

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЧУЛКОВ

Евгений Георгиевич

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА
КАНАЛООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ НИСТАТИНА**

03.01.03 — молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Ольга Сергеевна Остроумова

Санкт-Петербург

2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность исследования	6
Цели и задачи исследования	7
Основные положения, выносимые на защиту	8
Научная новизна исследования	8
Теоретическая и практическая значимость работы	9
Публикации	9
Апробация работы	10
Список работ, опубликованных по теме диссертации	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Общая характеристика, классификация и биологические функции флавоноидов	13
1.2. Дипольный потенциал мембраны и флавоноиды	16
1.3. Спонтанная кривизна и флавоноиды	23
1.4. Макролидные полиеновые антибиотики	27
1.4.1. Классификация полиеновых антибиотиков	27
1.4.2. Молекулярные механизмы биологической активности нистатина и амфотерицина Б	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Материалы	41
2.2. Методы	43
2.2.1. Электрофизиологические измерения на плоских липидных мембранах	43

2.2.2. Конфокальная микроскопия гигантских моноламеллярных липосом	47
2.2.3. Измерение проницаемости мембран больших моноламеллярных липосом с помощью флуоресцентного маркера кальцеина	48
2.2.4. Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	51
3.1. Влияние флавоноидов на мембранную активность нистатина	51
3.1.1. Увеличение трансмембранного тока, индуцированного односторонней добавкой нистатина, под действием флоретина	51
3.1.2. Подтверждение канальной природы тока	52
3.1.3. Неспецифичность действия флавоноидов на асимметричные нистатиновые поры	56
3.1.4. Проверка электростатической гипотезы регуляции активности асимметричных нистатиновых каналов	59
3.1.5. Влияние флавоноидов на латеральную гетерогенность и механические свойства бислоя	63
3.1.6. Образование <i>so</i> фазы полиеновыми антибиотиками	69
3.1.7. Влияние флавоноидов на фазовую сегрегацию мембраны, модифицированной нистатином	72
3.1.8. Полиморфизм липидов, индуцированный флоретином, биоханином А и мирицетином	74
3.2. Мишень флавоноидов — липидное устье асимметричного нистатинового канала	76
3.2.1. Влияние нистатина и флавоноидов на ДОФЭ-содержащие бислои	76
3.2.2. Рост активности нистатина в присутствии флавоноидов со стороны, противоположной стороне добавки полиена	78
3.2.3. Влияние флавоноидов на утечку кальцеина из липосом	79

3.2.4. Действие флавоноидов на индуцированную нистатином утечку кальцеина из липосом	82
3.2.5. Модель увеличения каналобразующей активности нистатина флавоноидами	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	88
ВЫВОДЫ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДМСО — диметилсульфоксид

ДОФХ — 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилохолин

ДОФЭ — 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин

ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхолин

ЛР-ДПФЭ — N-(лисамин родамин В сульфонил)-

дипальмитоилфосфатидилэтанолламин

ПОФХ — 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин

СМ — сфингомиелин мозга свиной

ТГАФ — 2,4,6-тригироксиацетофенон

ТХ-100 — тритон X-100

Хол — холестерин

ld — жидкая неупорядоченная липидная фаза

lo — жидкая упорядоченная липидная фаза

so — твёрдая упорядоченная (гелеобразная) липидная фаза

φ_d — дипольный потенциал мембраны

$\Delta\varphi_d$ — изменение дипольного потенциала мембраны

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Противогрибковые макролидные полиеновые антибиотики широко используются в медицине. Их фунгицидное действие обусловлено образованием в плазматической мембране патогенной клетки пор, через которые происходит неконтролируемая утечка компонентов цитоплазмы [1,2]. Несмотря на многолетние интенсивные исследования полиеновых антибиотиков, характер их взаимодействия с липидными мембранами остаётся недостаточно изученным. Токсичность полиенов является серьёзным ограничением их применения в клинической практике [3–5]. Востребованной задачей молекулярной биологии является поиск соединений, увеличивающих активность антибиотиков по отношению к болезнетворным микроорганизмам и снижающих их токсичность для человека.

Потенциальными синергистами действия полиенов могут выступать полифенольные растительные метаболиты — флавоноиды, известные широким спектром биологической активности в клетках млекопитающих [6,7]. Благодаря своей амфифильной природе флавоноиды способны встраиваться в липидные мембраны и модифицировать их физико-химические свойства: характер фазовой сегрегации [8], дипольный потенциал [9–11], температуру плавления углеводородных цепей липидов [12], локальную кривизну, профиль латерального давления, текучесть [13] и проницаемость [14] бислоя.

Среди модельных систем, использующихся для изучения взаимодействия полиенов с плазмолеммой, особый интерес представляют те, в которых антибиотик находится только с одной стороны мембраны, так как *in vivo* экзогенный агент взаимодействует только с внешней стороной клеточной мембраны [15,16].

В экспериментах на мембранах живых организмов интерпретация получаемых данных затруднена влиянием множества факторов на измеряемые

величины. Работа с искусственными модельными мембранами позволяет избежать сложностей подобного рода и с высокой точностью контролировать липидный состав бислоя и омывающих его растворов, концентрацию биологически активных соединений, регистрировать ионные потоки и движущие силы транспорта. Поэтому использование искусственных липидных бислоев представляется актуальным экспериментальным подходом для изучения взаимодействия мембраноактивных соединений с поверхностью клетки.

Цели и задачи исследования

Цель работы — выявление механизмов действия флавоноидов на мембранную активность полиенового антибиотика нистатина. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучение влияния различных флавоноидов на трансмембранный ток, индуцированный введением нистатина с одной стороны мембраны.
2. Определение характера действия флавоноидов на физико-химические свойства мембраны (фазовую сегрегацию в гигантских однослойных липосомах различного состава, дипольный потенциал, проницаемость для кальцеина, температуру плавления углеводородных цепей липидов).
3. Выяснение связи между увеличением нистатин-индуцированного трансмембранного тока и изменениями физико-химических свойств бислоя.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Двусторонняя добавка флавоноидов (таксифолина, кверцетина, биоханина А, мирицетина, флоретина, флорицина, генистеина и генистина) увеличивает трансмембранный ток, индуцированный односторонней добавкой нистатина.

2. Способность флавоноидов дестабилизировать мембрану зависит от их гидрофобности и конформации.

3. Рост каналообразующей активности нистатина при добавке флавоноидов обусловлен изменением эластических свойств мембраны *транс*-монослоя, в котором находится липидное устье полиеновой поры.

Научная новизна исследования

Среди флавоноидов, обнаружены соединения, увеличивающие каналообразующую активность нистатина, введённого с одной стороны мембраны. Установлено, что полифенольные соединения влияют на липидное устье полиеновой поры. С помощью конфокальной микроскопии впервые визуализированы твёрдые упорядоченные гелеобразные домены, индуцированные добавкой нистатина в мембранах гигантских однослойных липосом из пальмитолеоилфосфатидилхолина или смеси диолеоилфосфатидилхолина и холестерина. Показано, что флоретин и биоханин А способны растворять эти домены. Выявлен синергизм действия флоретина и нистатина на утечку флуоресцентного маркера кальцеина из больших однослойных липосом.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют представления о молекулярных механизмах мембранной активности полиеновых антибиотиков и флавоноидов. Результаты работы могут способствовать разработке новых, в том числе липосомальных, лекарственных форм на основе полиеновых антибиотиков. Впервые продемонстрировано образование гелеобразных доменов в присутствии нистатина в бислоях, содержащих липиды с низкой температурой плавления ацильных цепей, что может быть применено для модернизации методик, использующих нистатин в качестве флуоресцентного маркера стерин-обогащённых упорядоченных доменов в клеточных мембранах. Обнаруженное влияние флавоноидов на фазовую сегрегацию позволит полнее характеризовать спектр их воздействия на липидные мембраны.

Результаты работы могут быть использованы в учебных курсах по молекулярной биологии, биофизике, липидомике и биомембранологии в высших учебных заведениях.

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Апробация работы

Основные положения работы были представлены на III и IV конференциях молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012, 2014), 38 конгрессе Европейского биохимического общества (Санкт-Петербург, 2013), III Международной научной Интернет-конференции “На стыке наук. Физико-химическая серия” (Казань, 2015), V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием “Молодая фармация — потенциал будущего” (Санкт-Петербург, 2015), X научно-практической конференции молодых ученых и студентов “Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику” ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием (Душанбе, 2015). Материалы докладывались на научных семинарах Лаборатории ионных каналов клеточных мембран Института цитологии РАН.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Ostroumova O.S., **Chulkov E.G.**, Stepanenko O.V., Schagina L.V. Effect of flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures. // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. Vol. 178. P. 77–83.
2. **Chulkov E.G.**, Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Direct visualization of solid ordered domains induced by polyene antibiotics in giant unilamellar vesicles. // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. Vol. 183. P. 204–207.
3. **Chulkov E.G.**, Schagina L.V., Ostroumova O.S. Membrane dipole modifiers modulate single-length nystatin channels via reducing elastic stress in the vicinity of the lipid mouth of a pore. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. Vol. 1848. P. 192–199.

Тезисы докладов:

1. **Чулков Е.Г.**, Остроумова О.С. Эффект дипольных модификаторов на стационарный трансмембранный ток, индуцированный полиеновым антимикотиком нистатином, в содержащих эргостерин бислоях. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на III конференцию молодых учёных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 15–16 мая 2012 г.). Цитология. 2012. Т. 54, №4. С. 363.
2. **Chulkov E.G.**, Ostroumova O.S. The influence of the plant flavonoids on the domain shape in unilamellar vesicles. // 38th FEBS Congress. FEBS Journal. 2013. Vol. 280, Suppl. 1. P. 205.
3. **Чулков Е.Г.**, Степаненко О.В., Щагина Л.В., Остроумова О.С. Полиморфизм липидов, индуцированный флоретином, биоханином А и мирицетином. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на IV конференцию молодых учёных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 18–20 марта 2014 г.). Цитология. 2014. Т. 56, №5. С. 387–388.
4. **Чулков Е.Г.**, Щагина Л.В., Остроумова О.С. Исследование влияния флавоноидов на фазовое разделение в гигантских однослойных липосомах. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на IV конференцию молодых учёных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 18–20 марта 2014 г.). Цитология. 2014. Т. 56, №5. С. 388.
5. **Чулков Е.Г.**, Остроумова О.С. Исследование влияния полиеновых антибиотиков на фазовое разделение в гигантских моноламеллярных липосомах. // На стыке наук. Физико-химическая серия. III Международная научная Интернет-конференция Казань. 2015. Т. 2. С. 115–117.
6. **Чулков Е.Г.** Флавоноиды увеличивают мембранную активность нистатина. // Сборник материалов V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием “Молодая фармация — потенциал будущего”. СПб: Изд-во СПХФА, 2015. С. 228–230.
7. **Чулков Е.Г.** Растительный полифенол флоретин увеличивает мембранную активность нистатина и амфотерицина Б. // Сборник материалов X годичной

научно-практической конференций молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием “Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику”. 2015. С. 326.

8. **Чулков Е.Г.**, Остроумова О.С. Влияние флавоноидов на утечку кальцеина из липосом. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на II Всероссийскую конференцию “Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет” (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 20–22 октября 2015 г.). Цитология. 2015. Т. 57, №9. С. 664–665.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика, классификация и биологические функции флавоноидов

Флавоноиды — полифенольные соединения, как правило, выделяемые из растительного сырья. Начало активного изучения флавоноидов относится к середине прошлого века. Интенсивность их исследований стремительно возрастает. В последнее время число ежегодно публикуемых работ, посвящённых флавоноидам, достигло нескольких тысяч (Рис. 1).

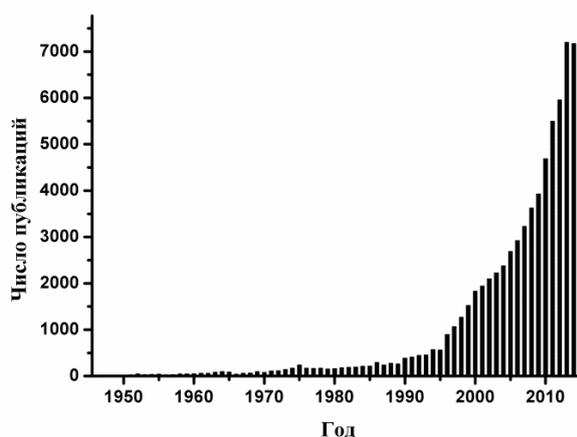


Рис. 1. Распределение по годам числа работ, посвящённых исследованию флавоноидов. Данные приведены согласно базе Scopus.

В начале 1960х гг. считалось, что флавоноиды в основном встречаются в вакуолях высших растений, но их строение и функции оставались мало изученными. С развитием в 1970х гг. методов N^1 ядерно-магнитного резонанса и высокоафинной жидкостной хроматографии удалось установить химические структуры многих флавоноидов. Лидирующими группами в изучении флавоноидов в тот период были лаборатория в Техасском университете, г. Остин (под

руководством Марби, Альстона и Тёрнера) и в университете Ридинга, Великобритания (под руководством Харборна) [17].

На Рис. 2 показана общая структурная формула молекул флавоноидов и некоторые наиболее распространённые классы этих соединений в негликозилированной форме (агликоны). Структурно флавоноиды содержат два бензольных кольца (А и В), соединённые друг с другом изопропановым фрагментом (часто замыкающимся в кольцо С) и имеющие гидроксильные группы в различных положениях бензольных колец. В природе флавоноиды часто имеют остаток глюкозы в качестве заместителя в бензольном кольце.

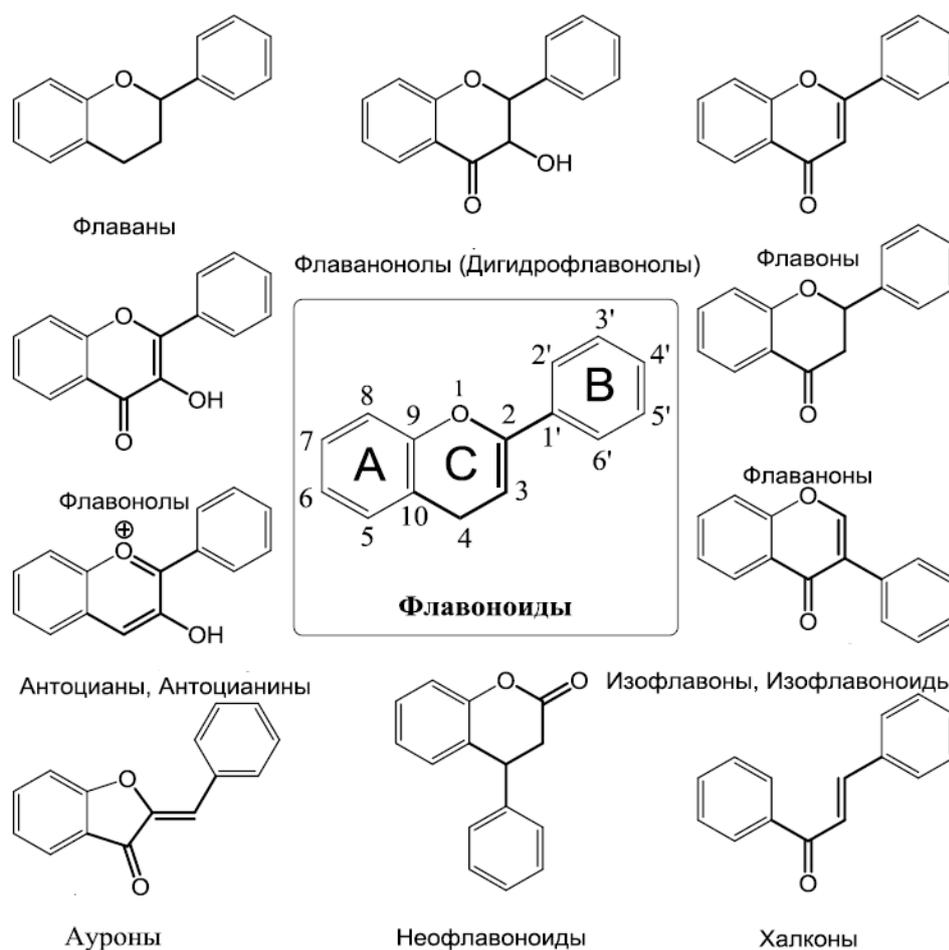


Рис. 2. Структурные формулы типичных классов флавоноидов [18].

Биосинтез флавоноидов является частью фенилпропаноидного пути растительного метаболизма. Главными предшественниками флавоноидов

являются аминокислота фенилаланин и малонил-кофермент А, образующийся в цикле трикарбоновых кислот [19]. Широкое разнообразие ферментов, участвующих в синтезе, позволяет рассматривать эти метаболические пути как мишень биоинженерии с целью создания мутантов с заданными свойствами. Так, например, в начале века с помощью введения в геном дикой розы нуклеотидной последовательности, кодирующей синтез флавоноида дельфинидина — синего пигмента фиалки, были выведены синие розы [20].

Понимание биологической функции флавоноидов в организмах, синтезирующих их, может быть полезно для поиска наиболее эффективных путей применения растительных полифенолов в медицине. В растениях флавоноиды выполняют защитные функции. Например, антоцианины токсичны для беспозвоночных, но не токсичны для высших животных [17]. Апигенинин ингибирует рост грибов *Fusarium oxysporum*, *Gibberella zeae*, *Gliocladium roseum*, *Alternaria* и некоторых грамм-позитивных бактерий [21]. Флорицин в высоких концентрациях оказывает ингибирующее действие на рост *Microsporum canis* [22]. Способность фенольных соединений поглощать ультрафиолетовое излучение предохраняет растения от повреждений, наносимых солнечными лучами [23]. Исследования *in vitro* указывают на высокую антиоксидантную активность ряда флавоноидов, сравнимую с эффектами аскорбиновой кислоты и α -токоферола [24–28]. Для растений защита от свободных радикалов крайне важна, т.к. в процессе фотосинтеза в хлоропластах интенсивно образуется пероксид водорода и другие активные формы кислорода [29].

В животных клетках флавоноиды способны проявлять антиоксидантную активность. Например, в экспериментах на крысах и клеточных линиях млекопитающих показано значительное снижение количества поломок ДНК и уровня перекисного повреждения липидов и липопротеинов низкой плотности при введении флавоноидов [30–34]. Предполагается три механизма антиоксидантной активности: *in vitro* флавоноиды способны хелатировать ионы железа и меди [35,36], способствующие продукции свободных радикалов по механизму реакции Габера-Вайсса [37]; поглощение ультрафиолетового излучения, создающего

свободные радикалы [17] и прямое тушение реакционно способных атомов кислорода и азота. Флавоноиды могут выступать в качестве антидота, предохраняющего растения от отравлений тяжёлыми металлами. Например, показано, что катехин способен образовывать стабильные комплексы с Al^{3+} [38]. Флавоноиды участвуют в ответных реакциях на холодовой стресс [39]. Велика роль флавоноидов в размножении растений, т.к. многие представители класса флавоноидов обладают яркой окраской и привлекают опылителей. Высокая встречаемость флавоноидов в семенах защищает ДНК растений от повреждений ультрафиолетовыми лучами и окислительного стресса [40]. Высказываются предположения о функционировании флавоноидов в качестве растительных гормонов [41].

Растительный компонент занимает большую долю в рационе животных и человека, что ставит вопрос о влиянии флавоноидов на метаболизм клеток и организмов млекопитающих. Большинство флавоноидов существует в форме гликозидов, которые в желудочно-кишечном тракте при помощи флоридин-гидролазы гидролизуются до агликонов [42]. Агликоны всасываются через стенку кишечника и превращаются в β -глюкорониды и сульфаты [43]. Изофлавоны, такие как, например, генистеин и даидзеин, а также их гликозиды из-за своего структурного сходства с женскими половыми гормонами нередко рассматриваются как нестероидные фитоэстрогены [44].

1.2. Дипольный потенциал мембраны и флавоноиды

Существование потенциального барьера на границе между мембраной и водным раствором известно с последней трети прошлого века [10,45]. Наличие положительного электрического поля внутри мембраны объяснило значительно большую эффективность транспорта гидрофобных анионов по сравнению с гидрофобными катионами [46]. Форма существования мембраны как жидкого кристалла определяет анизотропию бислоя, что приводит к неравномерному

распределению электрического потенциала вдоль нормали к поверхности мембраны. Скачок потенциала на границе раздела мембрана-водный раствор, обусловлен специфической взаимной ориентацией диполей мембранных липидов и связанной с мембраной воды. В результате подобного разделения зарядов электрический потенциал внутренней части бислоя оказывается положительным относительно окружающей мембрану воды.

Толщина мембраны (порядка 4 нм) значительно превышает размер молекул типичных биологических диэлектриков, что позволяет рассматривать углеводородную область как гомогенную среду. Зная нормальную компоненту поверхностной плотности диполей (σ) и предполагая их равномерное распределение по поверхности мембраны, можно найти величину φ_d на расстоянии z_0 от плоскости, проходящий через центры диполей, проинтегрировав вклады от всех диполей в мембране:

$$\varphi_d = 2 \iint \frac{z_0 \sigma dx dy}{4\pi \varepsilon \varepsilon_0 (x^2 + y^2 + z_0^2)^{1.5}} \quad (1)$$

где ε и ε_0 — относительная и абсолютная диэлектрические проницаемости мембраны, x , y и z — оси в декартовой системе координат (Рис. 3). Коэффициент 2 перед интегралом учитывает наличие двух монослоёв, каждый из которых даёт идентичный вклад в дипольный потенциал. Решением приведённого выше уравнения является константа (φ_d), не зависящая от z_0 на расстояниях больше длины плеча диполя [47,48]:

$$\varphi_d = \frac{\sigma}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (2)$$

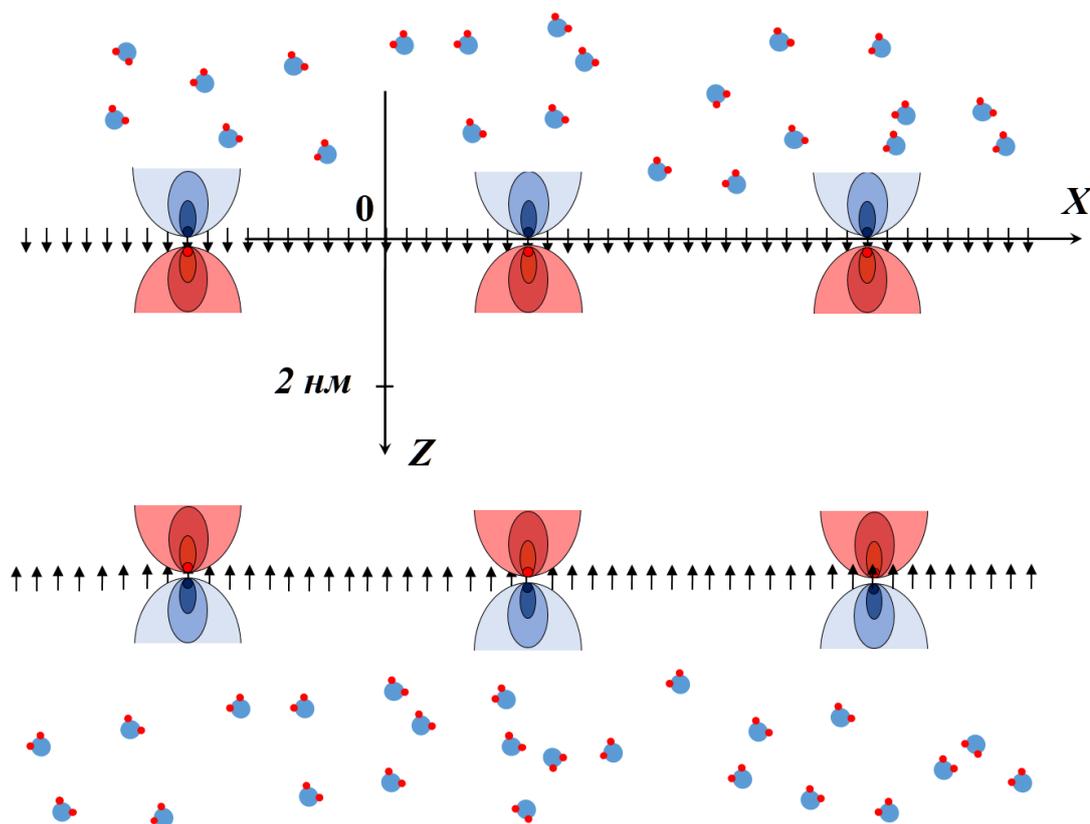


Рис. 3. Схема возникновения дипольного потенциала. Ориентация эффективных диполей противоположных монослоёв мембраны голова к голове приводит к появлению дипольного потенциала внутри гидрофобной области мембраны. Ось OY ориентирована перпендикулярно к плоскости рисунка.

В силу симметрии плоскость диполей создаёт электрическое поле как в углеводородной области бислоя, так и в омывающем мембрану водном растворе. В последнем случае оно незначительно в силу высокой диэлектрической проницаемости воды, значительно большей диэлектрической проницаемости в области жирнокислотных остатков фосфолипидов.

Взаимосвязь между различными электрическими потенциалами, относящимися к мембране, показана на Рис. 4. Трансмембранный потенциал определяется как разность потенциалов между водными растворами по разные стороны липидной мембраны. Поверхностным потенциалом называют разницу потенциалов между водной фазой и поверхностью мембраны, а дипольным

потенциалом — разницу потенциалов между углеводородной областью и водным раствором.

