

УДК 577.352

# Исследование каналообразующей активности полиеновых антибиотиков в липидных бислоях с использованием дипольных модификаторов

С. С. Ефимова\*, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

\*E-mail: ssefimova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2014

**РЕФЕРАТ** В работе исследована роль мембранных компонентов, стерина, фосфолипидов и сфинголипидов в процессах формирования и функционирования ион-проницаемых нанопор, образуемых противогрибковыми макролидами, амфотерицином В, нистатином и филипином, в модельных мембранах. В качестве инструмента для выяснения молекулярных механизмов использованы дипольные модификаторы, флавоноиды и стироловые красители. Показано, что введение в мембраноомывающие растворы дипольных модификаторов приводит к изменению проводимости одиночных каналов и равновесного трансмембранного тока, индуцированного полиеновыми антибиотиками в стеринсодержащих фосфолипидных бислоях. Установлено, что проводимость одиночных амфотерициновых каналов зависит от дипольного потенциала мембраны. Использование набора различных фосфолипидов, стерина и полиеновых антибиотиков позволило заключить, что геометрия фосфолипидной молекулы, наличие двойных связей в 7- и 22-положениях молекулы стерина, число сопряженных двойных связей и наличие аминокислоты в молекуле антибиотика определяют стабильность полиен-липидных комплексов, образующих проводящие трансмембранные поры. Представленные в работе экспериментальные и литературные данные позволяют сделать предположение о связи каналообразующей активности полиеновых антибиотиков с физико-химическими свойствами обогащенных полиеновыми макролидами упорядоченных мембранных областей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** плоские липидные бислои, полиеновые антибиотики, стерин, стироловые красители, сфинголипиды, флавоноиды, фосфолипиды.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АМВ – амфотерицин В; НС – нистатин; ФЛ – филипин; ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДФФС – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин; ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДОФС – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин; ДОФЭ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин; ЛР-ДПФЭ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-*N*- (лиззаминродамин); Хол – холестерин; Эрг – эргостерин; ДХол – 7-дегидрохолестерин; Стигм – стигмастерин; СФС – *N*-стеароил-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae*; СМ – сфингомиелин из мозга свиней; СЭС – *N*-стеароил-*D*-эритро-сфинганин.

## ВВЕДЕНИЕ

Макролидные полиеновые антибиотики – одни из самых эффективных препаратов, применяемых при грибковых инфекциях, глубоких системных микозах, они широко используются в клинической медицине уже много десятилетий. Интерес к полиеновым макролидам обусловлен также их противоопухолевой и противовирусной активностью [1–3]. Несмотря на большое число побочных эффектов, таких, как нефротоксичность, анемия, сердечная аритмия [4, 5], полиеновые макролиды остаются препаратами выбора для лечения пациентов с иммунодефицитным статусом [6, 7]. Современные фар-

мацевтические технологии разработки препаратов на основе полиеновых макролидов направлены на снижение действующей концентрации антибиотика без ущерба для его терапевтической эффективности.

Основными представителями класса неароматических макролидных полиеновых антибиотиков являются амфотерицин В (АМВ) [8], нистатин (НС) [9, 10] и филипин (ФЛ) [11]. В состав лактонного кольца молекулы амфотерицина В входят 38 углеродных атомов (рис. 1). Гидрофильная и гептаеновая цепи в макролактонном кольце молекулы АМВ представлены углеродными атомами  $C_1-C_{15}$  и  $C_{20}-C_{33}$  соответ-

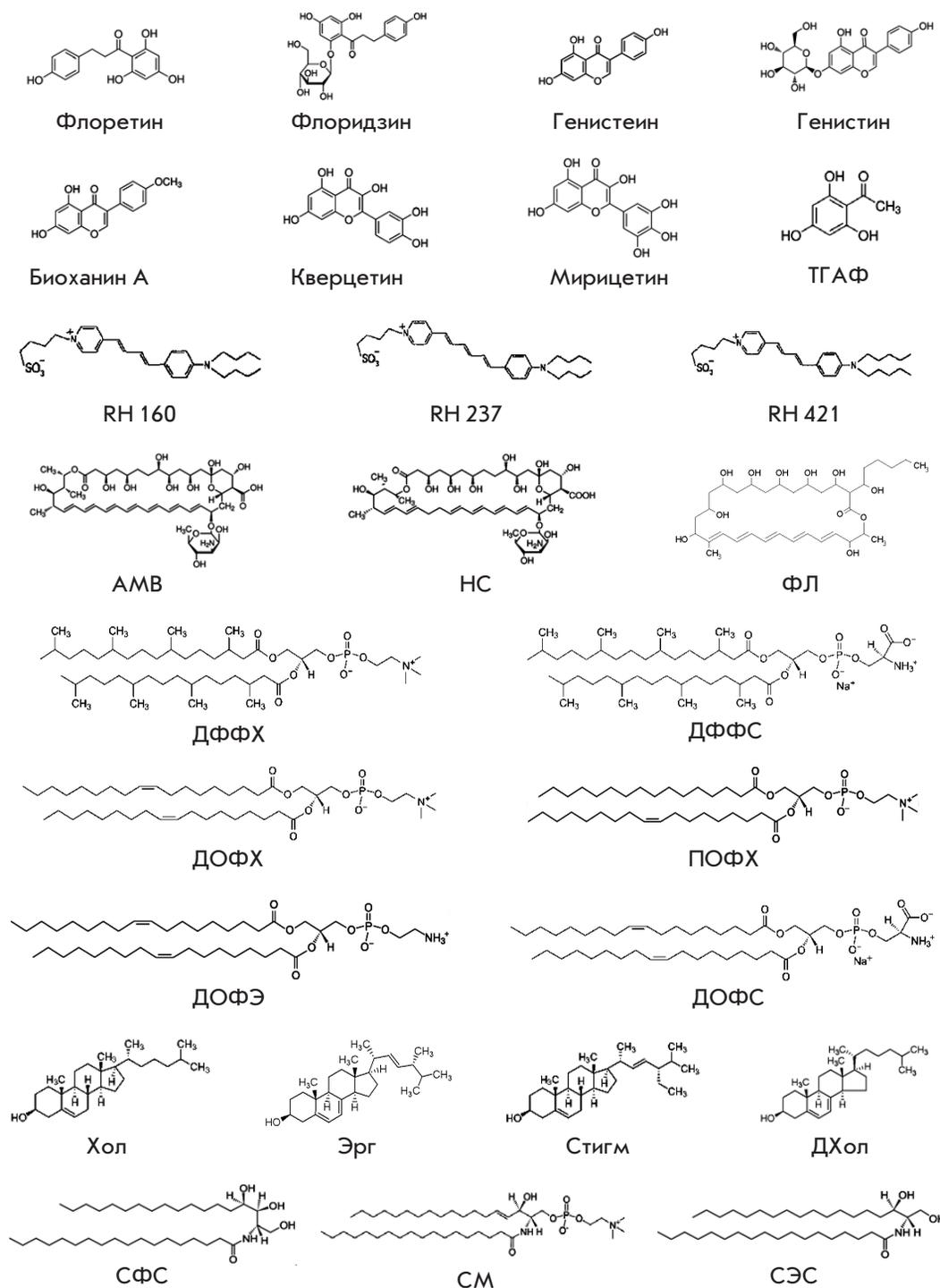


Рис. 1. Химическая структура флавоноидов флоретина, флоридзина, генистеина, генистина, биоханина А, кверцетина, мирицетина и ТГАФ, стироловых красителей RH 160, RH 237 и RH 421, полиенов АМВ, НС и ФЛ, фосфолипидов ДФФХ, ДФФС, ДОФХ, ПОФХ, ДОФЭ и ДОФС, стерина Хол, Эрг, ДХол и Стигм, сфинголипидов СФС, СМ и СЭС

ственно. Эти цепи располагаются параллельно друг другу. Гептаеновая цепочка  $C_{20}-C_{33}$  – жесткая система, состоящая из семи двойных связей. В гидрофильной цепи молекулы АМВ содержатся гидроксильные и карбонильные группы. Гидроксильные группы в гидрофильной области молекулы расположены в одной плоскости. В положениях 6 и 19 находятся

карбоксильная группа и остаток микоамина соответственно. Еще одна гидроксильная группа локализована в гидрофобной части молекулы в положении 35. Химическая структура молекулы нистатина, относящегося к классу тетраенов, близка к структуре АМВ. Нистатин отличается от АМВ положением гидроксильных групп в гидрофильной цепи и преры-

вистостью системы сопряженных двойных связей, насыщенная связь разделяет хромофор на диеновый и тетраеновый участки. Филиппин относится к классу метилпентаенов, он отличается от АМВ и НС меньшим размером полиенового фрагмента, а также отсутствием аминсахарного остатка [12].

