соответственно, по сравнению с исходным [23]. Вышеприведённые

Таблица 1. Коэффициент проницаемости (P_d) липидных мембран для неэлектролитов в зависимости от кристаллического радиуса (r_i) молекул при введении леворина с одной стороны мембраны (C — концентрация антибиотика)

Неэлектролиты	r_i	Число мембран	Леворин A_2 (C) = 0 $P_d \text{ см} \times \text{сек}^{-1} \times 10^{-4}$	Число мембран	Леворин A_2 (C) = 1×10^{-5} $P_d \text{ см} \times \text{сек}^{-1} \times 10^{-4}$
H_2O	1,4	10	$9,5 \pm 2,1$	10	$16,7 \pm 2,2$
Мочевина	1,8	10	0,07	10	$11,2 \pm 0,7$
Ацетамид	2,5	11	$0,96 \pm 0,14$	11	$6,64 \pm 1,34$
Глицерин	3,1	12	0,08	12	$4,36 \pm 1,03$
Рибоза	3,6	10	0,08	10	$1,42 \pm 0,12$
Арабиноза	3,8	9	0,08	9	$1,38 \pm 0,11$
Глюкоза	4,2	12	0,08	12	$1,23 \pm 0,04$
Сахароза	5,2	11	0,08	11	$0,08 \pm 0,02$

эксперименты показывают увеличение объёма протекающей крови по сосудам за единицу времени. Отсюда следует тот факт, что леворин, по-видимому, уменьшает значение поверхностного натяжения раствора, и это способствует увеличению текучести крови и ускорению её движения по кровеносным сосудам как в покое, так и при мышечной деятельности.

Для проверки этого предположения было исследовано влияние некоторых поверхностно-активных соединений, обладающих низким поверхностным натяжением по сравнению с водой. В этом аспекте важными являются исследования, проведённые в присутствии леворина A_2 и некоторых органических соединений — ДМСО и цитрала. Все три соединения — леворин, ДМСО и цитраль обладают антигрибковой и антибактериальной активностью [24, 25]. На рис. 5 показана химическая структура цитрала.

Исследования показали, что поверхностное натяжение водного раствора ещё больше уменьшается при введении в раствор цитрала. Цитраль относится к алифатическим терпеновым альдегидам, выделен из лемонграсового масла и является смесью двух геометрических цис-транс-изомеров, в зависимости от расположения двойной связи в структуре молекул различают его α - β -формы [26]. Цитраль существует в основном в виде двух изомеров — α изомера гераниала и β изомера нерала. В природных эфирных маслах цитраль существует в виде смеси изомеров с преобладанием гераниала.

В работе было исследовано изменение величины поверхностного натяжения водных растворов в сочетании с ДМСО и цитралем (масса 1 мл ДМСО равен 1 г, а масса 1 мл цитрала соответствует 1,25 г). Особенность этих исследований состоит в том, что поверхностное натяжение чистого раствора ДМСО в 2 раза, а исходного раствора цитрала более чем в 3 раза меньше, чем поверхностное натяжение воды. В табл. 2 приведены основные физико-химические характеристики воды, ДМСО и цитрала.

Установлено, что некоторые водорастворимые формы ПА, например, Na-соль леворина, уменьшают поверхностное натяжение водных растворов [22]. Максимальное изменение поверхностного натяжения составляет 30% по сравнению с натив-

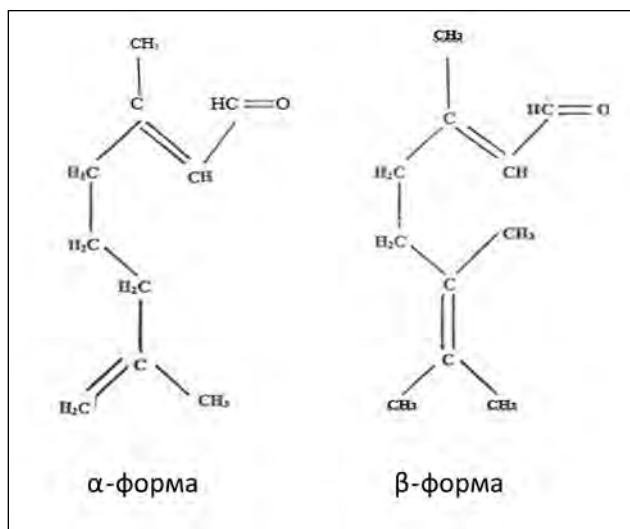


Рис. 5. Структура α и β форм цитрала [26].