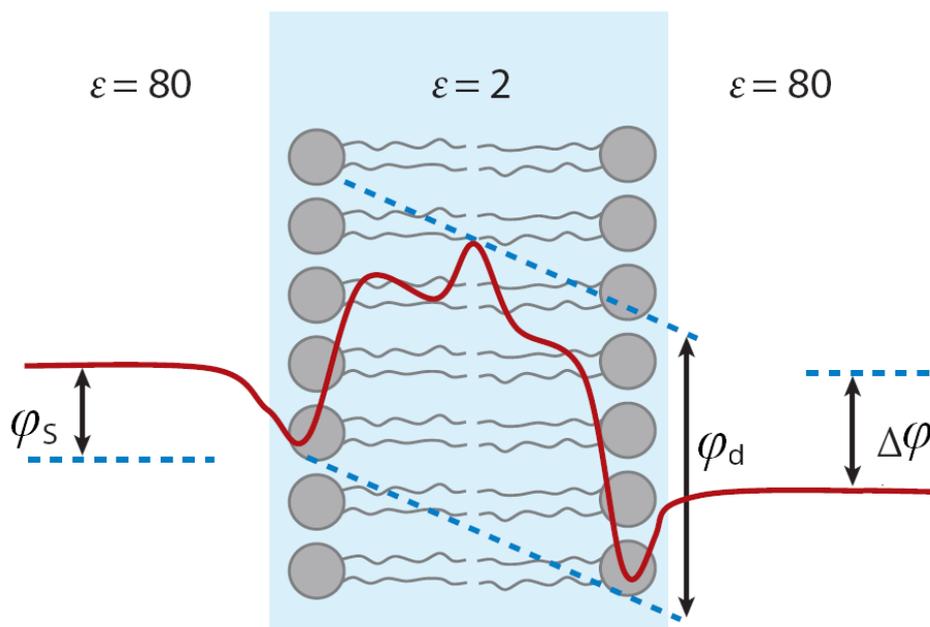


Рис. 4. Взаимосвязь между дипольным (φ_d), поверхностным (φ_s) и трансмембранным ($\Delta\varphi$) электрическими потенциалами в липидном бислое [49]. Углеводородная область мембраны с диэлектрической проницаемостью ϵ равной 2, окружена водным раствором с ϵ равным 80. Профиль электрического потенциала показан сплошной линией.

Непосредственно в эксперименте измерить величину дипольного потенциала мембраны довольно затруднительно [49]. Дипольный потенциал мембран варьирует от 200 до 1000 мВ [50], что значительно превышает типичные величины как трансмембранного, так и поверхностного потенциалов. На абсолютную величину дипольного потенциала значительно влияет состав мембраны. Например, мембраны из глицеромоноолеата имеют меньший дипольный потенциал в сравнении с бислоями, имеющими в своём составе фосфохолины [51]. Наличие в мембране 6-кетохолестанола значительно повышает дипольный потенциал фосфохолиновых мембран [52], а присутствие 30 мол % холестерина в ПОФХ мембране увеличивает её дипольный потенциал примерно на треть [53].

Нелипидные молекулы, способные при введении в мембраноомывающий раствор изменять дипольный потенциал бислоя, называют дипольными модификаторами мембран. Амфифильное строение молекул флавоноидов позволяет им легко адсорбироваться на поверхности мембраны или локализоваться на границе между гидрофильными головками и гидрофобными хвостами фосфолипидов. Адсорбция флавоноидов может сопровождаться изменением свойств мембраны, в частности, её дипольного потенциала (φ_d) [9,10,54]. Среди флавоноидов известны соединения, уменьшающие дипольный потенциал мембран. На Рис. 5 показана схема снижения дипольного потенциала флавоноидами, например, халконами (флоретином и его гликозидом флорицином [9,54,55]), а также флавоноидами, относящимися к другим классам, например, флавонолами кверцетином и мирицетином [11] и изофлавоноидом биоханином А [11,56].

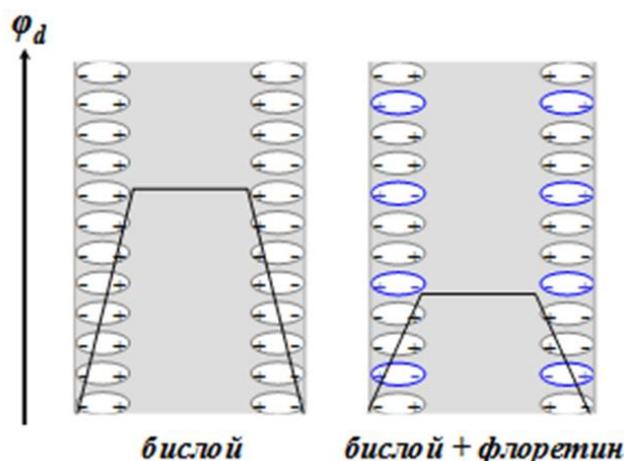


Рис. 5. Схема изменения скачка дипольного потенциала на границе между мембраной и омывающим раствором. Слева показан немодифицированный бислой — суммарный диполь головок фосфолипидов и примембранной воды создаёт эффективный дипольный момент, направленный к центру бислоя. Справа — сорбция флоретина, которая снижает φ_d мембраны.

Дипольный потенциал способен оказывать влияние на каналообразующую активность некоторых соединений, например, аламетицина (Рис. 6). Снижение φ_d

под действием дипольного модификатора флорицина увеличивает каналобразующую активность аламетицина [57]. N-концевой участок пептида несёт положительный заряд, погружённый в углеводородную область мембраны. Адсорбция флорицина уменьшает величину электрического потенциала внутри мембраны и облегчает погружение аламетицина в мембрану. Увеличение числа погружённых в мембрану аламетициновых молекул экспоненциально зависит от величины снижения потенциала.

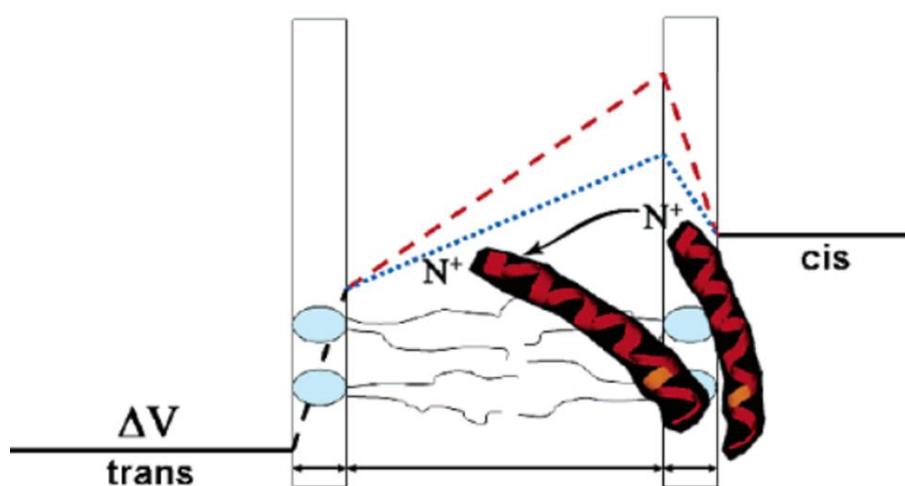


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая механизм увеличения порообразующей активности аламетицина вследствие снижения дипольного потенциала мембраны из-за адсорбции на её поверхности флорицина. Профиль внутримембранного электрического потенциала в контроле показан красными штрихами, а после сорбции флорицина синими точками. Положительный потенциал с *цис*-стороны мембраны способствует ориентации аламетицина вдоль нормали к плоскости бислюа. По [57].

Установлено влияние дипольного потенциала на свойства одиночных грамицидиновых каналов. Снижение φ_d приводит к росту проводимости и времени жизни грамицидинового канала [58,59]. На Рис. 7 показаны изменения проводимости одиночного грамицидинового канала под действием дипольного

модификатора флоретина. В присутствии в мембраноомывающем растворе 91 мкМ флоретина ток, протекающий через одиночный грамицидиновый канал, увеличивается в четыре раза [59]. Эффект связан с повышением концентрации носителей заряда в просвете катион-селективного грамицидинового канала за счёт снижения электростатического потенциального барьера для катионов флоретином.

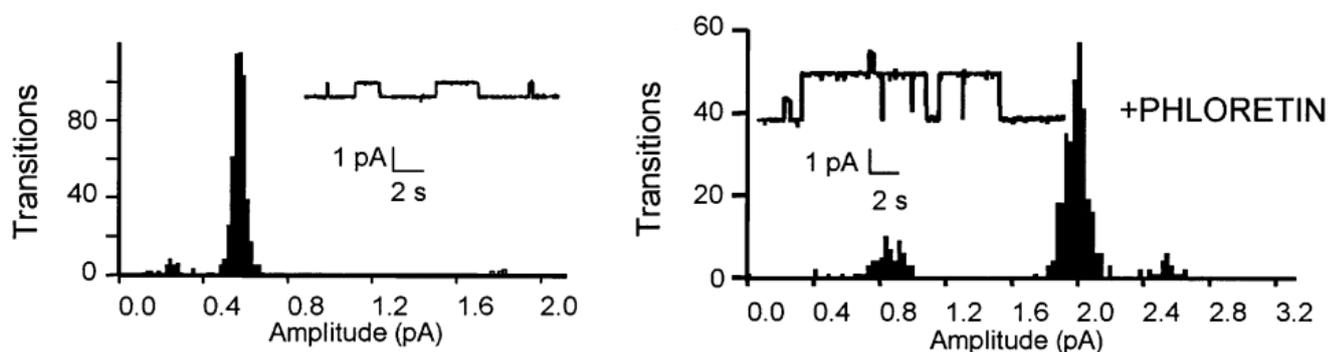


Рис. 7. Ток, протекающий через одиночный грамицидиновый канал, в отсутствие (слева) и присутствии (справа) в мембраноомывающем растворе 91 мкМ флоретина. Дифитаноилфосфатидилхолиновая мембрана омывалась 1 М КСl. Напряжение на мембране составляло 100 мВ. По [59].

Проводимость одиночного симметричного канала, образующегося при двусторонней добавке амфотерицина Б, существенно зависит от дипольного потенциала [60]. На Рис. 8 показаны записи токов, протекающих через одиночный симметричный амфотерициновый канал в отсутствие и присутствии флоретина. Снижение проводимости канала объясняется уменьшением концентрации носителей заряда в просвете анион-селективного амфотерицинового канала за счёт увеличения электростатического потенциального барьера для анионов под действием флоретина.

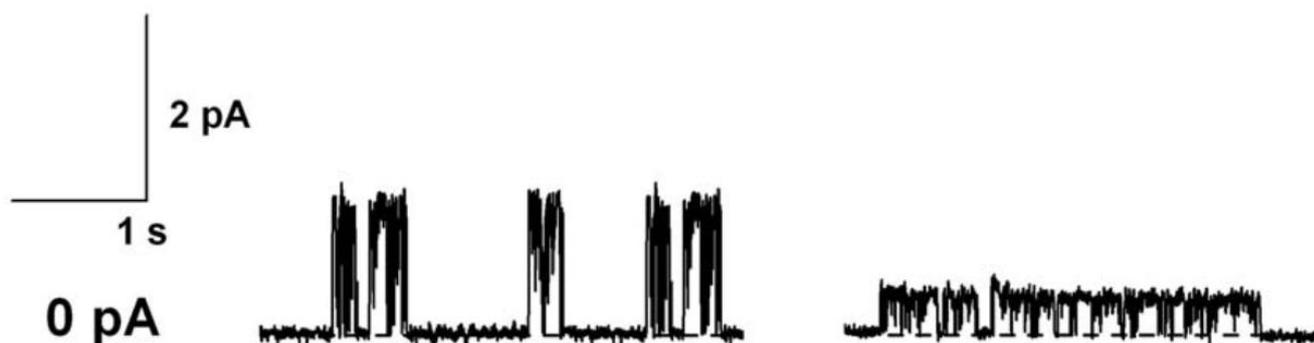


Рис. 8. Ток, протекающий через одиночный симметричный амфотерициновый канал в отсутствие (*слева*) и присутствии (*справа*) 20 мкМ флоретина в мембраноомывающем растворе. Дифитаноилфосфатидилхолин-холестериновая мембрана омывалась 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0, напряжение на мембране составляло 200 мВ. По [60].

1.3. Спонтанная кривизна и флавоноиды

Геометрия бислоя определяется составом и спонтанной кривизной образующих его липидов [61,62]. Спонтанная кривизна липидных молекул определяется отношением площади поперечного сечения головки к площади поперечного сечения хвостов (Рис. 9). Если оно больше единицы, то кривизну называют положительной, если меньше единицы, то кривизну считают отрицательной. Если это отношение равно единице, то липид имеет нулевую спонтанную кривизну. Нулевой спонтанной кривизной характеризуются ДОФХ И ПОФХ, отрицательной — стерины и ДОФЭ, положительной — лизолипиды и детергент тритон X-100 [63]. В суспензии липиды с ненулевой спонтанной кривизной имеют тенденцию к образованию небислойных структур [64].

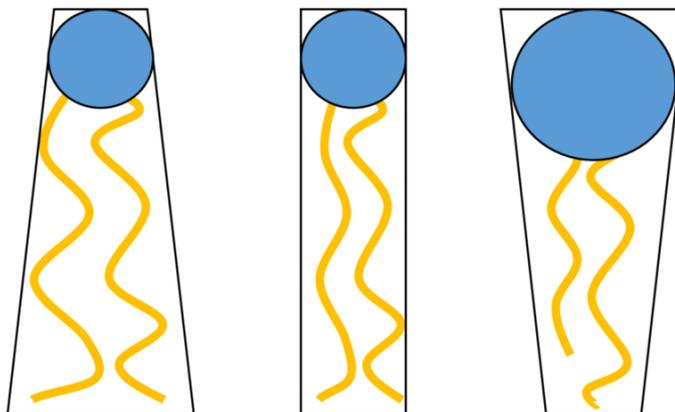


Рис. 9. Схематическое изображение липидов с различной спонтанной кривизной: отрицательной (*слева*), нулевой (*в центре*) и положительной (*справа*).

Строение липидных молекул определяет вид липидной фазы, которую они стремятся образовать: бислойную, гексагональную или инвертированную гексагональную. В живой природе наиболее распространённой липидной фазой является бислойная, которая формируется за счёт динамического баланса между липидами разной спонтанной кривизны. При избытке в мембране липидов с одной определённой спонтанной кривизной форма поверхности монослоя может становиться выгнутой или вогнутой (Рис. 10). Свойства механочувствительных каналов зависят от деформаций бислоя, определяющихся спонтанной кривизной молекул липида, входящих в его состав [65,66]. Процессы экзо- и эндоцитоза во многом протекают за счёт модификации липидного состава мембраны — процессы разделения и слияния мембран наиболее эффективно происходят при наличии в противоположных монослоях липидов с положительной и отрицательной кривизной [67,68]. Образование фосфатидной кислоты из лизофосфатидной кислоты играет важную роль в процессах слияния мембран [61]. Диацилглицеролы, обладающие исключительно высокой отрицательной спонтанной кривизной, участвуют в функционировании комплекса Гольджи [69]. Кривизна мембраны способна регулировать белок-липидные взаимодействия. Так, например, концентрация магаинина, индуцирующая порообразование в липосомах из

фосфатидилглицерина на порядок выше, чем в липосомах из кардиолипина, имеющего более отрицательную спонтанную кривизну [70].

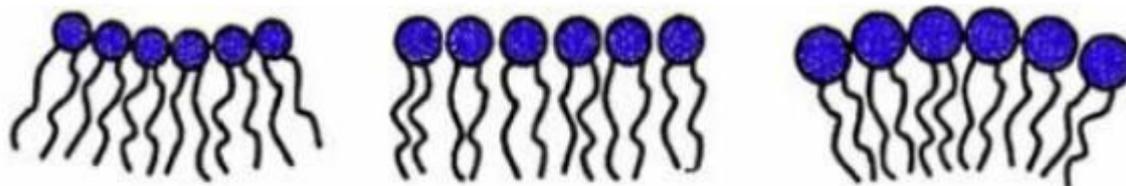


Рис. 10. Влияние липидного состава на кривизну мембраны. *Слева* — липиды с отрицательной спонтанной кривизной формируют вогнутую поверхность липидного монослоя. В центре — липиды с нулевой спонтанной кривизной формируют плоский монослой. Справа — липиды с положительной спонтанной кривизной формируют выпуклый монослой [67,71].

В липидной мембране существуют силы, действующие в направлении, перпендикулярном к нормали к бислою (Рис. 11). Эти силы удобно описывать с помощью модели профиля латерального давления в бислое [72]. В мембранах, содержащих липиды с нулевой спонтанной кривизной, наблюдается отталкивание в области объёмных головок и хвостов, а притяжение в области шеек фосфолипидов. В мембранах из липидов с положительной спонтанной кривизной силы отталкивания гидрофильных головок преобладают над отталкиванием хвостов, что способствует увеличению подвижности углеводородных цепей. В мембранах из липидов с отрицательной спонтанной кривизной гидрофобные хвосты отталкиваются друг от друга, что оставляет гидрофильным головкам больше свободного пространства.

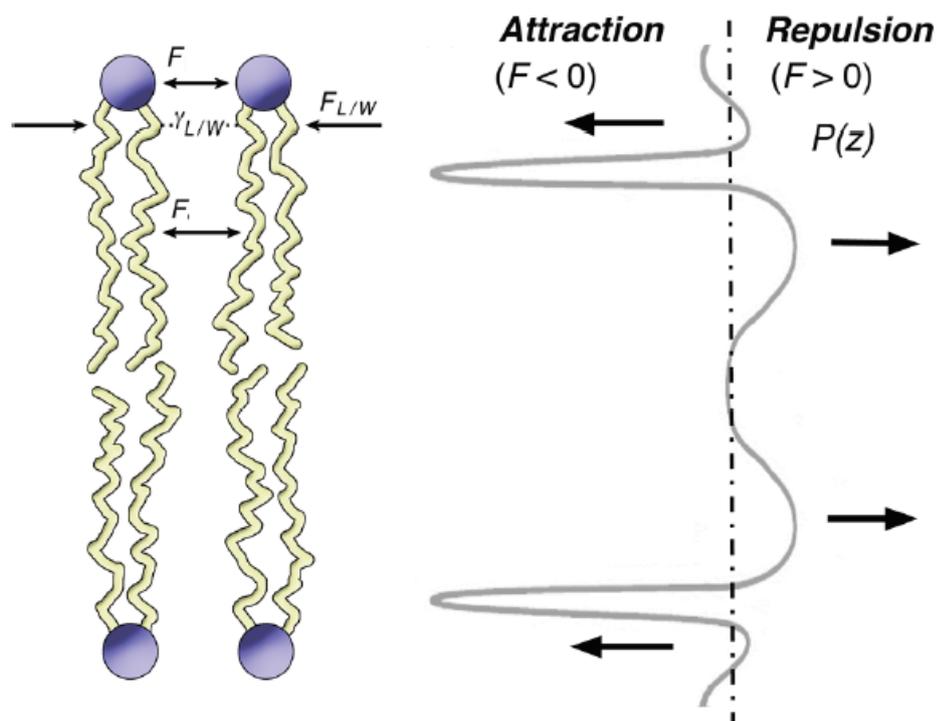


Рис. 11. Схема сил, действующих в бислое (слева), и профиль латерального давления (справа) мембраны, сформированной из липидов с нулевой спонтанной кривизной. Объёмные заместители (головки и хвосты) молекул липида отталкиваются друг от друга, создавая повышенное латеральное давление, в то же время в области шеек фосфолипидных молекул наблюдается пониженное латеральное давление. По [72].

Помимо непосредственно липидного состава на эффективную кривизну мембраны также могут влиять экзогенные соединения, приносящие избыток дефектов упаковки липидных молекул. Например, α -токоферол способствует переходу фосфатидилэтаноламинов из бислойной в небислойную фазу [18]. Флавоноиды способны оказывать существенное влияние на фазовое состояние и геометрию поверхности бислоя. Тараховский показал, что в комплексе с железом кверцетин способен изменять температуру перехода бислой-небислойная фаза ДОФЭ, имеющего отрицательную спонтанную кривизну [18]. Под действием флоретина наблюдалось снижение температуры фазового перехода различных насыщенных фосфолипидов (ДМФХ [12,55] и ДПФХ [73]), что говорит о

повышении подвижности ацильных цепей молекул липидов в присутствии флавоноида. При помощи ядерно-магнитного резонанса наблюдалось увеличение подвижности ацильных хвостов фосфолипидов в присутствии флавоноида лютеолина [74].

1.4. Макролидные полиеновые антибиотики

1.4.1. Классификация полиеновых антибиотиков

Макролиды — большой класс антибиотических веществ, продуцируемых микроорганизмами *Streptomyces* (*Actinomyces*). Макролиды принято делить на антибактериальные (группа эритромицина) [75] и противогрибковые [76] антибиотики. Последние называют полиеновыми, так как они имеют ряд сопряжённых двойных связей. Несмотря на наличие макролидного кольца, полиеновые антибиотики существенно отличаются от группы эритромицина по биологической активности). Антибиотики группы эритромицина оказывают бактериостатическое действие на грамм-положительные бактерии посредством связывания с рибосомами, что препятствует синтезу белка в патогенном микроорганизме. Большинство полиенов не обладает бактерицидным или бактериостатическим эффектом, но проявляет фунгицидную активность. Табл. 1 обобщает данные, относящиеся к биологической активности макролидных антибиотиков группы эритромицина и полиенового ряда.

Табл. 1. Характеристика биологического действия антибиотиков полиенового ряда и группы эритромицина. По [77].

Свойство	Группа эритромицина	Полиеновые антибиотики
Противогрибковая активность	Нет	Есть
Антимикробная активность	Грамм-положительные бактерии	Нет
Мишень в клетке	70s рибосома	Плазматическая мембрана
Характер действия	Ингибирование пептидилсинтазы	Увеличение проницаемости клеточной мембраны

В настоящее время известно более 200 полиеновых антибиотиков и их производных, однако из-за высокой токсичности, низкой биологической активности и нестабильности значительная их часть не нашла практического применения. Желание исследователей увеличить эффективность и снизить токсичность полиеновых антибиотиков поддерживает интерес учёных к полиеновым антибиотикам на стабильно высоком уровне (Рис. 12).

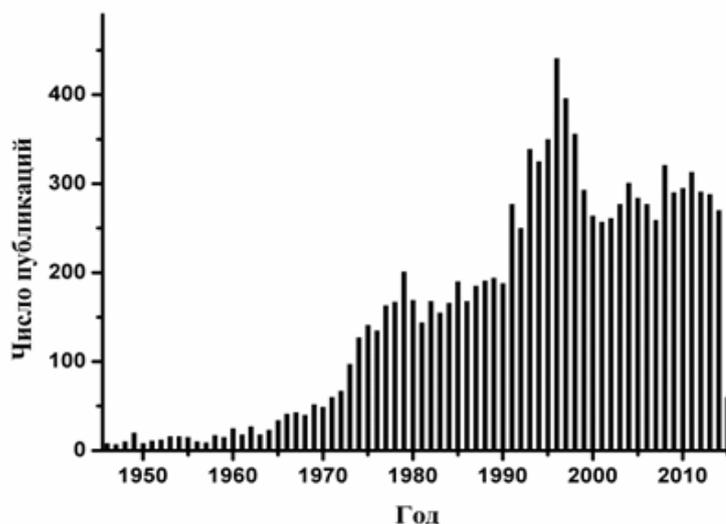


Рис. 12. Распределение по годам числа работ, посвящённых исследованию полиеновых антибиотиков. Данные приведены согласно базе Scopus.

По химическому строению полиеновые антибиотики являются относительно крупными непептидными органическими молекулами массой около 1 кДа, включающими в свой состав лактонное кольцо. Для многих представителей полиеновых антибиотиков точная химическая структура не установлена, поэтому их принято классифицировать по числу сопряжённых двойных связей: на триеновые, тетраеновые, пентаеновые, гексаеновые, гептаеновые и октаеновые [77,78]. Конъюгированные двойные связи формируют жёсткий каркас полиеновой молекулы (Рис. 13). Вследствие чего она способна поддерживать свою форму, не сворачиваясь в статистический клубок. Гидрофильная цепочка, состоящая из нескольких гидроксильных групп, расположена параллельно полиеновой и образует гидрофильную выстилку внутренней полости полиеновой поры [79].

Триеновые антибиотики — малочисленная группа, представленная аморфными соединениями с низкой стабильностью. Их строение мало изучено, и из-за невысокой устойчивости и токсичности триены не нашли практического применения в медицине.

Группа тетраеновых антибиотиков включает свыше 40 соединений, среди которых наибольшее распространение получили нистатин (Рис. 13) и пимарицин

(натамицин). Нистатин нашёл применение в лечении кандидозов, вызываемых дрожжеподобными грибковыми клетками [79]. Впервые он был выделен Рэйчел Браун и Элизабет Хазэн из *Streptomyces noursei* в 1950 году. Своё название нистатин (**NYStatin**) получил в честь организации в которой работали исследователи — нью-йоркского департамента здоровья (New York State Department of Health). Натамицин — полиеновый антибиотик, не формирующий в мембране пор и действующий на грибковые клетки посредством ингибирования стерол-зависимого транспорта аминокислот и сахаров [80]. Остальные представители этой группы изучены плохо и делятся на подгруппы по наличию аминсахара.