Считается, что клетки-мишени гибнут благодаря способности полиеновых антибиотиков связываться с их плазматическими мембранами, формировать в них трансмембранные поры и нарушать водно-электролитный баланс. Обязательное условие образования пор – наличие стерина в мембранах клеток-мишеней [8, 13, 14]. Несмотря на 40-летнее исследование молекулярных механизмов формирования и функционирования АМВ-канала, его точная молекулярная архитектура все еще находится на стадии обсуждения. Предложены различные модели АМВ-канала, из которых наиболее популярна стерин-зависимая модель, в рамках которой образование канала при двусторонней относительно мембраны добавке антибиотика происходит при ассоциации двух «полупор», образованных полиен-стериновыми комплексами, расположенными в противоположных монослоях [8, 13, 15]. Полупора, имеющая цилиндрическую форму, образуется одинаковым числом (от 7 до 10) молекул антибиотика и стерина, ориентированных перпендикулярно плоскости мембраны. Полость поры выстлана гидрофильными цепочками лактонового кольца. Сквозная трансмембранная пора формируется за счет образования водородных связей между гидроксильными группами молекул АМВ, сосредоточенных во взаимодействующих полупорах [12].

Стерин-зависимая мембранная активность амфотерицина В указывает на то, что терапевтическая эффективность АМВ прежде всего связана с его неодинаковой специфичностью в отношении различных стерина клеточных мембран. Как известно, холестерин (Хол) является основным стерина мембран клеток млекопитающих, а эргостерин (Эрг) – клеток грибов. До сих пор не ясно, обусловлена ли специфичность взаимодействия полиенов с мембранами различных клеток большей стабильностью комплекса АМВ с Эрг по сравнению с Хол или наблюдаемые эффекты опосредованы различным влиянием этих стерина на структурные и динамические свойства мембран [16, 17].

Данные Нейман и соавт. [18, 19] свидетельствуют в пользу первой гипотезы. Более жесткая и удлиненная молекулярная геометрия Эрг по сравнению с Хол облегчает взаимодействие Эрг с молекулой АМВ. Принимая во внимание тот факт, что сила Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий стержнеобразных молекул зависит от их взаимной ориен-

тации и достигает максимума, когда обе молекулы лежат в одной плоскости и параллельны друг другу,  $\pi$ - $\pi$ -электронное взаимодействие между двойной связью в боковой цепи Эрг и полиеновым хромофором АМВ может быть дополнительной точкой, необходимой для стабилизации правильной ориентации комплекса (рис. 2А,Б) [20]. В случае Хол не только энергия комплексообразования больше (нет двойной связи в боковой цепи молекулы стерина), но также должны быть компенсированы энтропийные потери, связанные с уменьшением конформационной гибкости боковой цепи стерина. Результаты исследования подвижности молекул АМВ и стерина в фосфолипидных бислоях методом 2Н-ЯМР, проведенные Матсумори и соавт. [21], подтвердили гипотезу о более сильном межмолекулярном взаимодействии АМВ с Эрг по сравнению с Хол.

Стерины определяют текучесть мембран и преимущественно локализуются в более упорядоченных мембранных областях – липидных рафтах, что может служить основанием для принятия второй гипотезы. Показано, что АМВ имеет более высокое сродство к стеринсодержащей упорядоченной фазе и, следовательно, может, как и стерины, аккумулироваться в липидных рафтах [17, 22]. Целый ряд работ указывает на увеличение упорядоченности Хол-содержащих мембран в присутствии АМВ и в отсутствие подобного эффекта в случае мембран, включающих Эрг [17, 23, 24].

Кжуб и Багинский [17] показали, что отрицательно заряженная карбоксильная группа ( $\text{COO}^-$ ) в молекуле АМВ смещена в сторону водной фазы по сравнению с протонированной аминогруппой ( $\text{NH}_3^+$ ). Авторы предположили, что диполь полярной головы АМВ ( $\text{COO}^- \rightarrow \text{NH}_3^+$ ) стремится ориентироваться параллельно диполям полярных голов фосфатидилхолина и соответственно приводит к росту дипольного потенциала мембраны. Это скачок потенциала, возникающий на границе раздела фаз бислоя–раствор в результате определенной взаимной ориентации диполей мембранных липидов и околомембранной воды [25–27] и играющий существенную роль в регуляции транспорта веществ через мембрану.

Как было отмечено, макролидные полиеновые антибиотики проявляют противогрибковый эффект, связываясь с мембранными стеринами, но при этом информации об участии других мембранных компонентов, в частности фосфолипидов и сфинголипидов, мало. Существует ряд свидетельств в пользу того, что фосфолипиды влияют на активность полиеновых антимикотиков. Согласно опубликованным данным, полиеновые антибиотики способны образовывать трансмембранные поры в бислое и в отсутствие в нем стерина [28–32]. Фуджи и соавт. [33] показали,

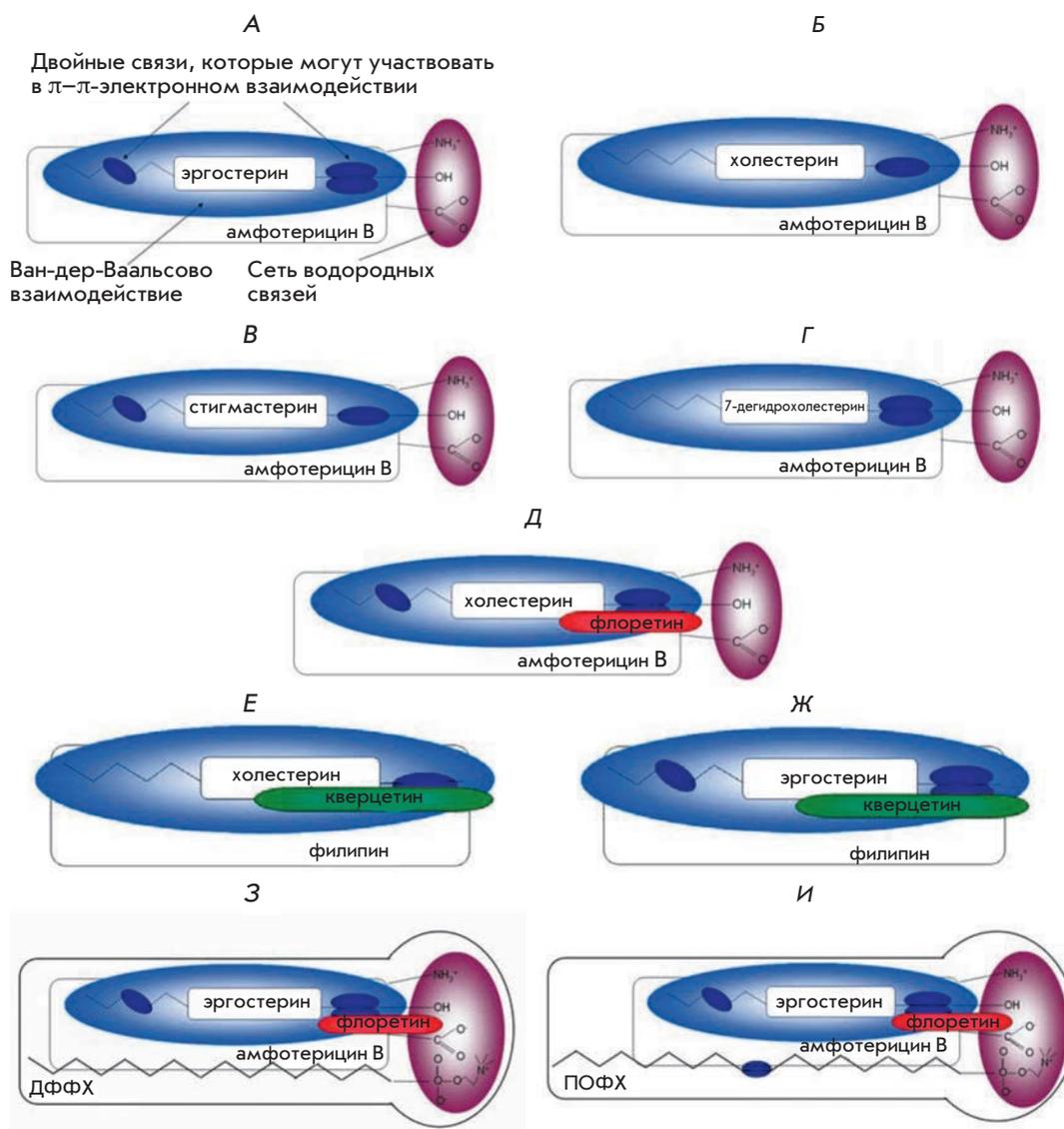


Рис. 2. Схематическое представление межмолекулярных связей, образующихся в комплексах АМВ-Эрг (А), АМВ-Хол (Б), АМВ-Стигм (В), АМВ-ДХол (Г), АМВ-Хол с флоретином (Д), ФЛ-Хол с кверцетином (Е), ФЛ-Эрг с кверцетином (Ж), АМВ-Эрг-ДФФХ с флоретином (З) и АМВ-Эрг-ПОФХ с флоретином (И). Комплексы АМВ-Хол и АМВ-Эрг по [20] с изменениями