ным [19]. Молекуле ДМСО присущи такие свойства, как амфифильность, полярность, высокая реорбция и быстрое проникновение в органы и ткани [28]. Нативный ДМСО хорошо смешивается с водой, эффективно воздействует на стабильность липидного матрикса клеточных мембран, оказывает корректирующее действие на лимфомикроциркуляцию и участвует в восстановлении нарушенных стафилококковым токсином функций лимфатических микрососудов [23]. В химической структуре ДМСО содержатся две метильные группы и сера, соединённая двойной связью с кислородом [29]. ПА в комплексе с ДМСО хорошо растворяются в воде. Из-за высокой разницы диэлектрической постоянной (см. таб. 2) цитраль плохо растворим в воде. Попадая в воду, цитраль образует коллоидно-дисперсную систему и, как показали эксперименты, оказывает влияние на поверхностное натяжение воды. На рис. 6 представлены результаты исследования поверхностного натяжения водных растворов в различных сочетаниях с ДМСО, леворином и цитралем.

Введение леворина в концентрации 1–10 мг/мл в раствор чистого ДМСО слабо влияет на его поверхностное натяжение. Поверхностное натяжение водных растворов существенно уменьшается в зависимости от концентрации вводимых в состав воды соединений (рис. 6). Как видно из рис. 6 независимое и совместное введение индивидуальных

Таблица 2. Основные физико-химические свойства воды, ДМСО и цитрала. Данные для воды и ДМСО взяты из работы [27]

Характеристики	Вода	ДМСО	Цитраль
Молекулярная масса, г/моль	18,02	78,13	152,2
Плотность при 20°C, г/см ³	0,9982	1,1014	0,890
Точка плавления	0,00	18,4	—
Точка кипения, °C	100,00	189,0	95–97
Коэффициент преломления при 20°C	1,3329	1,4770	1,4838
Поверхностное натяжение при 20°C, 10 ⁻³ × Н/м	72,75	46,2	29,4
Вязкость при 20°C, 10 ⁻³ × Па × с	1,002	2,20	3,40
Диэлектрическая постоянная при 20°C	80,20	48,9	4,36

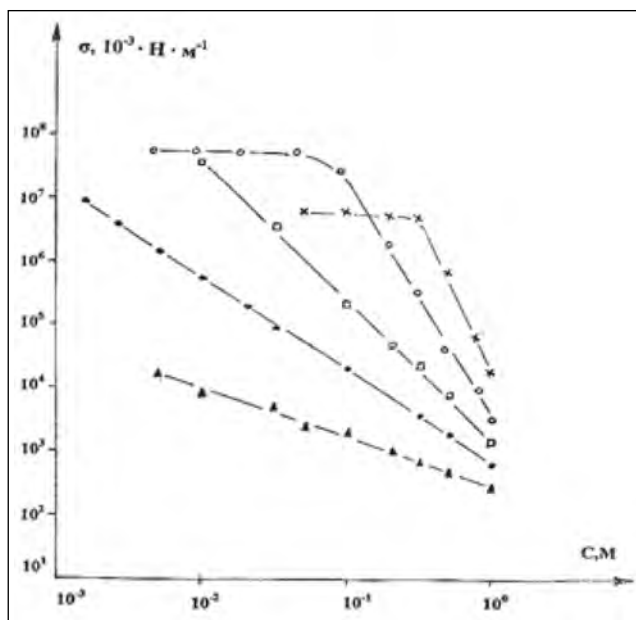


Рис. 6. Зависимость поверхностного натяжения водного раствора от концентрации вводимых поверхностно-активных веществ — цитраля, ДМСО и леворина A_2 в различных комбинациях.

Температура раствора 20°C . ● — цитраль; — ДМСО; ○ — ДМСО в комплексе с леворином A_2 (10 мг/мл); □ — ДМСО в комплексе с леворином A_2 (10 мг/мл) и цитралем (5% цитраля в ДМСО); ▲ — ДМСО в комплексе с цитралем (5% цитраля в ДМСО).