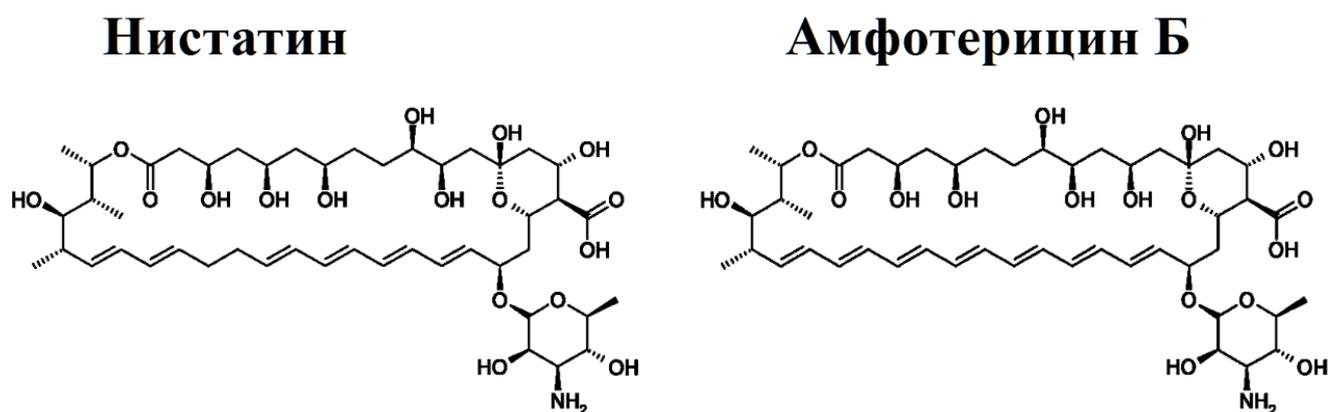


Рис. 13. Химические структуры молекул нистатина и амфотерицина Б.

Известно более 50 пентаеновых антибиотиков, которые можно разделить на метилпентаены, лактонсопряжённые и микозамин-содержащие пентаены [77]. Метилпентаены имеют характеристическую линию поглощения при 850 см^{-1} в силу наличия заместителей у двойных связей [81]. Наиболее известным представителем является филипин, использующийся в качестве маркера стеринов в клеточных мембранах [82].

Группа гептаеновых антибиотиков включает более 60 соединений. Гептаены делятся на неароматические с одним атомом азота, ароматические с двумя атомами азота (в микозамине и *n*-аминоацетофеноне) и ароматические с двумя атомами

азота (в микозамине и N-метил-*n*-аминоацетофеноне). Наиболее известным представителем гептаеновой группы является амфотерицин Б (Рис. 13).

Группа октаеновых антибиотиков содержит всего несколько представителей — охрамицин, октаен и октамицин, которые проявляют бактериостатическую активность по отношению к грамм-положительным бактериям [77].

1.4.2. Молекулярные механизмы биологической активности нистатина и амфотерицина Б

Молекулы нистатина и амфотерицина В имеют в своём составе карбоксильную группу и аминсахар, которые при нейтральных значениях рН заряжены отрицательно и положительно, соответственно (Рис. 13). Считается, что в мембране полиеновые антибиотики специфично связываются со стеринами, образуя биологически активные полиен-стериновые комплексы [77].

При взаимодействии антибиотика с бислоем образуются две популяции нистатина в зависимости от ориентации длинной оси молекулы. Одни молекулы расположены горизонтально, другие вертикально по отношению к плоскости бислоя. Вертикально ориентированные молекулы относят к олигомерным полупорам, а горизонтально ориентированные — к мономерам нистатина, которым предстоит сформировать канал [83]. На Рис. 14 представлена схема взаимодействия нистатина с участком бислоя. При введении в мембраноомывающий раствор антибиотик встраивается параллельно плоскости мембраны, а затем формирует олигомеры в гидрофобной области мембраны.

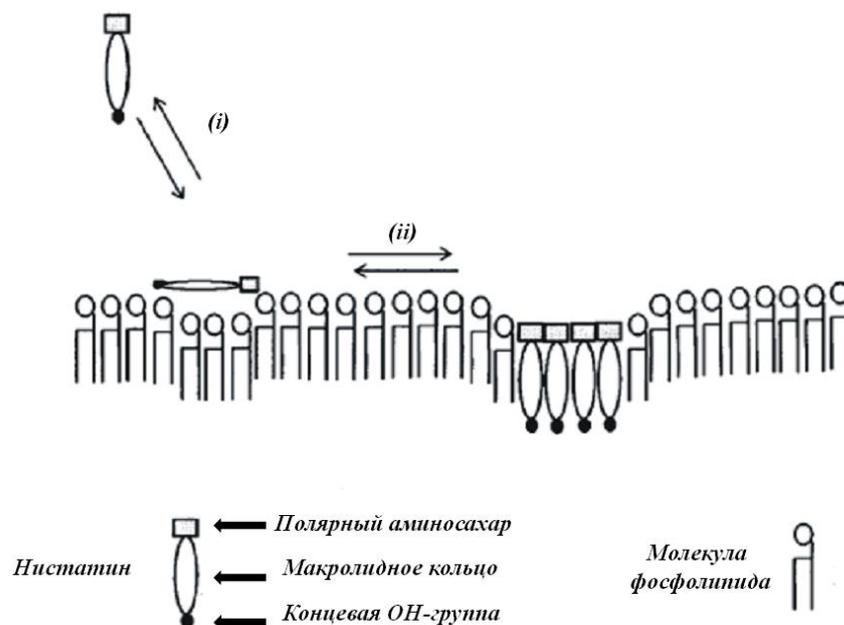


Рис. 14. Схема взаимодействия нистатина с участком липидного бислоя: (i) — связывание мономеров нистатина с участком мембраны со стороны добавки антибиотика, (ii) — формирование олигомеров. По [83].

Наличие в молекулах полиенов гидрофобной и гидрофильной областей обеспечивает их молекулам амфифильные свойства. Длина полиенового фрагмента (2 нм) по порядку величины сопоставима с толщиной мембраны (ок. 4 нм). Однако, одиночной молекуле антибиотика энергетически невыгодно встраиваться в гидрофобную область бислоя из-за наличия обширных гидрофильных участков. Встраивание возможно при снижении энергетического барьера вследствие образования тороидального олигомера, обращённого полиеновыми цепями к гидрофобной области мембраны, а полиоловыми участками к внутренней поверхности тора [15,84].

Часть популяции нистатиновых молекул, связанная в виде мономеров с бислоем, возможно, влияет на физико-химические свойства мембраны. Существуют данные, указывающие на то, что в присутствии полиенов в мембране происходит иммобилизация молекул липидов. С помощью ядерно-магнитного резонанса продемонстрировано снижение подвижности ближайших к нистатину

молекул липида в мембране [85]. Паке и др. (2002) показали возрастание ориентационного порядка ацильных цепей фосфолипидов в присутствии амфотерицина Б [86]. С помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии показано сосуществование различных фаз в присутствии полиенов в мембранах липосом, сформированных из насыщенных фосфолипидов [87]. Таким образом, приведённые косвенные свидетельства позволяют говорить о влиянии полиеновых антибиотиков на фазовую сегрегацию в бислое.

Установлено, что полиеновые антибиотики способны связываться с липидными мембранами, вызывая утечку ионов и мелких метаболитов, не превышающих по размеру глюкозу [15,79]. Через эти поры происходит неконтролируемая утечка компонентов цитоплазмы, что приводит к гибели микроорганизма. В присутствии амфотерицина Б резко (на 1–2 порядка) возрастают коэффициенты проницаемости мембраны для мочевины, глицерола, арабинозы, в то время как проницаемость мембраны для более крупной молекулы сахарозы (размером около 0.9 нм) практически не изменяется. Это позволяет оценить внутренний радиус полиеновой водной поры как 0.4 нм [88]. Добавка нистатина или амфотерицина Б в суспензию больших однослойных липосом, нагруженных способным к самотушению флуоресцентным маркером кальцеином, повышает проницаемость мембран везикул для кальцеина, причём транспорт метки блокируется в присутствии раффинозы, но не изменяется при наличии в суспензии маннитола, что позволяет точнее оценить радиус поры как 0.36–0.37 нм [89].

Полиеновые антибиотики могут образовывать два типа каналов в зависимости от способа введения: симметричные при двустороннем введении и асимметричные при одностороннем. Наиболее эффективно полиеновые антибиотики действуют на плоскую липидную мембрану, когда они находятся в водном растворе по обе стороны мембраны и могут формировать тороидальные полупоры в каждом липидном монослое. На Рис. 15 представлены молекулярные модели симметричного и асимметричного полиенового канала [2]. Каждая полупора содержит 6–8 молекул антибиотика и эквивалентное число молекул стерина [83]. Комплекс формируется в монослое, находящемся со стороны

введения антибиотика. Сильно гидратированный аминсахар нистатина и амфотерицина Б закоривает комплекс в водной фазе, не позволяя ему свободно перемещаться вдоль нормали к плоскости бислоя. В то же время, при наличии в противоположном монослое аналогичной полупоры, происходит их соединение в области торцевых участков, что приводит к формированию симметричного полиенового канала [79]. Подобная структура в холестерин-содержащих мембранах, омываемых 2 М КСl, характеризуется относительно высокими проводимостью (1–10 пСм) и временем жизни (порядка секунд) [90]. Также для симметричного канала характерна неидеальная анионная избирательность. Числа переноса хлора и калия в симметричном канале составляют 0.85 и 0.15, соответственно [78]. Асимметричные каналы характеризуются высокой селективностью к одновалентным катионам [16]. Табл. 2 суммирует электрофизиологические характеристики симметричных и асимметричных полиеновых каналов.

Табл. 2. Сравнительная характеристика симметричных и асимметричных нистатиновых каналов.

Тип канала	Проводимость одиночного канала (в 2 М КСl)	Ионная селективность	Действующая на мембрану концентрация антибиотика	Ссылки
Симметричный	1–10 пСм	Анионная	Менее 1 мкМ	[15,16,78,79]
Асимметричный	Менее 1 пСм	Катионная	Десятки мкМ	

Асимметричные каналы имеют липидное устье со стороны, противоположной стороне введения антибиотика [79]. Следовательно, свойства канала в этом случае будут определяться липидным составом мембраны: в бислоях из липидов с положительной спонтанной кривизной порообразование будет

проходить эффективнее, чем в бислоях из липидов с отрицательной спонтанной кривизной. Нечувствительность мембран бактерий к полиенам может объясняться наличием в их мембранах преимущественно фосфатидилэтаноламинов [91], имеющих отрицательную спонтанную кривизу, затрудняющую формирование липидного устья.

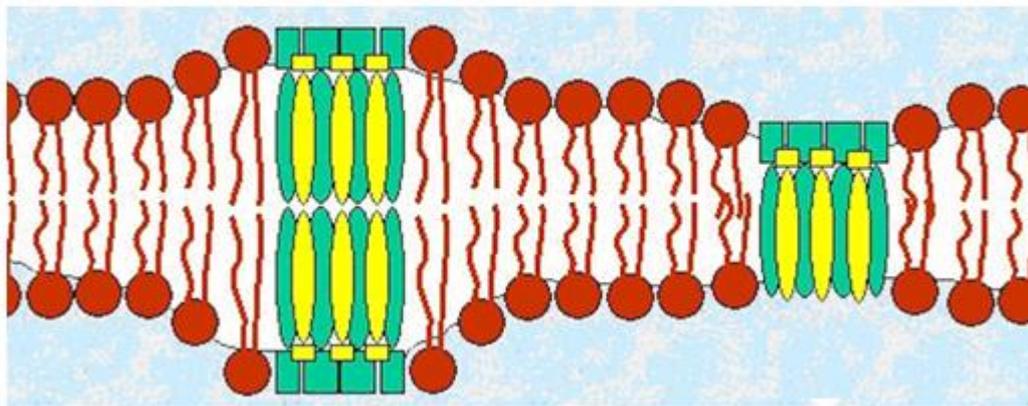


Рис. 15. Молекулярная модель симметричного (*слева*) и асимметричного (*справа*) полиенового канала. Молекулы полиена показаны зелёным, стерина — жёлтым, фосфолипидные молекулы — красным. По [2].

Свойства полиеновых каналов зависят от состава и физико-химических свойств мембраны. Например, было показано, что проводимость мембраны, модифицированной нистатином, сложным образом зависит от содержания в ней холестерина и температуры [92]. На Рис. 16 представлена диаграмма, демонстрирующая эту зависимость. При содержании холестерина менее 10 мол % мембрана находится в жидком неупорядоченном состоянии (*ld*), а при содержании холестерина более 50 мол % — в жидком упорядоченном (*lo*). При содержании холестерина от 10 до 50 мол % в бислое наблюдается сосуществование двух фаз — упорядоченной и неупорядоченной (*lo+ld*) [93].

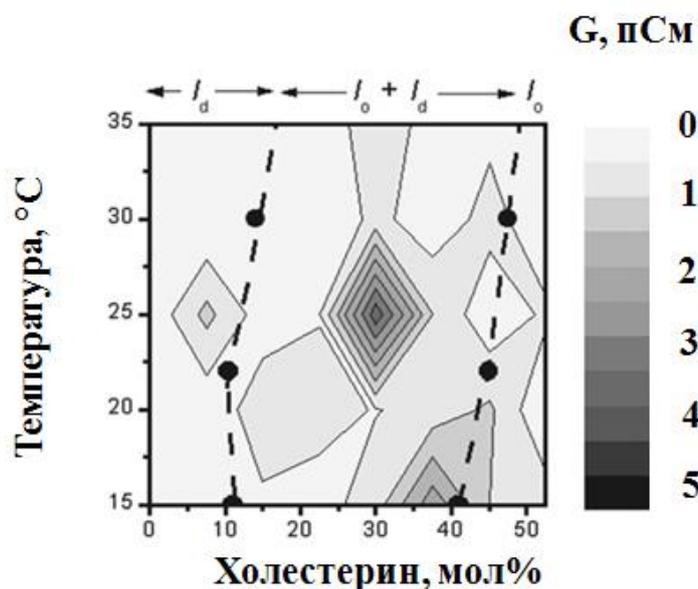


Рис. 16. Зависимость проводимости (G , показана градациями серого цвета справа), модифицированной нистатином ПОФХ мембраны, от содержания в ней холестерина и температуры [92]. Штриховые линии указывают на границы различных сценариев фазового разделения: ld и lo — жидкая неупорядоченная и жидкая упорядоченная липидные фазы, соответственно, $lo+ld$ — смесь ld и lo . По [93].

Из Рис. 16 видно, что наибольшая проводимость мембраны достигается в области сосуществования в бислое жидкой упорядоченной и неупорядоченной фаз. Подобная зависимость согласуется с гипотезой, согласно которой нистатиновые каналы располагаются на границе между упорядоченной и неупорядоченной участками липидного бислоя [94].

В многокомпонентных липидных смесях мембрана состоит из областей с различным составом и физико-химическими свойствами. На Рис. 17 показан профиль поверхности бислоя, сформированного из смеси ДОФХ, холестерина и сфинголипида [95]. Видно, что участки, обогащённые сфингомиелином и холестерином, обладают большей толщиной по сравнению с окружающей их неупорядоченной ДОФХ фазой (ld).

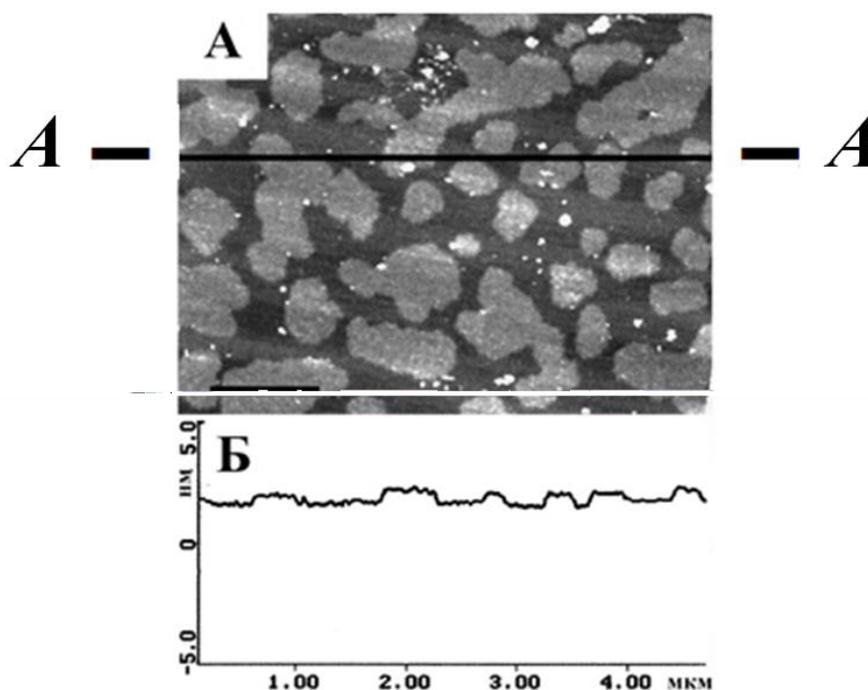


Рис. 17. Липидные домены в ДОФХ:Хол:СМ мембране. (А) — изображение мембраны, полученное с помощью атомно-силового микроскопа. Обладающие большей толщиной СМ:Хол домены (светло-серый цвет) окружены менее толстой ДОФХ-обогащённой фазой (тёмно-серый цвет). (Б) — профиль высоты бислоя вдоль разреза А–А. По [95].

В мембранах, сформированных из смеси ДОФХ и СМ, атом фосфора СМ находится в среднем на 0.74 нм дальше от центра бислоя, чем атом фосфора ДОФХ [96]. Следовательно гидрофобная область молекулы сфинголипида при соседстве с ДОФХ должна быть экспонирована в водную фазу, что энергетически невыгодно и является причиной образования упорядоченных доменов в бислое. В домене в контакт с водой вступают только молекулы липида, находящиеся на границе раздела фаз, в то время как внутренние области защищены от этого. Таким образом, на границе раздела фаз возникает напряжение и образуются локальные дефекты. Возможно, тот факт, что гидрофобная область границы упорядоченного домена может быть доступна для контакта с водой, облегчает встраивание амфифильных

молекул нистатина в виде мономеров на границе раздела фаз, компенсируя возникающее там избыточное напряжение.

Помимо действия на липиды мембран, полиены влияют и на активность мембраноассоциированных белков. Например, 5 мкМ амфотерицина Б полностью ингибируют Na^+ - K^+ -АТФазу эритроцитов человека, что способствует гемолизу за счёт рассеяния градиента калия на мембранах красных кровяных телец [97]. Подобный эффект может быть связан с прямым связыванием амфотерицина Б с ферментом, что подтверждается данными, полученными с помощью кругового дихроизма, который указывает на сходство между спектрами теней эритроцитов, обработанных антибиотиком, и спектров изолированных белков в присутствии амфотерицина Б [97,98].

Установлено, что в присутствии флавоноида куркумина I минимальные ингибирующие концентрации нистатина и амфотерицина Б для *Candida albicans* снижаются примерно на порядок [99], что может быть связано с активацией апоптоза в клетках *Candida albicans* из-за роста концентрации активных форм кислорода [100].

Полиеновые антибиотики, действуя на клеточную мембрану, формируют в ней полиен-липидные поры [15,16], активность которых зависит также и от состояния липидного микроокружения. Показано, например, что амфотерицин Б существенно эффективнее инициирует утечку калия из малых однослойных липосом (диаметром 30 нм), чем из больших, с диаметром свыше 100 нм [101]. Этот эффект может быть связан с большей кривизной внутреннего монослоя малой липосомы. При толщине бислоя 4 нм, поверхность сферы диаметром свыше 100 нм можно рассматривать как плоскость с одинаковыми профилями латерального давления во внешнем и внутреннем монослоях. В случае липосом диаметром порядка 30 нм латеральное давление в области гидрофильных голов внутреннего монослоя выше, чем во внешнем, что, по всей видимости, компенсирует отрицательное латеральное давление, привносимое тороидальными агрегатами амфотерицина Б, и способствует росту активности антибиотика.

Также выявлено влияние дипольного потенциала на проводимость одиночных симметричных амфотерициновых каналов. Например, в дифитаноилфосфатидилхолин-Хол мембранах наблюдалось трёхкратное снижение проводимости одиночного амфотерицинового канала в присутствии, уменьшающего дипольный потенциал кверцетина. В то же время красители серии RH, увеличивающие ϕ_d , приводили к росту проводимости одиночных амфотерициновых каналов [60]. Таким образом, проводимость одиночного симметричного полиенового канала коррелирует с дипольным потенциалом мембраны. Зависимость проводимости одиночных полиеновых каналов от дипольного потенциала, позволяет рассматривать дипольные модификаторы, как потенциальные регуляторы биологической активности этих антибиотиков.

Активность полиенов в условиях *in vitro* можно модулировать, добавляя в мембраноомывающий раствор различные мембраноактивные вещества. Например, двусторонняя добавка флоретина приводит к увеличению стационарного трансмембранного тока, индуцированного двусторонней добавкой нистатина или амфотерицина Б к дифитаноилфосфатадилхолин-Хол мембране, в 5 и 11 раз, соответственно [102]. Подобный эффект флоретина авторы объясняли специфическим взаимодействием флоретина с полиен-стериновыми комплексами. В молекуле флоретина два атома углерода в цепочке, соединяющей два бензольных кольца, находятся в состоянии sp^3 -гибридизации, в отличие от остальных атомов углерода, находящихся в sp^2 -гибридизации. Предположительно, благодаря этому флоретин может принимать конформацию “шпильки” [55] и взаимодействовать с полиен-стериновыми комплексами. Подобное взаимодействие может приводить к снижению свободной энергии поры, сдвигая равновесие в сторону образования проводящих каналов.

Несмотря на десятилетия интенсивных исследований механизмы биологической активности полиеновых антибиотиков остаются не до конца ясными. Полиены продолжают широко использоваться для терапии системных и поверхностных микозов, несмотря на их побочные эффекты. Для пациентов со сниженным иммунитетом вследствие аутоиммунных заболеваний, ВИЧ-инфекции

или терапии рака велика вероятность поражения микозами [4]. В таких случаях полиеновые антибиотики нередко остаются единственным средством борьбы за спасение жизни больного. Развитие фармакологии идёт по пути выработки наиболее активных препаратов при минимальной токсичности для организма человека. На этом пути перед учёными остаётся множество нерешённых задач фундаментального характера, таких как, например, исследование свойств асимметричных полиеновых каналов, слабо изученных вследствие трудностей их регистрации электрофизиологическими методами; определение влияния полиенов не только на проницаемость мембраны для катионов, но и на латеральную гетерогенность липидного бислоя; установление характера влияния мембраноактивных веществ, изменяющих дипольный потенциал, фазовую сегрегацию, текучесть бислоя на эффективность действия полиеновых антибиотиков на модельные мембраны.

Попытки снизить рабочую концентрацию антибиотика с помощью изменения химической структуры молекулы полиена не оправдывают ожиданий фармацевтической индустрии в силу низкой фунгицидной активности полученных производных [103]. Липосомальные формы полиеновых препаратов нередко обладают пониженной эффективностью по сравнению с немодифицированным препаратом [104]. Модуляция активности антибиотика с помощью модификаций, не изменяющих нативной структуры молекулы полиена, представляется правильным шагом в поиске способа повышения активности антибиотика без увеличения его токсичности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В работе использовали следующие реактивы: хлорид калия (KCl), хлорид натрия (NaCl), гидроксид калия (KOH), гидроксид натрия (NaOH), HEPES, ЭДТА, пентан, этанол, хлороформ, гексадекан, флоретин, флорицин, биоханин А, мирицетин, кверцетин, таксифолин, генистин, генистеин, даидзеин, катехин, 2,4,6-тригидроксиацетофенон (ТГАФ), стироловые красители RH 237 и RH 421, диметилсульфоксид (ДМСО), тритон X-100 (ТХ-100), нонактин, валиномицин, нистатин, кальцеин и N-(лиссамин родамин В сульфонил)-дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ЛР-ДПФЭ) производства фирмы “Sigma”, США. Фосфолипиды и стерины: 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДОФЭ), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), холестерин (Хол) и сфингомиелин из мозга свиней (СМ) (“AvantiPolarLipids”, США). Структурные формулы флавоноидов, использовавшихся в работе, представлены на Рис. 18.

