

УСЛОВИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ОДИНОЧНЫХ ПОЛИЕНОВЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СУБСТРАТНОГО ОКРУЖЕНИЯ МЕМБРАН

Бехбудова Г.М.

Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана,
Патамдартское шоссе, 40, г. Баку, AZ-1004, Азербайджан; e-mail: gunel2581@mail.ru
Поступила в редакцию: 13.06.2021

Аннотация. Описаны экспериментальные условия возникновения одиночных ионных каналов в липидных мембранах, модифицированных полиеновыми антибиотиками. В присутствии полиенов нарастание мембранного тока сопровождается дискретными скачками. Величина проводимости и концентрация антибиотика, необходимая для получения одиночного канала, зависят от вида и концентрации электролита, омывающего мембрану. От электролита зависят не только свойства канала в проводящем состоянии, но и время сборка каналов. В растворах хлоридов щелочных металлов при одинаковой активности этих солей проводимость канала увеличивается в ряду: Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , а в растворах галогенидов калия в ряду: I^- , F^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- . Проводимость канала возрастает с увеличением кристаллического радиуса катиона. Показано, что амфотерициновый канал имеет проводимость 3,5 пСм в растворе 10^{-1} М КСl. Нистатиновый канал имеет проводимость 1,4 пСм. Каналы совершают обратимые переходы из открытого состояния в закрытое состояние. Частота этих переходов зависит от вида электролита. Минимальная проводимость у микогептинового и леворинового каналов (0,2-0,3 пСм). Из изученных антибиотиков только ароматический антибиотик леворин A_2 чувствителен к колебаниям мембранного потенциала.

Ключевые слова: полиеновые антибиотики, химическая структура, липидные мембраны, ионные каналы, дискретная проводимость, состояния канала.

Использование полиеновых антибиотиков (ПА) в медицинской практике базируется на детальном изучении молекулярно-биологических механизмов их взаимодействия с клеткой. Показано, что антибиотики полиеновой структуры эффективно подавляют грибковые клетки и препятствуют росту злокачественных образований [1, 2]. Некоторые ПА способны инактивировать инфекционные вирусы, препятствовать их проникновению в клетку и ингибировать их репродукцию [3]. Однако молекулярный механизм действия ПА на клетки остается до сих пор не раскрытым. Основная информация о механизме действия ПА была получена на бислойных липидных мембранах (БЛМ) [4]. Одной из основных предпосылок, позволившей приблизиться к пониманию молекулярного механизма действия полиенов на бислой, было обнаружение резкого увеличения интегральной проводимости БЛМ в присутствии некоторых ПА [5].

Данные о действии амфотерицина В и нистатина с одной и с двух сторон мембран позволили многим авторам выдвинуть предположение о том, что эти антибиотики, взаимодействуя с холестерином, образуют на обеих сторонах мембраны полупоры определенного размера [6]. Две полупоры, располагаясь вдоль их общей оси поперек мембраны, могут образовывать водную пору (трубу), которая пронизывает мембрану насквозь. Такая пора может индуцировать в мембранах проницаемость для воды, ионов и не электролитов.

Молекулы амфотерицина В и фосфолипида имеют приблизительно одинаковую длину (около 24 Å). В молекуле амфотерицина В содержится длинная жесткая полиеновая цепь $\text{C}_{20}\text{-C}_{33}$ и гидрофильная цепочка $\text{C}_1\text{-C}_{15}$, состоящая из нескольких гидроксильных групп. Гидрофобная и гидрофильная цепи располагаются параллельно друг другу. Кроме того, в молекуле амфотерицина В имеется карбоксильная группа при C_{16} , аминоксахар, содержащий положительно заряженный азот, и гидроксильную группу при C_{35} в гидрофобной части молекулы [7]. Общая длина молекулы холестерина составляет 19 Å. Наиболее упакованной структурой в этом случае является полый цилиндр (полупора), состоящая из 8 молекул амфотерицина В и 8 молекул холестерина. В рамках предложенной модели не было возможности рассмотреть механизм функционирования такого канала, ввиду отсутствия экспериментальных данных, подтверждающих и непосредственно отражающих работу одиночных каналов в липидных мембранах. Экспериментально подтвердить существование таких структур в мембранах долгое время никому не удавалось, хотя в этом отношении и велся интенсивный поиск. Исследование свойств единичной проводящей структуры дало бы несравненно большую информацию о молекулярных механизмах функционирования ПА в липидных мембранах.