компонентов ДМСО и цитраля в воду специфически влияют на изменение величины поверхностного натяжения водных растворов. Так, например, цитраль более эффективно понижает поверхностное натяжение воды, чем ДМСО в комбинации с леворином. Такое поведение молекул цитраля и ДМСО в комплексе с леворином показывает сложный характер взаимодействия цитраля и ДМСО с молекулами воды.

Как было отмечено ранее, в процессе мышечной деятельности изменяется ряд физико-химических параметров мембран. Это, прежде всего, связано с усилением потока ионов через каналы мембран мышечных клеток, усилением проницаемости мембран для углеводов, изменением скорости доставки субстратов к клеточным мембранам. Мы предполагаем, что с помощью экзогенного мембраноактивного антибиотика леворина A_2 можно оказать влияние на указанные выше параметры.

Обсуждение

Исследования, проведенные с каналоформирующими соединениями, такими как грамицидин А, метилированный амфотерицин В, нистатин, микогептин и леворин на изолированных скелетных мышечных волокнах показали большое сходство по многим физико-химическим параметрам с БЛМ [30]. Холестеринсодержащие мембраны мышечных клеток оказались такими же чувствительными к

ПА, как и БЛМ. Исследования, проведенные на изолированных мышечных клетках и БЛМ показали, что из всех изученных ПА наибольшей эффективностью взаимодействия с мембранами имеет леворин A_2 [10, 30]. По степени возрастания эффективности взаимодействия антибиотиков с мембранами они располагаются в следующем порядке: нистатин < метиловый эфир амфотерицина В < микогептин < амфотерицин В < леворин [7]. В такой же ряд располагаются ПА по способности увеличивать ионную проницаемость БЛМ [7, 30]. Действие амфотерицина В с одной стороны мембран мышечных клеток, а также БЛМ и вызванная этим антибиотиком односторонняя проводимость, показало, что проводящие каналы формируются с одной стороны мембраны, что указывает на ассиметричное распределение проводящих каналов в мембране [7, 9]. Одинаковая селективность мембран при односторонней модификации леворином показывает, что возможной проводящей структурой является полупора. Образование ионпроводящих каналов под действием леворина и их относительно быстрая отмывка из мышечных мембран, чем при двухсторонней аппликации липидных мембран этим антибиотиком, предполагает, что односторонняя индукция проводимости в мембранах мышечных клеток и БЛМ связана с формированием полупор, которые способны шунтировать мембрану насквозь. Сравнительная характеристика действия полиенов на мембраны клеток и БЛМ показывает, что формируемые в мембранах мышечных клеток каналы идентичны каналам, наблюдаемым на бислойных мембранах.

Наибольший интерес представляют исследования, связанные с особенностями взаимодействия ПА с БЛМ и клеточными мембранами эритроцитов, лимфоцитов, тимоцитов и мышечных клеток. На изолированном мышечном волокне травяной лягушки *Rana temporaria* изучен индуцированный полиенами ионный транспорт [9]. Было показано, что амфотерицин В, метиловый эфир амфотерицина В, нистатин, микогептин и леворин усиливают рост проводимости мышечного волокна для катионов щелочных металлов — Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ [9, 20, 21, 30]. Предварительные исследования показали, что при определенных экспериментальных условиях с помощью леворина A_2 при действии его с одной стороны мембраны можно индуцировать трансмембранный перенос двухвалентных ионов Ca^{++} [31]. При этом селективность мембран для ионов кальция в присутствии леворина A_2 оказалась зависимой от концентрации липидов в мембраноформирующем растворе. Усиление транспорта ионов Ca^{++} под действием ПА было показано и в стеринсодержащих липосомах [28]. Результаты экспериментов по изучению проницаемости мембран для органических соединений показывают, что лево-

риновый канал имеет эффективный радиус ~ 4 Å. Эти данные согласуются с данными по определению размера диаметра леворинового канала, встроенного в эритроцитарные мембраны [29].

Эксперименты, проведённые с алкильными производными леворина A_2 , модифицированные по полярным карбоксильным и аминным группам показали, что подобная модификация не влияет на избирательную проницаемость мембран, а только определяет время пребывания антибиотика в мембране [7]. Модифицируя мембраны алкильными производными с разной длиной углеводородной цепи: $R-CH_3$ — метил; $R-C_2H_5$ — этил; $R-C_3H_7$ — пропил; $R-C_4H_9$ — бутил; $R-C_5H_{11}$ — амил, можно точно контролировать время нахождения антибиотика в мембране. Проведённые эксперименты на липидных мембранах показали, что с увеличением длины алкильной цепи производных леворина A_2 время нахождения их в мембране по сравнению с исходным леворином A_2 уменьшается [7]. Время пребывания антибиотика в мембране определялось по постоянной времени релаксации проводимости мембран после отмывки антибиотика из окружающего мембрану раствора.