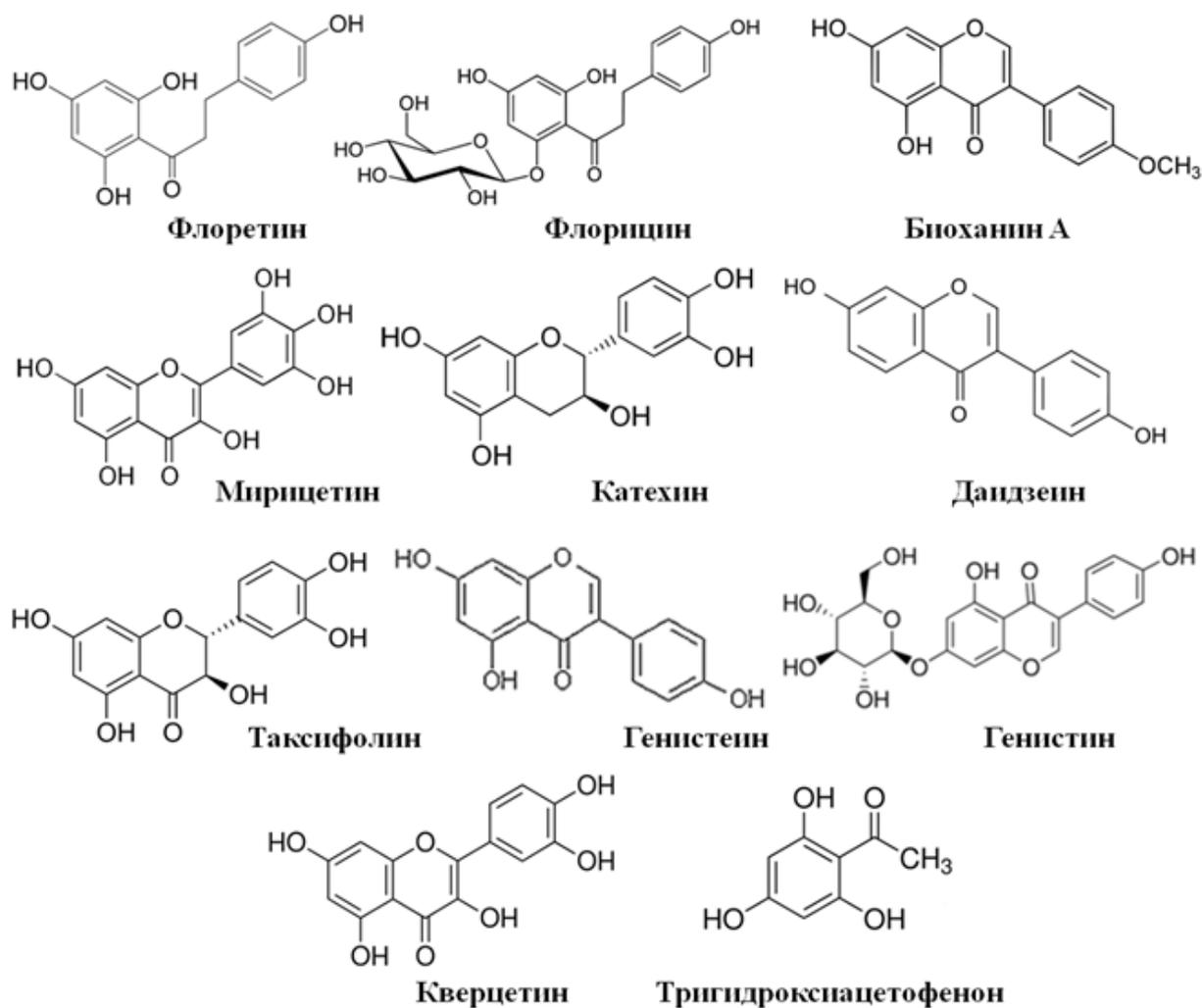


Рис. 18. Структурные формулы флоретина, флорицина, биоханина А, мирицетина, катехина, даидзеина, таксифолина, генистеина, генистина, кверцетина и синтетического укороченного аналога флавоноидов, ТГАФ.

2.2. Методы

2.2.1. Электрофизиологические измерения на плоских липидных мембранах

Плоские бислойные липидные мембраны формировали методом Монтала и Мюллера [105] посредством сведения конденсированных липидных монослоёв на отверстия в тефлоновой плёнке, разделяющей экспериментальную камеру на *цис*- и *транс*-отделения. Объёмы отсеков составляли 1.5 мл, толщина тефлоновой плёнки — 10 мкм, диаметр отверстия 20–30 мкм. Предварительно отверстие в тефлоновой плёнке обрабатывали гексадеканом, избыток которого удаляли фильтровальной бумагой. Монослои формировали на границе между водой и воздухом из раствора липидной смеси в пентане с концентрацией 1 мкг/мкл путём нанесения исходного раствора в пентане на поверхность водной фазы. После испарения пентана на поверхности водного раствора формировался конденсированный липидный монослой. Подъём уровней жидкости в обоих отсеках камеры выше отверстия приводил к образованию бислойной мембраны, проводимость которой не превышала 1 пСм (Рис. 19). Для формирования монослоёв использовали смеси различных фосфолипидов (ДОФХ или ДОФЭ) с Хол и СМ.

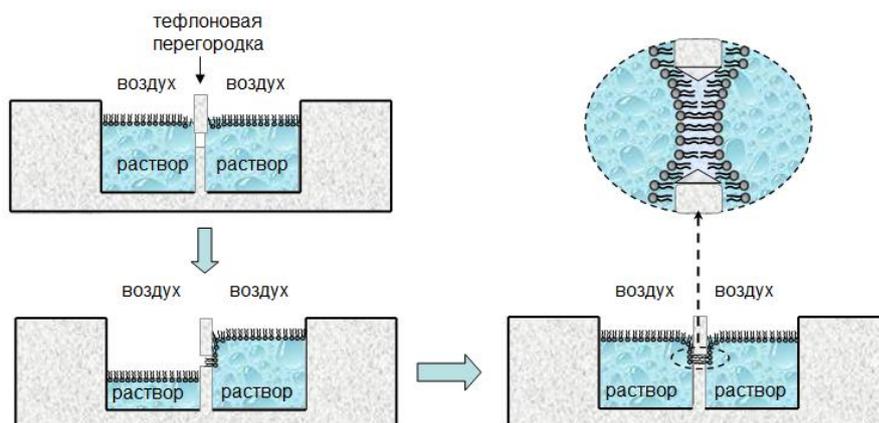


Рис. 19. Схематическое представление процесса формирования бислойной липидной мембраны из двух монослоёв на отверстии в тefлоновой перегородке.

На Рис. 20 представлена блок-схема экспериментальной установки. Измерения тока, протекающего через бислойную липидную мембрану, проводили при фиксации трансмембранного электрического потенциала. Подачу напряжения на мембрану и отведение сигнала производили с помощью хлор-серебряных электродов (Ag/AgCl), соединяющихся с растворами отсеков камеры через агарозные мостики (1.5 % гель агарозы, 2 М KCl). Положительным принимали напряжение, приводящее к возникновению потока катионов из *цис*- в *транс*-отсек камеры. Все измерения проводили при комнатной температуре. Усиление и аналогово-цифровое преобразование трансмембранных токов проводили при помощи Axopatch 200B и Digidata 1440A ("Axon Instruments", США). Обработку записей токов проводили с помощью программы Clampfit 9.0 ("Axon Instruments", США).

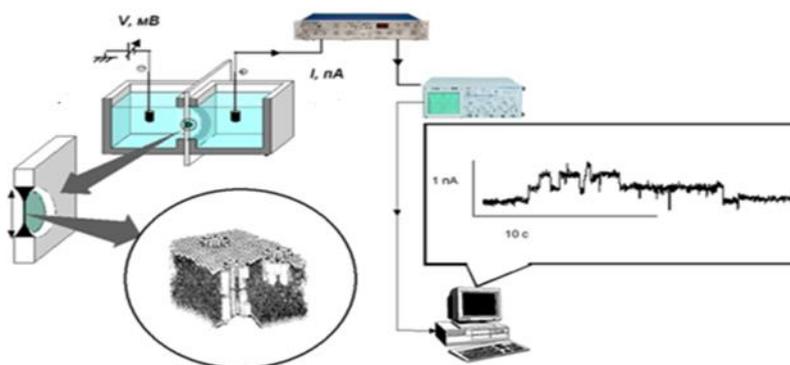


Рис. 20. Блок-схема экспериментальной установки для электрофизиологических измерений.

Измерение изменений дипольного потенциала мембран, сформированных согласно описанной выше методике, проводили в растворе 0.1 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0. В мембраноомывающий раствор вводили ионофор, являющийся переносчиком ионов калия (нонактин при изучении влияния на дипольный потенциал флавоноидов или валиномицин при работе со стириловыми красителями). После достижения стационарного значения трансмембранного тока порядка 100 пА в оба отсека камеры вносили флавоноиды или стириловые красители до концентрации 20 и 5 мкМ, соответственно. Напряжение на мембране составляло 50 мВ. Так как ток, протекающий через мембрану, при постоянном напряжении прямо пропорционален концентрации носителей заряда в гидрофобной области мембраны, то по его изменению можно определить изменение дипольного потенциала. Для вычисления изменений дипольного потенциала под действием соответствующих модификаторов использовали статистику Больцмана:

$$\Delta\varphi_d = -\frac{kT}{q_e} \ln\left(\frac{I_m}{I_m^0}\right) \quad (3)$$

где I_m^0 и I_m — ионофор-индуцированный ток, протекающий через мембрану в отсутствие и присутствии дипольного модификатора, соответственно, k — постоянная Больцмана ($1.38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К), T — термодинамическая температура

(298 К), q_e — элементарный заряд ($1.6 \cdot 10^{-19}$ Кл). Независимые эксперименты проводили для 3–5 бислоёв; после чего вычисляли средние значения и стандартные отклонения изменений φ_d .

Полиеновые антибиотики добавляли в водный раствор (2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0) *цис*-отсека камеры. Нистатин добавляли из 20 мМ раствора ДМСО до конечной концентрации 20 мкМ. Концентрация растворителя в камере не превышала 1 % и не приводила к изменениям проводимости мембраны в отсутствие мембранотропных агентов и модификаторов. По достижении стационарного значения трансмембранного тока в мембраноомывающий раствор при постоянном перемешивании вводили дипольные модификаторы до концентрации 20 и 5 мкМ для флавоноидов и стироловых красителей, соответственно. После повторного достижения стационарного состояния проводимости мембраны фиксировали отношение токов до и после добавки модификаторов (I_m/I_m^0) и вычисляли натуральный логарифм этого отношения $\ln(I_m/I_m^0)$. Полученные для 4–9 бислоёв значения усредняли и приводили со стандартным отклонением.

Ступенеобразные скачки трансмембранного тока, индуцированные односторонней добавкой нистатина, регистрировали в водном растворе (3 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 2.5), т.к. в кислых растворах полиеновый асимметричный канал обладает большей стабильностью. Спектральную плотность шума вычисляли с помощью фурье-преобразования сигнала с частотами дискретизации и граничной частотой 5 и 100 кГц, соответственно. Ток регистрировали через мембрану, омываемую водным раствором (2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0), при напряжении 100 мВ. Измерения зависимости проводимости мембраны, модифицированной нистатином с одной стороны, от напряжения проводили в водном растворе (2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0). На бислой последовательно подавали напряжение в 50, 100, 150, 0, –50, –100 и –150 мВ и измеряли стационарные значения трансмембранного тока для построения зависимости проводимости от напряжения.

2.2.2. Конфокальная микроскопия гигантских моноламеллярных липосом

Гигантские моноламеллярные везикулы создавали с помощью метода электроформации при помощи прибора Nanion vesicle prep pro (Германия) на покрытых смесью оксидов индия и титана стёклах (90 % оксида индия и 10 % оксида титана, размер 29 мм × 68 мм × 0.9 мм) с поверхностным удельным сопротивлением 20–30 Ом/кв. На проводящую поверхность стекла помещали резиновое кольцо диаметром 15 мм, смазанное с одной стороны вакуумной смазкой. Проводящую сторону стекла определяли омметром.

20 мкл 10 мг/мл раствора липида в хлороформе помещали на поверхность стекла в центре резинового кольца. После того как растворитель испарялся, липидную плёнку гидратировали 0.5 М раствором сорбитола, накрывали другим проводящим стеклом и подвергали воздействию переменного напряжения с амплитудой 3 В и частотой 10 Гц в течение 1 ч. Суспензия содержала однослойные везикулы диаметром от 1 до 30 мкм при общей концентрации липида 0.8 мМ. Затем суспензию разделяли на равные аликвоты объёмом 50 мкл и инкубировали с полиеном или флавоноидом. Полиены добавляли из раствора 20 мМ в ДМСО до концентраций 50, 150, 300 или 600 мкМ. Флавоноиды добавляли из раствора 40 мМ в этаноле до концентрации 400 мкМ. После добавки дипольного модификатора суспензию аккуратно пипетировали.

Гетерогенность строения бислоя наблюдали с помощью введения в исходный мембранообразующий раствор липидного флуоресцентного маркера — ЛР-ДПФЭ. В мембране ЛР-ДПФЭ включается преимущественно в жидкую неупорядоченную (*ld*) фазу, вследствие чего она становится окрашенной и доступной для наблюдения под микроскопом [106]. Упорядоченные фазы — жидкая (*lo*) и твёрдая (*so*) не окрашиваются ЛР-ДПФЭ. Везикулы визуализировали посредством конфокального микроскопа 100×/1.4 HCX PL Leica TCS SP5 (“Leica Microsystems”, Мангейм, Германия).

Дискриминацию l_o и s_o фаз проводили согласно морфологическим признакам: жидкая упорядоченная (l_o) фаза за счёт сил натяжения, стремящихся минимизировать длину границы, имела форму круглых доменов правильной формы — “рафтов”, в отличие от твёрдой (s_o) фазы, представленной дендритическими доменами неправильной формы [107]. Количественно фазовое разделение в изучаемых системах характеризовали частотой встречаемости везикул, демонстрирующих тот или иной сценарий фазовой сегрегации (p_k , %):

$$p_k = \frac{N_k}{N} \cdot 100\% \quad (4)$$

где N_k — число везикул в препарате с определённым характером фазового разделения, k — тип фазового разделения: однородно окрашенные липосомы (ld), липосомы с круглыми ($ld+l_o$) или дендритическими доменами ($ld+s_o$), N — общее число везикул в препарате (не менее 50 в каждом образце).

2.2.3. Измерение проницаемости мембран больших моноламеллярных липосом с помощью флуоресцентного маркера кальцеина

Определение проницаемости мембран больших однослойных липосом проводили путём измерения утечки флуоресцентного красителя кальцеина, испытывающего самотушение в миллимолярных концентрациях. Большие однослойные везикулы формировали посредством мини-экструдера (“Avanti Polar Lipids”, США). Необходимое количество исходного раствора липида в хлороформе помещали в виалу, после чего растворитель удаляли потоком азота. Полученную липидную плёнку гидратировали буфером (35 мМ кальцеина, 10 мМ HEPES-NaOH, 1 мМ ЭДТА, pH 7.4) и после пятикратного замораживания-размораживания получали суспензию мультиламеллярных липосом. Для получения гомогенной популяции больших однослойных липосом суспензию 13 раз пропускали через поликарбонатную мембрану (Nuclepore™, США) с диаметром пор 100 нм. Удаление не попавшего в липосомы кальцеина проводили методом гель-

фльтрации на колонке, заполненной гелем сефадекс-75. В качестве элюента использовали свободный от кальцеина буфер (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7.4). Концентрацию липида в суспензии, очищенной от не захваченного везикулами кальцеина, определяли при помощи фосфорного анализа [108]. Затем суспензию разбавляли свободным от кальцеина буфером до концентрации липида 10 мкМ.

В полученную смесь вводили флавоноиды или полиеновые антибиотики из исходных растворов в этаноле и ДМСО, соответственно. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте измеряли интенсивность флуоресценции высвобожденного кальцеина. ДМСО и этанол в использованных концентрациях не влияли на утечку кальцеина из липосом. После инкубации в раствор добавляли тритон X-100 до концентрации 10 мМ из водного раствора в концентрации 100 мМ. TX-100 вызывал лизис липосом и приводил к полному высвобождению захваченного кальцеина. Флуоресценцию суспензии определяли при помощи спектрофлуориметра Флюорат Панорама-02 (при длине волны возбуждения 490 нм, эмиссии 520 нм). Величину утечки (I_r , %) определяли по формуле:

$$I_r = \frac{(I - I_0)}{\left(\frac{I_{max}}{0.9} - I_0\right)} \cdot 100\% \quad (5)$$

где I и I_0 — интенсивность флуоресценции раствора в присутствии и отсутствие флавоноида или антибиотика, I_{max} — интенсивность флуоресценции раствора после добавки TX-100 до концентрации 10 мМ (множитель 0.9 введён для учёта разбавления образца раствором TX-100). Индекс тушения Q определяли как отношение I_{max}/I_0 .

2.2.4. Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия

Для получения термограмм использовали дифференциальный сканирующий микрокалориметр μ DSC7 (“Setaram”, Франция) со скоростью нагрева 0.2 К/мин и давлением 1 атм. Образцы липида, содержащие 0.5 мкмоль ДПФХ, изготавливали при температуре 50 °С методом электроформации, описанным выше (см. 2.2.2). ДПФХ гидратировали 800 мкл буфера (5 мМ HEPES-KOH, pH 7.4). Флавоноиды добавляли из 20 мМ растворов в этаноле или ДМСО до отношения концентраций липида к флавоноиду 9 к 1. Растворитель в соответствующей концентрации не оказывал влияния на фазовый переход ДПФХ [109]. Размер кооперативной единицы мембраны (n) находили согласно выражению [110,111]:

$$n = RT_m^2 \left(\int_0^{\infty} C(\tau) d\tau \right)^{-1} \frac{d}{dT} \left(\ln \frac{\int_0^T C(\tau) d\tau}{\int_T^{\infty} C(\tau) d\tau} \right) \Bigg|_{T=T_m} \quad (6)$$

где R — универсальная газовая постоянная (8.3 Дж·К⁻¹·моль⁻¹), T_m — температура главного фазового перехода бислоя, $C(\tau)$ — зависимость теплоёмкости от температуры, τ — переменная интегрирования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние флавоноидов на мембранную активность нистатина

3.1.1. Увеличение трансмембранного тока, индуцированного односторонней добавкой нистатина, под действием флоретина

На Рис. 21 показана временная зависимость величины трансмембранного тока, индуцированного односторонним введением полиенового антимикотика нистатина, до и после добавки в омывающий раствор 20 мкМ флоретина. Начальному моменту времени соответствует введение антибиотика в *цис*-отсек камеры, после чего проводимость мембраны, сформированной из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 мол %) и омываемой 2 М водным раствором хлорида калия (рН 7.0), резко возрастает. Наступление стационарного состояния происходит после достижения равновесных концентраций нистатина в водной и липидной фазах. Последующее введение флавоноида флоретина в мембраноомывающий раствор с двух сторон приводит к увеличению трансмембранного тока и достижению нового, более высокого по величине, стационарного значения.

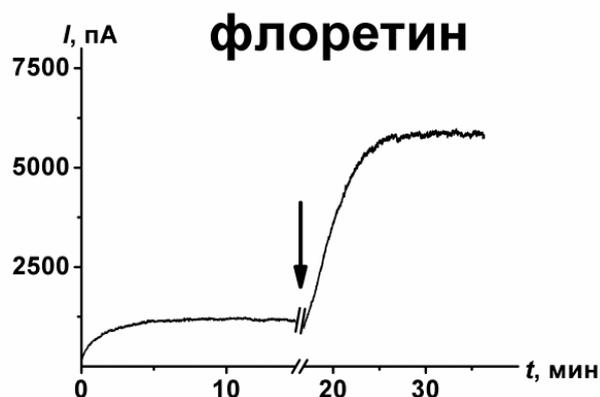


Рис. 21. Временная зависимость трансмембранного тока, индуцированного односторонним (*цис*-) введением 20 мкМ нистатина до и после добавки флоретина

до концентрации 20 мкМ в оба отсека камеры. ДОФХ:Хол:СМ мембрана омывалась 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0, трансмембранное напряжение составляло 50 мВ. Момент добавки флоретина указан стрелкой.

Ранее выявлено, что добавка флоретина с обеих сторон бислоя увеличивает трансмембранный ток, индуцированный двусторонней добавкой нистатина [102]. Эффекты флоретина качественно совпадают в отношении мембран, модифицированных нистатином как с одной, так и с двух сторон. В цитируемой работе [102] был предложен механизм, объясняющий рост тока специфическим связыванием флоретина с полиен-стериновыми комплексами, что способствует снижению потенциального барьера образования поры. Для проверки предположения о взаимодействии флоретина с асимметричными нистатиновыми каналами первоначально необходимо продемонстрировать их существование в ДОФХ:Хол:СМ мембранах. Это осложнено техническими трудностями регистрации асимметричных нистатиновых каналов, характеризующихся низкой проводимостью и малым временем жизни [16,79,112].

3.1.2. Подтверждение канальной природы тока

В нейтральной среде асимметричные полиеновые каналы характеризуются низкой проводимостью, в то время как в кислой среде (при рН ниже 3) формируется более стабильная полиеновая пора, демонстрирующая различные флуктуации между открытым и закрытым состояниями [113]. В силу этих причин регистрацию одиночных нистатиновых каналов, образованных при односторонней добавке антибиотика, проводили в кислом (рН 2.5) 3 М растворе хлорида калия. На Рис. 22 показаны флуктуации тока, который протекает через ДОФХ:Хол:СМ мембрану, модифицированную нистатином с одной стороны. Эти флуктуации можно отнести к переключениям между открытыми и закрытыми состояниями асимметричного

нистатинового канала. Стабилизация поры при низких значениях рН может объясняться протонированием карбоксильной группы, что снижает силы электростатического отталкивания мономеров нистатина друг от друга [113].

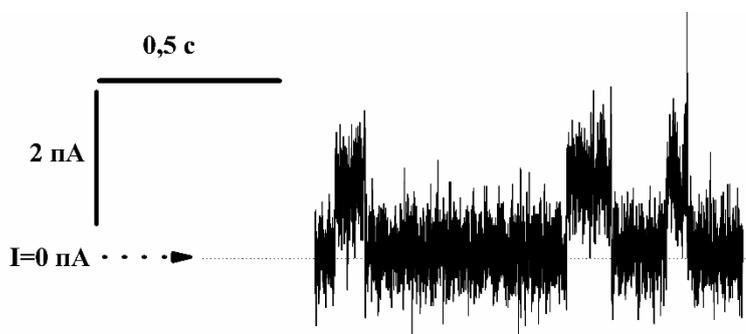


Рис. 22. Флуктуации трансмембранного тока в присутствии нистатина с *цис*-стороны. Мембрана из ДОФХ:Хол:СМ омывалась 3 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 2.5. Напряжение на мембране составляло 100 мВ.

Для подтверждения существования нистатиновых каналов при рН 7.0 были изучены свойства электрического шума мембраны, модифицированной нистатином с *цис*-стороны при напряжении 100 мВ. На Рис. 23 показана спектральная плотность флуктуаций стационарного трансмембранного тока. S-образный характер огибающей и спад зависимости, пропорциональный $1/f^m$, где $m \geq 2$, позволяет говорить о том, что в мембране протекает стохастический лоренцевский процесс. По экстремуму второй производной огибающей плотности шума мембраны, модифицированной нистатином, можно оценить характерное время жизни асимметричного нистатинового канала, составляющее около 1/400 с. В то же время спектральная плотность трансмембранного тока, опосредованного переносчиками или липофильными ионами, описывается инвертированной лоренцевской кривой или “белым” шумом [114,115]. Полученный результат позволяет говорить о канальной природе тока, индуцированного односторонней добавкой нистатина.

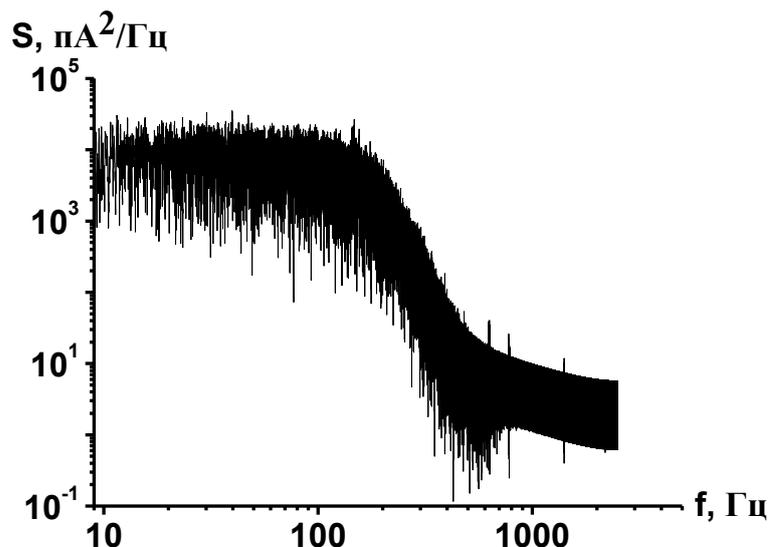


Рис. 23. Спектральная плотность шума тока, индуцированного присутствием 20 мкМ нистатина в *цис*-отсеке камеры. ДОФХ:Хол:СМ мембрана омывалась 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0, напряжение на мембране составляло 100 мВ. Частота дискретизации сигнала была равна 5 кГц, частота отсечки составляла 100 кГц.

О канальной природе тока свидетельствует и асимметричная зависимость интегральной проводимости бислоя от трансмембранной разности потенциалов (Рис. 24). При положительном напряжении проводимость мембраны значительно выше, чем при отрицательном, что согласуется с наблюдениями большего числа асимметричных нистатиновых каналов в открытом состоянии при положительной трансмембранной разности потенциалов, чем при отрицательной [16,116]. Проводимость одиночного асимметричного полиенового канала в эргостерин- и холестерин-содержащих мембранах не зависит от знака трансмембранной разности потенциалов [16,113]. Таким образом, рост проводимости мембраны, модифицированной нистатином с одной стороны, может быть отнесён к увеличению числа каналов, которые имеют в своём составе группы, чувствительные к электрическому полю [79,113].

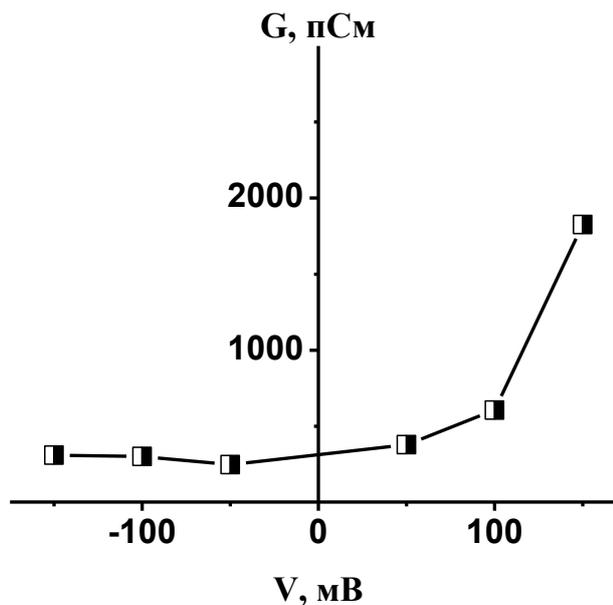


Рис. 24. Зависимость проводимости мембраны, модифицированной 20 мкМ нистатина с *цис*-стороны, от напряжения. ДОФХ:Хол:СМ мембрана омывалась 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0.

