

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМБИНИРОВАННЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ, ИНДУЦИРУЕМЫХ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ПОЛИЕНОВЫМИ АНТИБИОТИКАМИ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ В БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

Багирова А.А.

Институт ботаники НАН Азербайджана

Бадамдартское ш., 40, г. Баку, Азербайджан, AZ1004; e-mail: arifabaghirova@gmail.com

Поступила в редакцию: 22.06.2020

**Аннотация.** В статье приводится исследование биологической активности и физико-химических свойств макролактонных полиеновых антибиотиков (ПА) с различной структурой гидрофильного и гидрофобного участков молекул при их взаимодействии с бислойными липидными мембранами (БЛМ). На физико-химические параметры ионных каналов, формируемых ПА в клеточных мембранах, такие как избирательность и проводимость, оказывают влияние даже не очень значительные изменения в количестве двойных связей и числе гидроксильных и карбонильных групп в молекуле этих соединений. Обнаружено, что чем выше число двойных связей в молекуле ПА, тем выше биологическая активность антибиотиков. В экспериментах из ПА используются амфотерицин В, леворин А, нистатин и филипин. Приводится сравнительный анализ одиночных ионных каналов вышеуказанных ПА и гибридных ионных каналов, формируемых из ПА различной химической структуры в холестерин-содержащих фосфолипидных мембранах, что создает возможности для целенаправленного синтеза антибиотиков нового поколения.

**Ключевые слова:** полиеновые антибиотики (ПА), бислойные липидные мембраны (БЛМ), мембранная активность, проводимость, избирательность, ионные каналы.

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение свойств макроциклических соединений при проникновении их в клетку является очень актуальным и приоритетным биофизическим направлением. Механизм транспорта ионов через мембраны исследуется посредством изучения физико-химических свойств ионных каналов, образующихся в клеточных мембранах при участии каналаобразующих макроциклических ПА. Альтернативой клеточных мембран служат бислойные липидные мембраны, адекватно отражающие физико-химические свойства клеточных мембран, что позволяет интерпретировать результаты экспериментов при сопоставлениями их с данными, полученными на биологических объектах. Среди ПА наиболее востребованными являются амфотерицин В, леворин, микогефтин, кандидин, нистатин и филипин, химическая структура которых представлена на рис.1. Проводимость макроциклов в мембранах представляет собой интегральную составляющую при высокой концентрации ПА и одиночные ионные каналы при низкой концентрации антибиотика. Ионные каналы или поры образуются соединениями из двух полупор. Оказалось, что ПА с различной структурой молекул, находясь по разные стороны мембраны, также формируют ионные каналы. Такие ионные каналы носят название комбинированных или гибридных ионных каналов. Они обладают промежуточной проводимостью в мембранах. В приведенном ниже экспериментальном материале они имели место у амфотерицина В с филипином, у нистатина с филипином, а также у амфотерицина А с леворином А. Будучи продуцентами класса *Streptomyces*, эти антибиотики насчитывают более 200 представителей. Функционально ПА проявляют антимикробную активность в той или иной степени, что позволяет их использовать в практической медицине против грибковых заболеваний и детально исследовать биологическую активность, особенно биофизические свойства. Все это было экспериментально изучено на примере ионных каналов в бислойных фосфолипидных мембранах в присутствии ПА.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

БЛМ получали по методу Мюллера с соавт. [2]. Мембраны формировали в тефлоновой ячейке диаметром 0,5 мм и толщиной стенки около 30 мкм. Для приготовления мембран использованы оющие фосфолипиды бычьего мозга в хлороформе с метанолом, выделенных по методу Фолч и Лиз [3], с исходной концентрацией 20 мг/мл. При этом использовались смеси мембранных растворов с холестерином в различных соотношениях. Перед началом опыта исходные мембранные смеси путем испарения переводились в раствор гептана, из которого затем получались бимолекулярные мембраны. Большая часть работы проводилась с мембранами из общих фосфолипидов, экстрагированных из бычьего мозга. ПА были любезно предоставлены Санкт-Петербургским НИИ антибиотиков и ферментов. ПА растворялись в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавлялись в водный раствор. Биологическая активность антибиотиков и стабильность результатов обеспечивались за счет обновления раствора антибиотиков. Из ПА в работе были использованы амфотерицин В, нистатин, филипин и леворин. Антибиотики растворяли в ДМСО в концентрации 1 мг/мл, а затем микрошприцом добавляли в водно-солевой раствор, окружающий мембрану. Кинетика изменения мембранного потенциала и сопротивления