Избирательная проницаемость липидных мембран зависит от структуры гидрофильной цепи полиеновой молекулы. Так, амфотерицин В, нистатин и микогептин эффективно увеличивают проницаемость мембран эритроцитов, лимфоцитов, тимоцитов и мышечных клеток при наличии их даже с одной стороны мембраны и при этом на мембранах наблюдается усиление потока для катионов щелочных металлов [15, 17, 30–32]. Изучение механизма избирательной проницаемости мембран для ионов и органических молекул в присутствии леворина является важным аспектом проводимых исследований. В химической структуре леворина A_2 имеются две положительно заряженные группировки (см. рис. 1). Казалось, что мембраны, модифицированные леворином, должны были обладать анионной селективностью. Однако каждый раз в экспериментах наблюдалась практически идеальная проницаемость для катионов щелочных металлов, а также при соответствующих экспериментальных условиях для двухвалентных ионов Ca^{++} [7, 28]. Не наблюдается корреляции избирательной проницаемости мембран с величиной проводимости и внутренним диаметром левориновых каналов. Отсюда следует, что ионная избирательность мембран в присутствии каналотормозящих молекул связана со структурой молекулярных групп, выстилающих внутреннюю полость канала. В молекуле микогептина на одну карбонильную группу больше, чем в молекулах амфотерицина В и нистатина. Через микогептиновые каналы анионы и катионы проникают примерно одинаково. В молекуле леворина на две карбонильные группы больше, чем в молекулах

амфотерицина В и нистатина, и в присутствии леворина уже наблюдается идеальная проницаемость мембран для катионов [7]. Проведённые исследования показали, что мембраны, модифицированные леворином A_2 с одной стороны мембраны, обладают такой же селективностью, как и при двухстороннем введении антибиотика. Эти данные, а также данные по зависимости проводимости мембран от концентрации леворина A_2 при асимметричной модификации мембран, говорят о том, что проводящей функционирующей единицей в мембране является полупора. Проводимость одиночных полупор примерно такая же, как и проводимость канала, образующаяся при двухстороннем введении антибиотика. Для расшифровки молекулярной природы катионной селективности левориновых каналов требуется синтез новых молекул с изменённой химической структурой молекул. Биологический синтез и химическая трансформация молекул ПА — вот реальный путь получения новых производных ПА с новыми физико-химическими свойствами [33]. Наибольший интерес представляет модификация полиеновой молекулы по гидрофильной цепи, составляющая внутреннюю полость канала, и, как показывают исследования, только эта система в молекулах полиенов отвечает за избирательную проницаемость мембран для ионов и органических соединений [8].

Биологическая активность ПА зависит не только от структуры молекул полиенов, но и от выбора растворителя. Водорастворимые формы ПА примерно в 10 раз менее эффективны, чем при введении в водную фазу антибиотиков в растворах ДМСО [7, 10]. Полиены с ДМСО формируют в водных растворах ассоциаты, состоящие из нескольких молекул антибиотиков, и только в такой форме они обладают высокой мембранной активностью [34]. Частота образования и размер агрегированных ассоциатов возрастает с увеличением концентрации ПА [35, 36]. Использование ПА в комплексе с ДМСО усиливает эффективность биологического действия ПА, увеличивает степень избирательного воздействия на мембраны. Введение ДМСО в водный раствор изменяет поверхностное натяжение мембран и, как показали исследования, одновременно изменяет чувствительность мембран к антибиотику. Результаты проведённых экспериментов на БЛМ показывают, что уменьшение поверхностного натяжения мембран под действием ДМСО оказывает влияние на рост числа каналов в мембране. 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 диэлектрическая проницаемость ДМСО ($\epsilon=48,9$) находится между водой и жирами (см. табл. 2), происходит уменьшение коэффициента распре-

деления ПА между мембраной и водой и, как следствие, резко снижается токсическое действие ПА. Отмывка ПА из мышечных клеток идёт с большей скоростью, чем из БЛМ [15, 21].