Изучение только интегральных свойств мембран принципиально не может дать исчерпывающего ответа о молекулярном механизме функционирования ПА в мембране. Принципиально важной задачей представляется выход на более адекватный уровень исследований – изучение свойств и поведения единичного функционирующего канала в липидной мембране. В этом направлении многими исследователями предпринимались интенсивные попытки обнаружить работу одиночно функционирующей поры в присутствии ПА. Именно здесь при попытках обнаружения и записи полиеновых каналов зарубежных исследователей постигает неудача. Хладки и Хейдон в 1970 году пытались зарегистрировать одиночную пору на мембране с нистатином [8]. Однако попытка оказалась безуспешной. Авторы в то время предполагали, что канал проводит ток слишком короткое время. Такой довод кажется убедительным, тем более, что авторы резко увеличили

чувствительность своей установки. В течение последующих лет, несмотря на широкое развитие метода регистрации одиночных ионных каналов, с одной стороны, и детальное исследование проницаемости БЛМ в присутствии ПА, с другой, не было сообщений об успешных попытках обнаружения одиночных ионных каналов на БЛМ. Следует здесь отметить, что примерно в это же время в 1977 году в журнале *Biophysical J.* была опубликована статья о невозможности обнаружения одиночных ионных каналов в присутствии нистатина [9]. Статья так и называлась “Доказательство того, что нистатин не может образовывать каналы в тонких липидных мембранах”! Неспособность нистатина образовывать каналы в бислойных мембранах основывалась на измерении шумов тока в диапазоне частот $1 \div 10^3$ Гц. Исходя из свойств одиночного нистатинового канала, шум тока должен был наблюдаться в диапазоне $10^{-3} \div 10^{-2}$ Гц. Группе сотрудников в Институте Биологической Физики Российской Академии Наук в содружестве с автором данной статьи удалось впервые экспериментально обнаружить и зарегистрировать одиночные ионные каналы, образуемые амфотерицином В, нистатином и микогептином [10]. Авторами были теоретически обоснованы экспериментальные условия для обнаружения одиночного полиенового канала. Входной ток усилителя не превышал 10^{-14} ампера (А). Ток, протекающий через один ионный канал имеет величину $10^{-13} \cdot 10^{-12}$ А в 2 М КСl. Напряжение шума на выходе усилителя при коэффициенте усиления 1 было не более $1,5 \cdot 10^{-5}$ В (подробные условия описаны в разделе методика). Физико-химические характеристики полиеновых каналов в растворах различных электролитов, окружающих мембрану, изучены не достаточно полно. Данная статья посвящена открытию одиночных полиеновых каналов и изучению их свойств в зависимости от субстратного окружения мембран.

БЛМ получали из общих фосфолипидов, выделенных из белого вещества бычьего мозга [11] путем нанесения капли фосфолипидов на отверстие в тefлоновой ячейке. Фосфолипиды очищали от нейтральных липидов ацетоновой промывкой и хранили при 0°C в хлороформ-метанольном растворе в объемном соотношении (2:1). Концентрация фосфолипидов в хлороформ-метанольном растворе была 20 мг/мл. Затем к этим липидам добавляли необходимое количество холестерина и эргостерина в соответствующих концентрациях. В работе были использованы ПА, любезно предоставленные нам проф. Вайнштейном В.А. из Санкт-Петербургского Государственного Химико-фармацевтического Университета. Электрические характеристики БЛМ измеряли с помощью метода фиксации мембранного потенциала и тока, используя электрометрический усилитель постоянного тока Keithley-301 (США) и двухкоординатный самописец “Endim” (Германия). Мембраноформирующие растворы готовились из разных соотношений фосфолипидов с холестерином и эргостерином. В работе использовался перекристаллизованный холестерин и эргостерин фирмы Sigma, Saint Louis, США. Для стабилизации pH водных растворов использовали буферные системы в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М. Проводимость не модифицированной мембраны составляла величину 2-3 пСм в 2 М КСl. Исходные ПА практически в воде нерастворимы. Основным растворителем ПА является ДМСО с брутто формулой $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$. Все ПА в индивидуальном порядке растворялись в ДМСО из расчета 1 мг/мл, что являлось основным маточным раствором, из которых затем с помощью микрошприца антибиотики вводились в водные растворы. Маточный раствор антибиотика хранили в течение недели.

В первых экспериментах при стандартных условиях (100 мМ КСl, pH 6,0) не удалось зарегистрировать минимального скачкообразного изменения мембранной проводимости. Кинетика нарастания проводимости мембраны с момента добавки антибиотика была плавной и не выходила на плато в течение длительного времени (>1 ч). При внимательном рассмотрении начального участка измеряемого мембранного тока обнаружилось, что нарастание сопровождается характерным низкочастотным шумом на фоне увеличивающейся во времени постоянной составляющей тока. При этом амплитуда шума была приблизительно пропорциональна корню квадратному из абсолютной величины мембранного тока. Предположив, что наличие шума связано с дискретной работой слабо проводящих единиц, ориентировочно была подсчитана проводимость одной единицы (рис. 1).

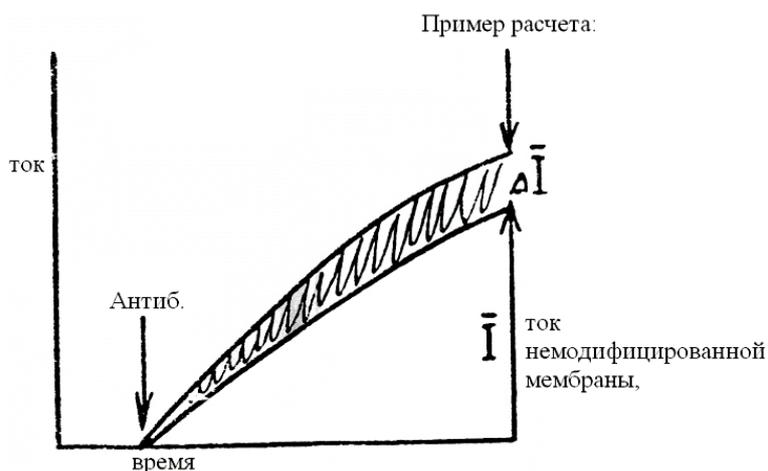


Рисунок 1. Характерная картина нарастания мембранного тока после добавки антибиотика (\bar{I} — средняя величина мембранного тока в момент времени t , $\Delta \bar{I}$ — средняя величина шума в тот же момент времени t)

Для этого случая можно записать два уравнения:

$$\bar{I} = N \cdot I_k \tag{1}$$

$$\Delta \bar{I} = \sqrt{N} \cdot I_k \tag{2}$$

где N – число токопроводящих дискретных единиц; I_k – ток, протекающий через одну проводящую единицу.

Возведем обе части уравнений в квадрат и, поделив уравнение (1) на уравнение (2), получим число проводящих единиц в любой точке кривой нарастания мембранного тока:

$$N = \bar{I}^2 / \Delta \bar{I}^2 \tag{3}$$

Поставив значение N из (3) в уравнение (1), получим:

$$I_k = \Delta \bar{I}^2 / \bar{I} \tag{4}$$

но поскольку проводимость $g = I / E_m$, то

$$g_k = \Delta g^2 / g, \tag{5}$$

где g_k – проводимость одной дискретной единицы.

Приближенный расчет для этого случая показал, что проводимость одиночного канала составляет 0,3 пСм в растворе электролита 100 мМ КСl. Проводимость же не модифицированной мембраны с площадью $s_m = 3 \cdot 10^{-2}$ мм² составляет 5 пСм. Это означает, что качественное и количественное изучение функционирующего одиночного канала сильно затруднено в связи с тем, что вклад проводимости канала в общую проводимость мембраны составляет меньше 10 %. Казалось, что увеличить этот вклад можно за счет уменьшения площади мембраны ($g_{\text{мембр.}} = g_{\text{удельн.}} \cdot s_{\text{мембр.}}$), однако работать с мембранами, площадь которых меньше 10⁻³ мм², практически невозможно. Такие по площади маленькие мембраны затекают липидами с краев отверстия (там они находятся в избытке) и становятся уже не бислойными. С целью увеличения полезного сигнала (ионного тока через одну проводящую единицу) необходимо повысить концентрацию примембранного электролита от 100 мМ КСl до 2 М КСl. Только в этих условиях удалось обнаружить дискретные изменения мембранного тока в присутствии амфотерицина В. В пользу доказательства того, что дискретные изменения тока есть результат работы одиночных ионных каналов, а не артефактное явление свидетельствуют следующие полученные экспериментальные данные. Во-первых, немодифицированная мембрана (без антибиотика) не дает вообще никаких скачкообразных изменений тока. Во-вторых, введение антибиотиков в концентрации ниже определенного порога также не приводит к изменению тока и только при достижении удельной пороговой концентрации наблюдается хорошо воспроизводимые скачки мембранного тока. В-третьих, вероятность появления дискретных уровней тока резко зависит как от концентрации антибиотиков в примембранном растворе, так и от концентрации холестерина в мембране. В первых экспериментах при стандартных условиях (100 мМ КСl, рН 6,0) не удалось зарегистрировать минимального скачкообразного изменения мембранной проводимости. Кинетика нарастания проводимости мембраны с момента добавки антибиотика была плавной и не выходила на плато в течение длительного времени (> 1 ч).

При особенно тщательном подборе концентрации антибиотика и хорошем разрешении по оси времени удалось получить воспроизводимые изменения мембранного тока. После введения в водные растворы низких концентраций ПА происходит скачок проводимости. Предполагается, что каналы находятся в единственном проводящем состоянии несколько минут и за это время совершают множество попыток перейти в непроводящее состояние. Среднее время жизни канала в проводящем состоянии вычислялось из общего времени нахождения канала в проводящем состоянии деленное на число кратковременных переходов в непроводящее состояние. На записи каналов видны кратковременные отключения с верхнего проводящего уровня на уровень ($I=0$), либо на предыдущий уровень. Через некоторое время после включения канала можно видеть переход такой дискретно-проводящей единицы на более продолжительный непроводящий уровень. Это, по-видимому, означает, что на промежуточных стадиях формирования канала в мембране образуются непроводящие структуры. Проводимость каналов, образуемых амфотерицином В, примерно на порядок ниже проводимости грамицидиновых каналов при той же концентрации электролита.

На рисунках 2-5 показана работа одиночных каналов в зависимости от различных электролитов, окружающих мембрану.

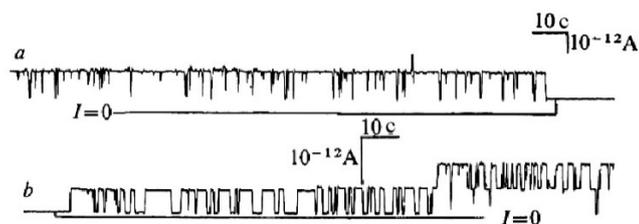


Рисунок 2. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии амфотерицина В $2 \cdot 10^{-8}$ М. Мембранный Потенциал равен 100 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембраны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 5 М CsCl - *a*, 2 М KNO₃ – *b*, рН 7,0, $t=23^{\circ}\text{C}$.



Рисунок 3. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина $1 \cdot 10^{-7}$ М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембраны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 3 М КСI, pH 7,0, $t=23^{\circ}\text{C}$.

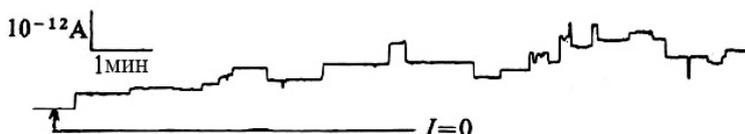


Рисунок 4. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина $1 \cdot 10^{-7}$ М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембраны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 2 М КСI, pH 7,0, $t=23^{\circ}\text{C}$.

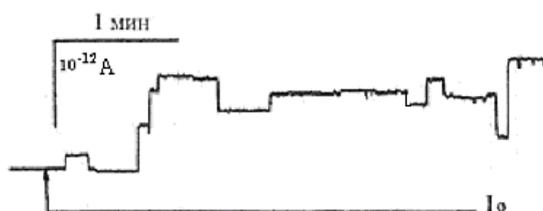


Рисунок 5. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина $1 \cdot 10^{-7}$ М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембраны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 2 М КСI, pH 7,0, $t=23^{\circ}\text{C}$.

Амфотерициновый канал имеет наибольшую проводимость (3,5 пСм) и совершает частые переходы из открытого состояния в закрытое состояние (рис. 2а). Нистатиновый канал имеет меньшую проводимость (1,4 пСм) (рис. 3). Переключения нистатинового канала зависят от вида электролита. В растворах КСI практически не наблюдается переключений, однако в растворах KNO_3 видны короткие переключения из проводящего состояния в непроводящее состояние (рис. 2б). Минимальная проводимость у микогептинового и леворинового каналов (0,2-0,3 пСм). Практически не наблюдается переключения микогептинового канала.

Ни формирование каналов, ни переходы между состояниями каналов не чувствительны к изменению напряжения в присутствии неароматических антибиотиков. Ароматический антибиотик леворин A_2 чувствителен к колебаниям мембранного потенциала. Свойства каналов, образуемых амфотерицином В, сильно зависят от вида и концентрации электролита в водных растворах. Следует отметить, что от вида электролита зависят не только свойства канала в проводящем состоянии, но и формирование каналов, и время переключения канала между состояниями. Селективность амфотерициновых одиночных каналов такая же, как и у мембран с большим числом каналов.

Число амфотерициновых каналов не зависит от величины приложенного к мембране потенциала, т.е. сборка амфотерициновых каналов не является потенциал зависимой и, поэтому, измерения электрических характеристик мембран проводились как при 100, так и при 200 мВ. На рисунках 2-5 видны кратковременные отключения с верхнего уровня на уровень ($I=0$), либо на предыдущий уровень. Через некоторое время наблюдается выключение такой дискретно-проводящей единицы (справа в конце рисунка 2 а). Это, по-видимому, означает, что на промежуточных стадиях сборки и разборки канала в мембране образуются непроводящие структуры. Проводимость каналов слабо зависит от величины приложенного к мембране потенциала.

Чтобы исследовать физико-химические свойства одиночного ионного канала, необходимо было сначала доказать следующее:

1. Дискретные изменения проводимости такого рода есть результат работы только одного ионного канала, для которого характерно наличие двух его состояний (открытого – $g=6,5$ пСм при 200 мВ и закрытого $g=0$), а также вполне определенной частоты кратковременных отключений (рис. 2 а);

2. Показать, что одиночные ионные каналы выступают как самостоятельные, независимые друг для друга дискретные единицы проводимости.

Для доказательства этих двух положений было сделано следующее: повышая концентрацию антибиотика в растворе электролита, окружающего мембрану, можно наблюдать ступенчатые изменения проводимости, связанные с включением и выключением одиночных проводящих единиц. На одной из таких записей, сделанной в растворе электролита 2 М C_5Cl , наблюдалось в течение длительного времени от двух до семи уровней проводимости, кратных одной и той же величине. Статистическая обработка таких записей показала, что частота кратковременных отключений со второго, третьего и так далее уровней на предыдущий уровень были равны соответственно, 0,76; 1,65; 1,9; 2,3; 3,3 $сек^{-1}$. Легко видеть, что эти частоты примерно пропорциональны номерам уровней. Такое поведение должно наблюдаться, если в мембрану встроены одинаковые, независимо работающие каналы с двумя состояниями.

На качество регистрируемого процесса сильно влияет величина шума собственной липидной мембраны. Мембраны малой площади (по отношению к большим мембранам) обладают низким уровнем собственного шума, поскольку:

$$g_{\text{общ.шума}} = g_{\text{удельн.шума}} \cdot S_{\text{мембр.}} \quad (6)$$

Изменяя площадь мембраны, можно в определенной мере регулировать число одновременно работающих ионных каналов.

Общее количество каналов в мембране описывается формулой:

$$N_{\text{общ.}} = N_{\text{удельн.}} \cdot S_{\text{мембр.}} \quad (7)$$

где $N_{\text{удельн.}}$ – количество каналов на единицу площади; $S_{\text{мембр.}}$ – площадь мембраны.

Показано, что удельная проводимость мембраны ($g_{\text{удельн. мембр.}}$) пропорциональна степенной функции концентрации антибиотика в растворе электролита (C_A) с показателем степени n для амфотерицина В, равным 7-10.

$g_{\text{удельн. мембр.}} \sim (C_A)^n$, так как $g_{\text{удельн. мембр.}} = N_{\text{удельн.}} \cdot g_k$, где g_k – проводимость одного канала = const., то можно записать, что $N_{\text{удельн.}} \sim (C_A)^n$.

Подставив последнее выражение в формулу (7), получим

$$N_{\text{общ.}} \sim (C_A)^n \cdot S_{\text{мембр.}} \quad (8)$$

Из последней формулы следует, что получить на мембране одиночно работающий канал только подбором концентрации антибиотика практически невозможно, поскольку в этом случае работает показатель степени n . В эксперименте же это делается следующим образом: для мембраны с максимальной площадью аккуратно подбирается такая концентрация антибиотика, при которой наблюдается работа 2-3 одиночных каналов. Затем, образуя мембраны с меньшей площадью, можно добиться продолжительной работы только одного ионного канала по всей мембране.

Таким образом, из всего сказанного выше следует, что площадь бислойной мембраны является важной при изучении одиночных полиионных каналов, так как с ее помощью можно в определенных пределах регулировать емкость мембраны, величину проводимости шума мембраны, а также число одновременно работающих каналов. Все эти параметры прямо пропорциональны величине площади мембраны.

Анализируя записи работы амфотерициновых одиночных ионных каналов можно видеть, что в основном наблюдаются дискретные скачки величиной 6,4 пСм в 2 М КСl, однако реже можно наблюдать скачки проводимости другой величины. При анализе большого числа записей одиночных каналов было обнаружено, что ионный канал не всегда имеет одинаковую величину проводимости при постоянных условиях эксперимента. При изучении проводящих свойств открытого канала было видно, что изредка наблюдаются скачки проводимости разной величины. Чтобы исключить ошибки измерений за счет наличия флуктуаций, проводились усреднения проводимости для каждого отдельного эксперимента не менее, чем по 10 одиночным каналам. Набрав большое количество записей работы одиночных каналов, и проведя статистический анализ, была построена гистограмма распределения частоты проводимости одиночных амфотерициновых каналов при постоянных условиях эксперимента. Результаты проведенных экспериментов показали, что в основном образуются каналы с проводимостью в 6,5 пСм в 2 М КСl. Однако с меньшей вероятностью образуются каналы почти с любой другой меньшей проводимостью. Из функции распределения проводимости каналов вытекает, что существует резкий максимум в области 6 – 6,5 пСм, но возможны и скачки любой другой меньшей величины. Статистический анализ поведения нескольких, одновременно работающих в мембране каналов, показал, что они функционируют независимо друг от друга. Кроме того, подавляющее большинство каналов характеризуются одинаковой величиной проводимости. Поведение канала во времени более сложно, чем можно судить по записи, приведенной на рисунках 2-5. Кроме быстрых переключений, существует другой, более медленный процесс с характеристическим временем в несколько минут. Определение времени жизни по записям одиночных каналов дает величину ~ 280 с (среднее по 30 каналам). Концентрация антибиотика, необходимая для получения одного канала (за 10-30 мин наблюдения), сильно зависит от концентрации стерина в мембраноформирующем растворе.

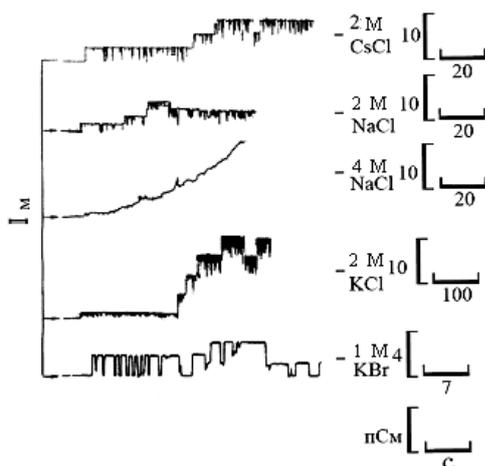


Рисунок 6. Одиночные амфотерициновые каналы в растворах различных электролитов. Потенциал на мембране 200 мВ, рН 6,5; 23°С, фосфолипид:холестерин 20:1. Концентрация амфотерицина В: CsCl- $5 \cdot 10^{-8}$ М; NaCl- $1 \cdot 10^{-7}$ М; KCl- $3 \cdot 10^{-8}$ М; KBr- $1 \cdot 10^{-7}$ М.

С увеличением концентрации холестерина вдвое необходимо уменьшить примерно вдвое концентрацию антибиотика. Это наблюдение подтверждает предположение о том, что образуется канал из молекул стерина и амфотерицина В, взятых в стехиометрическом соотношении 1:1

По-видимому, для открытого ионного канала характерно наличие наиболее вероятного его физико-химического состояния (например, число молекул антибиотика, составляющего канал, определенное расположение его структурно-активных групп и т.д.), которое определяет его проводимость. Величина проводимости канала не зависит от концентрации холестерина и от концентрации антибиотика. Эти данные подтверждают постоянство стехиометрии полиен-холестеринового комплекса. Одиночные каналы в присутствии амфотерицина В могут образовываться в растворах различных электролитов. Для иллюстрации на рисунке 6 показаны экспериментальные записи таких каналов.

Свойства каналов, образуемых амфотерицином В, не зависят от мембранного потенциала. Ни сборка каналов, ни переходы между состояниями канала не чувствительны к изменению напряжения мембраны. Свойства амфотерициновых каналов сильно зависят от вида и концентрации электролита в водных растворах. Причем от электролита зависят не только свойства канала в проводящем состоянии, но и сборка каналов, и время переключения канала между состояниями.

В результате исследования каналов были обнаружены интересные свойства: величина проводимости и концентрация антибиотика, необходимая для получения одиночного канала, зависят от вида и концентрации электролита, омывающего мембрану.

Для наглядной иллюстрации в таблице приведена величина проводимости каналов, полученных в растворах разных солей в присутствии амфотерицина В. Проводимость каналов в растворах различных электролитов несколько отличается друг от друга. В растворах хлоридов щелочных металлов при одинаковой активности этих солей проводимость канала увеличивается в ряду: Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , а в растворах галогенидов калия в ряду: I^- , F^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- . Проводимость канала возрастает с увеличением кристаллического радиуса катиона. Однако для галогенидов калия проводимость канала определяется не только размером гидратных оболочек ионов, но и их кристаллическим радиусом.

Для каналов, образуемых амфотерицином В, проводимость канала зависит как от вида катиона, так и от вида аниона. Величина предельной проводимости зависит от вида и аниона, и катиона. Проводимость канала в растворах хлоридов щелочных металлов возрастает с ростом кристаллического радиуса катиона. В растворах

Таблица 1. Зависимость проводимости одиночных каналов от вида электролита в присутствии амфотерицина В. Потенциал на мембране 200 мВ. Фосфолипид:холестерин 20:1, рН 6,5; $t=24^\circ\text{C}$

Вид электролита	гм, пСм	Вид электролита	гм, пСм	Вид электролита	гм, пСм
2 М		2 М		1 М	
LiCl	1,4±0,2	KF	3±0,25	MgCl ₂	3,5±0,3
NaCl	3±0,25	KCl	6,5±0,65	CaCl ₂	3,25±0,3
KCl	6,5±0,5	KBr	3,5±0,3	BaCl ₂	3,25±0,3
CsCl	7±0,5	KI	0,5±0,1		
		KNO ₃	3±0,25		

гм – проводимость одиночного канала.

галогенидов калия максимальная проводимость при любой активности соли наблюдается для хлорида. Заметим, что, несмотря на большой диаметр поры, канал довольно хорошо различает сходные ионы – галогениды. Так, отношение величин проводимостей канала в растворах KCl и KF достигает ~3, а в растворах KCl и KI >10. Изменение величины проводимости полиеновых каналов в зависимости от структуры антибиотика и от вида электролита, окружающих мембрану, можно объяснить двумя причинами. Предполагается, что внутри мембраны формируются каналы с разной стехиометрией, что влияет на проводимость самого канала. С другой стороны, ионы, входящие в канал, обладают сложным характером взаимодействия с гидрофильными участками внутри самого канала.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю благодарность член-корр. Национальной Академии Наук Азербайджана, проф. Касумову Халил Мамедовичу за ценные замечания при обсуждении результатов проделанной работы и помощь при подготовке материалов работы к публикации.

Работа выполнена при поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики (грант № EYF_BGM_3_BRFTF_2+/2017_15/12).

Список литературы / References:

1. Grela E., Zdybicka-Barabas A., Pawlikowska-Pawlega B., Cytrynska M., Wlodarczyk M., Grudzinski W., Luchowski R., Gruszecki W.I. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, (IF 3. 998). 17029, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
2. Vainshtein V.A., Nikolayevic L.N., Sultanova G.H., Baghirova A.A., Pashazade T.J., Gasimova V.Kh., Tagizade T.P., Kasumov Kh.M. The action of chemically transformed macrocyclic polyene antibiotics on tumor cells. *J. Experimental biology and medicine*, Moscow, 2019, vol. 166, no. 6, pp. 735-738. doi: 10.1007/s10517-019-04429-9.
3. Xu F., Zhao X., Hu S., Li J., Yin L., Mei S. et al. Amphotericin B Inhibits Enterovirus 71 Replication by Impeding Viral Entry. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 9, no. 6, p. 33150. doi: 10.1038/srep33150.
4. Kamiński D. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *Eur. Biophys. J.*, 2014, vol. 43, pp. 453-467. doi: 10.1007/s00249-014-0983-8.
5. 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, vol. 44, no. 3, pp. 337-345. doi: 10.1134/S1068162018030135.
6. Boukari Kh., Paris G., Gharbi T., Balme S., Janot J-M., Picaud F. Confined Nystatin Polyenes in Nanopore Induce Biologic Ionic Selectivity. *Journal of Nanomaterials*, 2016, Article ID 2671383, <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01455011>.
7. Borowski E. Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmaco*, 2000, vol. 55, pp. 206-208. doi: 10.1016/s0014-827x(00)00024-0.
8. Hladky S., Haydon D. Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics. *Nature*, 1977, vol. 225, pp. 451-453. doi: 10.1038/225451a0.
9. Romine W.O., Sherette G.R., Brown G.B., Bradley R.J. Evidence that nystatin may not form channels in thin lipid membranes. *Biophys. J.*, 1977, vol. 17, no. 3, pp. 269-274. doi: 10.1016/S0006-3495(77)85655-5.
10. Ermishkin L.N., Kasumov K.M., Potzeluyev V.M. Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine. *Nature*, 1976, vol. 262, no. 5570, p. 698-699. PMID: 958440 doi: 10.1038/262698a0.
11. 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, vol. 3, pp. 100-110, 163-164, 251-253, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2008.09.002.

THE CONDITION FOR THE FORMATION OF SINGLE POLYENE ION CHANNELS AND STUDY OF THEIR PROPERTIES DEPENDING ON THE SUBSTRATE ENVIRONMENT OF THE MEMBRANES**Behbudova G.M.**

Institute of Botany of the Azerbaijan National Academy of Sciences
Patamdart Highway, 40, Baku, AZ1004, Azerbaijan; e-mail: gunel2581@mail.ru

Abstract. Experimental conditions for the discovery of single ion channels in lipid membranes modified by polyene antibiotics are described for the first time. In the presence of polyenes, the increase in the membrane current is accompanied by discrete jumps. The amount of conductivity and concentration of the antibiotic required to obtain a single channel depend on the type and concentration of the electrolyte washing the membrane. The properties of the channel in the conducting state depend on the electrolyte and also on the time assembly of the channels. In solutions of alkali metal chlorides with the same activity of these salts, the channel conductivity increases in a row: Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , and in solutions of potassium chloride in the row: I^- , F^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- . The channel conductivity increases with the crystal radius of the cation. It is showed that the amphotericin channel has a conductivity of 3.5 pS in a solution of 10^{-1} M KCl. The nystatin channel has a conductivity of 1.4 pS. The channels make reversible transitions from the open state to the closed state. The frequency of these transitions depends on the type of electrolyte. The minimum conductivity had been a mycoheptin and levorin channels (0.2-0.3 pS). Of the studied antibiotics, only the aromatic antibiotic levorin A₂ is sensitive to fluctuations in the membrane potential.

Key words: polyene antibiotics, chemical structure, lipid membrane, ion channel, discrete conductivity, channel states.