что молекула АМВ может специфически взаимодействовать с молекулами фосфолипидов. Дуфорк и соавт. [34], основываясь на результатах 2Н-ЯМР-исследования липосом из димиристоилфосфатидилхолина с АМВ, отметили упорядочивание ацильных цепей молекул этого липида при взаимодействии с АМВ. Кроме того, на основе анализа спектров кругового дихроизма АМВ в липосомах в отсутствие стерина Балакришнан и Еашаран [35] предположили существование в бислое организованной многомолекулярной структуры, в которой АМВ взаимодействует с ацильными цепями молекул дипальмитоилфосфатидилхолина в соотношении 1 : 1. Результаты исследований, проведенных Фурниер и соавт. [36] методом дифференциальной сканирующей калориметрии, показали, что АМВ индуцирует разделение фаз в мембране, а именно в присутствии АМВ

в липосомах из дипальмитоилфосфатидилхолина выявляются одновременно три фазы. Первая фаза соответствует чистому фосфолипиду, вторая и третья характеризуются фазовым переходом в широком диапазоне температур выше температуры фазового перехода чистого фосфолипида. Более того, Паке и соавт. [23] показали дозозависимое увеличение температуры фазового перехода липидов из геле- в жидкокристаллическое состояние в присутствии АМВ. Мийо и соавт. [37] предположили, что молекулы АМВ взаимодействуют с полимолекулярными фосфолипидными ансамблями. Результаты Штернала и соавт. [38], полученные с использованием методов молекулярной динамики, не противоречат гипотезе о взаимодействии полярных голов АМВ и димиристоилфосфатидилхолина. Такое взаимодействие отмечено, в частности, между карбоксильной группой АМВ

и аминокгруппой липида. Херец и соавт. [39] предположили, что водородные связи между горизонтально ориентированными молекулами АМВ и полярными группами липидов приводят к конденсации бислоя.

Нам удалось найти только косвенные свидетельства возможного взаимодействия между полиеновыми макролидами и мембранными сфинголипидами. Например, Загер [40] показал, что полиеновые антибиотики влияют на концентрацию фосфолипидов и церамидов в плазматической мембране. Наджиек и соавт. [41] установили, что мутантный штамм *Saccharomyces cerevisiae*, способный расти без образования сфинголипидов, более восприимчив к АМВ, чем клетки дикого типа. Изучение влияния сфинголипидного состава мембраны на активность полиеновых макролидов представляет интерес еще и потому, что сфинголипиды, так же как стеринны и полиены, локализуются в липидных рафтах [17].

Целью представленной работы было установление молекулярных механизмов образования полиеновых трансмембранных пор в мембранах, содержащих различные фосфолипиды, стеринны и сфинголипиды. В качестве инструментов исследования использованы дипольные модификаторы – соединения, способные изменять величину дипольного потенциала мембран, а именно флавоноиды и стироловые красители. Основанием для применения дипольных модификаторов послужили данные об их успешном применении при исследовании процессов формирования и функционирования ионных каналов в модельных и клеточных мембранах [42–51].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

В работе использовали следующие реактивы: КСl, НЕРЕС, пентан, этанол, хлороформ, диметилсульфоксид (ДМСО), гексадекан и сквален, флоретин, флоридзин, генистин, генистеин, кверцетин, мирицетин, биоханин А, 2',4',6'-моногидрат тригидроксиацетофенона (ТГАФ), RH 421 и амфотерицин В (АМВ), нистатин (НС) и филиппин (ФЛ) (Sigma, США); RH 160 и RH 237 (Molecular Probes, США); 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДФФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин (ДОФЭ), холестерин (Хол), эргостерин (Эрг), 7-дегидрохолестерин (ДХол), стигмастерин (Стигм), N-стеароил-фитосфингозин из *S. cerevisiae* (СФС), сфингомиелин из мозга свиней (СМ), синтетический сфинголипид N-стеароил-

D-эритро-сфинганин (СЭС) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиззаминродамин) (ЛР-ДПФЭ) (Avanti Polar Lipids, США). Химические структуры флавоноидов, стироловых красителей, полиенов, фосфолипидов, стериннов и сфинголипидов показаны на рис. 1.

### Регистрация токов, протекающих через плоские липидные бислои

Формирование бислойных липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера [52] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстиях в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки – 10 мкм, диаметр отверстия – около 50 мкм. Перед началом процесса формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Монослои формировали на границе вода–воздух из раствора 1 мг/мл липида в пентане. Для образования монослоев использовали смеси фосфолипид : стерин или фосфолипид : эргостерин : сфинголипид в молярных соотношениях 67 : 33 моль % или 53 : 27 : 20 моль % соответственно. Каналообразующую активность полиенов измеряли при одинаковом ионном составе водных растворов электролита (2.0 М КСl), кислотность растворов (рН 7.0) поддерживали буферной смесью 5 мМ Нерес-КОН.

Полиеновые антибиотики добавляли к водной фазе обоих отделений камеры: АМВ и НС из раствора в ДМСО  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М соответственно и ФЛ из раствора в этаноле  $10^{-4}$  М до конечной концентрации в околосмембранных растворах  $10^{-8}$ – $10^{-6}$  М. Двустороннее введение полиеновых антибиотиков обусловлено тем, что согласно [8, 13, 15], каналы формируются из двух ассоциированных полупор. Конечная концентрация спирта или ДМСО в камере не превышала 0.1% и не вызывала изменения стабильности проводимости мембраны.

Флавоноиды флоретин, флоридзин, генистин, генистеин, кверцетин, мирицетин, биоханин А и ТГАФ вводили в оба отделения камеры из миллимолярных растворов в этаноле или ДМСО, до конечной концентрации в околосмембранных растворах 20 мкМ, а стироловые красители RH 160, RH 237 и RH 421 – до концентрации 5 мкМ.

Ток, протекающий через бислойную липидную мембрану, измеряли в режиме фиксации потенциала. Для подачи трансмембранного потенциала (*V*) и отведения сигнала с мембраны использовали хлор-серебряные электроды (Ag/AgCl), соединенные с растворами камеры через мостики с 1.5% агарозой в растворе 2 М КСl. Положительным считали потен-

циал, вызывающий поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре.

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

Среднее отношение ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ ) равновесного интегрального трансмембранного тока, индуцированного каналобразующим агентом (АМВ, НС и ФЛ) в присутствии ( $I_{\infty}$ ) и в отсутствие дипольных модификаторов ( $I_{\infty}^0$ ), определяли как среднее арифметическое значение  $I_{\infty}/I_{\infty}^0$  при измерении от трех до девяти бислюев (среднее  $\pm$  SE). Равновесное число функционирующих в мембране каналов определяли как отношение равновесного трансмембранного тока ( $I_{\infty}^0$ ) к току, протекающему через одиночный канал ( $i$ ).

Проводимость одиночных каналов ( $g$ ) определяли как отношение протекающего через одиночный канал тока ( $i$ ) к трансмембранной разности потенциалов ( $V$ ). Для построения гистограмм флуктуаций тока значения трансмембранных токов определяли по изменениям амплитуды тока при открывании (или закрывании) одиночных каналов. Общее число событий ( $N$ ), используемых для анализа при фиксированном значении трансмембранного потенциала, составляло от 100 до 5000. По оси ординат откладывали относительные частоты значений трансмембранного тока  $n/N$ . Все пики на гистограммах аппроксимировали плотностью нормального распределения. В качестве критерия проверки гипотезы о законе распределения использовали критерий  $\chi^2$  ( $P < 0.05$ ).

### Измерение селективности каналов

При измерении катион-анионной селективности каналов на мембране создавали 10-кратный градиент концентрации электролита KCl. Измерение селективности АМВ-каналов проводили при концентрациях растворов 2.0 и 0.2 М KCl в *цис*- и *транс*-отсеках экспериментальной камеры соответственно. Число переноса для анионов ( $t^-$ ) ( $t^- + t^+ = 1$ ) рассчитывали согласно уравнению Гендерсона [53]:

$$V^{rev} = (RT/F)(1-2t^-)\ln(C_{\text{цис}}/C_{\text{транс}}), \quad (1)$$

где  $V^{rev}$  – потенциал реверсии, соответствующий нулевому трансмембранному току при заданном от-

ношении концентраций проникающих ионов с *цис*- и *транс*-стороны мембраны ( $C_{\text{цис}}/C_{\text{транс}}$ );  $R$  – универсальная газовая постоянная ( $R = 8.31$  Дж/(моль·К));  $T$  – термодинамическая температура ( $T = 294$  К);  $F$  – число Фарадея ( $F = 96485$  Кл/моль).

### Конфокальная микроскопия гигантских одноламеллярных липосом

Гигантские одноламеллярные липосомы изготавливали методом электроформации с помощью Nanion vesicle prep pro (Германия) (стандартный протокол, напряжение 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, 25°C). Латеральное фазовое разделение визуализировали путем введения флуоресцентного зонда ЛР-ДПФЭ в исходный липидный раствор ПОФХ в хлороформе (11 мМ). Концентрация ЛР-ДПФЭ в образце составляла 1 моль %. Полученную суспензию липосом разделяли на аликвоты. В качестве контроля использовали аликвоту без АМВ. Экспериментальные образцы содержали 100 или 300 мкМ АМВ. Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив 100.0×/1.4 НСХ PL в Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Аро (Leica Microsystems, Германия). Препараты наблюдали при температуре 25°C. Свечение ЛР-ДПФЭ возбуждали светом с длиной волны 543 нм (гелий-неоновый лазер). Известно, что ЛР-ДПФЭ в бислюе с фазовым разделением встраивается преимущественно в жидкую неупорядоченную фазу [54], в то время как жидкая упорядоченная и твердая упорядоченная (гель) фазы остаются неокрашенными [55]. Для каждой системы проводили как минимум четыре независимых эксперимента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние дипольных модификаторов на проводимость одиночных амфотерициновых каналов

На *рис. 3* приведены примеры записей флуктуаций трансмембранного тока, протекающего через одиночные АМВ-каналы в ДФФХ: Хол-мембранах (*рис. 3, левый столбец*) и ДФФХ: Эрг-бислюях (*рис. 3, правый столбец*), до и после введения дипольных модификаторов, флавоноидов (флоретина и кверцетина) и стироловых красителей (RH 160, RH 237 и RH 421). Из *рис. 3А,Б* видно, что ток, протекающий через одиночные АМВ-каналы в отсутствие дипольных модификаторов не зависит от вида стерина (Хол или Эрг) в мембране. Введение в мембраноомывающие растворы флоретина вызывает уменьшение трансмембранного тока, протекающего через одиночные АМВ-каналы, как в ДФФХ: Хол-мембранах, так и в ДФФХ: Эрг-бислюях (*рис. 3В,Г*). При этом до-

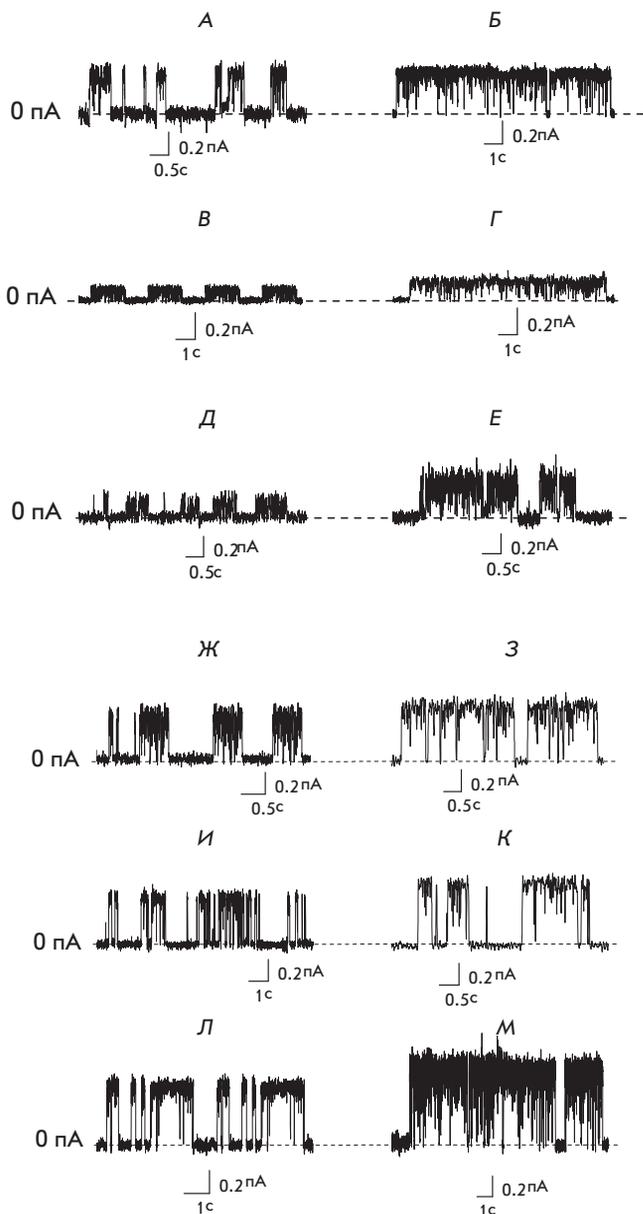


Рис. 3. Записи флуктуаций трансмембранного тока, протекающего через одиночные АМВ-каналы в липидных бислоях. Мембраны сформированы из ДФФХ : Хол (67 : 33 моль %) и ДФФХ : Эрг (67 : 33 моль %) в растворах 2.0 М КСl (рН 7.0). А, Б – контроль (отсутствие дипольных модификаторов). Мембраноомывающий раствор содержит (мкМ): 20 флоретина (В, Г), 20 кверцетина (Д, Е), 5 RH 160 (Ж, З), 5 RH 237 (И, К), 5 RH 421 (Л, М). Штриховые линии соответствуют 0 пА. V = 50 мВ

бавка кверцетина уменьшает трансмембранный ток, протекающий через АМВ-каналы в ДФФХ : Хол-мембранах, и не влияет на трансмембранный ток, протекающий через АМВ-каналы в ДФФХ : Эрг-мембранах (рис. 3Д,Е). Введение в мембраноомыва-

Таблица 1. Отношения проводимостей одиночных амфотерициновых каналов в отсутствие и в присутствии различных дипольмодифицирующих агентов при V = 50 мВ ( $g/g_{V=50}$ ). Мембраны сформированы из ДФФХ : Хол (67 : 33 моль %) и ДФФХ : Эрг (67 : 33 моль %) в растворах 2.0 М КСl (рН 7.0)

Дипольный модификатор		Мембранообразующий раствор	
		ДФФХ : Хол	ДФФХ : Эрг
Флавоноид	Флоретин	3.30 ± 0.21	2.20 ± 0.41
	Флоридзин	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10
	Кверцетин	1.72 ± 0.21	0.95 ± 0.15
	Генистеин	0.98 ± 0.09	–
	Генистин	0.96 ± 0.08	–
	Биоханин А	0.89 ± 0.11	–
	ТГАФ	0.91 ± 0.15	–
Стириловый краситель	RH 421	0.69 ± 0.07	0.49 ± 0.06
	RH 237	0.71 ± 0.08	0.61 ± 0.05
	RH 160	0.80 ± 0.09	0.63 ± 0.06

ющие растворы стириловых красителей серии RH вызывает увеличение трансмембранного тока, протекающего через одиночные АМВ-каналы: ток возрастает в ряду RH 160 < RH 237 < RH 421 как в случае ДФФХ : Хол-мембран (рис. 3Ж,И,Л), так и в случае ДФФХ : Эрг-бислоев (рис. 3З,К,М).

В табл. 1 представлены отношения проводимостей одиночных АМВ-каналов в отсутствие и в присутствии дипольмодифицирующих агентов при трансмембранном потенциале, равном 50 мВ ( $g/g_{V=50}$ ). Приведенные в табл. 1 результаты показывают, что флоретин уменьшает проводимость одиночных АМВ-каналов в ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-мембранах в 3 и 2 раза соответственно. При этом добавка кверцетина уменьшает проводимость одиночных АМВ-каналов в 1.7 раза в ДФФХ : Хол-мембранах и практически не изменяет  $g$  в случае ДФФХ : Эрг-бислоев. Видно, что добавка в мембраноомывающие растворы других флавоноидов: флоридзина, биоханина А, ТГАФ, генистина или генистеина практически не влияет на проводимость АМВ-каналов. Введение в мембраноомывающие растворы стириловых красителей вызывает увеличение  $g$  в ряду RH 160, RH 237 и RH 421 в ДФФХ : Хол-мембранах в 1.3, 1.4 и 1.5 раза и в ДФФХ : Эрг-бислоях – в 1.6, 1.7 и 2.1 раза соответственно.

В табл. 2 представлены величины изменения дипольного потенциала ДФФХ : Хол- и ДФФХ :

**Таблица 2.** Изменение дипольного потенциала ( $\Delta\varphi_d(\infty)$ , мВ) ДФФХ : Хол (67:33 моль %)\* или ДФФХ : Эрг (67:33 моль %)\* мембран в присутствии различных дипольмодифицирующих агентов

Дипольный модификатор		Мембранообразующий раствор	
		ДФФХ : Хол	ДФФХ : Эрг
Флавоноид, 20 мкМ	Флоретин	$-75 \pm 10$	$-150 \pm 5$
	Флоридзин	$-45 \pm 10$	$-50 \pm 10$
	Кверцетин	$-110 \pm 10$	$-105 \pm 15$
	Генистеин	$-35 \pm 5$	$-40 \pm 10$
	Генистин	$-30 \pm 5$	–
	Биоханин А	$-75 \pm 15$	$-80 \pm 15$
	ТГАФ	$-40 \pm 10$	$-40 \pm 10$
Стириловый краситель, 5 мкМ	RH 421	$50 \pm 8$	$57 \pm 9$
	RH 237	$75 \pm 10$	$85 \pm 5$
	RH 160	$55 \pm 10$	$45 \pm 5$

\*Результаты взяты из [69].

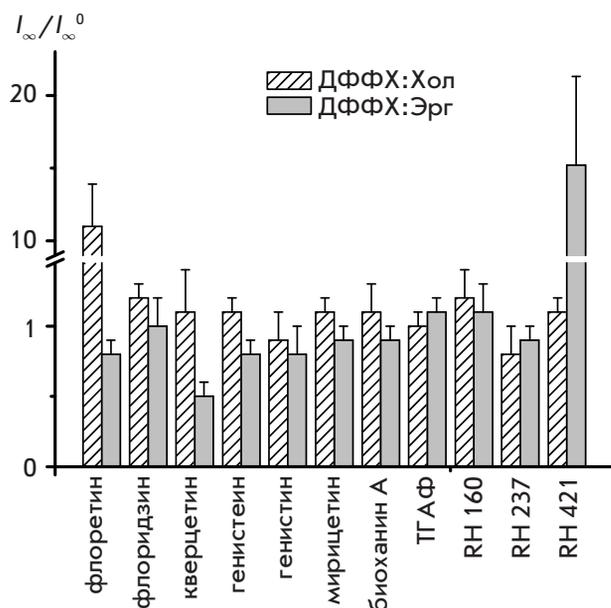
Эрг-бислоев в присутствии использованных дипольных модификаторов в мембраноомывающих растворах. Так, например, флоретин уменьшает дипольный потенциал ДФФХ : Хол-мембран на  $75 \pm 10$  мВ, а ДФФХ : Эрг-бислоев на  $150 \pm 5$  мВ. Добавка кверцетина в мембраноомывающие растворы приводит к практически одинаковому падению  $\varphi_d$  Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-бислоев на  $100 \pm 15$  мВ. Введение в мембраноомывающие растворы генистина и ТГАФ слабо влияет на  $\varphi_d$  ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-бислоев. Добавка в околосмембранные растворы стириловых красителей серии RH приводит к росту дипольного потенциала мембран, при этом способность увеличивать дипольный потенциал стеринсодержащих мембран возрастает в ряду RH 421  $\approx$  RH 160 < RH 237. Добавка в околосмембранные растворы стирилового красителя RH 237 увеличивает  $\varphi_d$  стеринсодержащих бислоев на  $80 \pm 10$  мВ независимо от стеринового состава мембраны. При этом RH 421 или RH 160 в мембраноомывающих растворах увеличивают дипольный потенциал ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-мембран на  $55 \pm 10$  мВ и  $50 \pm 10$  мВ соответственно. Сравнение величин, приведенных в табл. 1 и 2, указывает на корреляцию изменений проводимости одиночных АМВ-каналов и дипольного потенциала стеринсодержащих ДФФХ-бислоев при введении дипольных модификаторов. Полученные результаты позволяют

предположить, что изменение  $g$  при введении флоретина или стириловых красителей в растворы, омывающие Хол- и Эрг-содержащие ДФФХ-мембраны, и кверцетина в растворы, омывающие ДФФХ : Хол-бислой, может быть связано с изменением дипольного потенциала мембран. Выявленные несоответствия между изменениями проводимости одиночных АМВ-каналов и дипольного потенциала стеринсодержащих ДФФХ-бислоев при введении дипольных модификаторов позволяют утверждать, что изменение  $g$  обусловлено не только варьированием дипольного потенциала бислоя, но может быть результатом взаимодействия дипольных модификаторов (флоретина, кверцетина и/или стириловых красителей) с комплексами АМВ-Хол и/или АМВ-Эрг.

На рис. 2 схематически представлены межмолекулярные связи в полиен-стериновых комплексах. Известно, что полиен-стериновые комплексы образуются за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий [19]. Сила взаимодействия в этом случае зависит от параллельности и копланарности молекул полиена и стерина. Взаимная ориентация молекул происходит благодаря образованию водородных связей между ОН-группой молекулы стерина и аминокислотом молекулы полиена. Присутствие дополнительных (по сравнению с Хол) двойных связей в стероидном ядре и боковой цепи молекулы Эрг приводит к образованию более стабильного комплекса АМВ-Эрг за счет дополнительных точек  $\pi$ - $\pi$ -электронного взаимодействия по сравнению с комплексом АМВ-Хол [20] (рис. 2А,Б). По этим причинам комплексы АМВ-Эрг и АМВ-Хол могут по-разному взаимодействовать с дипольными модификаторами.

**Влияние дипольных модификаторов на индуцированную полиеновыми антимикотиками мультиканальную проводимость мембран**

*Варьирование стеринового состава.* Для проверки предположения о взаимодействии дипольных модификаторов с полиен-стериновыми комплексами изучили влияние дипольмодифицирующих агентов на равновесный трансмембранный ток, индуцированный амфотерицином В. Среднее отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного АМВ в Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-бислоях, после и до введения различных дипольных модификаторов ( $I_\infty/I_\infty^0$ ), при трансмембранном напряжении 50 мВ представлено в виде диаграммы на рис. 4. Добавка флоретина в мембраноомывающие растворы вызывает существенное увеличение равновесного трансмембранного тока, индуцированного АМВ ( $I_\infty$ ) в ДФФХ : Хол-бислоях. В ДФФХ : Эрг-



**Рис. 4.** Отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного амфотерицином В в стерин-содержащих бислоях, после и до введения различных дипольных модификаторов ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ ). Мембраны сформированы из ДФФХ : Хол (67 : 33 моль %) или ДФФХ : Эрг (67 : 33 моль %) и оmyваются 2.0 М КСl (рН 7.0)

мембранах влияние флоретина на  $I_{\infty}$  отсутствует. Введение в мембраноомывающие растворы кверцетина не влияет на  $I_{\infty}$  в ДФФХ : Хол-мембранах и приводит к уменьшению  $I_{\infty}$  в ДФФХ : Эрг-бислоях. Влияния таких флавоноидов, как флоридзин, генистеин, генистин, биоханин А, мирицетин и ТГАФ, на  $I_{\infty}$  в Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-мембранах не наблюдается. Введение RH 421 в растворы, оmyвающие ДФФХ : Хол-бислои, практически не изменяет  $I_{\infty}$ , а добавка этого модификатора в растворы, оmyвающие ДФФХ : Эрг-мембраны, увеличивает  $I_{\infty}$ . При этом другие стироловые красители RH 160 и RH 237 не оказывают эффекта на мультиканальную активность АМВ в Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-мембранах. По всей вероятности, в случае менее выгодного с энергетической точки зрения комплекса АМВ-Хол, флоретин, благодаря своей «шпильчатой» конформации, способен выполнять роль медиатора между полиеновой и стероидной молекулами и стабилизировать комплекс АМВ-Хол (рис. 2Д), что выражается в увеличении каналаобразующей активности АМВ в присутствии этого дипольного модификатора в Хол-содержащих мембранах. Кверцетин, благодаря большей, чем у флоретина, глубине погружения в бислои [56], может конкурировать со стероидом за взаимодействие с АМВ и де-

стабилизировать самый выгодный с энергетической точки зрения комплекс АМВ-Эрг, что выражается в уменьшении каналаобразующей активности полиена (рис. 4). Учитывая, что стироловый краситель RH 421 имеет промежуточную между RH 160 и RH 237 глубину погружения хромофора в бислои и наиболее близкую к нормали к поверхности мембраны ориентацию [57], можно предполагать его колокализацию с комплексом АМВ-Эрг. В этом случае стироловый краситель можно рассматривать в качестве третьего участника Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, служащего дополнительным взаимориентирующим фактором за счет участия в  $\pi$ - $\pi$ -электронных взаимодействиях.

Учитывая, что главное отличие молекулы Эрг от Хол заключается в наличии двух двойных связей – в 7-м положении стероидного ядра и в 22-м положении боковой углеводородной цепи, были также выбраны стероиды, которые отличаются от холестерина наличием одной двойной связи в 7-м или 22-м положении, 7-дегидрохолестерин (ДХол) и стигмастерин (Стигм) соответственно (см. рис. 1). Установлено, что добавка флоретина в мембраноомывающий раствор приводит к большему росту равновесного трансмембранного тока, протекающего через ДФФХ : Стигм-мембраны ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0 = 5.3 \pm 3.1$ ), по сравнению с ДФФХ : ДХол-бислоями ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0 = 1.7 \pm 0.3$ ). Выраженность эффекта флоретина в модифицированных АМВ ДФФХ : Хол и ДФФХ : Стигм-мембранах, а также его отсутствие в ДФФХ : Эрг-бислоях и малость в случае ДФФХ : ДХол-мембран могут свидетельствовать в пользу сходства геометрии комплексов АМВ-Хол и АМВ-Стигм, АМВ-Эрг и АМВ-ДХол соответственно. Схематическое представление образования межмолекулярных связей в комплексах АМВ-ДХол и АМВ-Стигм представлено на рис. 2В,Г. Учитывая, что сходство молекул Хол и Стигм, а также Эрг и ДХол заключается в отсутствие или наличии двойной связи в положении 7, соответственно можно думать об определяющей роли распределения электрической плотности в области стероидного ядра (вблизи 7-го положения), что может сказываться на возможности образования водородной связи между гидроксильной группой молекулы стерина и одной из ОН-групп молекулы флоретина. Введение RH 421 в растворы, оmyвающие ДФФХ : ДХол- и ДФФХ : Стигм-бислои, практически не изменяет  $I_{\infty}$  ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0 = 1.1 \pm 0.1$ ). Поскольку RH 421 эффективен только в отношении ДФФХ : Эрг-мембран и не влияет на модифицированные АМВ ДФФХ : ДХол-бислои, а Эрг отличается от ДХол наличием двойной связи в 22-м положении, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что RH 421 является более чувствительным инстру-

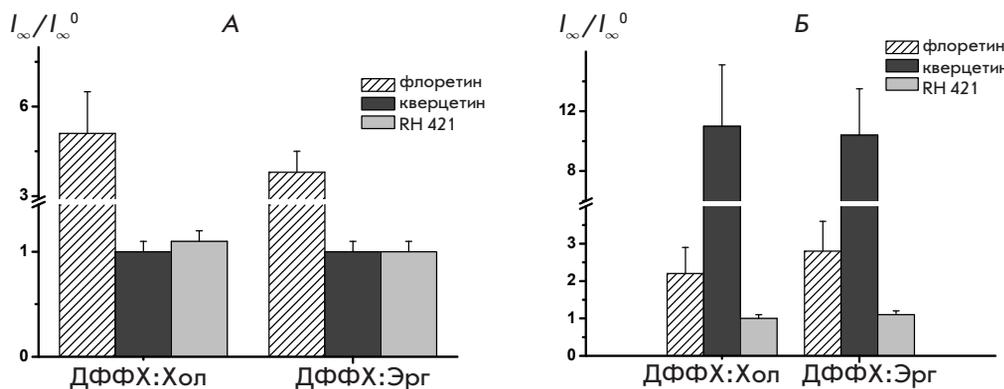


Рис. 5. Отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного нистатином (А) и филипином (Б) в стеринсодержащих бислоях, после и до введения различных дипольных модификаторов ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ ). Мембраны сформированы из ДФФХ : Хол (67 : 33 моль %) или ДФФХ : Эрг (67 : 33 моль %) и омываются 2.0 М КСl (рН 7.0)

ментом для изучения АМВ-стериновых комплексов, чем флоретин, а двойная связь в положении 22 все-таки влияет на геометрию и энергию комплекса.

*Варьирование вида полиенового антибиотика.*

Поскольку полиеновые молекулы также могут взаимодействовать с дипольными модификаторами, было изучено их влияние на равновесный трансмембранный ток, индуцированный в стеринсодержащих бислоях нистатином и филипином (рис. 1). Молекула НС отличается от молекулы АМВ отсутствием двойной связи в середине полиенового фрагмента, что может сказаться на π-π-электронных взаимодействиях в полиен-стериновых комплексах. Молекула ФЛ, в отличие от АМВ и НС, не содержит остатка аминокислоты. Подобное структурное отличие должно отразиться на формировании сети водородных связей между полиеновой и стеринной молекулами. В случае нистатина  $I_{\infty}$  увеличивается при добавке флоретина как в ДФФХ : Хол-, так и в ДФФХ : Эрг-содержащих мембранах, при этом введение кверцетина не влияет на  $I_{\infty}$  в присутствии в мембране как Хол, так и Эрг (рис. 5А). Оба флавоноида (флоретин и кверцетин) независимо от вида мембранообразующего стерина вызывают рост стационарного равновесного трансмембранного тока, индуцированного филипином (в 2 и 10 раз для ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-мембран соответственно) (рис. 5Б). При этом добавка RH 421 в растворы, омывающие ДФФХ : Хол- и ДФФХ : Эрг-мембраны, не изменяет стационарный трансмембранный ток, индуцированный как нистатином, так и филипином (рис. 5А,Б). Нарушение конъюгации двойных связей в молекуле НС может дестабилизировать полиен-стериновый комплекс и увеличивать глубину погружения стерина в бислой, отодвигая его от полярной «головы» полиеновой молекулы. Флоретин, по всей вероятности, способен стабилизировать такие НС-стериновые комплексы. Отсутствие аминокислоты в молекуле филипина приводит к изменению сети водородных связей в по-

лиен-стериновых комплексах и их дестабилизации. Можно думать, что локализация кверцетина в углеводородной области бислоя делает возможным его взаимодействие с более гидрофобным полиеном филипином (рис. 2Е,Ж), в результате чего наблюдается существенный рост стационарного трансмембранного ФЛ-индуцированного тока в Хол- и Эрг-содержащих ДФФХ-бислоях.

*Варьирование фосфолипидного состава.*

Для изучения взаимодействия полиенов с другими мембранными компонентами была исследована каналообразующая активность АМВ в липидных бислоях, включающих, кроме стерина, различные фосфолипиды и сфинголипиды в присутствии флоретина и RH 421. Средние отношения равновесного трансмембранного тока, индуцированного АМВ в Эрг-содержащих фосфолипидных бислоях, после и до введения дипольных модификаторов ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ ) при трансмембранном напряжении 50 мВ представлены в виде диаграммы на рис. 6А. Установлено, что введение флоретина в околосмембранный раствор приводит к существенному увеличению каналообразующей активности АМВ в Эрг-содержащих ПОФХ-бислоях (в 12 раз) и ДОФХ (в 4 раза), в то время как этот дипольный модификатор не влияет на модифицированные АМВ Эрг-содержащие мембраны, сформированные с участием ДФФХ, ДФФС, ДОФЭ и ДОФС. Введение RH 421 в мембраноомывающий раствор вызывает многократное увеличение  $I_{\infty}$  через Эрг-содержащие бислои из ДФФХ (в 15 раз) и ДФФС (в 42 раза) и не влияет на равновесный трансмембранный ток, индуцированный АМВ, в Эрг-содержащих мембранах, включающих ПОФХ, ДОФХ, ДОФЭ и ДОФС. Учитывая, что молекулы ДФФХ, ДФФС, ДОФЭ и ДОФС имеют коническую, а ДОФХ и ПОФХ – цилиндрическую форму [58, 59], можно предположить, что последние лучше соответствуют жесткой молекуле АМВ. Схематическое представление образования межмолекулярных свя-

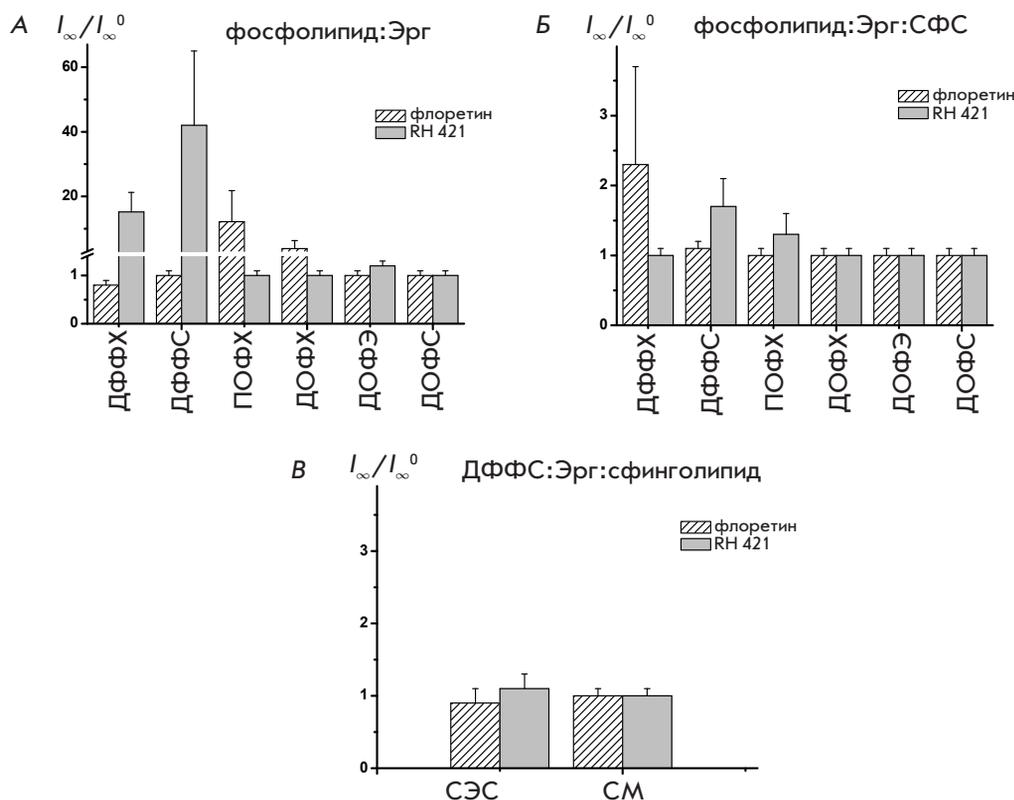


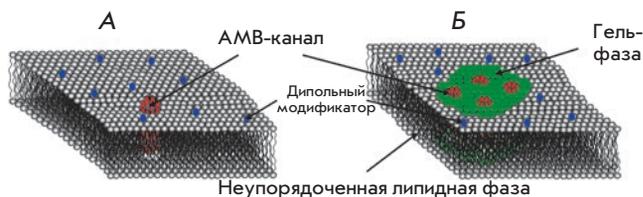
Рис. 6. Отношение равновесного транс-мембранного тока, индуцированного амфотерицином В в эргостеринсодержащих бислоях, после и до введения дипольных модификаторов ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ ). Мембраны сформированы из фосфолипид : Эрг (67 : 33 моль %) (А), фосфолипид : Эрг : СФС (53 : 27 : 20 моль %) (Б) и ДФФС : Эрг : сфинголипид (53 : 27 : 20 моль %) (В) и омываются 2.0 М КСl (рН 7.0)

зей между АМВ-Эрг-ДФФХ и АМВ-Эрг-ПОФХ представлено на рис. 23,И. Можно думать, что сильное взаимодействие «полиен-фосфолипид» ослабляет взаимодействие «полиен-эргостерин». Такой полиен-стериновый комплекс может быть стабилизирован молекулами флоретина, которые, благодаря высокой конформационной подвижности и четырем функциональным гидроксильным группам, способны служить посредниками в образовании сети водородных связей между стеринном и АМВ. Несоответствие между жесткой палочкообразной молекулой АМВ и фосфолипидами конической формы (ДФФХ, ДФФС, ДОФЭ и ДОФС) предотвращает сильное взаимодействие «полиен-фосфолипид» и поэтому не происходит дестабилизации полиен-стеринового комплекса. Выше мы предположили, что RH 421 увеличивает каналобразующую активность АМВ в Эрг-содержащих ДФФХ-мембранах в результате вклада этого дипольного модификатора в сеть как водородных связей, так и π-π-электронных взаимодействий между молекулами Эрг и АМВ. По всей вероятности, аналогичные процессы имеют место и в случае модифицированных АМВ Эрг-содержащих ДФФС-бислоев.

*Варьирование сфинголипидного состава.* Введение в мембранообразующий раствор сфинголипидов существенно влияет на взаимодействие между молеку-

лами АМВ и фосфолипидов. Установлено, что флоретин в 2 раза увеличивает  $I_{\infty}$  в случае ДФФХ : Эрг : СФС-мембран, а RH 421 – в 1.7 раза в ДФФС : Эрг : СФС-бислоях. При замене сфинголипидной (СФС на СЭС или СМ (рис. 6В)) или фосфолипидной (ДФФХ на ДФФС, ПОФХ, ДОФХ, ДОФЭ или ДОФС в случае флоретина и ДФФС на ДФФХ, ПОФХ, ДОФХ, ДОФЭ или ДОФС в случае RH 421 (рис. 6Б)) составляющей в указанных смесях не наблюдается увеличения  $I_{\infty}$  в присутствии дипольных модификаторов. Полученные результаты показывают, что молекулы сфинголипидов, введенные в мембранообразующий раствор, играют существенную роль во взаимодействии молекул АМВ с фосфолипидами и стеринами.

Учитывая, что флоретин уменьшает проводимость одиночных АМВ-каналов в ДФФХ : Эрг-мембранах, отсутствие влияния дипольного модификатора на равновесный трансмембранный ток, индуцированный АМВ, должно означать одномоментный скачок числа открытых АМВ-каналов. Необоснованность подобного заключения позволяет выдвинуть два предположения: 1) различие свойств одиночных АМВ-каналов, в частности, отсутствие селективности у АМВ-каналов, обеспечивающих интегральный ток, тогда проводимость каналов не должна быть функцией дипольного потенциала мембраны; 2) различие свойств липидного микроокружения каналов в мембране, т.е.



**Рис. 7.** Схематическое представление микроокружения АМВ-каналов в мембранах с различной концентрацией полиенового антимикотика, соответствующей функционированию одиночных каналов (А) и интегральному мультиканальному току (Б). При высоких концентрациях (Б) АМВ провоцирует образование в мембране более упорядоченной липидной фазы (показана зеленым цветом)

одиночные АМВ-поры и каналы, обеспечивающие интегральный ток, локализуются в областях мембраны с различными свойствами, в том числе и с различным значением дипольного потенциала бислоя (рис. 7).

**Катион-анионная селективность амфотерициновых каналов**

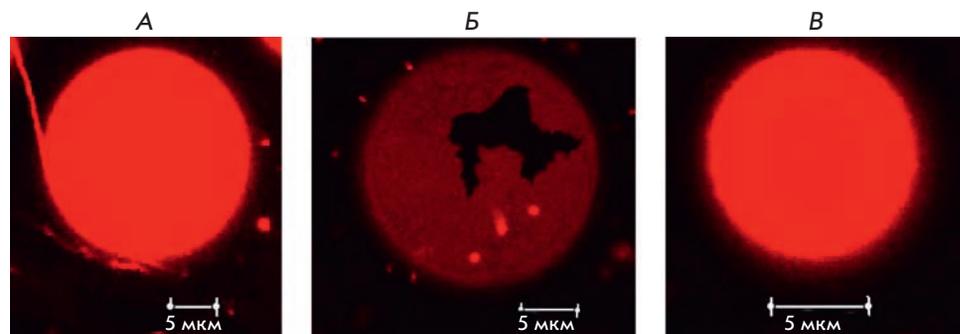
Для проверки первого предположения были проведены измерения катион-анионной селективности одиночных АМВ-каналов и интегрального трансмембранного тока. Результаты измерений показали, что АМВ-каналы в стеринсодержащих бислоях преимущественно анион-селективны, независимо от степени модификации мембраны АМВ. Число переноса анионов для одиночных АМВ-каналов составляет  $t^- = 0.9 \pm 0.1$ , а для интегрального тока, индуцированного АМВ, равно  $t^- = 0.8 \pm 0.1$ . Приведенные данные указывают на то, что ввиду высокой селективности проводимость АМВ-каналов, обеспечивающих интегральный ток, должна зависеть от дипольного потенциала мембраны.

**Амфотерициновые каналы в мембранах с фазовым разделением**

Существует ряд свидетельств в пользу второго предположения. Так, в присутствии АМВ показано

дозозависимое увеличение температуры фазового перехода липидов из гель- в жидкокристаллическое состояние [23]. Это означает, что АМВ провоцирует образование в мембране более упорядоченной фазы. Более того, как уже отмечалось ранее, молекулы АМВ обладают более высоким сродством к упорядоченным липидным доменам (рафтам) [17]. Поскольку упорядоченные липидные домены обогащены стеринами и сфинголипидами, очевидно, что их физико-химические свойства определяются липидным составом мембраны. Известно, что степень упорядоченности липидных молекул и вероятность формирования рафтов зависят от типа включенного в бислой стерина [60–62]. Существенное значение имеет и сфинголипидный состав мембраны. В частности, СФС отличается от СЭС наличием одной гидроксильной группы в положении С4. Идковиак-Балдис и соавт. показали, что С4-гидроксильное группирование существенно влияет на физические и структурные свойства липидных микродоменов [63]. По всей вероятности, дополнительная гидроксильная группа способствует конденсации липидных молекул за счет увеличения числа водородных связей [64]. Плазматические мембраны клеток грибов содержат фитосфингозин и эргостерин [65], а плазматические мембраны клеток млекопитающих – сфингомиелин и холестерин [66]. Эволюционное предпочтение указанным комбинациям может быть обусловлено свойствами формируемых ими упорядоченных липидных доменов. Более того, некоторые фосфолипиды с низкой температурой плавления, которые не локализуются в упорядоченных мембранных областях, способны индуцировать образование этих доменов. Так, способность стабилизировать рафты зависит от структуры фосфолипида и уменьшается в следующем ряду: ДФФХ, ДФФС, ПОФХ (ДОФХ) [67].

С помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии гигантских одноламеллярных липосом показано, что дипольные модификаторы влияют на фазовое разделение в липосомах [68]. Флавоноиды, биоханин А и флоретин приводят к разжижению твердокристаллических областей в мембранах липо-



**Рис. 8.** Микрофотографии одноламеллярных липосом из ПОФХ в отсутствие полиенового антибиотика (А), в присутствии в мембраноомывающих растворах 300 мкМ АМВ (Б) и комбинации 300 мкМ АМВ и 400 мкМ флоретина (В)

сом и способствуют образованию рафтов в мембране, в то время как мирицетин скорее вызывает конденсацию бислоя. Данные, полученные методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, подтверждают влияние флавоноидов на фазовое разделение в липосомах [68].

Результаты наших исследований показали, что в отсутствие АМВ липосомы из ПОФХ окрашены гомогенно; латеральной гетерогенности мембран не наблюдается (рис. 8А). Введение 300 мкМ АМВ индуцирует образование в липосомах неокрашенных доменов дендритной формы, которые могут быть отнесены к твердокристаллической липидной фазе (рис. 8Б). Флоретин в концентрации 400 мкМ приводит к разжижению гель-доменов в модифицированных АМВ везикулах, и липосомы оказываются гомогенно окрашенными (рис. 8В). Эти данные указывают на то, что дипольные модификаторы влияют

на образование и динамику обогащенных полиеновыми макролидами упорядоченных мембранных областей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что каналобразующая активность полиеновых антибиотиков в липидных бислоях определяется суперпозицией нескольких факторов: дипольного потенциала мембраны, стабильности полиен-липидных комплексов и физико-химических свойств упорядоченных липидных областей. ●

*Авторы выражают благодарность Е.Г. Чулкову за участие в некоторых экспериментах.*

*Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-33121), программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ИИИ-1721.2014.4.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Malewicz B., Momsen M., Jenkin H.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983. V. 23. P. 119–124.
- Kuwano M., Akiyama S., Endo H., Kohga M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 49. P. 1241–1248.
- Medoff G., Kwan C.N., Schlessinger D., Kobayashi G.S. // *Cancer Res.* 1973. V. 33. P. 1146–1149.
- Craven P.C., Gremillion D.H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985. V. 27. P. 868–871.
- Shigemi A., Matsumoto K., Ikawa K., Yaji K., Shimodozono Y., Morikawa N., Takeda Y., Yamada K. // *Int. J. Antimicrob. Agent.* 2011. V. 38. P. 417–420.
- Guinet R., Chanas J., Goullier A., Bonnefoy G., Ambroise-Thomas P.J. // *Clin. Microbiol.* 1983. V. 18. P. 443–444.
- Hawkins J.L., Baddour L.M. // *Clin. Infect. Dis.* 2003. V. 36. P. 14–18.
- Andreoli T. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1974. V. 235. P. 448–468.
- González-Damián J., Ortega-Blake I. // *Membr. Biol.* 2010. V. 237. P. 41–49.
- Récamier K.S., Hernández-Gómez A., González-Damián J., Ortega-Blake I. // *J. Membr. Biol.* 2010. V. 237. P. 31–40.
- Samedova A.A., Kasumov Kh.M. // *Antibiot. Khimioter.* 2009. V. 54. P. 44–52.
- Касумов Х.М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука, 2009. 512 с.
- de Kruijff B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., Demel R.A., van Deenen L.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. V. 339. P. 30–43.
- Baginski M., Resat H., Borowski E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1567. P. 63–78.
- Marty A., Finkelstein A. // *J. Gen. Physiol.* 1975. V. 65. P. 515–526.
- Venegas B., Gonzalez-Domian J., Celis H., Ortega-Blake I. // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 2323–2332.
- Czub J., Baginski M. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 16743–16753.
- Neumann A., Czub J., Baginski M. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 15875–15885.
- Neumann A., Baginski M., Czub J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 18266–18272.
- Baran M., Borowski E., Mazerski J. // *Biophys. Chem.* 2009. V. 141. P. 162–168.
- Matsumori N., Tahara K., Yamamoto H., Morooka A., Doi M., Oishi T., Murata M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 11855–11860.
- Hamilton K.S., Barber K.R., Davis J.H., Neil K., Grant C.W. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. V. 1062. P. 220–226.
- Paquet M.J., Fournier I., Barwicz J., Tancrede P., Auger M. // *Chem. Phys. Lipids.* 2002. V. 119. P. 1–11.
- Gabrielska J., Gagoś M., Gubernator J., Gruszecki W.I. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 2677–2685.
- Liberman E.A., Topaly V.P. // *Biofizika (Russian).* 1969. V. 4. P. 452–461.
- Hladky S.B., Haydon D.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. V. 318. P. 464–468.
- Brockmann H. // *Chem. Phys. Lipids.* 1994. V. 73. P. 57–79.
- Hsuchen C.C., Feingold D. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1973. V. 4. P. 316–319.
- Vertut-Croquin A., Bolard J., Chabbert M., Gary-Bobo C. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 2939–2944.
- Hartsel S.C., Perkins W.R., McGarvey G.J., Cacsó D.S. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 2656–2660.
- Cohen B.E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1108. P. 49–58.
- Ruckwardt T., Scott A., Scott J., Mikulecky P., Hartsel S.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1372. P. 283–288.
- Fujii G., Chang J.E., Coley T., Steere B. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 4959–4968.
- Dufourc E.J., Smith I.C.P., Jarell H.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 778. P. 435–442.
- Balakrishnan A.R., Easwaran K.R.K. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 4139–4144.
- Fournier I., Barwicz J., Tancrede P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1373. P. 76–86.
- Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1558. P. 95–108.
- Sternal K., Czub J., Baginski M. // *J. Mol. Model (Online).* 2004. V. 10. P. 223–232.
- Herec M., Dziubinska H., Trebacz K., Morzycki J.W., Gruszecki W.I. // *Biochem. Pharmacol.* 2005. V. 70. P. 668–675.
- Zager R.A. // *Am. J. Kidney Dis.* 2000. V. 36. P. 238–249.

41. Nagiec M.M., Young C.L., Zaworski P.G., Kobayashi S.D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 307. P. 369–374.
42. Sun X., Garlid K.D. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 19147–19154.
43. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 865–873.
44. Hwang T.C., Koeppe R.E., Andersen O.S. // *Biochemistry.* 2003. V. 42. P. 13646–13658.
45. Ostroumova O.S., Kaulin Y.A., Gurnev P.A., Schagina L.V. // *Langmuir.* 2007. V. 23. P. 6889–6892.
46. Asandei A., Mereuta L., Luchian T. // *Biophys. Chem.* 2008. V. 135. P. 32–40.
47. Остроумова О.С., Щагина Л.В. // *Биол. мембраны.* 2009. V. 26. P. 287–292.
48. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1790. P. 809–816.
49. Ostroumova O.S., Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. // *Langmuir.* 2010. V. 26. P. 15092–15097.
50. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2011. V. 1808. P. 2051–2058.
51. Mereuta L., Asandei A., Luchian T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e25276.
52. Montal M., Muller P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 65. P. 3561–3566.
53. Morf W.E. // *Anal. Chem.* 1977. V. 49. P. 810–813.
54. Juhasz J., Davis J.H., Sharom F.J. // *Biochem. J.* 2010. V. 430. P. 415–423.
55. Muddana H.S., Chiang H.H., Butler P.J. // *Biophys. J.* 2012. V. 102. P. 489–497.
56. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. // *Mol. Cell Biochem.* 2008. V. 314. P. 65–71.
57. Passechnik V.I., Sokolov V.S. // *Bioelectrochemistry.* 2002. V. 55. P. 47–51.
58. Bezrukov S.M. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000. V. 5. P. 237–243.
59. Sakuma Y., Taniguchi T., Imai M. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 472–479.
60. Hsueh Y.W., Chen M.T., Patty P.J., Code C., Cheng J., Frisken B.J., Zuckermann M., Thewalt J. // *Biophys. J.* 2007. V. 92. P. 1606–1615.
61. Cournia Z., Ullmann G.M., Smith J.C. // *J. Phys. Chem.* 2007. V. 111. P. 1786–1801.
62. Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1788. P. 97–121.
63. Idkowiak-Baldys J., Grilley M.M., Takemoto J.Y. // *FEBS Lett.* 2004. V. 569. P. 272–276.
64. Lofgren H., Pascher I. // *Chem. Phys. Lipids.* 1977. V. 20. P. 273–284.
65. Rest M.E., Kamminga A.H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W.N. // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59. P. 304–322.
66. Simons K., Toomre D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000. V. 1. P. 31–39.
67. Bakht O., Pathak P., London E. // *Biophys. J.* 2007. V. 93. P. 4307–4318.
68. Ostroumova O.S., Chulkov E.G., Stepanenko O.V., Schagina L.V. // *Chem. Phys. Lipids.* 2014. V. 178. P. 77–83.
69. Efimova S.S., Ostroumova O.S. // *Langmuir.* 2012. V. 28. P. 9908–9914.