Изложенные выше результаты проведённых экспериментов позволяют высказать предположение о том, что путём 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, необходимых при мышечной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cho M.R., Thatte H.S., Silvia M.T. et al. Transmembrane calcium influx induced by alternating current (ac) electric fields. *FASEB J* 1999; 13: 677–683.
2. Hille B. In book: *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd Edn., Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2001.
3. MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett* 2003; 555: 62–65.
4. Никольский Н.Н. В кн.: Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия. Науч. труды Института Цитологии АН СССР. Л.: 1977. — Вып. 17. — С. 23–25. / *Nikolskiy N.N.* V kn.: Obshchiye mekhanizmi kletochnix reaktsiy na povrejdayushie vozdeystviya. Nauch. trudi Instituta Tsitologii AN SSSR. L.: 1977; 17: 23–25. [in Russian]
5. Duncan J.M., Hicks A.L., MacDonald J.R. et al. Muscle performance and enzymatic adaptations to sprint interval training. *J Appl Physiol* 1998; 84: 2138–2142.
6. Khassaf M., Child R.B., BmcArdle A. et al. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1031–1035.
7. Касумов Х.М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. Наука, М.: 2009. / *Kasumov Kh. M.* Struktura i membrannaya funktsiya poliyenovix makrolidnix antibiotikov. Nauka, 2009. [in Russian]
8. Samedova A.A. Tagi-zade T.P., Kasumov Kh.M. Dependence of ion channel properties formed by polyene antibiotics molecules on the lactone ring structure. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2018; 44 (3): 337–345.
9. Shvinka N. Cannel-formation in muscle fibre membrane compared ton artificial bilayer membranes. *Proc Latv Acad Sci* 2001; 56: 57–60.
10. Касумов Х.М. Открытие одиночных полиеновых каналов и изучение их свойств в мембранах. Lambert Academic Publishing. — 2020. — С. 1–541. / *Kasumov Kh.M.* Otkritie odinochnix poliyenivix kanalov i izuchenie ix svoystv v membranax. Lambert Academic Publishing 2020; 1–541. [in Russian]
11. Cybulska B., Bolard J., Seksek O. et al. Identification of the structural elements of amphotericin B and other polyene macrolide antibiotics of the heptaene group influencing the ionic selectivity of the permeability pathways formed in the red cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1240: 167–178.
12. Borowski E. Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmacology* 2000; 55: 206–208.
13. Filipova A.I., Shenin Yu.D. Physical and chemical properties of levorin components. *Antibiotics* [in Russian], 1974; 19 (1): 32–35.
14. Филиппова А.И., Лашков Г.И., Козел С.П., Шенин Ю.Д. Спектрофотометрическое исследование фотохимической изомеризации полиенового макролидного антибиотика леворина A_2 . Антибиотики и медицинская биотехнология. — 1987. — Т. 32. — С. 749–754. / *Filipova A.I., Lashkov G.I., Kozel S.P., Shenin Yu.D.* Spektrofotometricheskoe issledovanie fotohimicheskoy izomerizatsii poliyenovogo antibiotika levorina A_2 . Antibiotiki i Meditsinskaya Biotekhnologiya 1987; 32: 749–754. [in Russian]
15. Shvinka N., Caffner G. Cation conductance and efflux induced by polyene antibiotics in the membrane of skeletal muscle fiber. *Biophys J* 1994; 67: 143–152.
16. Kates M. Techniques of lipidology. In R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg (ed.), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier. Amsterdam. The Netherlands 1986; 3: 100–110, 163–164, 251–253.
17. Yu Z., Quinn P. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Bioscience Reports* 1994; 14: 259–281.
18. Зенин В.В. Проницаемость модифицированных амфотерицином В бислойных липидных мембран для неэлектролитов и ионов. Автореф. дис. канд. биол. наук. Л.: 1979. / *Zenin V.V.* Pronisayemost modifisirovannix amphoterisinom B bisloynix lipidnix membrane dlya neelektroli tov I onov. Avtoref. dis. kand. boil. Nauk. L.: 1979. [in Russian]