Скорость выхода тока на стационарное значение после увеличения напряжения на мембране имеет характерное время порядка минуты, что свидетельствует о росте числа каналов. Для симметричных нистатиновых каналов установление стационарного значения тока после подачи напряжения на мембрану достигается практически мгновенно и определяется ростом тока, проходящего через одиночный канал [78].

Таким образом, совокупность экспериментальных данных, относящихся к модификации ДОФХ:Хол:СМ мембраны нистатином с одной стороны, позволяет говорить о формировании асимметричных полиеновых каналов в бислое. Как видно из Рис. 21, время достижения стационарного состояния по току после введения флоретина составляет порядка минут, что также позволяет говорить об увеличении числа нистатиновых каналов после добавки флоретина. Как уже отмечалось, молекулярным механизмом наблюдаемого эффекта может являться связывание флоретина с образующими пору полиен-стериновыми комплексами [102], что наблюдается для взаимодействия флоретина с симметричными

полиеновыми каналами. Взаимодействие нистатина с флоретином может приводить к уменьшению потенциального барьера формирования проводящей поры и росту числа каналов.

3.1.3. Неспецифичность действия флавоноидов на асимметричные нистатиновые поры

Для экспериментальной проверки возможности специфического взаимодействия флоретина с асимметричными нистатиновыми каналами на предмет влияния на трансмембранный ток были протестированы флавоноиды, отличающиеся от флоретина по химическому строению.

На Рис. 25 показано влияние флорицина, биоханина А, мирицетина, даидзеина, катехина и ТГАФ на стационарный трансмембранный ток, индуцированный односторонней добавкой нистатина. Из Рис. 25 видно, что введение флорицина, биоханина А и мирицетина приводит к увеличению трансмембранного тока, в то время как даидзеин, катехин и ТГАФ не оказывают влияния на проводимость мембраны, модифицированной нистатином с одной стороны.

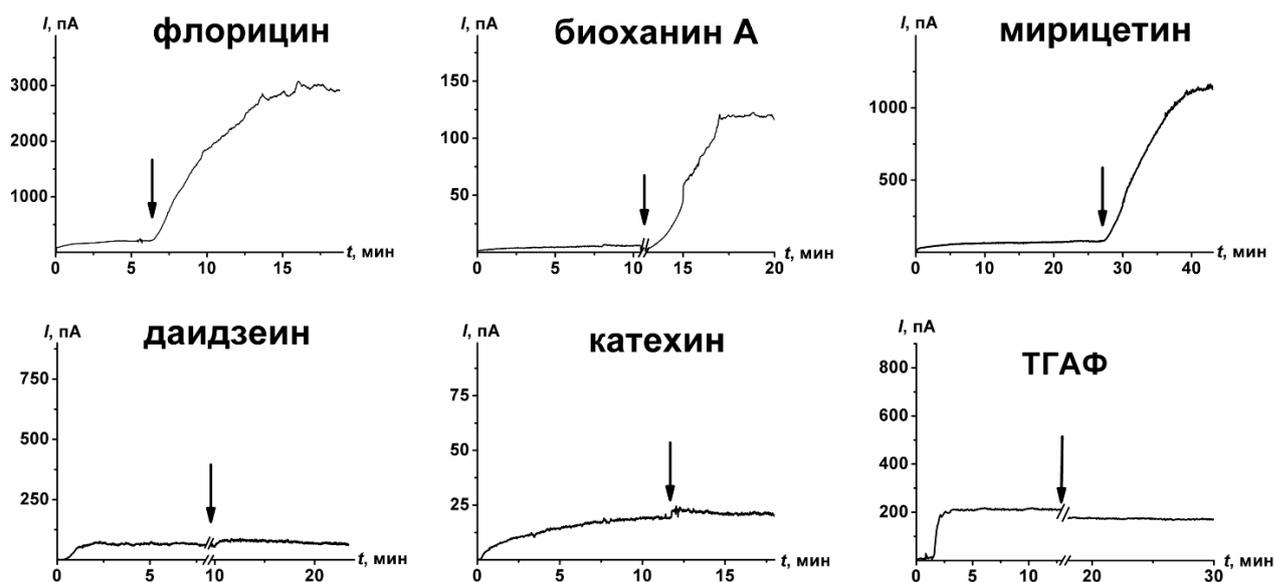


Рис. 25. Влияние двусторонней добавки дипольных модификаторов на стационарный трансмембранный ток, индуцированный односторонним введением 20 мкМ нистатина. Стрелки указывают момент добавки 20 мкМ флорицина, биоханина А, мирицетина, даидзеина, катехина или ТГАФ в околосмембранные растворы. ДОФХ:Хол:СМ мембраны омывались 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0, напряжение на мембранах составляло 50 мВ.

Аналогичным способом было исследовано влияние на асимметричные полиеновые поры кверцетина, таксифолина, генистина и генистеина. Табл. 3 резюмирует результаты статистической обработки; представлены значения натурального логарифма отношения токов до и после введения различных флавоноидов ($\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$). В случае таксифолина, кверцетина, биоханина А, мирицетина, флоретина и флорицина это значение составляет 2–4, что соответствует увеличению тока в 10–100 раз. В случае генистеина и генистина $\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$ близок к 1, что соответствует увеличению трансмембранного тока приблизительно в 3 раза, а для даидзеина, катехина и ТГАФ соответствующая величина близка к нулю вследствие неизменности тока.

Табл. 3. Средние значения и стандартные отклонения натуральных логарифмов отношений токов до и после введения в мембраноомывающий раствор 20 мкМ флавоноида ($\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$). ДОФХ:Хол:СМ мембраны омывались 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0 при напряжении 50 мВ.

Флавоноид	$\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$
Таксифолин	3.4 ± 1.7
Кверцетин	3.3 ± 0.4
Биоханин А	2.9 ± 1.1
Мирицетин	2.7 ± 1.4
Флоретин	2.5 ± 1.2
Флорицин	2.4 ± 1.6
Генистеин	1.3 ± 0.6
Генистин	1.1 ± 0.5
Даидзеин	0.1 ± 0.2
Катехин	0.1 ± 0.1
ТГАФ	-0.1 ± 0.1

Анализ химического строения использованных флавоноидов не позволил выявить структурных особенностей, ответственных за взаимодействие флоретина с асимметричным нистатиновым каналом. Можно заключить, что вещества, существенно отличающиеся от флоретина по химическому строению, также увеличивают порообразующую активность нистатина, добавленного с одной стороны мембраны. Следует отметить, что в случае двусторонней добавки нистатина, в отличие от его одностороннего введения, кверцетин не вызывает увеличения стационарного тока [102]. Этот факт также указывает на различие процессов регуляции флавоноидами активности асимметричных и симметричных полиен-стериновых каналов. Вероятно, в первом случае механизм имеет более общий характер, присущий различным группам флавоноидов. Возможно, изменение дипольного потенциала мембраны под действием флавоноидов

оказывает влияние на асимметричные нистатиновые каналы, приводя к росту их числа.

3.1.4. Проверка электростатической гипотезы регуляции активности асимметричных нистатиновых каналов

Известно, что некоторые флавоноиды способны существенно снижать дипольный потенциал мембран (φ_d), что, в свою очередь, может влиять на трансмембранный ток, обусловленный наличием переносчиков [9] или каналов [58]. Так как каналы, образующиеся при односторонней добавке нистатина, преимущественно катионселективны [79], можно предположить, что снижение φ_d будет приводить к росту тока за счёт повышения эффективной концентрации носителей заряда в просвете канала. Компьютерное моделирование распределения плотности электрического заряда вдоль оси симметрии полиеновой полупоры даёт противоречивые результаты, указывающие как на бóльшую глубину погружения положительного заряда в бислой по сравнению с отрицательным [117], так и на противоположную локализацию положительного полюса диполя в гидрофильной области канального комплекса [118]. Отсутствие совпадения результатов в цитированных выше работах, по всей видимости, связано с различным выбором липидного микроокружения и начальных условий симуляции.

Зависимость проводимости ДОФХ:Хол:СМ мембраны, модифицированной нистатином с одной стороны, от положительного напряжения имеет суперлинейный характер, что может свидетельствовать об ориентации эффективного диполя нистатина в мембране в направлении от *цис*- к *транс*-монослою, как схематически показано на Рис. 26. Положительная трансмембранная разность потенциалов может способствовать более глубокому погружению полупоры и интенсивному формированию проводящих каналов. В свете данного предположения можно допустить, что флавоноиды, способные значительно снижать положительный потенциал гидрофобной области мембраны

[119], будут также способствовать образованию проводящих каналов, аналогично действию положительного трансмембранного напряжения. Эти факты позволяют говорить о значительной роли внутримембранного электрического поля в регуляции каналобразующей активности асимметричных полиеновых пор.

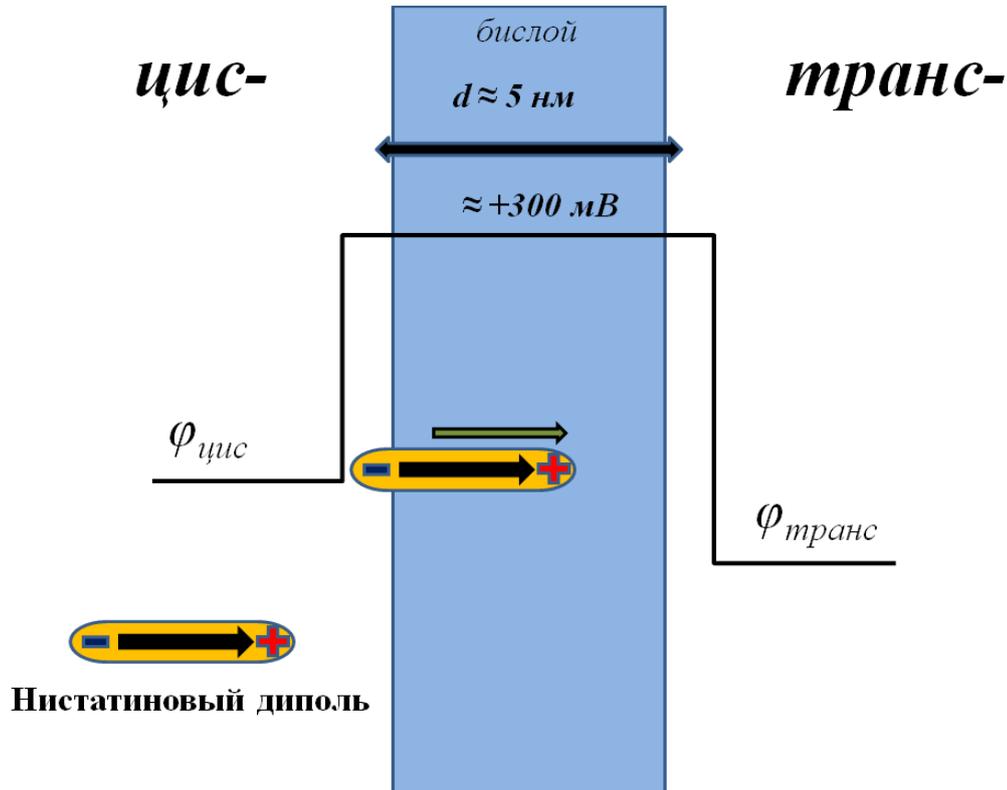


Рис. 26. Схема ориентации эффективного диполя нистатина в бислое. Положительный полюс нистатинового диполя ориентирован по направлению от *цис-* к *транс-*стороне мембраны.

Для проверки этой гипотезы были измерены значения изменений дипольного потенциала мембран в присутствии указанных выше флавоноидов. Приведённые в Табл. 4 данные свидетельствуют о том, что флоретин, флорицин, биоханин А, мирицетин, кверцетин и генистеин снижают φ_d на 50–150 мВ, в то время как таксифолин, генистин, даидзеин, катехин и ТГАФ не оказывают существенного влияния на φ_d . Сравнивая Табл. 3 и Табл. 4 можно заключить, что корреляции между увеличением тока и изменением дипольного потенциала не наблюдается. Например, в случае таксифолина с одной стороны и флоретина, кверцетина и

мирицетина с другой, $\Delta\varphi_d$ существенно различаются, в то время как значения $\ln(I_\infty/I_\infty^0)$ близки. Более того генистеин, снижающий дипольный потенциал на 50 мВ, и его гликозид генистин, не меняющий φ_d , оказывают одинаковое действие на каналобразующие свойства нистатина, добавленного с одной стороны мембраны.

Табл. 4. Средние значения и стандартные отклонения изменений дипольного потенциала мембран ($\Delta\varphi_d$) после двусторонней добавки 20 мкМ флавоноидов. ДОФХ:Хол:СМ мембраны омывались 0.1 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0. Напряжение на мембране составляло 50 мВ.

Флавоноид	$\Delta\varphi_d$, мВ
Таксифолин	-17 ± 2
Кверцетин	-152 ± 12
Биоханин А	-97 ± 7
Мирицетин	-125 ± 10
Флоретин	-153 ± 18
Флорицин	-104 ± 5
Генистеин	-48 ± 10
Генистин	-1 ± 1
Даидзеин	-8 ± 1
Катехин	-10 ± 7
ТГАФ	-19 ± 5

Дополнительно для проверки электростатической гипотезы модифицирования асимметричных полиеновых каналов были протестированы стироловые красители RH 237 и RH 421, увеличивающие φ_d . Ожидаемый с точки зрения электростатической гипотезы результат заключался бы в снижении (или по крайней мере в отсутствии увеличения) активности нистатиновых пор после

добавки модификаторов, увеличивающих φ_d [120]. Данные о влиянии стироловых красителей на нистатин-индуцированный ток, протекающий через мембрану, и дипольный потенциал приведены в Табл. 5.

Табл. 5. Средние значения и стандартные отклонения натуральных логарифмов отношений трансмембранного тока, индуцированного односторонней добавкой нистатина ($\ln(I_\infty/I_\infty^0)$), и изменений дипольного потенциала мембран ($\Delta\varphi_d$) до и после введения 5 мкМ стироловых красителей. Напряжение на ДОФХ:Хол:СМ мембране составляло 50 мВ.

Дипольный модификатор	$\ln(I_\infty/I_\infty^0)^a$	$\Delta\varphi_d^b$, мВ
RH 237	0.2 ± 0.1	66 ± 14
RH 421	2.7 ± 1.2	54 ± 10

^a Мембраноомывающий раствор 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0.

^b Мембраноомывающий раствор 0.1 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0.

Из Табл. 5 видно, что, несмотря на увеличение дипольного потенциала мембраны на 70 мВ, добавка RH 237 не приводит к изменению нистатин-индуцированного тока, а добавка RH 421, увеличивающего φ_d на 50 мВ, вызывает рост тока примерно в 15 раз. Следовательно, изменение внутримембранного электрического поля под действием различных модификаторов не является определяющим фактором, регулирующим нистатин-индуцированный трансмембранный ток. Учитывая, что холестерин- и сфингомиелин-содержащие мембраны подвержены латеральной сегрегации компонентов [107,121], можно думать о том, что влияние флавоноидов на ток опосредовано их действием на фазовое разделение в мембране.

3.1.5. Влияние флавоноидов на латеральную гетерогенность и механические свойства бислоя

На Рис. 27 показаны типичные микрофотографии гигантских однослойных липосом, сформированных из ДОФХ и СМ (80:20 мол %), ДОФХ и ДМФХ (50:50 мол %), ДОФХ и ДПФХ (50:50 мол %), в отсутствие и присутствии в суспензии 400 мкМ биоханина А, флоретина или мирицетина. На левой панели Рис. 27 представлены микрофотографии везикул, приготовленные из смеси ДОФХ с насыщенными липидами в отсутствие флавоноидов. В данных условиях бикомпонентный бислой распадается на две несмешивающиеся фазы, одна из которых окрашена ЛР-ДПФЭ. Неокрашенные домены имеют неправильную форму, это указывает на то, что они представлены *so* фазой [121,122]. Как видно из Рис. 27, добавка флавоноидов к липосомальной суспензии приводит к изменению фазового поведения бислоя. Биоханин А и флоретин способствуют образованию круглых доменов вместо доменов неправильной формы, наблюдаемых в ДОФХ:СМ липосомах в отсутствие флавоноидов. Мирицетин характера фазовой сегрегации не изменяет. В липосомах, приготовленных из ДОФХ и насыщенных фосфатидилхолинов, добавка биоханина А и флоретина приводит к разрушению видимых *so* доменов, в результате чего в препарате наблюдаются гомогенно окрашенные липосомы. Мирицетин, как и в случае ДОФХ:СМ липосом, эффекта не оказывает.

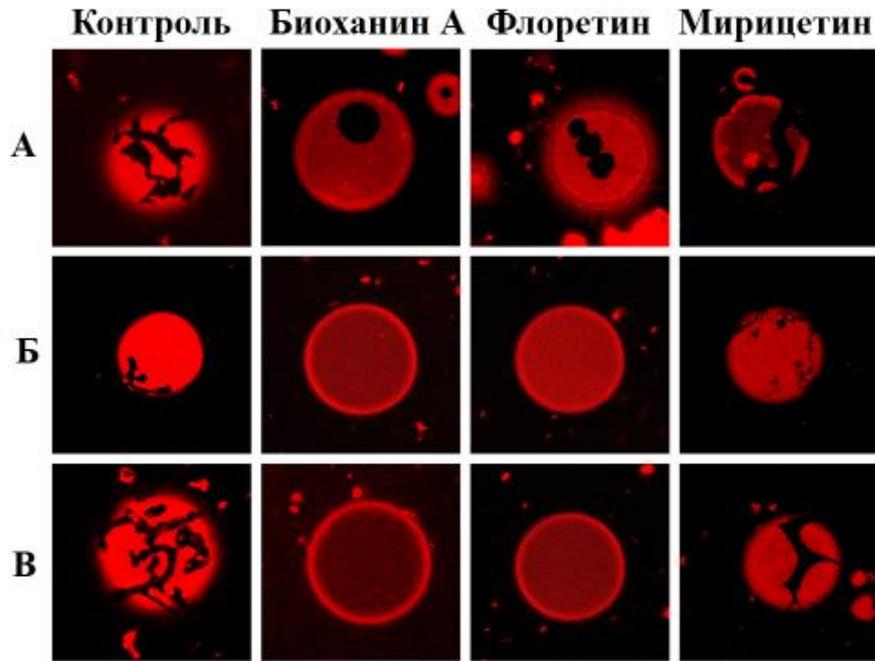
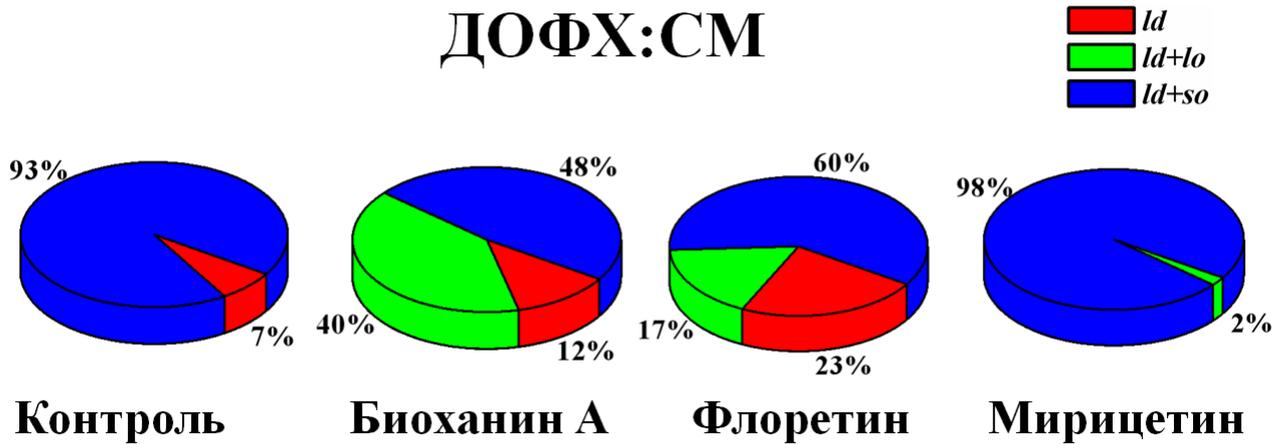


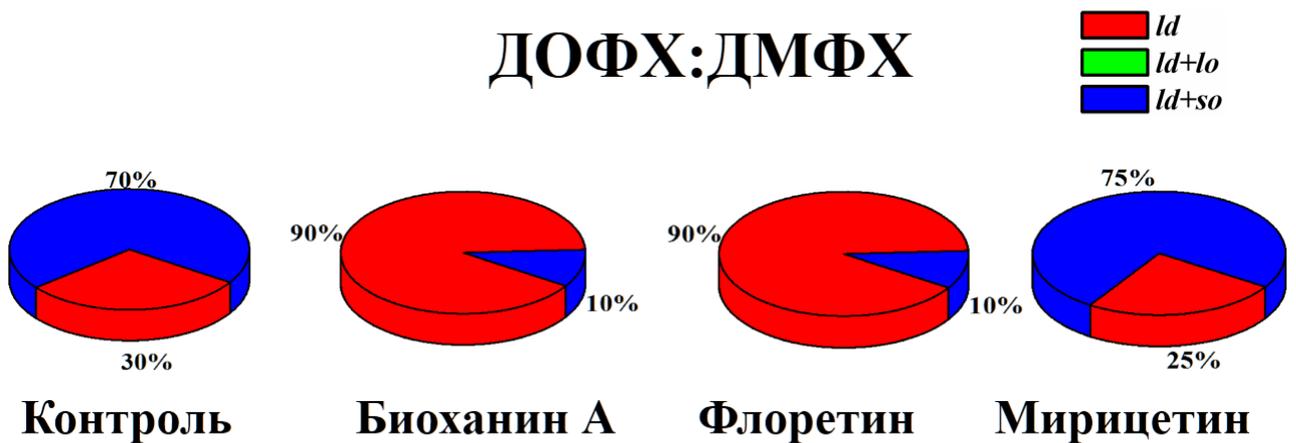
Рис. 27. Микрофотографии гигантских однослойных липосом, сформированных из (А) — ДОФХ и СМ (80:20 мол %), (Б) — ДОФХ и ДМФХ (50:50 мол %) и (В) — ДОФХ и ДПФХ (50:50 мол %) в отсутствие (*контроль*) и присутствии в суспензии 400 мкМ биоханина А, флоретина или мирицетина. Размер каждой микрофотографии составляет 26×26 мкм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили путём подсчёта частоты встречаемости гигантских однослойных липосом с различными типами гетерогенности (p_k). Из диаграмм на Рис. 28 видно, что в отсутствие флавоноидов во всех системах не наблюдали *lo* фазы; более 90 % ДОФХ:СМ и около 70 % ДОФХ:ДМФХ и ДОФХ:ДПФХ липосом содержали *so* домены. В присутствии 400 мкМ биоханина А или флоретина количество ДОФХ:СМ, ДОФХ:ДМФХ и ДОФХ:ДПФХ липосом с *so* доменами уменьшалось приблизительно в 2, 4 и 7 раз, соответственно. При этом в 40 % ДОФХ:СМ и 10 % ДОФХ:ДПФХ липосом присутствовали круглые домены (*lo* фаза). Добавка мирицетина не приводила к изменению морфологии доменов в липосомах.

ДОФХ:СМ



ДОФХ:ДМФХ



ДОФХ:ДПФХ



Рис. 28. Диаграммы распределения частот встречаемости гигантских однослойных липосом с различными морфологическими характеристиками, сформированных из ДОФХ и СМ (80:20 мол %), ДОФХ и ДМФХ (50:50 мол %), ДОФХ и ДПФХ (50:50 мол %), в отсутствие (*контроль*) и в присутствии 400 мкМ биоханина А, флоретина или мирицетина в суспензии.

Изменения латеральной гетерогенности мембраны можно интерпретировать как разжижающее (т.е. приводящее к разрушению упорядоченных доменов в мембране) действие биоханина А и флоретина в отношении *so* фазы мембраны. Мирицетин подобного действия не оказывает. Следует также отметить, что мирицетин, в отличие от биоханина А и флоретина, интенсивно тушит флуоресценцию ЛР-ДПФЭ. Приведённые выше факты свидетельствуют о различном погружении изученных флавоноидов в мембрану. Для понимания роли флавоноидов в формировании и функционировании липидных доменов следует рассмотреть и особенности их химической структуры. Биоханин А, флоретин и мирицетин имеют различное количество гидроксильных групп: 2, 4 и 6, соответственно. Количество гидроксильных групп определяет гидрофобность флавоноидов. Например, мирицетин не оказывает разжижающего действия на мембраны липосом, в то время как более гидрофобные флавоноиды оказывают подобный эффект [123]. Время задержки флавоноида апигенина, имеющего три гидроксильные группы, на покрытых ДПФХ колонках в пять раз больше, чем для мирицетина [13]. Результаты, полученные методом ядерного магнитного резонанса показывают, что флавоноиды с малым числом гидроксильных групп имеют коэффициенты диффузии, схожие с таковыми для молекул липидов, и они скорее встраиваются в бислои, чем мирицетин с шестью гидроксильными группами, демонстрирующий подвижность, сравнимую с подвижностью ассоциированных с мембраной молекул воды [74]. Коэффициенты распределения флавоноидов между октанолом и водой имеют обратную корреляцию с числом гидроксильных групп в молекуле [124]. В молекулах биоханина А и мирицетина все атомы углерода (за исключением концевой метильной группы в биоханине А) находятся в sp^2 гибридизации. Такое строение определяет плоскую конформацию молекул вышеуказанных флавоноидов. В то же время флоретин имеет два атома углерода в sp^3 гибридизации, что позволяет ему формировать большое число различных конформаций [55].

Таким образом, разжижающий эффект биоханина А на мембрану может быть объяснён его достаточно высокой гидрофобностью. Наличие только двух

гидроксильных групп, расположенных на одном конце молекулы, и метильного остатка на другом позволяет ему встраиваться в гидрофобную область мембраны и допускает формирование внутримолекулярной водородной связи, что также снижает общую гидрофильность молекулы. В ближайшем аналоге биоханина А генистеине подобная водородная связь существует 95 % времени и способствует разжижению мембраны за счёт увеличения гидрофобности молекулы [125]. Длинная ось молекулы генистеина параллельна плоскости бислоя и расположена на границе между гидрофобной и гидрофильной областями мембраны. Подобное положение может приводить к увеличению пространства для движения ацильных цепей насыщенных фосфатидилхолинов и СМ, что сопровождается разрушением *so* доменов. Флавоноид акацетин, изомер биоханина А, снижает T_m липосом, сформированных из ДМФХ или ДПФХ [126]. Приведённые данные поддерживают идею о разжижающем действии биоханина А на бислои.

Установлено, что флоретин также снижает температуру фазового перехода липосом, сформированных из ДМФХ [55] или ДПФХ [73]. Анализ взаимодействия флоретина с мембраной показывает, что флоретин, благодаря своей гибкой структуре, может связываться с головками фосфолипидов и образовывать структуры типа “шпильки” [12]. Это взаимодействие приводит к росту площади, приходящейся на одну молекулу липида в бислое, и, следовательно, увеличивает подвижность углеводородных цепей, что приводит к разрушению твёрдых кристаллических доменов.

Как уже отмечалось, при введении мирицетина наблюдается интенсивное тушение флуоресценции ЛР-ДПФЭ. Этот факт указывает на колокализацию хромофора ЛР-ДПФЭ и мирицетина. Так как хромофор ЛР-ДПФЭ расположен в водной фазе, то можно предположить, что мирицетин находится в непосредственной близости от него. Благодаря плоской структуре и наличию шести гидроксильных групп, мирицетин может образовывать водородные связи с головками фосфолипидов, формируя межмолекулярную сеть водородных связей, что может способствовать конденсации бислоя. Это предположение

подтверждается некоторым увеличением частоты встречаемости ДМФХ:ДПФХ и ДПФХ:ДОФХ липосом с *so* доменами в присутствии мирицетина (Рис. 28).

Дополнительные сведения о влиянии флавоноидов на фазовое поведение бислоя даёт дифференциальная сканирующая калориметрия. На Рис. 29 приведены термограммы ДПФХ липосом в отсутствие и присутствии флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина. Катехин и даидзеин практически не меняют положение и форму пика плавления насыщенных цепей ДПФХ. Флоретин и биоханин А способствует уширению пика и снижают температуру перехода ДПФХ с 41.4 до 39.9 и 39.6 °С, соответственно. Кверцетин слабо влияет на фазовый переход ДПФХ.

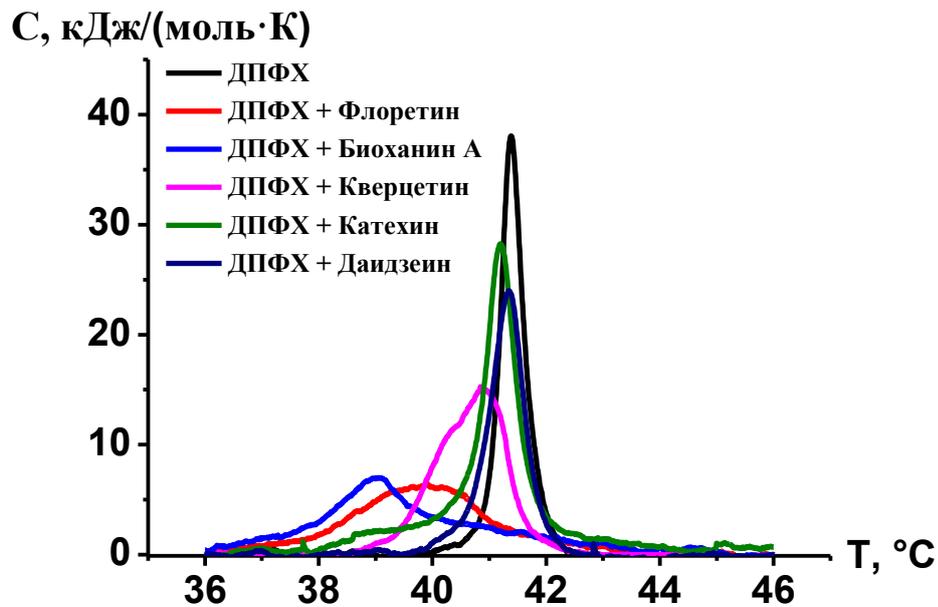


Рис. 29. Зависимость удельной теплоёмкости суспензии ДПФХ липосом от температуры в отсутствие и присутствии флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина. Отношение липид:флавоноид составляло 9:1.

Табл. 6 демонстрирует величину температуры фазового перехода (T_m) и размер кооперативной единицы мембран (n) ДПФХ липосом в отсутствие и присутствии изученных флавоноидов. Наблюдается корреляция между значениями

n и T_m с одной стороны и структурными особенностями молекул протестированных флавоноидов с другой: более гидрофобные флавоноиды (флоретин и биоханин А) оказывают большее разжижающее действие на мембрану, чем менее гидрофобные (кверцетин и катехин). Даидзеин, имеющий две гидроксильные группы на противоположных концах молекулы, по всей видимости, менее эффективно встраивается в бислои по сравнению с биоханином А, у которого две ОН-группы расположены поблизости.

Табл. 6. Температура фазового перехода (T_m) и размер кооперативной единицы (n) ДПФХ липосом в отсутствие и присутствии различных флавоноидов.

	T_m , °C	n
Контроль (ДПФХ)	41.4	224
Флоретин	39.9	48
Биоханин А	39.6	33
Кверцетин	40.8	101
Катехин	41.2	120
Даидзеин	41.4	170

Полученные данные свидетельствуют о влиянии флавоноидов на фазовые превращения липидов. Встаёт вопрос о возможности влияния флавоноидов на упорядоченную фазу, индуцированную самим полиеновым антибиотиком.

3.1.6. Образование *so* фазы полиеновыми антибиотиками

Несмотря на многочисленные косвенные свидетельства формирования полиенами в бислое отдельной фазы, результаты непосредственной визуализации этого явления неизвестны [85,86]. На Рис. 30 показаны микрофотографии гигантских однослойных липосом различного состава в отсутствие и присутствии

нистатина. В отсутствие нистатина липосомы были гомогенно окрашены. В присутствии 300 мкМ нистатина в суспензии липосом из ДОФХ:Хол (67:33 мол %), ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 мол %) и ПОФХ обнаруживались *so* домены, а липосомы, сформированные из 100 мол % ДОФХ оставались гомогенно окрашенными.

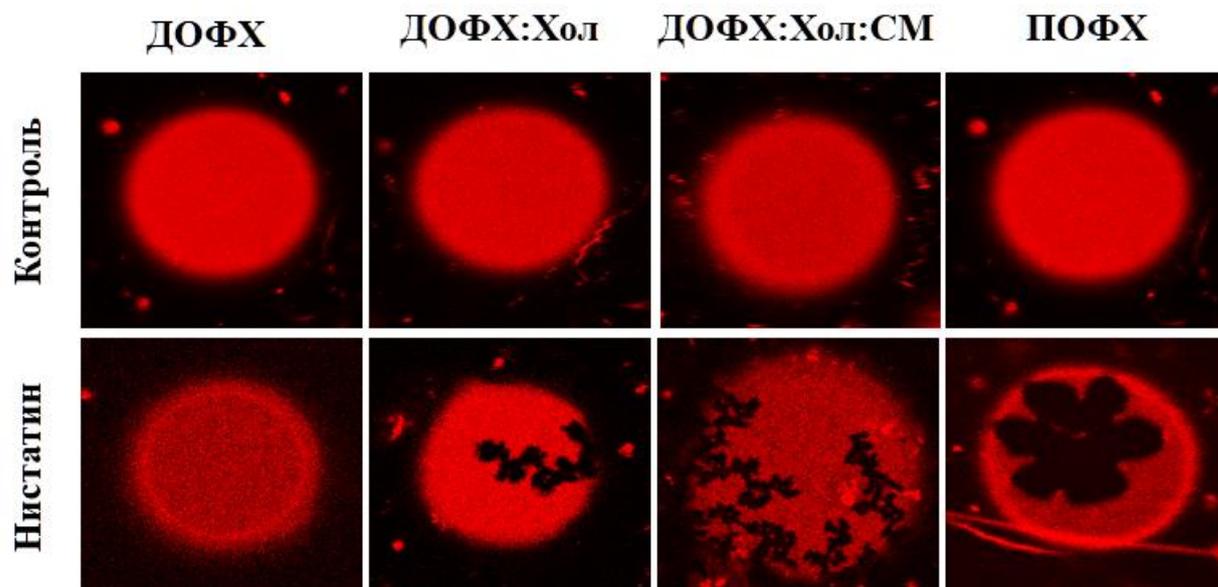


Рис. 30. Микрофотографии гигантских однослойных липосом, изготовленных из ДОФХ (100 мол %), ДОФХ:Хол (67:33 мол %), ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 мол %) и ПОФХ (100 мол %) в отсутствие (*Контроль*) и присутствии 300 мкМ нистатина (*Нистатин*). Размер каждого изображения 26×26 мкм.

На Рис. 31 показана зависимость частоты встречаемости липосом с *so* доменами от концентрации нистатина для липосом различного состава. В липосомах из ДОФХ нистатин не образует упорядоченных доменов, что может быть связано с тем, что остаток глицерола ДОФХ имеет два ненасыщенных углеводородных заместителя, обладающих высокой подвижностью. По всей вероятности, нистатин не способен иммобилизовать ДОФХ так, чтобы он перешёл в твёрдую фазу при комнатной температуре. В то же время в ПОФХ липосомах нистатин индуцирует образование твёрдых упорядоченных доменов. ПОФХ имеет один насыщенный и один ненасыщенный ацильный хвост и существенно большую T_m (-2 °С), чем ДОФХ (-18 °С). Можно думать, что при комнатной температуре

потенциальная энергия взаимодействия друг с другом молекул ПОФХ, иммобилизованных нистатином, превышает кинетическую энергию их теплового движения, что приводит к образованию *so* доменов.

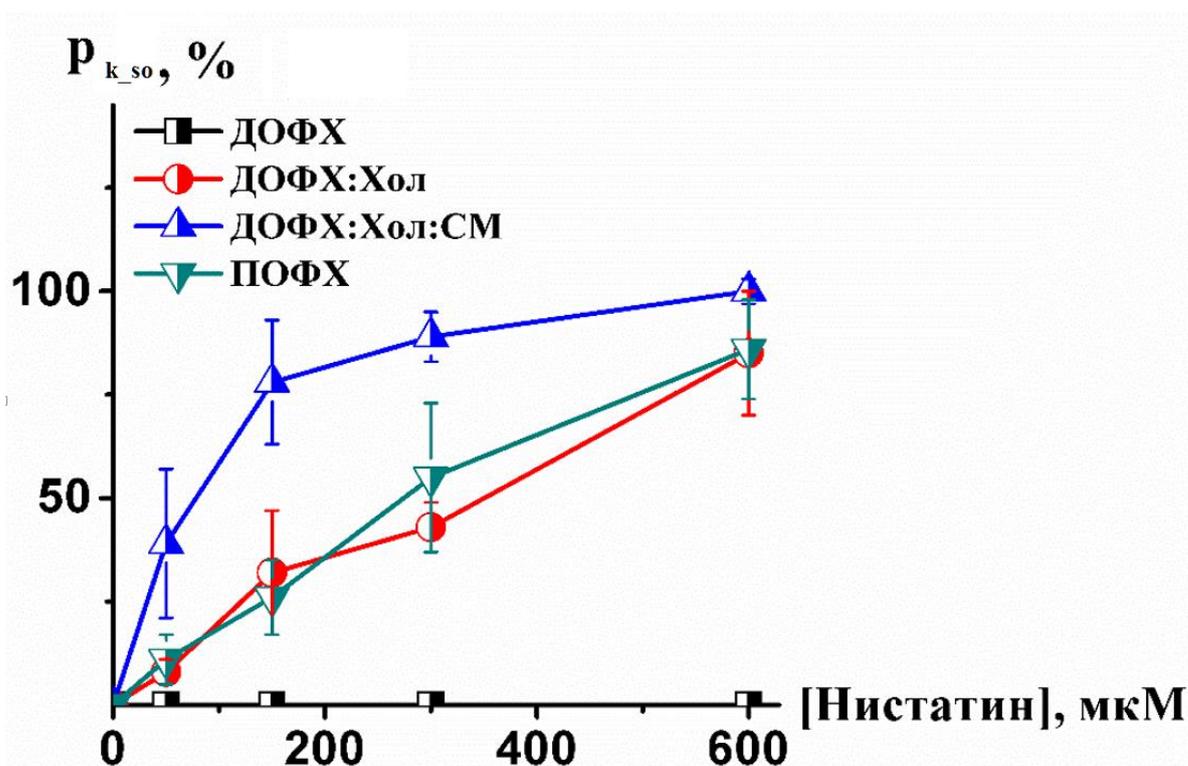


Рис. 31. Зависимость частоты встречаемости ДОФХ (\blacksquare), ДОФХ:Хол (\bullet), ДОФХ:Хол:СМ (\blacktriangle) и ПОФХ (\blacktriangledown) липосом с *so* доменами ($p_{k_{so}}$) от концентрации нистатина.

В ДОФХ:Хол везикулах в присутствии нистатина наблюдалось образование гелеобразных доменов. Следует отметить высокое сродство полиенов к стеринам в мембране [78], а также тот факт, что холестерин снижает текучесть липидных мембран [127]. В бинарных смесях холестерин не образует различимых под световым микроскопом доменов [128]. По всей видимости, форма молекул холестерина в виде усечённого конуса не позволяет им собираться в крупные группы. В то же время, наличие нистатина в мембране компенсирует отрицательную спонтанную кривизну холестерина и позволяет ему в комплексе с полиеном образовывать домены размером более 1 мкм, различимые с помощью

светового микроскопа. В липосомах из ДОФХ:Хол:СМ *so* домены в присутствии нистатина встречаются чаще, чем в ДОФХ:Хол или ПОФХ липосомах. Сфингомиелин, благодаря высокой температуре плавления цепей способен самостоятельно образовывать *so* домены, но при концентрации СМ в мембране порядка 10 мол % они имеют небольшой размер и встречаются довольно редко [129]. В присутствии нистатина субмикроскопические СМ домены, возможно, выступают точками инициации, в которых начинается рост гелеобразных доменов после добавки нистатина.

Следующим шагом на пути к установлению молекулярных механизмов взаимодействия нистатина-липидных комплексов с флавоноидами стало изучение влияния флавоноидов на индуцированную полиеном упорядоченную фазу.

3.1.7. Влияние флавоноидов на фазовую сегрегацию мембраны, модифицированной нистатином

Ток, протекающий через мембрану (I), в случае сосуществования в бислое различных фаз можно рассматривать как сумму независимых компонент:

$$I = \sum_{(k)} j_k S_k \quad (7)$$

где j , S , и k плотность тока, площадь фазы и тип липидной фазы (например, жидкая упорядоченная, твёрдая упорядоченная и т.д.), соответственно. Флавоноиды способны разжижать или конденсировать бислои (см. 3.1.5) и, следовательно, менять соотношения между различными фазами [8,55]. В результате, влияние флавоноидов на нистатин-индуцированный трансмембранный ток может быть опосредовано их действием на фазовое разделение.

На Рис. 32 показаны липосомы, проинкубированные с нистатином в отсутствие и присутствии 400 мкМ флоретина, биоханина А и мирицетина, соответственно. Присутствие в суспензии 200 мкМ нистатина в ДОФХ:Хол:СМ

липосомах вызывает образование *so* фазы (Рис. 32А). Добавка флоретина (Рис. 32Б) и биоханина А (Рис. 32В) приводит к снижению числа липосом, содержащих *so* фазу, и появлению гомогенно окрашенных липосом. В то же время добавка мирицетина не вызывает изменения характера фазовой сегрегации (Рис. 32Г): число липосом с *so* доменами остаётся неизменным.

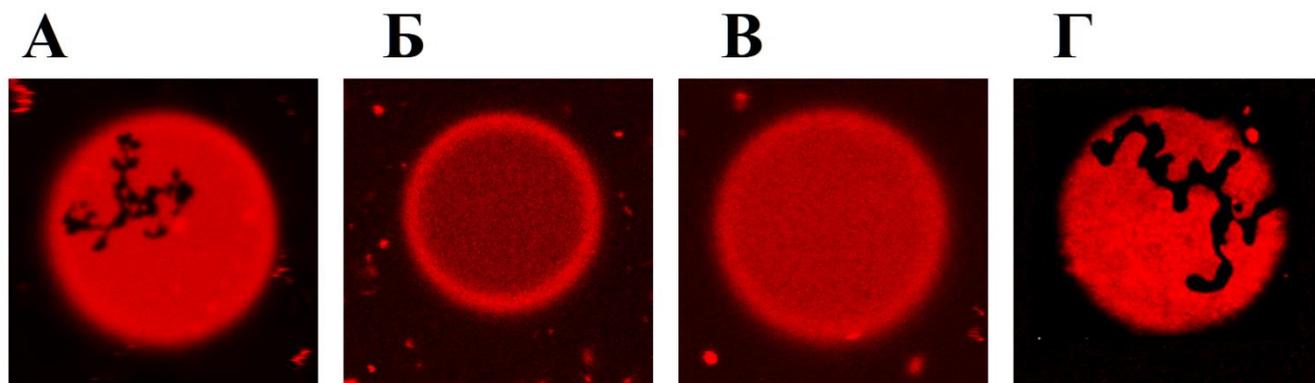


Рис. 32. Микрофотографии типичных гигантских однослойных ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 мол %) липосом в суспензии, модифицированной 200 мкМ нистатина, в отсутствие (А) и присутствии 400 мкМ флоретина (Б), биоханина А (В) и мирицетина (Д). Размер каждого изображения 26×26 мкм.

Статистическое описание влияния флавоноидов на индуцированное нистатином фазовое разделение в мембране дано при помощи диаграмм (Рис. 33). Видно, что 80 % липосом, проинкубированных с 200 мкМ нистатина, имеют *so* домены. Введение флоретина или биоханина А снижает число везикул с твёрдыми упорядоченными областями до 30 и 50 %, соответственно. Наличие мирицетина в суспензии не приводит к исчезновению индуцированных нистатином *so* доменов.

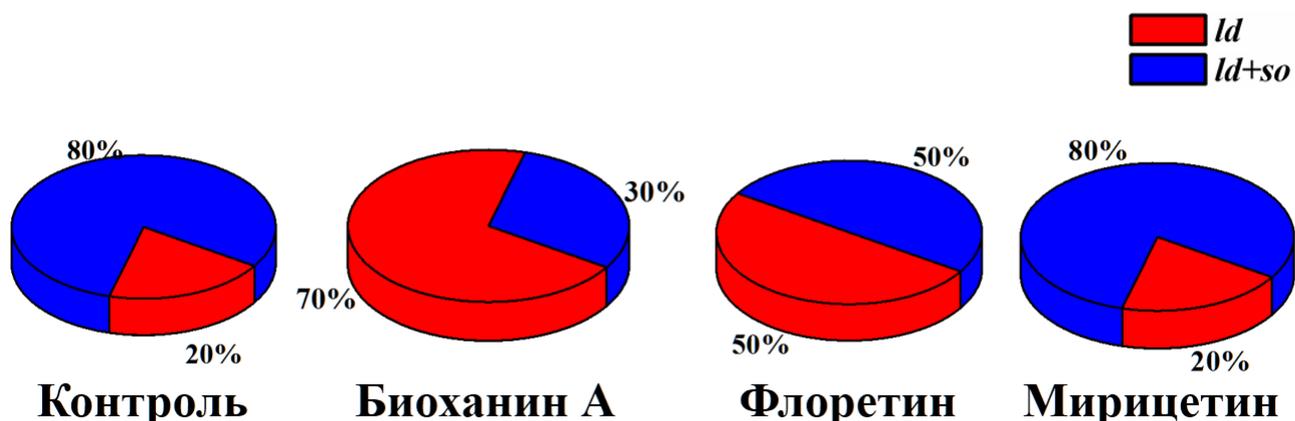


Рис. 33. Распределение относительного числа ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 мол %) липосом, демонстрирующих различные сценарии фазовой сегрегации, после обработки 200 мкМ нистатина в отсутствие (*контроль*) и присутствии 400 мкМ флоретина, биоханина А или мирицетина. (*ld*) — гомогенно окрашенные липосомы, (*ld+so*) — липосомы, имеющие твёрдые упорядоченные домены.

Флоретин, биоханин А и мирицетин в одинаковой степени увеличивают нистатин-индуцированный трансмембранный ток (Табл. 3), но по-разному влияют на фазовое состояние модифицированной нистатином мембраны (Рис. 33). Этот факт позволяет считать, что изменение отношения между площадями различных фаз в бислое не является фактором, определяющим рост нистатин-индуцированной проводимости при введении флавоноидов. Результаты наблюдения полиморфизма липидов в присутствии флавоноидов позволяют выдвинуть новое предположение о механизме влияния флавоноидов на нистатин-индуцированный ток.

3.1.8. Полиморфизм липидов, индуцированный флоретином, биоханином А и мирицетином

Флавоноиды, увеличивающие нистатин-индуцированный трансмембранный ток, способствовали образованию в липидной суспензии новой небислоидной

липидной фазы. В отсутствие флавоноидов в суспензии содержались только гигантские однослойные везикулы. После добавки в суспензию 400 мкМ флоретина помимо липосом в ней обнаруживались шарообразные структуры, представляющие собой тонкие игольчатые образования, исходящие из одного центра (Рис. 34А). В присутствии биоханина А или мирицетина в образце наблюдали волокнистые образования неправильной формы (Рис. 34Б и В).

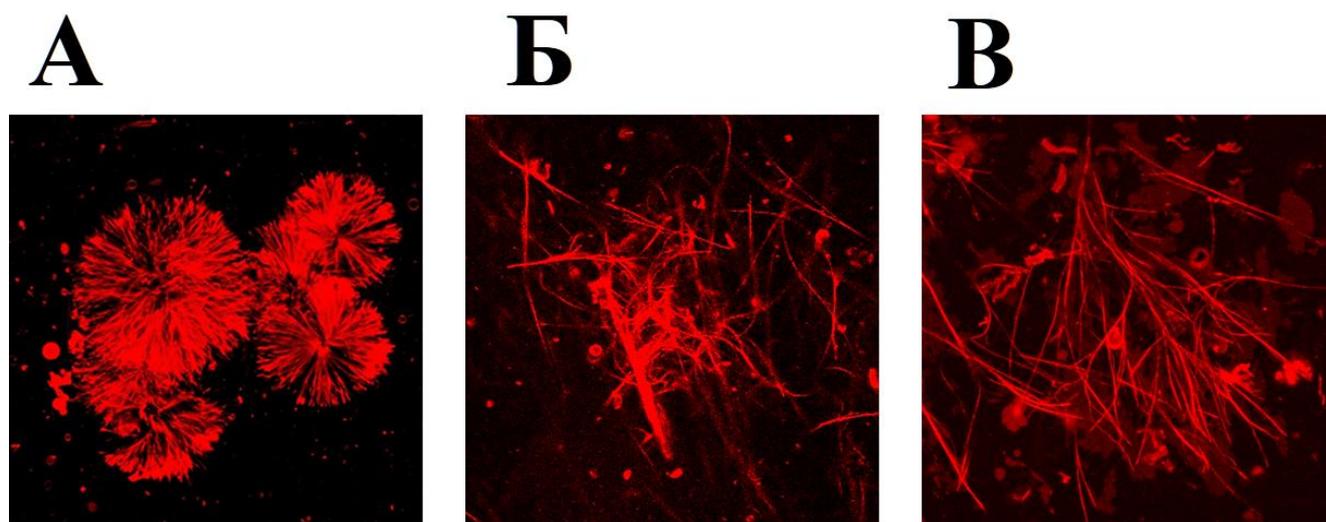


Рис. 34. Небислойные структуры в суспензии ДОФХ:ДПФХ липосом в присутствии 400 мкМ флоретина (А), биоханина А (Б) и мирицетина (В). Размер каждого изображения 100×100 мкм.

Представленные результаты позволяют говорить о переходе липидов в присутствии флавоноидов из бислойной в небислойную фазу, что характерно для веществ, изменяющих спонтанную кривизну липидного монослоя [18]. Возникновение небислойных структур в присутствии амфифильных веществ является результатом дисбаланса между объёмами, занимаемыми гидрофобными и гидрофильными участками мембраны [64]. Например, в присутствии флоретина на термограмме помимо главного фазового перехода липидного бислоя обнаруживается новый пик при 40–60 °С [8,12], который можно отнести к фазовому переходу небислойной фазы. Полученные результаты согласуются с предположением о способности флавоноидов инициировать образование в

суспензии новой небислойной фазы за счёт встраивания в область гидрофильных голов и изменения спонтанной кривизны. Таким образом, механизм действия флавоноидов может быть опосредован их влиянием на кривизну поверхности липидного монослоя.

3.2. Мишень флавоноидов — липидное устье асимметричного нистатинового канала

3.2.1. Влияние нистатина и флавоноидов на ДОФЭ-содержащие бислои

Эффективность встраивания порообразующих веществ в мембрану нередко зависит от кривизны монослоя вблизи липидного устья поры [130]. Для выявления корреляции между проводимостью мембраны, индуцированной односторонним введением нистатина, и спонтанной кривизной мембранообразующих липидов, была протестирована чувствительность ДОФЭ-содержащих мембран к нистатину. Спонтанная кривизна ДОФЭ и ДОФХ составляет -0.4 и -0.1 нм^{-1} , соответственно [63]. Пороговая концентрация нистатина в камере, вызывающая изменения проводимости мембраны для ДОФЭ-содержащих бислоёв, в 20 раз больше, чем для ДОФХ-содержащих. Более высокая действующая концентрация антибиотика свидетельствует о том, что отрицательная спонтанная кривизна препятствует образованию полиеновых каналов. Это указывает на наличие у нистатиновых каналов липидного устья с положительной кривизной. Полученные данные подтверждаются свидетельствами нечувствительности бактерий, содержащих в своих мембранах в основном фосфатидилэтаноламина, к полиеновым антибиотикам [131]. На этом основании можно предположить, что формирование асимметричных полиеновых каналов энергетически более выгодно в мембранах с положительной спонтанной кривизной, и, что увеличение кривизны монослоя в непосредственной близости от липидного устья поры будет приводить к

увеличению каналообразующей активности. Опыты, проведённые с TX-100, характеризующимся положительной спонтанной кривизной, показали, что введение TX-100 до концентрации 20 мкМ вызывает увеличение трансмембранного тока, индуцированного односторонней добавкой нистатина.

Было проверено влияние катехина и таксифолина на трансмембранный ток, индуцированный односторонней добавкой нистатина к ДОФЭ:Хол:СМ мембране (Табл. 7). Установлено, что введение таксифолина увеличивает проводимость бислоя, а катехин её не меняет. Полученные данные качественно совпадают с результатами, полученными на ДОФХ:Хол:СМ мембранах, что может говорить о неспецифическом по отношению к фосфолипидному компоненту механизме действия флавоноидов на нистатин-липидные поры.

Табл. 7. Средние значения и стандартные отклонения натуральных логарифмов отношений нистатин-индуцированных токов ($\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$) до и после двустороннего введения 20 мкМ катехина или таксифолина. ДОФЭ:Хол:СМ (57:33:10 мол %) мембраны омывались 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0. Напряжение на мембране составляло 50 мВ.

$\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$	Катехин	Таксифолин
	0.3 ± 0.2	3.3 ± 2.4

Асимметрия строения нистатиновых каналов обуславливает необходимость рассмотрения различий во влиянии флавоноидов на трансмембранный ток при их добавке с *цис*- или *транс*-стороны бислоя. Согласно выдвинутой гипотезе, флавоноиды должны оказывать своё действие при добавке с *транс*-стороны и не влиять на нистатин-индуцированный трансмембранный ток при введении в *цис*-раствор.

3.2.2. Рост активности нистатина в присутствии флавоноидов со стороны, противоположной стороне добавки полиена

Дипольные модификаторы, оказывающие влияние на трансмембранный ток, индуцированный односторонней *цис*-добавкой нистатина вводились в *цис*- или *транс*-отсеки камеры до концентрации 20 мкМ для флорицина, биоханина А, мирицетина и 5 мкМ для RH 421, соответственно. На Рис. 35 показано, что при добавке с *цис*-стороны флорицина, биоханина А, мирицетина или RH 421 увеличения трансмембранного тока не происходит, в то время как добавка указанных модификаторов с *транс*-стороны вызывает рост проводимости бислоя.

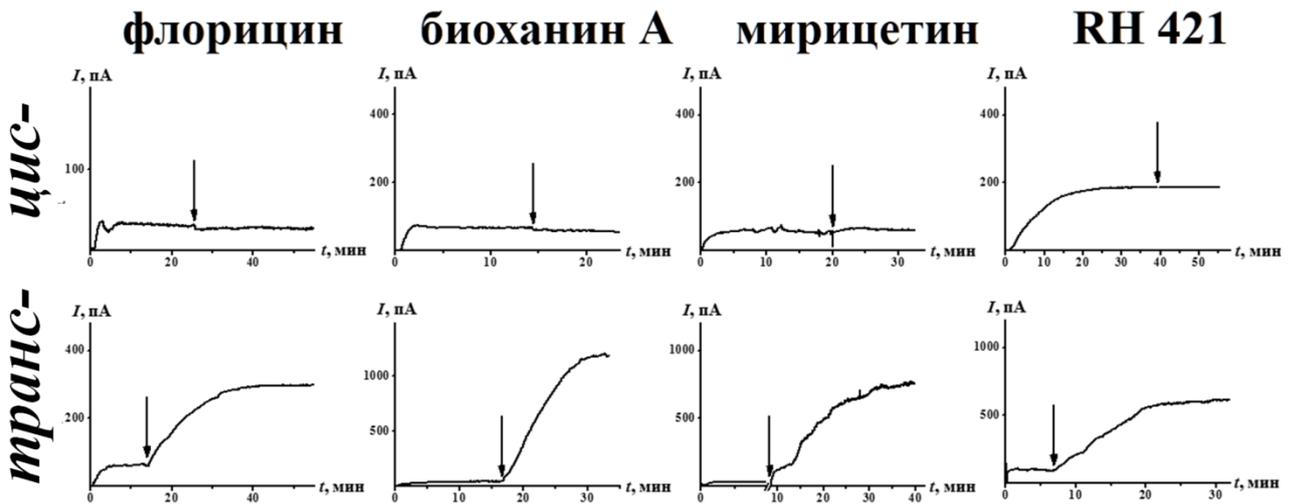


Рис. 35. Влияние *цис*- и *транс*-добавки дипольных модификаторов на нистатин-индуцированный стационарный трансмембранный ток. Стрелки указывают моменты введения 20 мкМ флорицина, биоханина А, мирицетина или 5 мкМ RH 421. ДОФХ:Хол:СМ мембраны омывались 2 М КСl, 5 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.0. Напряжение на мембране составляло 50 мВ.

В Табл. 8 обобщены данные изучения влияния дипольных модификаторов, добавленных отдельно в *цис*- или *транс*-отсеки камеры. Добавка биоханина А, мирицетина, флорицина и RH 421 с *цис*-стороны мембраны практически не

изменяет трансмембранный ток, в то время как добавка тех же модификаторов с *транс*-стороны вызывает рост тока в число раз, сравнимое с величиной, характерной для двусторонней добавки модификаторов. Подобный результат показывает, что эффект флавоноидов опосредован их действием на липидное *транс*-устье полиеновой поры. По всей видимости, введенные с *транс*-стороны флавоноиды способны встраиваться в мембрану в область гидрофильных головок фосфолипидов и увеличивать кривизну *транс*-монослоя. Это способствует стабилизации липидного устья поры за счёт изменения профиля латерального давления в бислое и приводит к росту числа каналов.

Табл. 8. Средние значения и стандартные отклонения натуральных логарифмов отношений нистатин-индуцированного трансмембранного тока ($\ln(I_{\infty}/I_{\infty}^0)$) до и после введения флорицина, биоханина А, мирицетина или RH 421 с *цис*- или *транс*-стороны. ДОФХ:Хол:СМ мембраны омывались 2 М КСl, 5 мМ HEPES-КОН, рН 7.0 при напряжении 50 мВ.

Способ добавки	Биоханин А	Мирицетин	Флорицин	RH 421
<i>Цис</i> -	-0.1 ± 0.4	-0.1 ± 0.2	-0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2
<i>Транс</i> -	2.9 ± 0.6	2.6 ± 1.7	2.7 ± 1.5	2.5 ± 0.8

3.2.3. Влияние флавоноидов на утечку кальцеина из липосом

Разжижающее действие флавоноидов на мембраны можно оценить по их влиянию на проницаемость мембраны для кальцеина. На Рис. 36 представлена зависимость утечки флуоресцентного маркера кальцеина из ДОФХ:Хол (67:33 мол %) липосом от концентрации в суспензии флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина или даидзеина. Пороговая концентрация флоретина или биоханина А, вызывающая регистрируемую утечку кальцеина из липосом, составляет 5–10 мкМ, а концентрация, вызывающая пятидесятипроцентную

утечку — порядка 200 мкМ. По всей вероятности, при 400 мкМ концентрации флоретина или биоханина А происходит разрушение липосом за счёт полиморфного фазового перехода бислой-небислойная фаза и высвобождения кальцеина по закону “всё-или-ничего” [132]. Подобный вывод подтверждается наличием небислойной липидной фазы в суспензиях гигантских однослойных липосом в присутствии 400 мкМ биоханина А или флоретина (см. 3.1.8). В субкритических концентрациях флоретин и биоханин А встраиваются в область гидрофильных голов фосфолипидного бислоя и увеличивают локальную кривизну мембраны; площадь, приходящуюся на одну липидную молекулу, и подвижность углеводородных цепей. Подобное действие флоретина и биоханина А приводит к возникновению в мембране дефектов упаковки липидов, через которые может осуществляться транспорт кальцеина из липосомы в омывающий раствор под действием градиента концентрации.

Для определения механизма утечки кальцеина была измерена величина индекса тушения (Q) суспензии, обработанной флавоноидами, после повторного удаления не захваченного липосомами кальцеина. В случае постепенного высвобождения кальцеина из липосом индекс Q уменьшается пропорционально количеству вытекшего маркера, а в случае высвобождения кальцеина по закону “всё-или-ничего” Q остаётся таким же как и для необработанных флавоноидом липосом [132,133]. Q после обработки суспензии ДОФХ:Хол липосом 100 мкМ флоретина и биоханина А и последующей очистки суспензии от высвобожденного кальцеина снизился с 10 до 8 и 5, соответственно, что указывает на градуальный механизм утечки кальцеина из везикул при концентрации флавоноида 100 мкМ.

Флавоноиды способны снижать изначально положительный (ок. + 0.3 В) [52,134,135] дипольный потенциал мембран на 100–150 мВ [11,56]. Снижение φ_d могло бы приводить к снижению эффективности транспорта отрицательно заряженного кальцеина, но влияние флоретина и биоханина А на механические свойства бислоя, по всей видимости, превалирует над их действием на электрические характеристики мембраны в отношении изменения проницаемости мембраны для кальцеина.

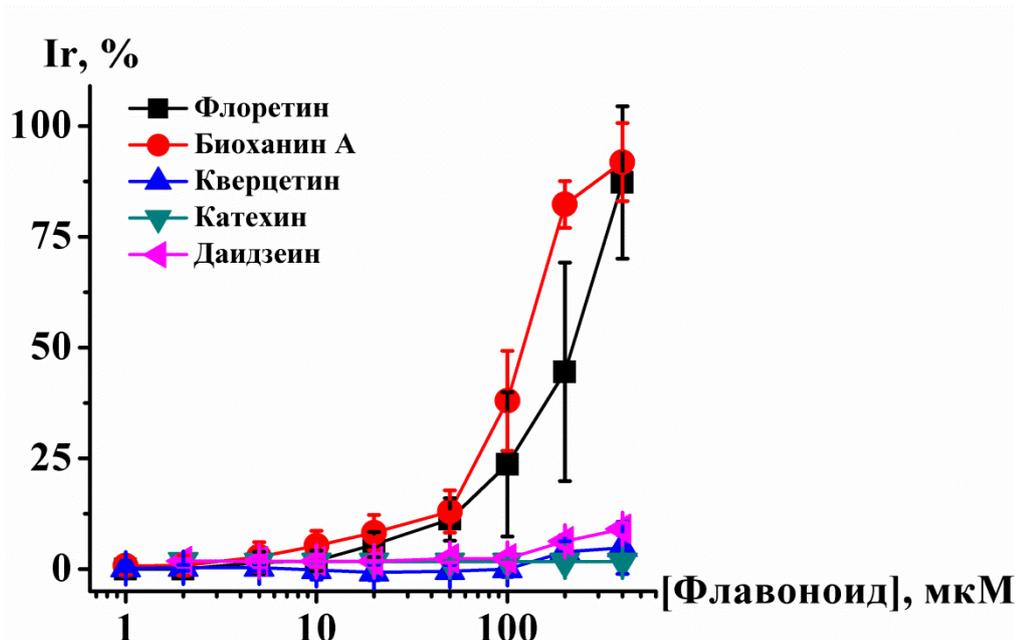


Рис. 36. Величина утечки кальцеина (I_r , %) из липосом, сформированных из ДОФХ:Хол (67:33 мол %) в зависимости от концентрации флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина при рН 7.4.

Кверцетин, катехин и даидзеин практически не влияют на утечку кальцеина из ДОФХ:Хол (67:33 мол %) липосом. Кверцетин, благодаря своей жёсткой структуре, состоящей из плоских ароматических колец, способен образовывать сеть водородных связей с головками фосфолипидов [123,136], что не должно способствовать росту эффективности транспорта кальцеина. Кверцетин и мирицетин также не влияют на утечку кальцеина из липосом, сформированных из яичного лецитина [123], что говорит об отсутствии у них разжижающего действия как на фосфохолиновые, так и на холестерин-содержащие мембраны. Катехин преимущественно взаимодействует с поверхностью мембраны с помощью водородных связей и не оказывает действия на подвижность углеводородных хвостов липидных молекул [137]. Две гидроксильные группы даидзеина расположены на противоположных концах молекулы, что не позволяет ему погружаться в гидрофобную область мембраны и разжижать её.

3.2.4. Действие флавоноидов на индуцированную нистатином утечку кальцеина из липосом

Однослойные липосомы могут служить более релевантной моделью живой клетки, чем плоские липидные бислои. Например, показана корреляция между концентрациями полиена, вызывающими утечку кальцеина из липосом и гемолиз эритроцитов [89]. Исследование проницаемости липосомальных мембран, индуцированной добавкой нистатина, может служить удобным методом для изучения возможностей совместного применения флавоноидов и полиенов в фармакологической практике.

На Рис. 37 показана временная зависимость утечки флуоресцентного маркера кальцеина из ДОФХ:Хол липосом под действием 20 мкМ нистатина, предварительно проинкубированных в течение 1 ч с 50 мкМ флоретина или кверцетина. В качестве контроля на Рис. 37 приведена временная зависимость утечки кальцеина под действием нистатина из не модифицированных флавоноидом ДОФХ:Хол липосом. При расчёте I_r незначительное увеличение интенсивности флуоресценции высвобожденного под действием флавоноида кальцеина вычиталось из величины интенсивности общей флуоресценции. При добавке нистатина к липосомальной суспензии антибиотик взаимодействует с внешним монослоем мембраны везикулы. В таком случае липидное устье асимметричной нистатиновой поры находится во внутреннем монослое липосомальной мембраны. Флавоноиду, чтобы воздействовать на него, необходимо проникнуть внутрь везикулы. Следовательно на внутренний монослой мембраны липосомы могут оказывать воздействие только флавоноиды, способные проникать через бислой. Именно эти соединения в дальнейшем могут быть рассмотрены как потенциальные синергисты противогрибкового действия нистатина.

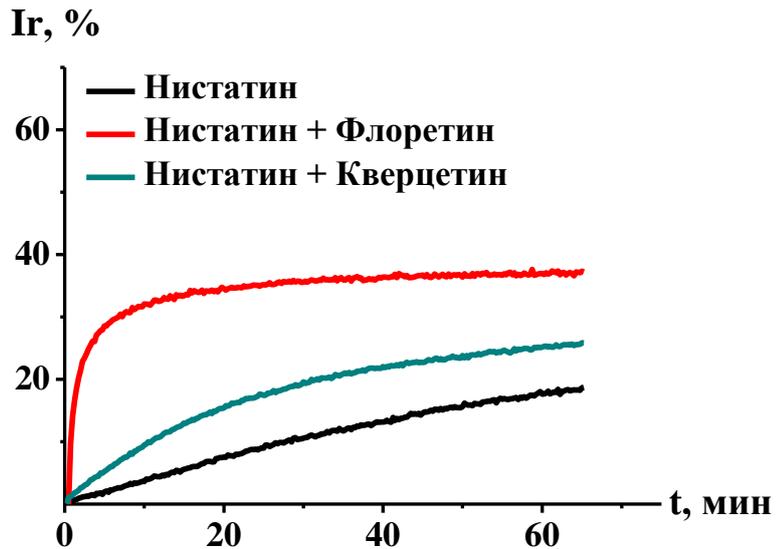


Рис. 37. Зависимость от времени утечки кальция (I_r , %) из ДОФХ:Хол липосом, обработанных 20 мкМ нистатина в отсутствие (*Нистатин*) и присутствии 50 мкМ флоретина (*Нистатин + Флоретин*) или кверцетина (*Нистатин + Кверцетин*) при pH 7.4.

Вид кинетической кривой утечки кальцеина в присутствии флоретина значительно отличается от контрольной кривой или характерной временной зависимости утечки маркера из липосом, обработанных кверцетином. Скорость выхода кальцеина в присутствии флоретина существенно выше, чем в присутствии кверцетина или в отсутствие флавоноидов. Флоретин, благодаря своей гибкой структуре, может легко проникать через липидную мембрану [138] и, следовательно, воздействовать не только на внешний, но и на внутренний монослой мембраны липосомы. Проницаемость мембраны для кальцеина в присутствии флоретина увеличивается за счёт формирования в бислое новых асимметричных нистатиновых каналов вследствие увеличения спонтанной локальной кривизны внутреннего монослоя мембраны липосомы. В то же время относительно гидрофильный кверцетин способен эффективно проникать через бислой только при низких значениях pH, когда все его гидроксилы протонированы [139]. В физиологических условиях кверцетин формирует водородные связи с

головками фосфолипидов и примембранной водой [140], что препятствует его движению сквозь бислои. Кверцетин, в основном локализованный на поверхности внешнего монослоя, не способен влиять на липидное устье нистатинового асимметричного канала, находящееся во внутреннем монослое везикулы.

На Рис. 38 показана зависимость утечки кальцеина из больших однослойных липосом от концентрации нистатина в отсутствие и присутствии флоретина и кверцетина. Различия в эффектах флоретина и кверцетина, ярко выраженные во влиянии на кинетику утечки (Рис. 37), имеют место и для концентрационной зависимости утечки, индуцированной нистатином в присутствии флоретина и кверцетина. Присутствие в омывающем растворе 50 мкМ флоретина заметно увеличивает утечку, в то время как кверцетин на неё практически не влияет.

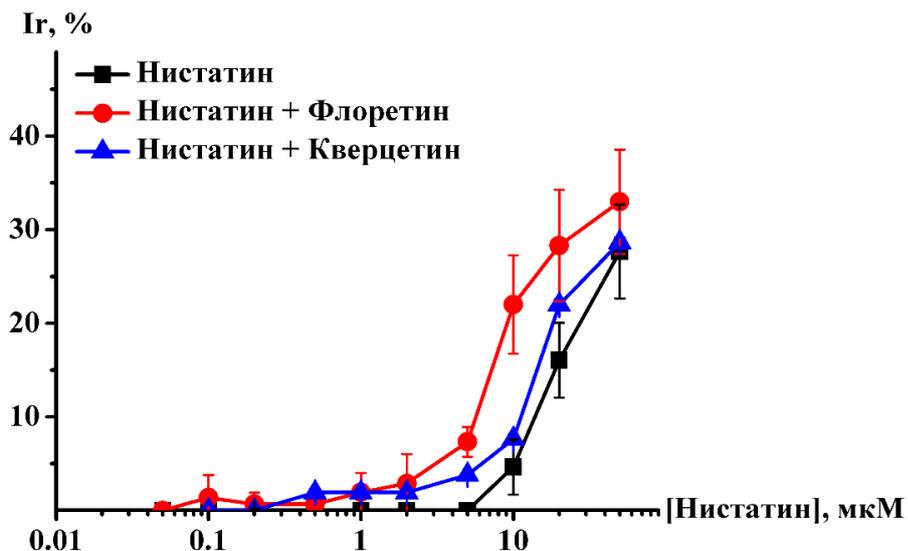


Рис. 38. Зависимость утечки кальцеина (I_r , %) из ДОФХ:Хол липосом от концентрации нистатина в отсутствие и присутствии в липосомальной суспензии 50 мкМ флоретина или кверцетина при pH 7.4.

Схема, объясняющая различия в действии флоретина и кверцетина на индуцированную нистатином утечку кальцеина, представлена на Рис. 39. На схеме показано, что флоретин, свободно проникающий через мембрану, увеличивает

индуцированную нистатином утечку кальцеина, действуя на липидное устье полиеновой поры, локализованной во внутреннем монослое мембраны липосомы. Кверцетин, локализованный с внешней стороны мембраны, утечку не меняет, так как не может повлиять на липидное устье канала.

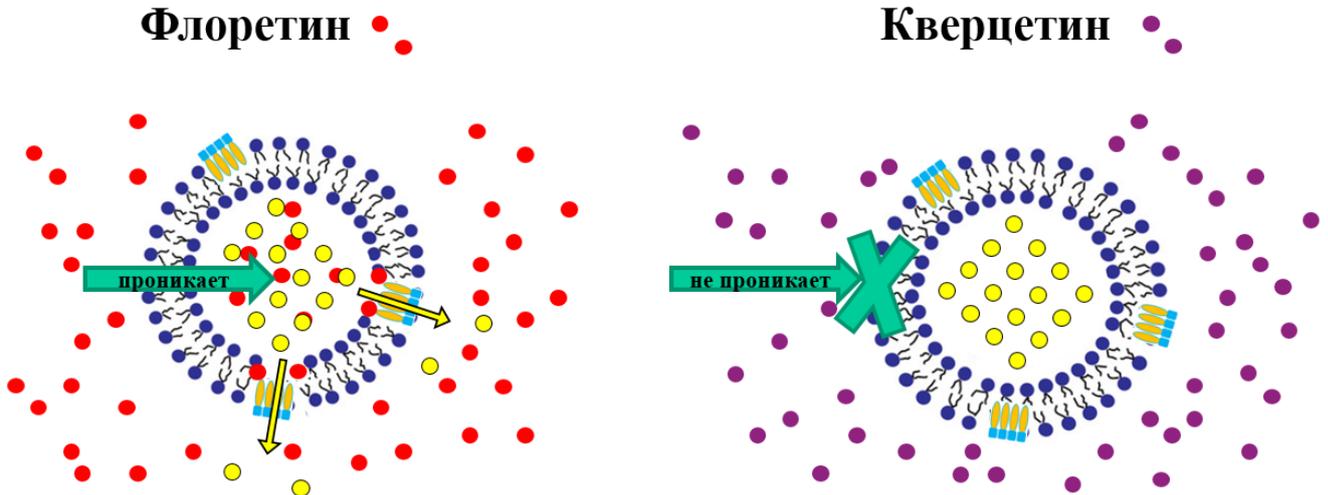


Рис. 39. Схема действия флоретина и кверцетина на асимметричные нистатиновые каналы. Слева — флоретин (●) проникает внутрь липосомы и, действуя на липидное устье полиеновой поры, способствует высвобождению кальцеина (●). Справа — кверцетин (●) не проникает через бислои и не оказывает влияния на липидное устье нистатинового канала.

Таким образом, результаты проведенных исследований влияния некоторых флавоноидов на нистатин-индуцированную утечку флуоресцентного маркера кальцеина из больших однослойных липосом, обуславливают возможность рассмотрения флоретина как потенциального синергиста полиеновых антибиотиков в живых клетках.

3.2.5. Модель увеличения каналообразующей активности нистатина флавоноидами

Полученные в работе результаты позволяют построить модель взаимодействия флавоноидов с липидным *транс*-устьем асимметричного полиенового канала (Рис. 40). Флавоноид, встраивающийся в область головок фосфолипидов, увеличивает кривизну монослоя и потенцирует образование асимметричных нистатиновых каналов за счёт стабилизации липидного устья поры.

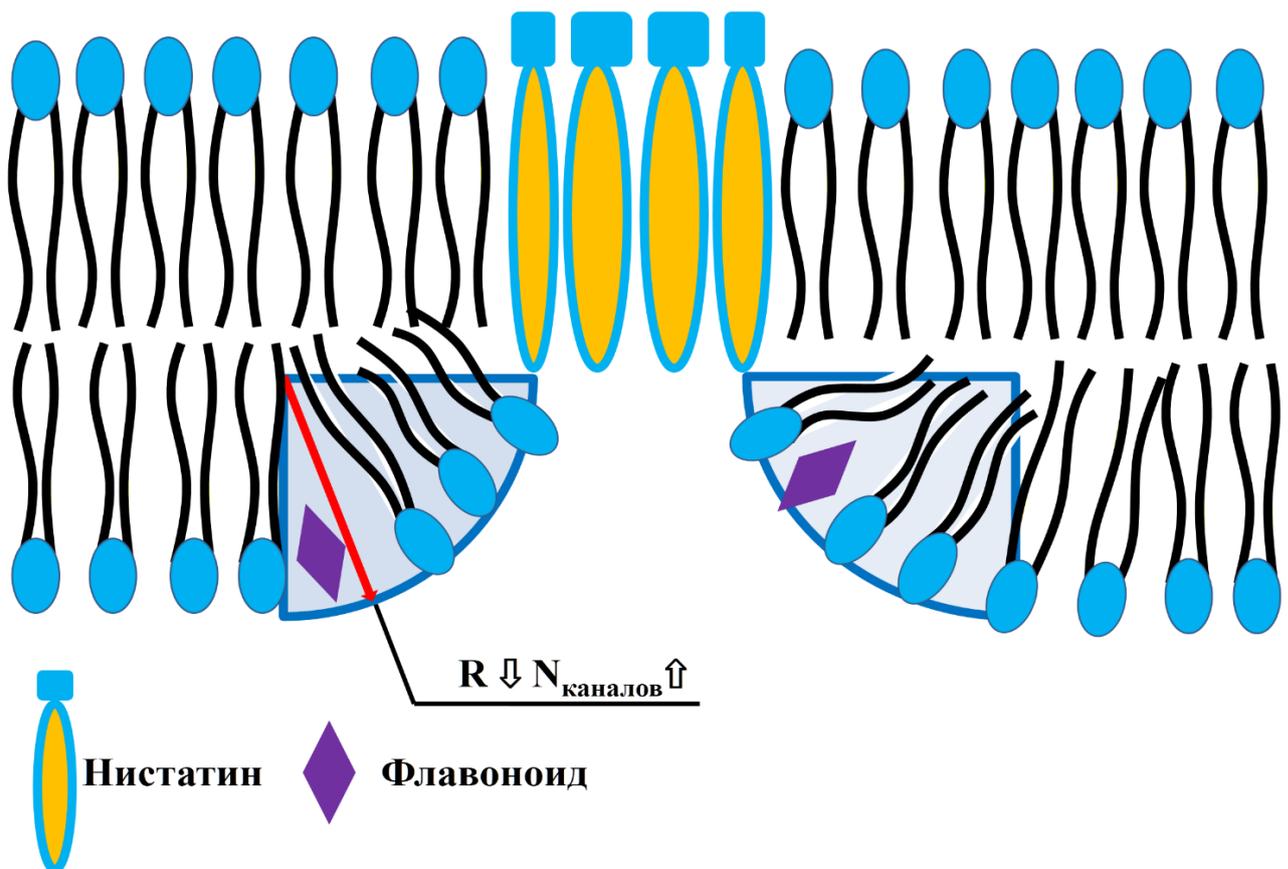


Рис. 40. Схема, иллюстрирующая действие флавоноидов на липидное *транс*-устье асимметричного нистатинового канала. Модификатор встраивается в область гидрофильных голов и усиливает порообразование посредством увеличения кривизны *транс*-устья канала.

Для оценки числа молекул флоретина, участвующих во взаимодействии с устьем полиенового канала, была определена зависимость нистатин-индуцированного трансмембранного тока от концентрации флоретина (Рис. 41). Сигмовидный характер кривой позволяет говорить о насыщении связывания флоретина с мембраной, обработанной нистатином с одной стороны.

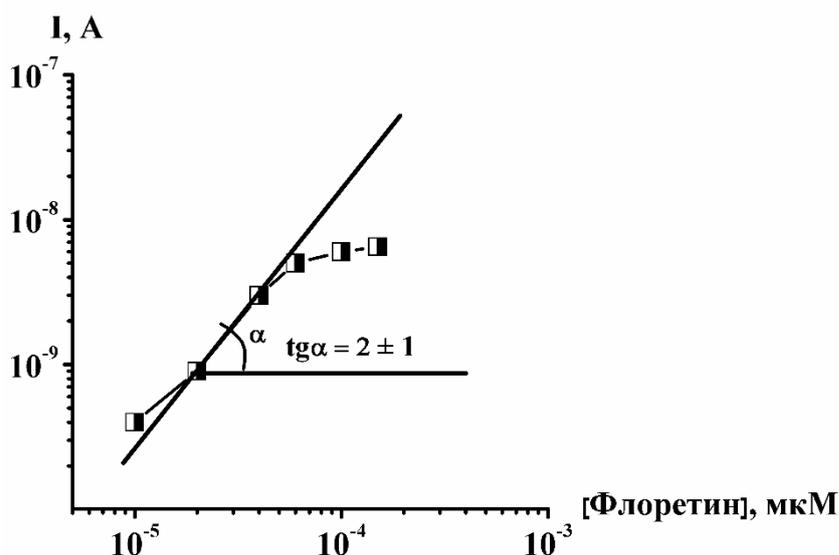


Рис. 41. Билогарифмическая зависимость трансмембранного тока (I , А), индуцированного односторонней добавкой нистатина к ДОФХ:Хол:СМ мембране, от концентрации флоретина. Тангенс угла наклона линейного участка зависимости трансмембранного тока от концентрации флоретина ($tg\alpha$) равен 2 ± 1 .

Зависимость трансмембранного тока от концентрации мембраноактивного соединения позволяет оценить кооперативность связывания агента с бислоем [141]. Тангенс угла наклона линейного участка билогарифмической зависимости трансмембранного тока от концентрации флавоноида равен 2 ± 1 , что позволяет говорить о том, что во взаимодействии с одним асимметричным нистатиновым каналом участвуют две молекулы флоретина. Полученный результат представляется вполне адекватным, поскольку в области липидного устья нистатиновой поры способны разместиться две небольшие молекулы флавоноида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты и проведённый анализ литературных данных позволяют предположить механизм увеличения флавоноидами трансмембранного тока, индуцированного односторонним введением нистатина в мембраноомывающий раствор.

Способности флавоноидов снижать дипольный потенциал мембраны, влиять на фазовую гетерогенность бислоя, уменьшать температуру плавления цепей мембранообразующих липидов и кооперативность главного фазового перехода не являются определяющими факторами увеличения порообразующей активности нистатина, введённого с одной стороны мембраны. Поведение асимметричных нистатиновых каналов, во многом, объясняется наличием липидного *транс*-устья. Ведущую роль в увеличении порообразующей активности нистатина, введённого с одной стороны мембраны, играет способность флавоноидов встраиваться в область фосфолипидных головок бислоя и увеличивать кривизну монослоя. Вероятно, последнее приводит к снижению потенциальной энергии образования каналов и увеличению их числа.

ВЫВОДЫ

1. Таксифолин, кверцетин, биоханин А, мирицетин, флоретин, флорицин, генистеин и генистин при добавке со стороны, противоположной стороне введения антибиотика, увеличивают индуцированный полиеном трансмембранный ток.

2. Уменьшение дипольного потенциала и изменение латеральной гетерогенности мембраны под действием флавоноидов не являются факторами, определяющими рост нистатин-индуцированного трансмембранного тока под действием флавоноидов.

3. Упорядоченные липидные домены, в том числе, индуцированные нистатином, разрушаются под действием флоретина и биоханина А.

4. Росту каналообразующей активности нистатина при введении флавоноидов способствует изменение эластических свойств *транс*-монослоя, в котором находится липидное устье полиеновой поры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holz R., Finkelstein A. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. // *J. Gen. Physiol.* 1970. Vol. 56. P. 125–145.
2. De Kruijff B., Demel R.A. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. Vol. 339. P. 57–70.
3. Zotchev S.B. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. 2003. Vol. 10. P. 211–223.
4. Laniado-Laborín R., Cabrales-Vargas M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. // *Rev. Iberoam. Micol.* 2009. Vol. 26. P. 223–227.
5. Bagnis C.I., Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. // *Saudi J. Kidney Dis. Transplant.* 2013. Vol. 13. P. 481–491.
6. Yamamoto Y., Gaynor R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. // *J. Clin. Invest.* 2001. Vol. 107. P. 135–142.
7. Hendrich A.B. Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2006. Vol. 27. P. 27–40.
8. Ostroumova O.S., Chulkov E.G., Stepanenko O.V., Schagina L.V. Effect of flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures. // *Chem. Phys. Lipids.* 2014. Vol. 178. P. 77–83.

9. Andersen O.S. et al. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. // *J. Gen. Physiol.* 1976. Vol. 67. P. 749–771.
10. Melnik E. et al. Phloretin-induced changes in ion transport across lipid bilayer membranes. // *J. Gen. Physiol.* 1977. Vol. 69. P. 243–257.
11. Efimova S.S., Ostroumova O.S. Effect of dipole modifiers on the magnitude of the dipole potential of sterol-containing bilayers. // *Langmuir.* 2012. Vol. 28. P. 9908–9914.
12. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. Rafts making and rafts braking: How plant flavonoids may control membrane heterogeneity. // *Mol. Cell. Biochem.* 2008. Vol. 314. P. 65–71.
13. Arora A. et al. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. Vol. 373. P. 102–109.
14. Środa K. et al. Genistein derivatives decrease liposome membrane integrity – calcein release and molecular modeling study. // *Biophys. Chem.* 2008. Vol. 138. P. 78–82.
15. Marty A., Finkelstein A. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin, differences in its one-sided and two-sided action. // *J. Gen. Physiol.* 1975. Vol. 65. P. 515–526.
16. Kleinberg M.E., Finkelstein A. Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayer membranes. // *J. Membr. Biol.* 1984. Vol. 80. P. 257–269.
17. Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. / ed. Andersen Ø.M., Markham K.R. CRC Press, 2006. 1212 p.

18. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино, 2013. 310 с.
19. Bohm В.А. Introduction to flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998. 503 p.
20. Katsumoto Y. et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. // *Plant Cell Physiol.* 2007. Vol. 48. P. 1589–1600.
21. Schutt C., Netzly D. Effect of apiforol and apigeninidin on growth of selected fungi. // *J. Chem. Ecol.* 1991. Vol. 17. P. 2261–2266.
22. Baldisserotto A. et al. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications. // *Molecules.* 2012. Vol. 17. P. 13275–13289.
23. Hada H. et al. Higher amounts of anthocyanins and UV-absorbing compounds effectively lowered CPD photorepair in purple rice (*Oryza sativa L.*). // *Plant, Cell Environ.* 2003. Vol. 26. P. 1691–1701.
24. Bors W., Michel C., Saran M. Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions. // *Methods Enzymol.* 1994. Vol. 234. P. 420–429.
25. Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. // *Trends Plant Sci.* 1997. Vol. 2. P. 152–159.
26. Tsuda T., Kato Y., Osawa T. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 484. P. 207–210.
27. Wang H., Cao G.H., Prior R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. // *J. Agric. Food Chem.* 1997. Vol. 45. P. 304–309.

28. Yamasaki H., Uefuji H., Sakihama Y. Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical. // Arch. Biochem. Biophys. 1996. Vol. 332. P. 183–186.
29. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. // Plant Physiol. 2006. Vol. 141. P. 391–396.
30. Ferguson L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. // Mutat. Res. 2001. Vol. 475. P. 89–111.
31. Frankel E.N., Waterhouse A.L., Teissedrespt P.L. Principal phenolic phytochemicals in selected california wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. // J. Agric. Food Chem. 1995. Vol. 43. P. 890–894.
32. Hu C. et al. Black rice (*oryza sativa L. indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. // J. Agric. Food Chem. 2003. Vol. 51. P. 5271–5277.
33. Lazzé M.C. et al. Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. // Mutat. Res. 2003. Vol. 535. P. 103–115.
34. Ramirez-Tortosa C. et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 31. P. 1033–1037.
35. Bors W. et al. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. // Methods Enzymol. 1990. Vol. 186. P. 343–355.
36. George F., Figueiredo P., Brouillard R. Malvin Z-chalcone: an unexpected new open cavity for the ferric cation. // Phytochemistry. 1999. Vol. 50. P. 1391–1394.

37. Haber F., Weiss J. Über die katalyse des hydroperoxydes. // Naturwissenschaften. 1932. Vol. 20. P. 948–950.
38. Kidd P.S. et al. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays L.*). // J. Exp. Bot. 2001. Vol. 52. P. 1339–1352.
39. Coberly L.C., Rausher M.D. Analysis of a chalcone synthase mutant in *Ipomoea purpurea* reveals a novel function for flavonoids: amelioration of heat stress. // Mol. Ecol. 2003. Vol. 12. P. 1113–1124.
40. Kootstra A. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. // Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 26. P. 771–774.
41. Stafford H.A. Flavonoid evolution: an enzymic approach. // Plant Physiol. 1991. Vol. 96. P. 680–685.
42. Rowland I. et al. Bioavailability of phyto-oestrogens. // Br. J. Nutr. 2003. Vol. 89, № Suppl. 1. P. S45–S58.
43. Giusti M.M., Rodríguez-Saona L.E., Wrolstad R.E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. // J. Agric. Food Chem. 1999. Vol. 47. P. 4631–4637.
44. Marino M., Galluzzo P. Is there an answer? Are flavonoids agonists or antagonists of the natural hormone 17 β -estradiol? // IUBMB Life. 2008. Vol. 60. P. 241–244.
45. Hladky S.B., Haydon D.A. Membrane conductance and surface potential. // Biochim. Biophys. Acta. 1973. Vol. 318. P. 464–468.
46. De Levie R. et al. On the adsorption of phloretin onto a black lipid membrane. // Biophys. J. 1979. Vol. 25. P. 295–300.

47. Jordan P.C. Electrostatic modeling of ion pores. II. Effects attributable to the membrane dipole potential. // *Biophys. J.* 1983. Vol. 41. P. 189–195.
48. Flewelling R.F., Hubbell W.L. Thermodynamic analysis of tetraphenylphosphonium binding to vesicles $QP + Q$. // *Biophys. J.* 1986. Vol. 49. P. 531–540.
49. Wang L. Measurements and implications of the membrane dipole potential. // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. Vol. 81. P. 615–635.
50. Vitha M.F., Clarke R.J. Comparison of excitation and emission ratiometric fluorescence methods for quantifying the membrane dipole potential. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1768. P. 107–114.
51. Peterson U. et al. Origin of membrane dipole potential: Contribution of the phospholipid fatty acid chains. // *Chem. Phys. Lipids.* 2002. Vol. 117. P. 19–27.
52. Gross E., Bedlack R.S., Loew L.M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. // *Biophys. J.* 1994. Vol. 67. P. 208–216.
53. Bandari S. et al. Membrane dipole potential is sensitive to cholesterol stereospecificity: Implications for receptor function. // *Chem. Phys. Lipids.* 2014. Vol. 184. P. 25–29.
54. Cseh R., Benz R. Interaction of phloretin with lipid monolayers: relationship between structural changes and dipole potential change. // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77. P. 1477–1488.
55. Cseh R. et al. Interaction of phloretin with membranes: On the mode of action of phloretin at the water-lipid interface. // *Eur. Biophys. J.* 2000. Vol. 29. P. 172–183.

56. Chulkov E.G., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Membrane dipole modifiers modulate single-length nystatin channels via reducing elastic stress in the vicinity of the lipid mouth of a pore. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. Vol. 1848. P. 192–199.
57. Luchian T., Mereuta L. Phlorizin- and 6-ketocholestanol-mediated antagonistic modulation of alamethicin activity in phospholipid planar membranes. // *Langmuir*. 2006. Vol. 22. P. 8452–8457.
58. Rokitskaya T.I., Antonenko Y.N., Kotova E.A. Effect of the dipole potential of a bilayer lipid membrane on gramicidin channel dissociation kinetics. // *Biophys. J.* 1997. Vol. 73. P. 850–854.
59. Duffin R.L. et al. Modulation of lipid bilayer interfacial dipole potential by phloretin, RH421, and 6-ketocholestanol as probed by gramicidin channel conductance. // *Langmuir*. 2003. Vol. 19. P. 1439–1442.
60. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. P. e30261.
61. Kooijman E.E. et al. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. P. 2097–2102.
62. Fuller N., Benatti C.R., Rand R.P. Curvature and bending constants for phosphatidylserine-containing membranes. // *Biophys. J.* 2003. Vol. 85. P. 1667–1674.
63. Kollmitzer B. et al. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. // *Soft Matter*. 2013. Vol. 9. P. 10877–10884.
64. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. М.: Издательство ЛКИ, 2011. 280 с.

65. Hamill O.P., Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. // *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81. P. 685–740.
66. Haswell E.S., Phillips R., Rees D.C. Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? // *Structure.* 2012. Vol. 29. P. 1356–1369.
67. McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. // *Nature.* 2005. Vol. 438. P. 590–596.
68. Martens S., McMahon H.T. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. Vol. 9. P. 543–556.
69. Shemesh T. et al. Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. // *Biophys. J.* 2003. Vol. 85. P. 3813–3827.
70. Matsuzaki K. et al. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 11856–11863.
71. Mouritsen O.G. Lipids, curvature, and nano-medicine. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011. Vol. 113. P. 1174–1187.
72. Brown M.F. Curvature forces in membrane lipid-protein interactions. // *Biochemistry.* 2012. Vol. 51. P. 9782–9795.
73. Auner B.G. et al. Interaction of phloretin and 6-ketocholestanol with DPPC-liposomes as phospholipid model membranes. // *Int. J. Pharm.* 2005. Vol. 294. P. 149–155.
74. Scheidt H.A. et al. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. Vol. 1663. P. 97–107.

75. Kanoh S., Rubin B.K. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2010. Vol. 23. P. 590–615.
76. Kotler-Brajtburg J. et al. Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979. Vol. 15. P. 716–722.
77. Hamilton-Miller J.M. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. // *Bacteriol. Rev.* 1973. Vol. 37. P. 166–196.
78. Касумов Х.М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука, 2009. 512 с.
79. Bolard J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. Vol. 864. P. 257–304.
80. Te Welscher Y.M. et al. Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Vol. 109. P. 11156–11159.
81. Whitfield G.B. et al. Filipin, an antifungal antibiotic: isolation and properties. // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. Vol. 77. P. 4799–4801.
82. Nishimura S. et al. Visualization of sterol-rich membrane domains with fluorescently-labeled theonellamides. // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. P. e83716.
83. Coutinho A., Prieto M. Cooperative partition model of nystatin interaction with phospholipid vesicles. // *Biophys. J.* 2003. Vol. 84. P. 3061–3078.
84. Ermishkin L.N., Kasumov K.M., Potseluyev V.M. Properties of amphotericin B channels in a lipid bilayer. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. Vol. 470. P. 357–367.

85. Milhaud J. et al. Association of polyene antibiotics with sterol-free lipid membranes II. Hydrophobic binding of nystatin to dilauroylphosphatidylcholine bilayers. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. Vol. 1326. P. 54–66.
86. Paquet M.J. et al. The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by ²H NMR. // *Chem. Phys. Lipids*. 2002. Vol. 119. P. 1–11.
87. Fournier I., Barwicz J., Tancrède P. The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol-or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. Vol. 1373. P. 76–86.
88. Andreoli T.E., Dennis V.W., Weigl A.M. The effect of amphotericin B on the water and nonelectrolyte permeability of thin lipid membranes. // *J. Gen. Physiol*. 1969. Vol. 53. P. 133–156.
89. Katsu T. Application of calcein-loaded liposomes for the determination of membrane channel size. // *Biol. Pharm. Bull*. 1999. Vol. 22. P. 978–980.
90. Ermishkin L.N., Kasumov K.M., Potzeluev V.M. Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine. // *Nature*. 1976. Vol. 262. P. 698–699.
91. Epanand R.F., Savage P.B., Epanand R.M. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. Vol. 1768. P. 2500–2509.
92. González-Damián J., Ortega-Blake I. Effect of membrane structure on the action of polyenes II: Nystatin activity along the phase diagram of ergosterol- and cholesterol-containing POPC membranes. // *J. Membr. Biol*. 2010. Vol. 237. P. 41–49.

93. Silva L. et al. Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic nystatin. A fluorescence study. // *Biophys. J.* 2006. Vol. 90. P. 3625–3631.
94. Helrich C.S., Schmucker J.A., Woodbury D.J. Evidence that nystatin channels form at the boundaries, not the interiors of lipid domains. // *Biophys. J.* 2006. Vol. 91. P. 1116–1127.
95. Rinia H.A., De Kruijff B. Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 504. P. 194–199.
96. Pandit S.A. et al. Sphingomyelin-cholesterol domains in phospholipid membranes: atomistic simulation. // *Biophys. J.* 2004. Vol. 87. P. 1092–1100.
97. Vertut-Doi A., Hannaert P., Bolard J. The polyene antibiotic amphotericin B inhibits the Na⁺/K⁺ pump of human erythrocytes. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. Vol. 157. P. 692–697.
98. Szponarski W., Bolard J. Temperature-dependent modes for the binding of the polyene antibiotic amphotericin B to human erythrocyte membranes. A circular dichroism study. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1987. Vol. 897. P. 229–237.
99. Sharma M. et al. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. // *FEMS Yeast Res.* 2010. Vol. 10. P. 570–578.
100. Sharma M. et al. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. // *Biosci. Rep.* 2010. Vol. 30. P. 391–404.
101. Bolard J., Cheron M., Mazerski J. Effect of surface curvature on the interaction of single lamellar phospholipid vesicles with aromatic and nonaromatic heptaene

- antibiotics (vacidin A and amphotericin B). // *Biochem. Pharmacol.* 1984. Vol. 33. P. 3675–3680.
102. Ostroumova O.S. et al. The interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes. // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. P. e45135.
103. Brautaset T. et al. Improved antifungal polyene macrolides via engineering of the nystatin biosynthetic genes in *Streptomyces noursei*. // *Chem. Biol.* 2008. Vol. 15. P. 1198–1206.
104. Hamill R.J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. // *Drugs.* 2013. Vol. 73. P. 919–934.
105. Montal M., Mueller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1972. Vol. 69. P. 3561–3566.
106. Juhasz J., Davis J.H., Sharom F.J. Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of “lipid raft” mixtures. // *Biochem. J.* 2010. Vol. 430. P. 415–423.
107. Samsonov A., Mihalyov I., Cohen F.S. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. // *Biophys. J.* 2001. Vol. 81. P. 1486–1500.
108. Fiske C., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. // *J. Biol. Chem.* 1925. Vol. 66. P. 375–400.
109. Koynova R., Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1376. P. 91–145.
110. Sturtevant J.M. A scanning calorimetric study of small molecule-lipid bilayer mixtures. // *Biochemistry.* 1982. Vol. 79. P. 3963–3967.

111. Sturtevant J. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1987. Vol. 38. P. 463–488.
112. Brutyan R.A., McPhie P. On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes. // *J. Membr. Biol.* 1996. Vol. 107. P. 69–78.
113. Asandei A., Luchian T. Ion selectivity, transport properties and dynamics of amphotericin B channels studied over a wide range of acidity changes. // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2008. Vol. 67. P. 99–106.
114. Kolb H.A., Läuger P. Electrical noise from lipid bilayer membranes in the presence of hydrophobic ions. // *J. Membr. Biol.* 1977. Vol. 37. P. 321–345.
115. Kolb H.A., Läuger P. Spectral analysis of current noise generated by carrier-mediated ion transport. // *J. Membr. Biol.* 1978. Vol. 41. P. 167–187.
116. Chung S., Kaczmarek L.K. Modulation channels of the inactivation by cAMP of voltage-dependent potassium channels by cAMP. // *J. Neurosci.* 1995. Vol. 15. P. 3927–3935.
117. Baginski M., Czub J., Sternal K. Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling studies. // *Chem. Rec.* 2006. Vol. 6. P. 320–332.
118. Bonilla-Marín M., Moreno-Bello M., Ortega-Blake I. A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channel. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. Vol. 1061. P. 65–77.
119. Starke-Peterkovic T. et al. Electric field strength of membrane lipids from vertebrate species: membrane lipid composition and Na-K-ATPase molecular activity. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Vol. 288. P. 663–671.

120. Malkov D.Y., Sokolov V.S. Fluorescent styryl dyes of the RH series affect a potential drop on the membrane/solution boundary. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1996. Vol. 1278. P. 197–204.
121. Bagatolli L.A., Gratton E. Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. // *Biophys. J.* 2000. Vol. 78. P. 290–305.
122. García-Sáez A.J., Chiantia S., Schwille P. Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. P. 33537–33544.
123. Ollila F. et al. Characterization of flavonoid – biomembrane interactions. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2002. Vol. 399. P. 103–108.
124. Rothwell J.A., Day A.J., Morgan M.R.A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53. P. 4355–4360.
125. Raghunathan M. et al. Structure and elasticity of lipid membranes with genistein and daidzein bioflavonoids using X-ray scattering and MD simulations. // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116. P. 3918–3927.
126. Wesółowska O. et al. Perturbation of the lipid phase of a membrane is not involved in the modulation of MRP1 transport activity by flavonoids. // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2009. Vol. 14. P. 199–221.
127. Cooper R.A. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. // *J. Supramol. Struct.* 1978. Vol. 8. P. 413–430.
128. Berkowitz M.L. Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1788. P. 86–96.

129. Chulkov E.G., Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Direct visualization of solid ordered domains induced by polyene antibiotics in giant unilamellar vesicles. // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. Vol. 183. P. 204–207.
130. Epand R.F. et al. The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 32632–32639.
131. Hammond S.M. Biological activity of polyene antibiotics. // *Prog. Med. Chem.* 1977. Vol. 14. P. 105–179.
132. Heerklotz H., Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. // *Eur. Biophys. J.* 2007. Vol. 36. P. 305–314.
133. Gupta K. et al. Mechanism of membrane permeation induced by synthetic β -hairpin peptides. // *Biophys. J.* 2013. Vol. 105. P. 2093–2103.
134. Amoroso S. et al. Photochemical behavior and Na^+, K^+ -ATPase sensitivity of voltage-sensitive styrylpyridinium fluorescent membrane probes. // *Photochem. Photobiol.* 2006. Vol. 82. P. 495–502.
135. Clarke R.J., Kane D.J. Optical detection of membrane dipole potential: Avoidance of fluidity and dye-induced effects // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. Vol. 1323. P. 223–239.
136. Boggs J.M. Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. Vol. 906. P. 353–404.
137. Abram V. et al. Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes. // *Food Chem.* 2013. Vol. 139. P. 804–813.
138. Verkman A.S., Solomon A.K. A stepwise mechanism for the permeation of phloretin through a lipid bilayer. // *J. Gen. Physiol.* 1982. Vol. 80. P. 557–581.

139. Movileanu L., Neagoe I., Flonta M.L. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. // *Int. J. Pharm.* 2000. Vol. 205. P. 135–146.
140. Košinová P. et al. Positioning of antioxidant quercetin and its metabolites in lipid bilayer membranes: Implication for their lipid-peroxidation inhibition. // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116. P. 1309–1318.
141. Karlin A. On the application of “a plausible model” of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. // *J. Theor. Biol.* 1967. Vol. 16. P. 306–320.