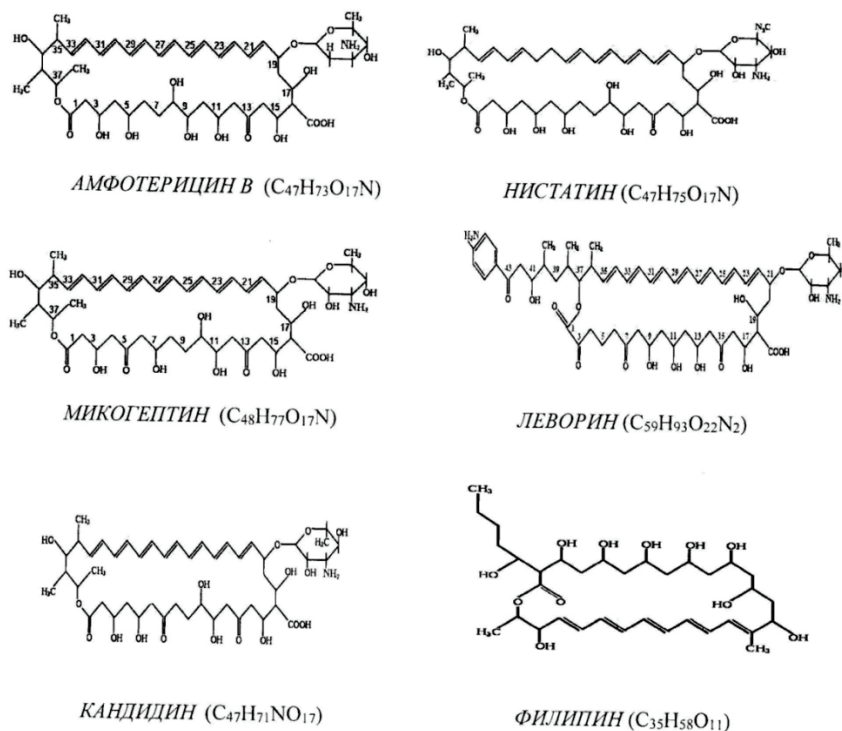


Рисунок 1. Химическая структура некоторых ПА [1]

регистрировалась с помощью двухкоординатного самописца. Интегральные характеристики мембран и одиночных ионных каналов измеряли методом фиксации мембранного потенциала, регистрируя ток через мембрану при помощи электрометрического усилителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что изменения в молекуле амфотерицина В, связанные с химической модификацией заряженных групп и удалением заряда этих групп с помощью рН растворов, не сопровождаются существенным изменением проводимости и одиночных каналов [4]. Проводимость амфотерицинового канала в растворе 2 М CsCl составляет  $6 \pm 1$  пСм, а проводимость нистатинового канала в растворе 3М  $KNO_3$  равна  $1,5 \pm 0,5$  пСм. На рис.2 приведена запись работы одиночных ионных каналов в присутствии амфотерицина В. Сравнительный анализ молекулярной структуры исследованных антибиотиков амфотерицина В, нистатина, леворина, кандидина и микогептина показал, что несмотря на то, что гидрофильные цепи молекул этих антибиотиков, выступающие полость канала, различаются очень мало, даже эти небольшие различия влияют на величину проводимости и избирательности канала. Амфотерицин В отличается от кандидина только тем, что радикал при  $C_5$  у амфотерицина гидроксил, а у кандидина – карбонил (рис. 1). Проводимость амфотерицинового ионного канала в 10 раз больше, чем проводимость кандидинового. Гидрофильная цепочка молекулы нистатина также отличается от молекулы микогептина (ОН-группа заменена на =O при  $C_5$ ). При такой замене проводимость канала уменьшается в 10 раз. Хотелось бы отметить, что комбинированные ионные каналы имеют место среди грамицидиновых и полиеновых антибиотиков.

Так как ПА снижают сопротивление БЛМ только при введении по обе стороны мембраны, то введение разных антибиотиков по разные стороны мембраны приводило к образованию только комбинированных каналов. Проводимость комбинированного канала имеет величину, промежуточную между двумя величинами проводимостей «чистых» ионных каналов. Асимметрию вольтамперной характеристики комбинированного ионного канал, сформированного из двух полупор с разными гидрофильными группами, локализованными в полости поры, можно объяснить асимметрией профиля потенциальной энергии иона в поре. В молекулах кандидина и микогептина различие состоит в перестановке гидроксильных радикалов (при  $C_8$  и  $C_9$  у кандидина и при  $C_7$  и  $C_{10}$  у микогептина). Наблюдается различие в гидрофильных цепях молекул амфотерицина В и нистатина. Молекула нистатина отличается от молекул других антибиотиков отсутствием двойной связи между атомами  $C_{28}$  и  $C_{29}$ , что несколько уменьшает величину проводимости канала по сравнению с амфотерицином В. Гидрофильная часть лактонного кольца различная у микогептина, амфотерицина В и нистатина. У микогептина ОН-группа заменена на карбонильную. Наибольшая ионная проводимость зафиксирована у амфотерицинового

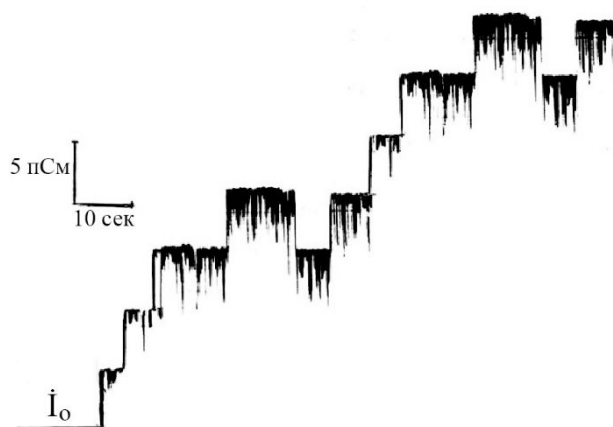
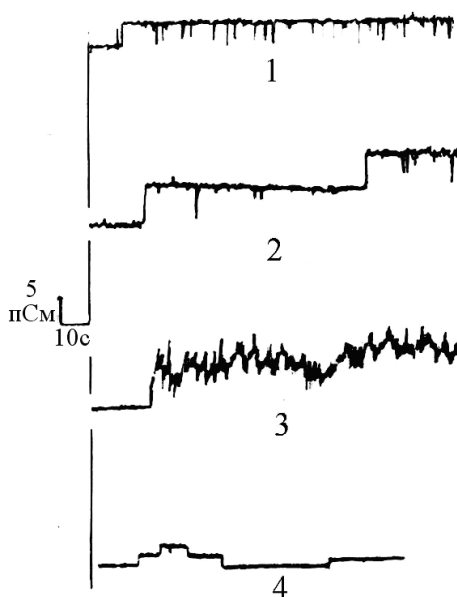


Рисунок 2. Одиночные ионные каналы амфотерицина В

канала – 6,5 пСм. Ионный канал нистатина имеет проводимость – 2 пСм. У кандидина и микогептина ионный канал имеет проводимость – 0,5 пСм. Левориновый канал имеет самую меньшую проводимость – 0,2-0,3 пСм. В присутствии леворина наблюдается идеальная катионная селективность. Однако через амфотерициновые каналы анионы проходят лучше, чем катионы. Анионная избирательность мембраны в присутствии микогептина значительно меньше. В растворе  $\text{NaNO}_3$  наблюдается положительный потенциал, то есть анион  $\text{NO}_3^-$  проходит через каналы хуже, чем ион  $\text{Na}^+$ . Замена ОН-группы молекулы микогептина на карбонильную приводит к уменьшению проницаемости канала для анионов, что связано с дипольным моментом карбонильной группы, повернутой отрицательным зарядом к середине канала. Так в середине канала возникает дополнительный электростатический барьер для проникающих анионов. Для наблюдения амфотерициновых одиночных каналов необходима концентрация  $2 \cdot 10^{-8}$  М антибиотиков, а нистатиновых –  $1 \cdot 10^{-7}$  М (при соотношении фосфолипид: холестерин = 20: 1), то есть для сборки амфотерициновых каналов необходима меньшая концентрация антибиотика, чем для нистатиновых, что объясняется разрывом одной двойной связи в полиеновой цепи нистатина. При добавлении с одной стороны мембраны амфотерицина В, микогептина и нистатина в концентрации  $10^{-5}$  М, не происходит увеличения проводимости мембраны, но если при этом добавить любой из этих препаратов в концентрации  $2 \cdot 10^{-8}$  М с другой стороны мембраны, то наблюдаются комбинированные каналы. Проводимость таких комбинированных каналов зависит от знака потенциала и лежит между значениями проводимости обоих «чистых» каналов. Комбинированные каналы могут образоваться из двух разных по структуре и избирательной проницаемости ПА. Например, при введении с одной стороны мембраны анион-специфичных молекул амфотерицина В, а с другой стороны мембраны катион-специфичных молекул леворина наблюдается их взаимодействие и образование комбинированных каналов, селективность которых определяется молекулами амфотерицина В. Проводимость комбинированных каналов составляет 2-3 пСм, что вдвое меньше проводимости индивидуальных амфотерициновых каналов и в 6 раз больше проводимости левориновых каналов. Предполагается, что при взаимодействии разных по селективности двух полупор, происходит изменение электрического потенциала внутри канала в области зоны контакта двух полупор. На рисунке 3 представлены ионные каналы амфотерицина и леворина в симметричных условиях и комбинированные ионные каналы амфотерицина В и леворина.

В молекуле леворина  $\text{A}_2$  в гидрофильной цепи отсутствуют две ОН-группы. С уменьшением числа ОН-групп в гидрофильной цепи молекул селективность меняется с анионной на катионную. Для сравнения можно привести пример изменения селективности ионных каналов в зависимости от числа гидроксильных групп в гидрофильной части лактонного кольца в ряду: амфотерицин В – нистатин – микогептин – леворин  $\text{A}_2$ . Это не дает основания полностью утверждать, что система проницаемости локализована на гидрофильной стороне молекул ПА. В данном случае гибридные или комбинированные каналы образуются при взаимодействии ароматических и неароматических антибиотиков. Ароматические антибиотики, в частности, леворин, характеризуются тем, что в его химической структуре содержатся две положительно заряженные аминные группировки. Несмотря на наличие этих двух группировок, ароматические ПА создают как в бислоях, так и в клеточных мембранах почти идеальную избирательную проницаемость для катионов щелочных металлов [4].

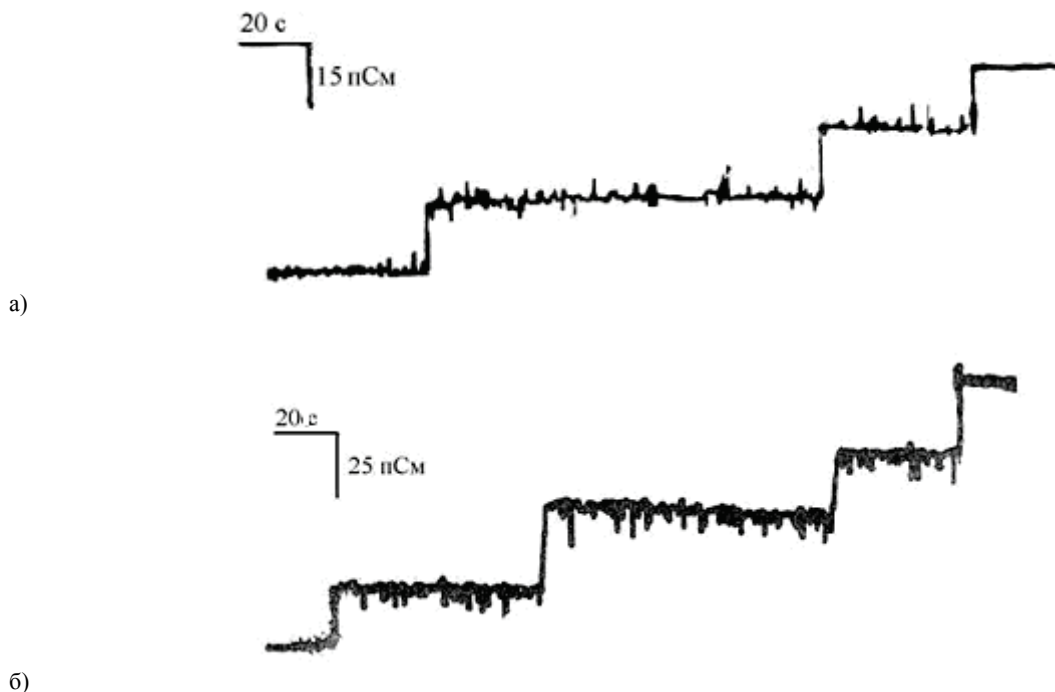
Хотелось бы отметить также факт формирования комбинированных ионных каналов нейтрального ПА филипина с амфотерицинов и нистатином [5]. Проводимость «чистых» филипиновых одиночных ионных каналов достаточно высокая и составляет 15-20 пСм на холестеринсодержащих бислоевых мембранах при концентрации антибиотика  $2 \cdot 10^{-8}$  М, что в несколько раз превышает проводимость амфотерициновых каналов (рис. 4а). Из рисунка 4 видно, что филипиновые ионные каналы так же, как и амфотерициновые, имеют два основных состояния – проводящее и непроводящее. За время жизни в канале видны кратковременные переходы из проводящего в непроводящее состояние. При дальнейшем исследовании филипина оказалось, что в случае введения с одной стороны мембраны филипина, а с другой стороны амфотерицина В или нистатина, образуются комбинированные ионные каналы. В случае образования комбинированных ионных каналов концентрации



**Рисунок 3.** Дискретные изменения проводимости бислоиных липидных мембран с холестерином (20 : 1) в присутствии амфотерицина В и леворина: 1- амфотерицин В в симметричных условиях ( $2 \cdot 10^{-8}$  М); 2 – амфотерицин В содной стороны мембраны ( $2 \cdot 10^{-8}$  М;  $\text{pH}=3,0$ ); 3- леворин с одной стороны мембраны ( $5 \cdot 10^{-8}$  М); 4- комбинированные ионные каналы амфотерицин В ( $5 \cdot 10^{-8}$  М); -леворин А<sub>2</sub> ( $2 \cdot 10^{-8}$  М). Водно-солевой раствор: 2М КСl;  $t^{\circ} = 25^{\circ}$ ; мембранный потенциал 200 мВ

амфотерицина В и филипина одинаковые –  $1 \cdot 10^{-6}$  (рис. 4б). При этом наблюдается взаимодействие между антибиотиками и увеличение интегральной проводимости мембран [5].

Резко уменьшив концентрацию антибиотиков, удалось экспериментально обнаружить работу комбинированных каналов, запись которой показана на рис.4б. Проводимость комбинированных каналов филипина и амфотерицина В составляет 25-30 пСм, что в 1,5-2 раза выше «чистых» филипиновых каналов,



**Рисунок 4.** а) Одиночные филипиновые каналы в фосфолипидных мембранах. Мембраны получали из смеси общих фосфолипидов бычьего мозга и холестерина в весовом соотношении 20мг:1мг в 2 М растворе КСl,  $\text{pH}$  7,0, Температура  $t = 22^{\circ}\text{C}$ . Потенциал на мембране 200 мВ. Концентрация филипина –  $2 \cdot 10^{-8}$  М. б) Комбинированные каналы, образованные в липидных мембранах при одинаковых концентрациях филипина и амфотерицина В ( $2 \cdot 10^{-8}$ М), введенных по разные стороны мембраны. Состав мембраны – смесь общих- фосфолипидов бычьего мозга и холестерина в весовом соотношении фосфолипид:холестерин 20мг:1мг в 2 М КСl,  $\text{pH}$  7,0.Температура  $t = 22^{\circ}\text{C}$ . Потенциал на мембране 200 мВ

примерно, в 5 раз выше «чистых» амфотерициновых каналов [5]. Избирательная проводимость филипиновых каналов преимущественно катионная. В ответ на создание 10-кратного градиента КСI на мембране наблюдается разность потенциалов величиной  $+18 \pm 2$  мВ. Результаты проведенных экспериментов дают основание предположить, что механизм избирательного действия ПА основан на специфическом взаимодействии аминной группы молекул антибиотиков аминной группы молекул антибиотиков с  $\beta$ -ОН группой стерина с образованием водородной связи между ними. Устойчивость ионного канала в проводящем состоянии силой Ван-дер-Вальсового взаимодействия между полиеновыми связями молекул антибиотиков и молекулами стерина внутри мембраны, а также электростатическим взаимодействием между аминной и карбоксильной группой соседних молекул антибиотиков, расположенных у входа в канал [4]. Вероятно, образование водородной связи между антибиотиков и фосфотными группами молекул фосфолипидов приводит к сборке ионных каналов в мембране [4]. Толщина самой мембраны больше, чем длина полиеновой полупоры и, для того, чтобы создать проводящий трансмембранный канал, необходимо взаимодействие двух канальных полупор с обеих сторон мембраны. Однако при определенных экспериментальных условиях наблюдается образование проводящей полупоры при одностороннем введении амфотерицина В и леворина [6]. Молекулярная структура гидрофильной части канала до сих пор не установлена из-за отсутствия соответствующих методов определения точной локализации молекулярных групп, выстилающих внутреннюю полость ионного канала. Согласно модели канала гидрофильные цепи молекул ПА, выстилающие полость канала, различаются очень мало. Тем не менее, даже небольшие различия существенно влияют на проводимость и избирательность канала.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Исходя из вышеизложенного, следует отметить, что исследования физико-химических свойств индивидуальных и комбинированных ионных каналов, индуцируемых макролактонными ПА различной химической структуры, показывают корреляционную зависимость структуры и функции данных соединений. Сравнительный анализ экспериментальных данных по проводимости и избирательности одиночных и комбинированных ионных каналов на бимолекулярных мембранах в присутствии макроциклических ПА открывает перспективы для научно обоснованной химической молификации антибиотиков нового поколения для дальнейшего использования этих препаратов в практической медицине.

#### Список литературы/References:

1. Borowski E. Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmaco.*, 2000, vol. 55, pp. 206-208.
2. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. Methods for formation of single bimolecular lipid membrane in aqueous solution. *J. Phys. Chem.*, 1963, vol. 67, pp. 534-535.
3. Folch J., Leese M., Sloan-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Bio. Chem.*, 1957, vol. 226, pp. 4997-509.
4. Касумов Х.М. *Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков*. Монография. Баку–Элм, Москва: Наука, 2009, 511 с. [Kasumov Kh.M. *Structure and membrane function of polyene macrolide antibiotics*. Monograph. Baku-Elm, Moscow: Nauka, 2009, 511 p. (In Russ.)]
5. Samedova A.A., Taghi-zade T.P., Kasumov Kh.M. Dependence of ion channel properties formed by polyene antibiotics molecules on the lactone ring structure. *Russian J. Of Bioorganic Chemistry*, 2018, vol. 44, no. 3, pp. 337-345.
6. Ибрагимова В, Х., Алиева И.Н., Касумов Х.М. Эффект леворина  $A_2$ , вводимого с одной стороны липидных мембран. *Биологические мембраны*, т. 23, № 6, с. 493-502. [Ibragimova V.Kh., Aliyeva I.N., Kasumov Kh.M. Effect of levorin  $A_2$  added by one side of lipid membranes. *Biological membranes*, vol. 23, no. 6, pp 493-502. (In Russ.)]

**PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF COMBINED ION CHANNELS, INDUCED BY  
MACROCYCLE POLYENE ANTIBIOTICS OF DIFFERENT CHEMICAL STRUCTURE IN BILAYER  
LIPID MEMBRANES**

**Baghirova A.A.**

Azerbaijan National Academy of Science, Institute of Botany

40, Badamdart Highway, Baku, AZ1004, Azerbaijan; e-mail: arifabaghirova@gmail.com

**Abstract.** This article is devoted to the research of biological activity and physical and chemical properties of macrolactone polyene antibiotics (PA) with different hydrophilic and hydrophobic parts of molecules at the interaction with bilayer lipid membranes (BLM). Physical and chemical parameters of ion channels such selectivity and conductivity inducing by PA are influenced even by small changes in the number of double bonds, hydroxyl and carbonyl groups in molecule of these compounds. It was found that higher number of double bonds in the molecule of PA leads the higher biological activity of antibiotics. Among of the different PA there are used amphotericin B, levorin A, nystatin and filipin in the our experiments. There is comparative analysis of single ion channels of above mentioned PA and hybrid ion channels formed of PA with various ion channels in cholesterol containing phospholipid membranes. It makes possibilities for the targeted synthesis of new generation antibiotics.

**Key words:** polyene antibiotics (PA), bilayer lipid membranes (BLM), membrane activity, conductivity, selectivity, ion channels.