19. Липатников В.Е., Казаков К.М. Физическая и коллоидная химия. Москва. Изд. Высшая школа. — 1981. — С. 60–64. / *Lipatnikov V.E., Kazakov K.M.* Fizicheskaya i kolloidnaya khimiya. Moskva. Izd. Vsshaya shkola. 1981; 60–64. [in Russian]
20. Швинка Н.Э., Кафнер Г. Влияние амфотерицина В и нистатина на транспорт катионов в мембране мышечного волокна. Биологические мембраны. — 1989. — № 6. — С. 1216–1221. / *Shvinka N.E., Kafner G.* Vliyaniye amfoterisina B i nistatina na transport kationov v membrane mishechnogo volokna. Biologicheskiye Membrane 1989; 6: 1216–1221. [in Russian]
21. Швинка Н.Э., Кафнер Г. Исследование кинетики взаимодействия амфотерицина В с мембраной мышечного волокна. Биологические мембраны. — 1991. — № 8. — С. 1292–1303. / *Shvinka N.E., Kafner G.* Issledovaniye kinetiki vzaimodeystviya amfoterisina B s membranoy mishechnogo volokna. Biologicheskiye Membrane 1991; 8: 1292–1303. [in Russian]
22. Цыганов В. Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА. Вып. V. Санкт-Петербург. 1970. — С. 1–159. / *Tsiganov V.* Levorin i ego klinicheskoye primeneniye. Trudi LNIIA. Vi p. V. Sankt-Peterburg: 1970; 1–159. [in Russian]
23. Бриль Г.Е., Захарова Е.И. Влияние диметилсульфоксида на изменения лимфомикроциркуляции, вызванные стафилококковым токсином. Экспер и клин фармакол. — 1998. — Т. 61. — С. 54–56. / *Brill G.E., Zaxarova E.* Vliyaniye dimetilsulfoksida na izmeneniya limfomikrosirkulyasii, vizvannie stafilokokkovim toksinom. Ekspers i Klin. Farmakol 1998; 61: 54–56. [in Russian]
24. Maria Clerya Alvino Leite, André Parente de Brito Bezerra, Janiere Pereira de Sousa et al. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2014; 1–9.
25. Grela E., Zdybicka-Barabas A., Pawlikowska-Pawlega B. et al. Modes of the antifungal activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Sci Rep* 2019; 9 (1): 17029.
26. Горяев М., Плива И. Методы исследования эфирных масел. Изд. АН Казахской ССР. Алма-Ата: 1962. — С. 427–434. / *Goryayev M., Pliva I.* Metodi issledovaniya efirnix masel. Izd. AN Kazaxskoy SSR. Alma-Ata: 1962; 427–434. [in Russian]
27. Lide D. (ed) *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Baton Rou., 1990.
28. Yu Z., Quinn P. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide (Review). *Molecular Membrane Biology*. 1998; 15: 59–68.
29. Yu Z., Quinn P. Solvation on effects of dimethyl sulphoxide on the structure of phospholipid bilayers. *Biophysical Chem* 1998; 70: 35–39.
30. Shvinka N., Caffner G. Nystatin — mycoheptin — and levorin-induced conductance in the membrane of frog skeletal muscle fibres. *Eur Biophys J* 1995; 24: 23–30.
31. Ramos H., Attias de Murciano A., Cohen B. et al. The polyene antibiotic amphotericin B acts as a Ca^{++} ionophore in sterol-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1989; 982: 303–306.
32. Hartsel S.C., Benz S.K., Ayenew W. et al. Na^{+} , K^{+} and Cl^{-} selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics. *Eur Biophys J* 1994; 23: 125–132.
33. Aparicio J.F., Caffrey P., Gil J.A. et al. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 61: 179–188.
34. Coutinho A., Prieto M. Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study. *Biophysical Journal* 1995; 69: 2541–2557.
35. Mazerski J., Borowski E. Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water. *Biophysical Chem* 1996; 57: 205–217.
36. Gaboriau F., Cheron M., Petit C. et al. Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its *in vitro* toxicity: a new way to improve its therapeutic index. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 2345–2351.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Таги-заде Тахмина Парвизовна — к. м. н., доцент кафедры медико-биологических наук Азербайджанской Государственной Академии Физической Культуры и Спорт, Баку, Азербайджан

Касумов Халил Мамедович — д. б. н., профессор, член-корреспондент Национальной Академии Наук Азербайджанской Республики, главный научный сотрудник лаборатории «Биофизика клетки» Института ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан