

ОСТРОУМОВА

Ольга Сергеевна

**РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ДИПОЛЬНЫХ МОДИФИКАТОРОВ
МЕМБРАН НА ИОННЫЕ КАНАЛЫ, ОБРАЗУЕМЫЕ
АНТИМИКРОБНЫМИ АГЕНТАМИ И ТОКСИНАМИ В ЛИПИДНЫХ
БИСЛОЯХ**

03.01.03 – Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

**Санкт-Петербург
2016**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Денис Борисович Тихонов
заведующий Лабораторией биофизики
синаптических процессов Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор
Зоя Иринарховна Крутецкая
заведующая кафедрой биофизики Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального
образования «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург

доктор физико-математических наук
Юрий Александрович Ермаков
ведущий научный сотрудник лаборатории
биоэлектрохимии Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
физической химии и электрохимии им.
А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва

Защита состоится «10» июня 2016 года в 13.00 ч на заседании Диссертационного совета
Д.002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург,
Тихорецкий пр., д. 4

Сайт института: www.cytspb.rssi.ru

Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru

Факс института (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте
института <http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Первичной мишенью действия лекарственных и токсических веществ на клетку является плазматическая мембрана. Во многих случаях взаимодействие экзогенного соединения с клеточной мембраной приводит к формированию в ней ион-проницаемых дефектов – ионных каналов. Выявление механизмов регуляции образуемых лекарственными и токсическими агентами каналов является одной из ключевых проблем молекулярной биологии и фармакологии. Поскольку взаимодействие каналообразующих агентов с липидным матриксом определяет специфичность их действия на клетки-мишени и, следовательно, терапевтическую и токсическую активность, особое значение приобретают регуляторные пути, опосредованные липидами мембраны. Об этом свидетельствуют и появившиеся в последние десятилетия данные об увеличении эффективности действия липосомных форм лекарственных препаратов при одновременном снижении их токсичности. Несмотря на значительные успехи, целостное представление об участии липидов мембраны в функционировании ионных каналов, образованных экзогенными для клетки соединениями, в литературе пока не сложилось. Во многом причиной такого положения дел является тот факт, что некоторым физико-химическим факторам, способным влиять на функционирование ионных каналов, долгое время не уделялось должного внимания. Прежде всего, речь идет о дипольной компоненте граничного потенциала мембраны.

Дело в том, что распределение электрического поля на границе мембраны таково, что, независимо от липидного состава, углеводородный остов мембраны оказывается положительным по отношению к объему водной фазы. Это является результатом существования не экранируемого ионами раствора скачка потенциала, обусловленного ориентацией диполей молекул липидов и молекул воды на границе раздела фаз и называемого дипольным потенциалом мембраны. Его роль в регуляции различных мембранных процессов, в том числе функционирования ионных каналов, до сих пор не достаточно изучена.

Ряд биологически активных низкомолекулярных соединений, называемых дипольными модификаторами, способен при их связывании с липидным бислоем менять величину дипольного потенциала и, тем самым, влиять на работу ионных каналов. Последнее делает чрезвычайно актуальной задачу поиска новых дипольных модификаторов и выработки принципов их систематизации по функциональной активности. Наибольший интерес в этом отношении представляют полифенолы растительного происхождения – флавоноиды. Перспективы их изучения обусловлены большим структурным разнообразием (идентифицировано несколько тысяч соединений), малой токсичностью и широким спектром биологического действия.

К настоящему моменту в литературе накопилось достаточное количество сведений о том, что регуляторная роль дипольных модификаторов не ограничивается модуляцией дипольного потенциала мембраны. Встраивание дипольных модификаторов может сопровождаться изменением не только электрических, но и механических свойств мембраны, в частности латеральной компоненты давления. Ее изменения могут существенно сказываться на конформационном равновесии встроенных в бислой порообразующих агентов. Одним из ключевых вопросов, нуждающихся в изучении, является определение влияния дипольных модификаторов на фазовое состояние мембраны. Воздействие дипольных модификаторов на ионные каналы может быть обусловлено изменением распределения каналообразующих агентов между липидными доменами с различными структурными и динамическими свойствами.

Огромный регуляторный потенциал дипольных модификаторов открывает широкие возможности их применения для исследования липидопосредованной модуляции ионных каналов и разработки принципов управления процессами порообразования в мембранах. Исследование механизмов регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами, актуально как в плане получения фундаментальных знаний о молекулярных механизмах функционирования ионных каналов, так и в связи с возможностью применения дипольных модификаторов для создания новых антимикробных препаратов. Наибольший интерес представляют возможные проявления синергизма в действии антимикробных соединений и малотоксичных дипольных модификаторов.

Ни одно исследование не может быть выполнено без привлечения адекватных и высокоинформативных методов. Существенной особенностью успешного подхода к изучению действия дипольных модификаторов на ионные каналы видится применение искусственных моделей клеточных мембран. Использование в качестве модельных мембран плоских липидных бислоев и моноламеллярных везикул открывает огромные возможности для исследования различных свойств мембран, прежде всего обусловленных именно липидным матриксом. Важные вопросы, на которые могут ответить модельные липидные мембраны, связаны с пространственным распределением мембраноассоциированных соединений, их действием на липидные домены, а также липидопосредованным влиянием на свойства и, следовательно, на функции встроенных в мембрану ионных каналов. К главным преимуществам подобных моделей следует отнести возможность варьирования условий эксперимента в широком диапазоне, что не всегда представляется доступным при работе с клеточными мембранами.

В соответствии с актуальностью обозначенной научной проблемы диссертационная работа направлена на систематическое исследование механизмов влияния дипольных модификаторов мембран на ионные каналы, формируемые антимикробными агентами и токсинами в модельных липидных мембранах.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось установление закономерностей и механизмов регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, образуемых экзогенными соединениями различной химической природы в модельных липидных мембранах.

Для достижения цели были поставлены следующие основные задачи:

1. Расширить круг дипольных модификаторов мембран, раскрыть структурно-функциональные связи, определяющие вызванные дипольными модификаторами изменения физико-химических характеристик липидного бислоя, включая его дипольный потенциал и фазовое состояние.

2. Установить факторы, ответственные за модулирование активности ионных каналов, формируемых различными антимикробными агентами и токсинами в модельных липидных мембранах, при введении дипольных модификаторов. Проанализировать возможности использования дипольных модификаторов мембран для изучения механизмов липидопосредованной регуляции каналов.

3. Исследовать механизмы активации и инактивации каналов, образованных антимикробными агентами, связанные с изменением дипольного потенциала на границах липидных бислоев, и разработать соответствующие теоретические модели.

4. Проанализировать особенности функционирования ионных каналов, образованных антимикробными агентами в мембранах, подверженных фазовому разделению, и проверить гипотезу о латеральной неоднородности дипольного потенциала.

5. Изучить гипотетическую возможность специфического взаимодействия между дипольными модификаторами мембран и каналообразующими агентами, идентифицировать вероятные сайты связывания.

6. Выявить общие закономерности регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, формируемых экзогенными соединениями различной химической природы, определить основные принципы управления ионными каналами с помощью дипольных модификаторов мембран.

7. Используя модельные системы, проанализировать возможности совместного применения антимикробных соединений и дипольных модификаторов в фармацевтических целях.

Научная новизна. Работа представляет собой углубленное комплексное исследование механизмов регуляции ионных каналов, образуемых различными классами экзогенных соединений, выполненное с применением оригинального методического приема – использования дипольных модификаторов в качестве фактора, инициирующего изменения физико-химических характеристик модельных липидных мембран.

Среди полифенолов растительного происхождения обнаружены и охарактеризованы новые дипольные модификаторы мембран, относящиеся к флавонолам и изофлавонам. Проведен детальный анализ связей между структурой модифицирующих агентов и изменениями дипольного потенциала и фазового состояния липидных бислоев. Показано, что величина уменьшения дипольного потенциала мембраны в присутствии флавоноидов определяется числом и расположением гидрофильных заместителей, а также конформацией молекул. Обнаружена взаимосвязь изменений дипольного потенциала и разупорядочивающего действия модификаторов на мембраны. Предложены гипотезы относительно механизмов изменения дипольного потенциала мембран в присутствии флавоноидов: посредством интеркаляции в бислой и изменения состояния гидратации мембранных липидов. Впервые показано, что флавоноиды способны индуцировать полиморфный фазовый переход липидов.

Получены приоритетные результаты, раскрывающие опосредованные липидным окружением механизмы регуляции ионных каналов, образованных различными антимикробными агентами. Впервые продемонстрирована ключевая роль дипольного потенциала мембран в функционировании каналов, формируемых липопептидами. Получены первые экспериментальные свидетельства модуляции кооперативности функционирования и воротных свойств каналов при изменении дипольного потенциала мембран. Установлено сходство механизмов влияния дипольного потенциала на активность пептидов и липопептидов, которые включают модификацию заряд-дипольных и диполь-дипольных взаимодействий между порообразующими соединениями и липидным бислоем.

Сформулирована и проверена гипотеза, связывающая особенности функционирования ионных каналов в мембранах, подверженных латеральной сегрегации компонентов, с различием физико-химических свойств упорядоченных и неупорядоченных липидных доменов, в том числе, скачка дипольного потенциала на их границах с внешней средой.

Показано, что изменение структурных характеристик бислоя при введении дипольных модификаторов либо при включении липидов, склонных к образованию неламеллярных структур, влияет на порообразующую способность антимикробных соединений благодаря стабилизации микроокружением открытого или закрытого состояния канала.

Впервые обнаружено специфическое взаимодействие дипольных модификаторов с ионными каналами, образуемыми токсинами. Электростатическое взаимодействие флоретина с бета-амилоидными пептидами приводит к изменению их агрегационной и каналобразующей способности. Установлено, что 5-, 7- и 4'-гидроксилированные флавоноиды увеличивают потенциал-чувствительность альфа-гемолизинной поры при связывании с ней в стехиометрическом соотношении 3 к 1.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа имеет как фундаментальное, так и практическое значение. Полученные на модельных системах результаты и сделанные на их основе выводы имеют принципиальное значение для понимания путей регуляции мембранного транспорта посредством ионных каналов, расширяя представления о роли физико-химических свойств липидного бислоя в процессах порообразования экзогенными соединениями. Создана теоретическая и экспериментальная база для исследования в дальнейшем липидопосредованной регуляции нативных каналов клеточных мембран. Обнаруженный синергизм действия некоторых антимикробных агентов и дипольных модификаторов представляет интерес для современной фармакологии. Полученные данные могут быть применены для повышения эффективности лекарственных препаратов, включая их липосомные формы.

Результаты работы могут быть включены в курсы лекций по молекулярной биологии, биофизике и мембранологии для студентов ВУЗов биологического и медицинского профилей и, в частности, использовались при чтении курса лекций по современным проблемам биофизики для студентов Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, а в настоящее время используются при чтении курса лекций по электрохимии мембран для студентов Института химии Санкт-Петербургского государственного университета.

Методология и методы исследования. Для выполнения экспериментальных исследований использованы модельные липидные мембраны, плоские липидные бислои и моноламеллярные липосомы. Применение известной техники регистрации токов, протекающих через плоские липидные бислои в присутствии ионофоров, позволило оценить эмпирические параметры, характеризующие изменения в распределении электрического поля на границах мембран и тем самым качественно и количественно охарактеризовать изменение дипольной компоненты граничного потенциала при введении дипольных модификаторов. Для изучения функционирования одиночных ионных каналов, формируемых различными антимикробными соединениями и токсинами, использованы методы их инкорпорирования в плоские липидные бислои и проведены измерения токов проводимости при фиксации трансмембранного напряжения. Для описания фазовых превращений в мембранах под действием дипольных модификаторов применен комплексный подход: фазовое состояние моноламеллярных липосом охарактеризовано методами дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и конфокальной флуоресцентной микроскопии. Проведена флуориметрия индуцированной дипольными модификаторами утечки флуорофора из липидных везикул.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Дипольные модификаторы мембран служат эффективными инструментами изучения механизмов функционирования ионных каналов, образованных антимикробными агентами и токсинами в модельных липидных мембранах, позволяя установить регуляторную роль дипольного потенциала, геометрических характеристик мембранообразующих молекул и характера фазовой сегрегации в бислое.

2. В качестве дипольных модификаторов мембран могут быть использованы флавонолы и изофлавоны. Дипольные модификаторы мембран флавонолового типа обладают улучшенными характеристиками по сравнению с модификаторами халконового и изофлавонового типа, поскольку флавонолы в значительной мере снижают дипольный потенциал мембраны, но, в отличие от халконов и изофлавонов, не влияют на характер фазового разделения в мембране.

3. Дипольный потенциал мембраны играет существенную роль в регуляции функционирования ионных каналов, образованных антимикробными липопептидами, синрингомицином E и сурфактином, а также пептидами, цекропинами A и B, модулируя заряд-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия между порообразующими соединениями и липидным бислоем.

4. Изменение соотношения объемов гидрофильной и гидрофобной областей мембраны при взаимодействии с дипольными модификаторами является одним из путей регуляции ионных каналов, характеризующихся различием геометрических характеристик в закрытом и открытом состояниях. В частности, таким образом модулируется активность каналов, формируемых противогрибковым липопептидом синрингомицином E и полиеновыми макролидными антибиотиками.

5. Эффекты дипольных модификаторов не всегда опосредованы липидным матриксом. Электростатическое связывание флоретина с фрагментом 25-35 бета-амилоида приводит к увеличению его каналобразующей активности. Флавоноиды, гидроксированные в 5- и 7-положениях A-цикла, а также в 4'-положении B-цикла, увеличивают потенциал-чувствительность закрывания одиночной альфа-гемолизинной поры при взаимодействии с ее сенсором напряжения.

Достоверность полученных результатов. Все использованные в работе приборы проходили плановую поверку, реагенты были сертифицированными продуктами известных фирм, оценка достоверности полученных результатов проведена с использованием соответствующих методов статистической обработки данных.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе, на научной конференции «Ионные каналы: структура и функции» (Санкт-Петербург, 2009), I Международной конференции по антимикробным исследованиям (Вальядолид, 2010), Международном Фрумкинском симпозиуме (Москва, 2010), II и III конференциях молодых ученых ИНЦ РАН (Санкт-Петербург, 2010, 2012), Международной конференции «Новые

информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, 2011), 17 Международном биофизическом конгрессе (Пекин, 2011), III Съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012), 37 и 38 конгрессах Европейского биохимического общества (Севилья, 2012; Санкт-Петербург, 2013), конференции Европейского биофизического общества (Лиссабон, 2013), II Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2015). Материалы докладывались на научных семинарах Института цитологии РАН и Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 27 статей в ведущих отечественных (9 статей) и международных (18 статей) журналах, 1 обзор в журнале «International Review of Cell and Molecular Biology», 1 монография в тематическом выпуске «Advances in planar lipid bilayers and liposomes», 1 учебное пособие для студентов ВУЗов, а также 55 работ в сборниках трудов конференций.

Финансовая поддержка работы. Работа проводилась при частичной финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (государственный контракт № П1372, соглашение № 8119), Президента РФ (грант МК-1813.2012.4), Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№12-04-31332, 12-04-33121, 15-34-20356), Российского научного фонда (грант № 14-14-00565). Автор является лауреатом премии Правительства Санкт-Петербурга за выдающиеся научные результаты в области науки и техники для молодых ученых в номинации естественные и технические науки (премия имени Л. Эйлера) (2012 г.), премии Европейской академии для молодых ученых России (2013 г.) и национальной премии Л'Ореаль-Юнеско «Для женщин в науке» (2014 г.).

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных и теоретических исследований. Основные результаты работы получены лично автором или под его непосредственным руководством. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения; 3 глав, посвященных обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, а также изложению результатов и их обсуждению; заключения; выводов; и списка литературы, содержащего 476 наименований. Работа изложена на 286 страницах и иллюстрирована 128 рисунками и 35 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулирована его цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, дана краткая характеристика методов исследования, приводятся основные положения, выдвигаемые на защиту, дана оценка достоверности полученных результатов и личного вклада автора в их получение.

Глава 1. Обзор литературы. В этой главе представлен критический анализ литературных данных о влиянии модификации физико-химических свойств липидного бислоя на транспорт ионов через ионные каналы, приведены сведения о дипольных модификаторах мембран и механизмах их действия на мембраны, дана краткая характеристика объектов исследования, тестируемых в работе порообразующих соединений. В результате проведенного анализа сформулированы современные представления о липидопосредованной регуляции ионных каналов, образуемых экзогенными для клетки соединениями, выявлены существующие проблемы, рассмотренные в разделе «Актуальность темы», а также намечены пути их решения.

Глава 2. Экспериментальная часть. В настоящем разделе перечислены использованные в экспериментах материалы и описаны основные методы исследования.

2.1. Материалы. В работе использовали липиды производства компаний «Avanti Polar Lipids» и «Sigma» (США); во всех случаях, кроме специально оговоренных, каналобразующие агенты были производства «Sigma». Сирингомицин Е был предоставлен проф. Д. Такемото (Utah State University, США), амилоидоподобные белки нейронального происхождения BASP1 и GAP-43 и их фрагменты – В.В. Захаровым (ПИЯФ, Санкт-Петербург, Россия). В работе использовали дипольные модификаторы мембран производства компаний «Sigma» и «Molecular Probes» (США).

2.2. Реконструкция ионных каналов в плоские липидные бислои и регистрация токов проводимости. Плоские липидные бислои формировали из конденсированных липидных монослоев путем их сведения на отверстия в тефлоновой пленке, отделяющей два водных отсека (*цис*- и *транс*-) экспериментальной ячейки друг от друга [1]. Каналоформеры добавляли в *цис*- (одностороннее введение) или в оба отсека экспериментальной ячейки (двустороннее введение). Измерение токов проводимости выполняли в режиме фиксации трансмембранного напряжения (V). Подачу V и отведение сигнала с мембраны осуществляли с помощью хлор-серебряных электродов (Ag/AgCl). Трансмембранное напряжение, вызывающее поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры, считали положительным. Регистрацию токов проводили с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A («Axon Instruments», США) при частотах дискретизации и фильтрации, равных $2 \div 5$ и 1 кГц, соответственно. Для обработки записей токов использовали программный пакет Clampfit 9.0 («Axon Instruments», США). Статистический анализ полученных данных проводили с помощью Origin 8.0 («OriginLab», США). Электрические измерения выполняли при комнатной температуре. Результаты нескольких независимых экспериментов (не менее трех) представляли в виде: среднее $\pm$ SD. Для построения гистограмм флуктуаций тока вычисляли приведенные к ширине столбца гистограмм частоты. Аппроксимацию пиков проводили плотностью распределения Гаусса. Среднее нормированное число синхронно функционирующих каналов (m) определяли как сумму произведений порядковых номеров пиков на гистограмме на площади под пиками. Средний нормированный ток,

протекающий через одиночные каналы (i_{sc}), рассчитывали как сумму произведений средних токов, характеризующих разные подуровни проводимости, на вероятности их появления. Для построения гистограмм времен жизни каналов вычисляли относительные частоты. Полученное распределение аппроксимировали плотностью показательного распределения с параметром, равным среднему времени жизни канала (τ_{on}). Проверку гипотез о законах распределения проводили с помощью критерия χ^2 ($P < 0.05$). Стационарное число функционирующих в мембране каналов (N_{op}) определяли как отношение равновесного интегрального трансмембранного тока (I_{∞}) к току, протекающему через одиночный канал (i). Эффективный «воротный» заряд каналов (q) и параметр (A), характеризующий коэффициент распределения порообразующего агента между мембраной и водной фазой, находили путем линеаризации зависимости $\ln N_{op}(eV/kT)$ как тангенс угла наклона прямой и отсекаемый по оси ординат отрезок (e – модуль заряда электрона, k – постоянная Больцмана, T – термодинамическая температура). Для сравнения величин при введении различных модификаторов определяли средние значения $q(\varphi_d)$ и $A(\varphi_{d1}) - A(\varphi_{d2})$, погрешность установления которых не превышала 20 %. Для характеристики изменения каналообразующей активности использовали среднее отношение стационарных макроскопических трансмембранных токов (I_{∞}/I_{∞}^0) или пороговых концентраций порообразующего агента после и до введения дипольных модификаторов в омывающие мембраны растворы.

2.3. Определение изменений дипольного потенциала бислоев. Изменение дипольного потенциала мембраны ($\Delta\varphi_d$) при введении модификаторов определяли как $G_m / G_m^0 = \exp(e\Delta\varphi_d / kT)$, где G_m^0 и G_m – значения стационарной K^+ -проводимости бислоя, индуцированной нонактином или валиномицином, до и после введения модификатора [2]. Для описания адсорбции флавоноидов и тиреоидных гормонов на поверхности липидных бислоев применяли выражение $\Delta\varphi_d(C) = \Delta\varphi_d(\infty)C / (C + K)$, где $\Delta\varphi_d(\infty)$ – изменение дипольного потенциала, соответствующее насыщению, C и K – концентрация и константа десорбции модификатора, соответственно [3]. Для описания адсорбции стирилпиридиновых красителей использовали линейную модель [4].

2.4. Конфокальная флуоресцентная микроскопия липосом. Гигантские моноламеллярные липосомы формировали в электрическом поле с использованием прибора «Nanion vesicle prep pro» («Nanion», Германия). Визуализацию фазового разделения липосомных мембран проводили путём введения флуоресцентного зонда, 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-(лиззамин родамин) (ЛР-ДПФЭ). Липосомы наблюдали с помощью конфокального микроскопа «Leica TCS SP5» через иммерсионный объектив 100×/1.4 HCX PL APO («Leica Microsystems», Германия) при комнатной температуре. Свечение флуоресцентного зонда регистрировали при длине волны возбуждения 543 нм (гелий-неоновый лазер). Дискриминацию упорядоченных фаз проводили на основании морфологии неокрашенных ЛР-ДПФЭ доменов [5,6]:

домены круглой формы относили к жидкой упорядоченной фазе (l_o), а нерегулярной дендритической или звездообразной формы – к гель-фазе (s_o). Окрашенные ЛР-ДПФЭ области считали пребывающими в жидком неупорядоченном состоянии (l_d).

2.5. Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия моноламеллярных везикул. Термограммы липосомных суспензий получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра μ DSC7 («Setaram», Франция). Скорость сканирования составляла 0.2 К/мин. Воспроизводимость температурной зависимости теплоемкости достигалась посредством повторного нагревания образца сразу после охлаждения. Анализ сканов проводили с использованием программы Calisto («Setaram», Франция). Пики на термограммах характеризовали температурой максимума (T_m) и шириной соответствующего пика на полувысоте ($T_{1/2}$), отвечающей кооперативности главного фазового перехода.

2.6. Флуориметрия утечки кальцеина из липосом. Моноламеллярные везикулы диаметром 100 нм получали методом экструзии с использованием мини-экструдера («Avanti Polar Lipids», США). Кальцеин, находящийся внутри липосом в концентрации 35 мМ, испытывал самотушение. Флуорофор, не захваченный липосомами, удаляли с помощью гель-фильтрации. Интенсивность флуоресценции высвобожденного из липосом кальцеина измеряли с помощью спектрофлуориметра «Флюорат Панорама-02» (при длине волны возбуждения 490 нм, эмиссии 520 нм). Величину утечки (R , %) определяли по формуле $R = [(I - I_0)/(I_{\max}/0.9 - I_0)] \cdot 100\%$, где I и I_0 – интенсивности флуоресценции образца в присутствии и в отсутствие мембраноактивного соединения, $I_{\max}$ – интенсивность флуоресценции образца после обработки тритоном X-100 [7].

Глава 3. Основные результаты и их обсуждение. Стартовым моментом в исследованиях было изучение влияния дипольных модификаторов на различные физико-химические свойства модельных мембран (3.1). На следующем этапе работы было предпринято детальное изучение молекулярных механизмов регуляции дипольными модификаторами ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами (3.2). Далее полученные результаты обобщались с целью выявления общих закономерностей липидопосредованной регуляции формирования и функционирования ионных каналов и отражены в заключительной части раздела (3.3).

3.1. Характеристика изменений физико-химических свойств липидных бислоев при адсорбции дипольных модификаторов мембран. Анализ структурно-функциональных связей. В подглаве приводятся результаты изучения действия дипольных модификаторов мембран на дипольную компоненту граничного потенциала (3.1.1), фазовое разделение в модельных мембранах (3.1.2) и проницаемость липосом для флуоресцентного маркера, кальцеина (3.1.3).

3.1.1. Дипольный потенциал липидных бислоев [10а, 14а, 15а, 17а, 19а, 24а, 25а]. В этом параграфе приведены количественные характеристики влияния дипольных

модификаторов, относящихся к флавоноидам, стирилпиридиновым красителям и тиреоидным гормонам, на дипольный потенциал (φ_d) фосфолипидных, стероидных и сфинголипидсодержащих мембран. Большая часть результатов получена методом регистрации индуцированной ионафорами проводимости плоских липидных бислоев [2]. На основании сравнения структур родственных соединений и их способности влиять на дипольный потенциал мембран выявлены особенности молекул модификаторов, ответственные за изменение φ_d при их адсорбции.

3.1.1.1. Действие флавоноидов на дипольный потенциал мембран различного состава. Согласно современным представлениям, многие биологические эффекты флавоноидов обусловлены их взаимодействием с клеточными мембранами [8]. Поскольку эти соединения характеризуются значительным дипольным моментом [9,10], есть основания полагать, что наиболее общим свойством для флавоноидов является их влияние на распределение электрического поля на границах мембран. В биохимии флавоноидов хорошо документирована способность флоретина уменьшать дипольный потенциал мембраны [2,3], в то время как работ, посвященных исследованию эффектов других соединений флавоноидного типа, практически нет. До недавнего времени некоторые исследователи были склонны связывать диполь-модифицирующие свойства флоретина с открытостью трехуглеродного фрагмента, соединяющего ароматические кольца, что определяет уникальную способность его молекулы принимать конформацию «скрепки» при образовании водородных связей с липидами мембраны [11]. На этом основании предполагалось, что другие флавоноиды на φ_d не влияют. Это определило целесообразность исследования эффектов флавоноидов, в молекулах которых пропановый фрагмент входит в состав гетероцикла. Для решения поставленной задачи в работе было предпринято сравнительное исследование диполь-модифицирующего действия флавоноидов, относящихся к различным структурным классам: халконы (флоретин и флорицин), флавонолы (кверцетин, мирицетин и рутин), флаванолы (таксифолин), изофлавоны (генистеин, биоханин А, генистин и даидзеин), флаван-3-олы (катехин), а также короткие полифенолы, содержащие только один ароматический цикл (2',4',6'-тригидрокси-ацетофенон (ТГАФ)). Структуры флавоноидов показаны на рис. 1.

На рис. 2 (А) показана кинетика изменения трансмембранного тока, индуцированного комплексом K^+ -нонактин, с увеличением концентрации флоретина в околосмембранном растворе. Видно, что в диапазоне концентраций модификатора до 50 мкМ трансмембранный ток растет, а при концентрациях более 60 мкМ достигает насыщения. Наблюдаемый рост проводимости мембраны обусловлен падением ее дипольного потенциала, вызванным адсорбцией молекул флоретина [2]. Насыщение токов, вероятно, связано с заполнением всех центров связывания для молекул флавоноида на мембране.

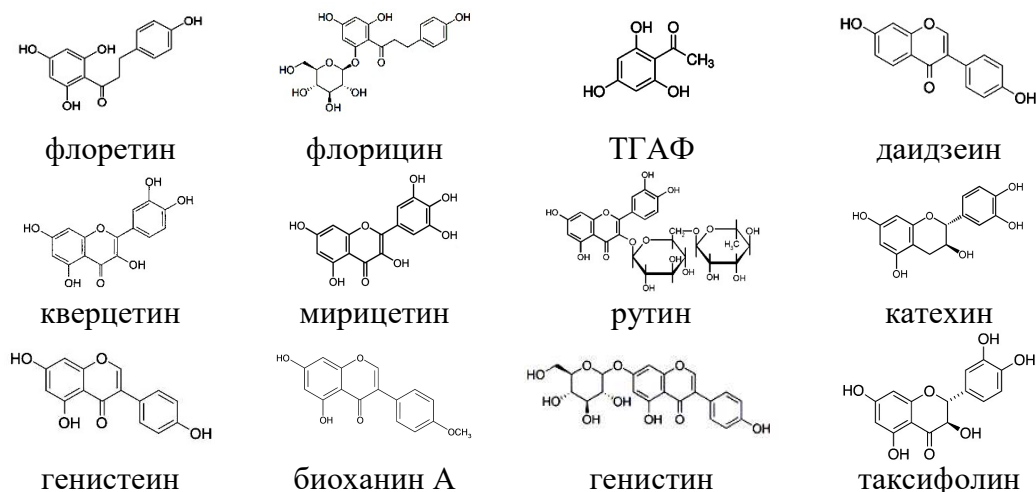


Рис. 1. Химическая структура тестируемых флавоноидов.

Пренебрегая вкладом факторов неэлектростатического происхождения в величину энергетического барьера для проникающих через мембрану ионов, на основании полученных данных можно оценить изменение дипольного потенциала мембраны и представить полученные результаты в виде зависимости уменьшения дипольного потенциала мембран ($-\Delta\varphi_d$) от концентрации флоретина (C) в омывающих их растворах (рис. 2, Б).

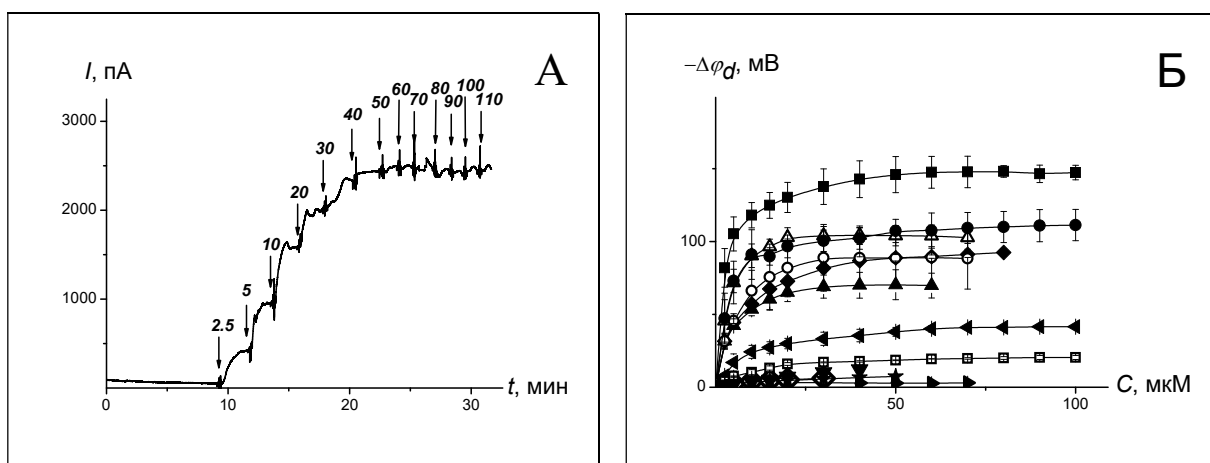


Рис. 2. (А) – Изменение K^+ -нонактин-индуцированного стационарного трансмембранного тока после введения в омывающие растворы флоретина. Моменты добавки указаны стрелками, над которыми приведены соответствующие концентрации модификатора. (Б) – Зависимость уменьшения дипольного потенциала мембраны ($-\Delta\varphi_d$) от концентрации в омывающем растворе (C) флоретина (■), флорицина (◆), кверцетина (Δ), мирицетина (●), рутина (◄), генистеина (▲), биоханина А (○), генистина (◇), даидзеина (□), катехина (►), таксифолина (★) и ТГАФ (▼). Мембраны изготовлены из дифитаноилфосфохолина (ДФФХ) и омываются 0.1 М раствором KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Согласно [3,12] адсорбция флоретина и его аналогов на мембране в первом приближении может быть описана выражением, близким по форме к изотерме адсорбции Ленгмюра. В этом случае в качестве характеристических параметров изотермы выступают изменение дипольного потенциала мембраны, соответствующее

насыщению ($-\Delta\varphi_d(\infty)$), и константа десорбции модификатора (K), отражающая его сродство к липидной фазе. Сопоставление указанных характеристик позволяет провести сравнение диполь-модифицирующей способности различных флавоноидов. На рис. 2 (Б) показаны зависимости $-\Delta\varphi_d(C)$ для всех тестируемых флавоноидов. Видно, что не только халконы (флоретин и флорицин), но и флавонолы (кверцетин и мирицетин), а также некоторые изофлавоны (биоханин А и генистеин) в значительной мере уменьшают φ_d . Меньшую активность проявляет рутин. Даидзеин обладает очень слабыми диполь-модифицирующими свойствами. Генистин, катехин, таксифолин и ТГАФ не уменьшают φ_d .

Сопоставление полученных результатов и структур тестируемых агентов (рис. 1) позволяет сделать вывод о связи рассматриваемых эффектов флавоноидов с гидрофобностью их молекул. Как правило, введение более гидрофобного халкона (флоретина по сравнению с флорицином), флавонола (кверцетина по сравнению с рутином) или изофлавона (гидрофобность убывает в ряду биоханин А, генистеин и генистин) вызывает большее изменение дипольного потенциала. Логично предположить, что причиной является различие в глубине погружения флавоноидов в мембрану. При этом существенна не только общая гидрофобность молекул, зависящая от числа гидрофильных заместителей, но их расположение в молекулах. Действительно, имеющий всего две гидроксильные группы изофлавоон даидзеин мало влияет на величину φ_d . Наиболее вероятно, что в отличие от биоханина А, две гидроксильные группы которого расположены поблизости и способны образовывать внутримолекулярную водородную связь, обеспечивая возможность интеркаляции этого изофлавоона в мембрану, достаточно удаленные друг от друга гидрофильные заместители в молекуле даидзеина препятствуют его погружению в бислой. Существенным моментом также является тип связи между атомами C_2 и C_3 . Присутствие двойной связи между этими атомами в молекулах кверцетина, мирицетина и рутина обуславливает компланарность бензольных колец и выраженное влияние указанных соединений на φ_d . Наличие одинарной связи в молекулах таксифолина и катехина приводит к нарушению компланарности и является причиной отсутствия диполь-модифицирующих свойств у этих флавоноидов.

Учитывая обнаруженную корреляцию между эффектами флавоноидов и их гидрофобностью, кажется странным, что высоко гидроксированные флавонолы обладают сходной с относительно гидрофобными флоретином, биоханином А и генистеином способностью уменьшать дипольный потенциал мембраны. Полученные данные указывают на различие механизмов действия этих соединений на скачок потенциала на границе мембраны. Благодаря плоской конформации и большому числу гидроксильных групп флавонолы могут взаимодействовать с «головками» сразу нескольких соседних фосфолипидов [13] и, вероятно, влиять на φ_d посредством изменения состояния ее гидратации. Более гидрофобные халконы и изофлавоны

интеркалируют в полярную область мембраны [3]. Можно полагать, что ориентация дипольных моментов их молекул оказывается таковой, что величина положительного потенциала внутри углеводородного остова мембраны падает. Подтверждением действенности предложенного сценария являются результаты измерения уменьшения дипольного потенциала мембран различного состава при адсорбции флавоноидов. Полученные данные указывают на зависимость эффекта флавонолов от исходного состояния гидратации фосфолипидных бислоев, а также выявляют связь диполь-модифицирующей способности халконов и изофлавонов с механическими свойствами мембран, определяемыми их стеринным и сфинголипидным составом, что хорошо согласуется с предположением о различии механизмов действия флавоноидов на φ_d .

3.1.1.2. Влияние стирилпиридиновых красителей на дипольный потенциал мембран. Для изучения роли скачка потенциала на границах мембран в функционировании ионных каналов, образуемых экзогенными соединениями, были необходимы и такие модификаторы, дипольный момент которых при встраивании в бислой приводил бы к изменению дипольного потенциала противоположного знака по сравнению с флавоноидами. Из литературы известно, что подобными свойствами обладают стирилпиридиновые красители серии RH. Их влияние на фосфолипидные мембраны достаточно полно охарактеризовано в [4]. В настоящей работе дана количественная характеристика их действия на липидные бислои, включающие стерин и сфинголипиды.

3.1.1.3. Диполь-модифицирующая способность гормонов щитовидной железы. Ранее отмечалось, что плоскость адсорбции флавоноидов ограничивается полярной областью мембраны. В связи с принципиальной возможностью влияния дипольных модификаторов на распределение латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности бислоя интерес представляют модификаторы, способные, как и флавоноиды, уменьшать φ_d , но погружающиеся в бислой на большую глубину. Предъявляемым требованиям соответствуют тиреоидные гормоны [14-16]. В настоящей работе определены количественные характеристики влияния тироксина и трийодтиронина на дипольный потенциал различных фосфолипидных бислоев.

3.1.2. Фазовое разделение в липидном бислое [16а, 25а, 27а]. В параграфе систематизированы полученные данные о влиянии дипольных модификаторов мембран на фазовое разделение в липидном бислое.

3.1.2.1. Флуоресцентная конфокальная микроскопия липосом, сформированных из бинарных смесей липидов с низкой и высокой температурой плавления в присутствии флавоноидов. Индукция полиморфного фазового перехода. Погружение дипольных модификаторов мембран в липидный бислой может сопровождаться изменением не только его электрических, но и механических свойств. Об этом свидетельствует обнаруженная несколькими группами исследователей способность флоретина, помимо снижения φ_d , также влиять на плавление ацильных цепей мембранных липидов [3,11,17].

В этой связи было высказано предположение о том, что подобным свойством обладают и другие флавоноиды, уменьшающие φ_d посредством интеркаляции своих диполей в бислой. При этом возникал вопрос о том, изменяются ли механические свойства мембраны при адсорбции флавоноидов, воздействующих на граничный скачок потенциала за счет изменения состояния гидратации мембранных липидов. Это определило необходимость изучения влияния флавоноидов на латеральную организацию модельных липидных мембран. С использованием флуоресцентной конфокальной микроскопии гигантских моноламеллярных липосом, изготовленных из бинарных смесей липидов с низкой (диолеилфосфохолин, ДОФХ) и высокой (сфингомиелин, СМ) температурой плавления, в работе изучены перестройки доменной структуры мембран под действием флавоноидов. На рис. 3 представлены диаграммы распределения везикул, характеризующихся определенным типом фазового разделения, до и после введения флавоноидов в липосомную суспензию.

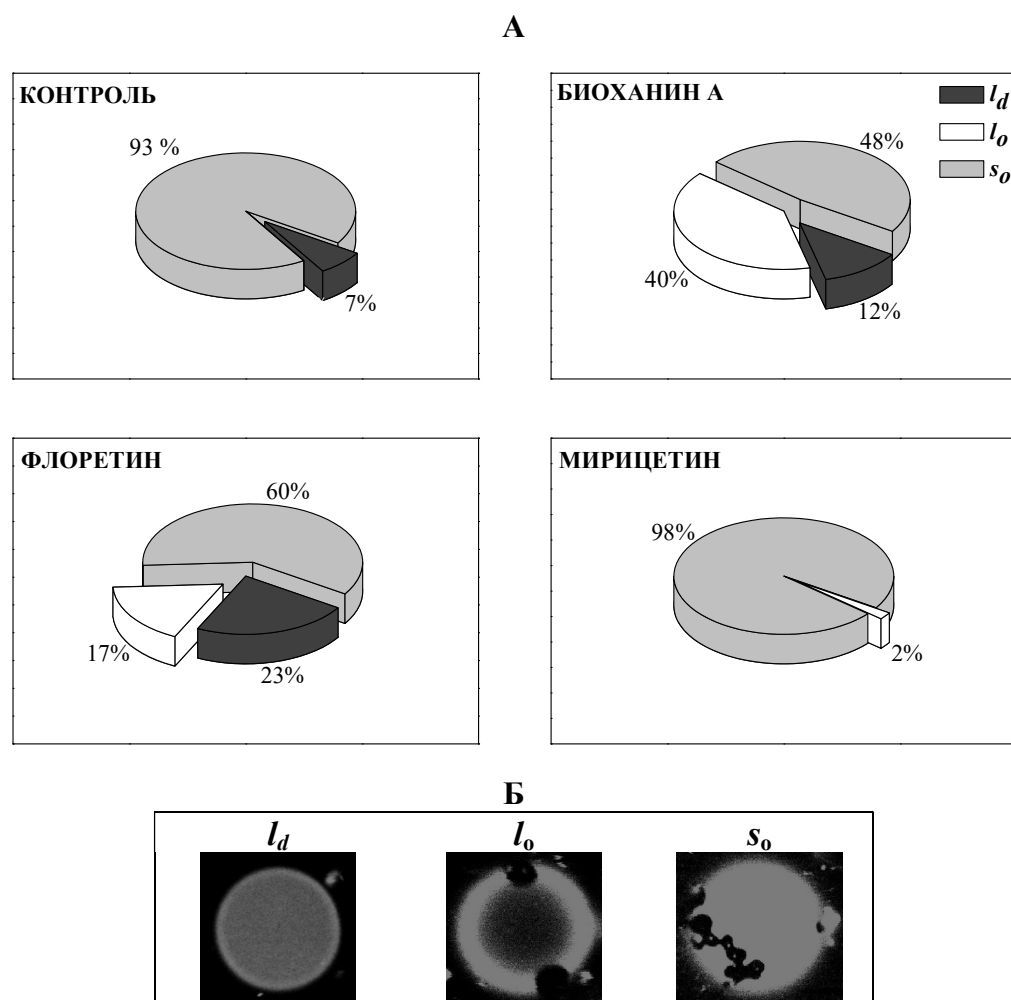


Рис. 3. (А) – Процентное соотношение везикул с разным типом фазового разделения в отсутствие (контроль) и в присутствии 400 мкМ биоханина А, флоретина или мирицетина в липосомной суспензии. (Б) – Примеры микрофотографий гигантских моноламеллярных липосом после введения биоханина А. Размер изображений составляет 26×26 мкм. Везикулы сформированы из смеси ДОФХ:СМ (80:20 мол%).

Как видно на рис. 3, в отсутствие каких-либо модификаторов около 90 % липосом из ДОФХ:СМ (80:20 мол%) содержат твердокристаллические (s_o) домены. Оставшиеся везикулы гомогенно окрашены ЛР-ДПФЭ, т.е. находятся в жидком неупорядоченном (l_d) состоянии. Липосом, включающих жидкие упорядоченные домены (l_o), не наблюдается. В присутствии биоханина А процент липосом, включающих s_o -домены, уменьшается приблизительно в 2 раза, при этом 40 % везикул содержат круглые неокрашенные домены, которые могут быть отнесены к l_o -подобному состоянию. Сходная ситуация наблюдается в присутствии флоретина. По всей вероятности, интеркаляция биоханина А и флоретина в полярную область мембраны приводит к уменьшению плотности упаковки липидных молекул и, соответственно, увеличению подвижности их углеводородных «хвостов». Это приводит к разрушению твердокристаллических доменов в мембране. Как видно на рис. 3, мирицетин мало влияет на фазовое поведение липидов в бислое, при этом он существенно тушит флуоресценцию ЛР-ДПФЭ. Последнее свидетельствует о колокализации гасителя с хромофором флуоресцентной метки, т.е. о малом погружении флавонола в бислой.

Несколько неожиданным результатом оказалось обнаружение в присутствии тестируемых флавоноидов в липосомной суспензии игольчатых или волокнистых структур, которые могут быть отнесены к небислойной фазе. Это может свидетельствовать об индукции флавоноидами полиморфного фазового перехода липидов из ламеллярной в гексагональную фазу. В подтверждение этого в присутствии флавоноидов на термограммах обнаруживается дополнительный пик с максимумом в области более высоких температур, который может быть отнесен к плавлению небислойной фазы [16a]. Известно, что такой переход инициируется дисбалансом между объемами, занимаемыми гидрофобными и гидрофильными областями мембраны [18]. Обращает на себя внимание тот факт, что глубина погружения флавоноидов в мембрану не имеет принципиального значения для инициации перехода. Он наблюдается в присутствии как флоретина и биоханина А, интеркалирующих в полярную область мембраны, так и мирицетина, адсорбирующегося вблизи поверхности бислоя. Полученные результаты указывают на возможность влияния этих флавоноидов на распределение латерального давления вдоль нормали к поверхности мембраны.

3.1.2.2. Флуоресцентная конфокальная микроскопия липосом, сформированных из тройных смесей липидов с низкой и высокой температурой плавления со стеринами в присутствии дипольных модификаторов. В подпараграфе приведены сведения относительно действия дипольных модификаторов на фазовую сегрегацию в липидных бислоях, имитирующих состав клеточных мембран. Показано, что эффекты дипольных модификаторов зависят от типа входящего в состав мембраны стерина и сфинголипида. Наблюдаемые различия отнесены к взаимодействию дипольных модификаторов с компонентами твердокристаллических доменов.

3.1.2.3. Влияние дипольных модификаторов мембран на температуру плавления насыщенных липидов. Для подтверждения способности дипольных модификаторов влиять на фазовую сегрегацию в бислое была применена дифференциальная сканирующая микрокалориметрия. Табл. 1 демонстрирует величины температур, соответствующих максимумам на термограммах (T_m), и значения ширины пиков на полувысоте, отвечающие кооперативности фазового перехода дипальмитоилфосфохолина (ДПФХ) ($T_{1/2}$), в отсутствие и при наличии различных дипольных модификаторов в липосомной суспензии. Видно, что даидзеин, таксифолин и катехин мало влияют на температуру и кооперативность плавления ДПФХ. Кверцетин несколько уменьшает T_m и увеличивает $T_{1/2}$. Наиболее выраженными эффектами обладают генистеин, флоретин и биоханин А: в их присутствии значительно падает температура и кооперативность плавления ДПФХ. Полученные результаты хорошо согласуются с данными флуоресцентной конфокальной микроскопии и позволяют связывать эффекты флавоноидов с глубиной их погружения в бислой.

Таблица 1. Температура главного фазового перехода ДПФХ (T_m) и ширина пика на полувысоте ($T_{1/2}$) в отсутствие и при наличии дипольных модификаторов.

Дипольный модификатор	Соотношение липид:модификатор	T_m , °C	$T_{1/2}$, °C
контроль	—	41.4	0.5
даидзеин	9:1	41.4	0.7
таксифолин		41.3	0.6
катехин		41.2	0.6
кверцетин		40.8	1.4
генистеин		40.3	1.7
флоретин		39.9	2.5
биоханин А		39.6	1.8
RH 421	42:1	41.1	1.5
триидтиронин	25:1	41.0	1.0
тироксин		41.4	1.0

Можно отметить, что влияние стирилпиридинового красителя RH 421 в указанной концентрации на фазовое поведение ДПФХ незначительно. Некоторое падение температуры и кооперативности перехода может быть связано с электростатическим отталкиванием сульфо-групп молекул красителя, встроенных в бислой. Это приводит к увеличению площади, приходящейся на одну липидную молекулу, и, как следствие, к относительному росту подвижности ацильных «хвостов» липидов.

В табл. 1 также видно, что тироксин не влияет на температуру плавления насыщенного фосфохолина, наблюдается лишь незначительное уменьшение кооперативности перехода. В отличие от тирокина, триидтиронин вызывает не только увеличение $T_{1/2}$, но и значимое снижение T_m . Полученные данные хорошо согласуются с результатами Иссе с соавторами [16], свидетельствующими о большей эффективности

взаимодействия триодтиронина с липидным бислоем по сравнению с тироксином. Возможной причиной является бо́льшая глубина погружения триодтиронина в гидрофобную область мембраны [15].

3.1.3. Проницаемость липидных бислоев для кальцеина [27a]. В параграфе систематизированы результаты исследования способности различных модификаторов мембран влиять на проницаемость больших моноламеллярных везикул для флуоресцентного маркера, кальцеина. Проницаемость липосомных мембран для кальцеина определяли путем измерения интенсивности флуоресценции красителя, вытекающего из везикул. На рис. 4 представлена зависимость величины утечки флуорофора из липосом, сформированных из смеси ДОФХ и холестерина (Хол) (67:33 мол%), от концентрации различных флавоноидов.

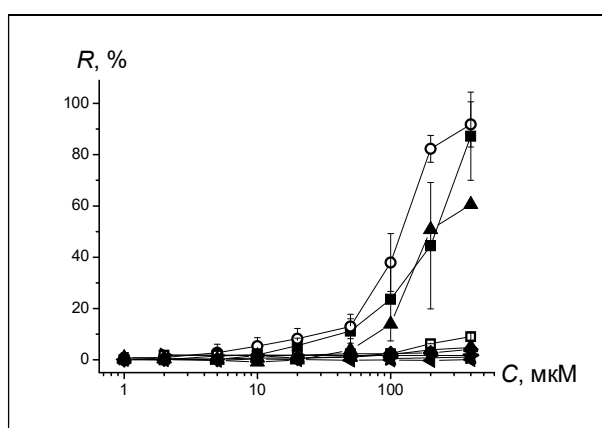


Рис. 4. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции кальцеина (R), вытекшего из ДОФХ:Хол -липосом, от концентрации флоретина (■), флорицина (◆), кверцетина (Δ), рутина (◄), генистеина (▲), биоханина А (○), даидзеина (□), катехина (►) и тахифолина (★).

Видно, что флорицин, кверцетин, катехин, даидзеин, рутин и тахифолин при концентрациях не более 400 мкМ практически не влияют на проницаемость липосомных мембран для кальцеина. В отличие от них флоретин и биоханин А при концентрациях более 5-10 мкМ, а генистеин при концентрациях более 50 мкМ вызывают высвобождение флуорофора из везикул.

Суммируя представленные результаты, можно сделать вывод о взаимосвязи изменений дипольного потенциала мембраны, ее проницаемости для кальцеина и фазового разделения в бислое при введении модификаторов, способных интеркалировать в мембрану. Можно полагать, что одной из причин «разжижающего» действия этих модификаторов является взаимное отталкивание перпендикулярных к поверхности мембраны компонентов их дипольных моментов. Модификаторы, связывающиеся вблизи границы раздела фаз, изменяют дипольный потенциал бислоя посредством изменения состояния его гидратации, и мало влияют на механические свойства мембраны.

3.2. Молекулярные механизмы функционирования ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами. Регуляторная роль дипольных модификаторов мембран. В подглаве приведены результаты изучения действия дипольных модификаторов мембран на ионные каналы, образуемые

экзогенными соединениями различной природы. Основным методом, используемый в этой части работы, состоял в регистрации токов, протекающих через ионные каналы, инкорпорированные в плоские липидные бислои.

Как показано в предыдущем разделе, дипольные модификаторы влияют на дипольный потенциал, латеральную организацию мембран, а также геометрические характеристики бислоя. В этой связи вставал вопрос о том, какие из этих регуляторных путей задействованы в модулировании ионных каналов дипольными модификаторами. Литературные данные свидетельствуют о влиянии дипольного потенциала на каналы пептидной природы, в частности формируемые грамицидином А и аламетицином [19-22]. Физические представления позволяют связывать чувствительность ионных каналов к дипольному потенциалу мембран с электрическими свойствами порообразующих молекул. На этом основании было высказано предположение о том, что зависимость каналообразующей активности от φ_d должна наблюдаться для большого числа полярных соединений, а также в случае встраивания в мембрану заряженных агентов независимо от их химической природы. Это определило выбор объектов исследования. К их числу были отнесены разноименно заряженные в физиологических условиях липопептиды, сирингомицин Е и сурфактин, а также полиеновые макролиды, полярные «головы» которых характеризуются некоторым дипольным моментом. С целью расширения круга объектов пептидной природы в работе были также протестированы цекропины и амилоидогенные пептиды. При оценке эффектов дипольного потенциала мембран важным аспектом является возможность его компенсации ориентированными молекулами воды внутри поры или полярными группами, образующими стенки канала. Предполагая, что увеличение молекулярной массы порообразующего соединения должно сопровождаться ослаблением влияния φ_d на энергетический барьер для проникающих через каналы ионов, проводили сравнительный анализ роли дипольного потенциала в мембранной активности антимикробных пептидов, цекропинов, и большого белкового токсина, альфа-гемолизина золотистого стафилококка.

Другим ключевым фактором регуляции каналообразующей активности антимикробных агентов и токсинов является распределение латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности мембраны, связанное, в первую очередь, с геометрическими характеристиками мембранообразующих молекул. Такой способ модуляции характерен для большого числа пептид- или белок-липидных пор, включая формируемые грамицидином, мелиттином, магаинином, колицином, кателицидинами и, вероятно, актинопоринами [23-30]. Было сделано предположение, что сходным образом могут регулироваться липопептид-липидные и полиен-липидные поры. При этом ожидалось, что в процессах формирования липидных пор роль дипольных модификаторов, сорбирующихся в области полярных «головок» липидов и углеводородного остова мембраны, будет аналогична участию липидов, склонных к образованию мицеллярных и инвертированных гексагональных фаз, соответственно.

3.2.1. Ионные каналы, формируемые синрингомицином E [1-5a, 8a, 26a, 28a].

Параграф посвящен изучению ионных каналов, образуемых синрингомицином E (СМЕ), липодепсинанопептидом, продуцируемым фитопатогенными бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Интерес к этому объекту обусловлен положительным зарядом и заметным фунгицидным действием липопептида [31,32]. Считается, что причиной гибели грибковых клеток является образование в их мембранах потенциал-чувствительных ионных каналов [33]. Добавка липопептида с одной стороны липидного бислоя и последующее приложение трансмембранного напряжения позволяют зарегистрировать флуктуации тока, соответствующие одиночным СМЕ-каналам, среди которых наблюдаются элементарные каналы и кластеры. Ранее было установлено, что последние являются результатом кооперативной работы сразу нескольких элементарных каналов [34,35], но вопрос о механизме синхронизации воротных процессов до недавнего времени оставался открытым. Зависимость кооперативности открывания СМЕ-каналов от трансмембранного напряжения [36-38], наблюдаемая как в разбавленных, так и в концентрированных растворах электролита, т.е. без и в условиях экранирования зарядов мембранных липидов и СМЕ, позволила высказать предположение об участии в функционировании воротного механизма дипольных групп. В работе показано, что введение флоретина, уменьшающего φ_d , и RH 421, его увеличивающего, сопровождается ростом и снижением среднего числа кооперативно открывающихся каналов в кластерах (m), для первого и второго модификатора соответственно. Полученные результаты хорошо согласуются с предположением об участии диполь-дипольных взаимодействий в синхронизации воротных процессов. Параллельно с изменением m , при введении дипольных модификаторов наблюдается изменение проводимости (g) и времени жизни элементарных СМЕ-каналов (τ_{on}): увеличение φ_d приводит к росту g и τ_{on} . Первый эффект отнесен к влиянию дипольного потенциала на энергетический барьер для проникающих через СМЕ-каналы анионов, а второй – к протеканию воротных процессов в области скачка потенциала. Сходный характер изменений времени жизни элементарных каналов и каналов-кластеров при модификации φ_d дает основание считать, что открывание кластера обусловлено синхронной работой воротных механизмов элементарных каналов.

Эффекты дипольных модификаторов не ограничиваются модуляцией характеристик одиночных СМЕ-каналов; в то же время изменяется число открытых пор в мембране. С ростом дипольного потенциала мембраны число открытых СМЕ-каналов в липидном бислое уменьшается. На рис. 5 представлена зависимость стационарного числа открытых СМЕ-каналов в мембране до и после введения дипольных модификаторов от абсолютной величины безразмерного трансмембранного напряжения, линеаризуемая в полулогарифмических координатах. Видно, что введению дипольных модификаторов соответствуют изменения как наклона прямых $\ln N_{op}(eV/kT)$, обусловленного модуляцией воротного заряда СМЕ-каналов, так и отсекаемого отрезка

по оси ординат, который, в основном, определяется изменением коэффициента распределения липопептида между мембраной и водной фазой. Последний результат является вполне ожидаемым. Учитывая, что углеводородный остов мембраны положителен относительно окружающей мембрану водной фазы, увеличение скачка потенциала должно привести к увеличению энергии встраивания в мембрану положительно заряженных молекул СМЕ.

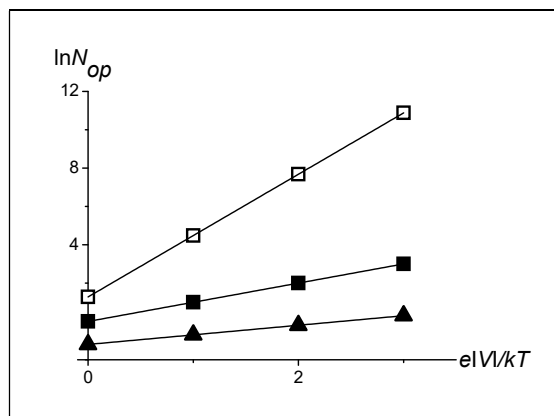


Рис. 5. Зависимость стационарного числа открытых СМЕ-каналов (N_{op}) от абсолютной величины безразмерного трансмембранного напряжения ($e|V|/kT$) в мембранах из эквимольной смеси диолеилфосфосерина (ДОФС) и диолеилфосфоэтаноламина (ДОФЭ) до (■) и после введения 20 мкМ флоретина (□) или 5 мкМ RH 421 (▲) в 0.1 М растворы NaCl при pH 6.0.

Модель строения СМЕ-канала как асимметричной липопептид-липидной поры [39] подразумевает, что распределение латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности мембраны также должно быть фактором, влияющим на каналообразующую активность СМЕ. Для проверки этого предположения была определена пороговая концентрация, необходимая для наблюдения одиночных СМЕ-каналов в ДОФХ и ДОФЭ-мембранах. В результате установлено, что в случае бислоев, сформированных их ДОФЭ, имеющего форму инвертированного конуса, соответствующая концентрация в 20 раз выше по сравнению с бислоями из ДОФХ, характеризующегося цилиндрической формой. В литературе распространено мнение, что липиды, склонные к образованию инвертированных гексагональных фаз, в частности ДОФЭ, дестабилизируют пептид-липидные поры, липидные устья которых обладают положительной кривизной [27,28]. В случае СМЕ равновероятным объяснением может быть стабилизация подобными липидами закрытого состояния канала, соответствующего одиночным липопептидным молекулам конической формы. В результате, равновесие между исходным и конечным состоянием смещается в сторону первого. Дипольные модификаторы, встраивающиеся в гидрофильную область бислоя, должны производить обратный эффект и способствовать образованию СМЕ-каналов. Как уже отмечалось, адсорбция флоретина сопровождается ростом числа открытых СМЕ-каналов. Этот эффект может быть обусловлен как падением φ_d , так и уменьшением энергии образования липидного устья поры. Несмотря на вносимый электростатическим отталкиванием сульфо-групп RH 421 дисбаланс между объемами гидрофильной и гидрофобной областей мембраны [30] и ожидаемое в этом случае увеличение каналообразующей активности СМЕ, введение стирилпиридинового красителя приводит к падению СМЕ-индуцированного стационарного тока вследствие увеличения φ_d .

Последнее свидетельствует о ключевой роли электростатических факторов в регуляции каналообразующей активности СМЕ стирилпиридиновыми красителями. Результаты изучения модуляции активности липопептида тиреоидными гормонами указывают на то, что в некоторых случаях могут преобладать механические факторы. Так, введение трийодтиронина индуцирует более чем 9-кратное падение стационарного тока, протекающего через модифицированную СМЕ ДФФХ-мембрану. Поскольку падение дипольного потенциала сопровождается ростом каналообразующей активности СМЕ, наблюдаемый эффект нельзя связать с уменьшением дипольного потенциала мембраны в присутствии гормона. Причиной может быть изменение распределения латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности бислоя в результате встраивания трийодтиронина в гидрофобную область мембраны, приводящее к стабилизации закрытого состояния СМЕ-канала подобно случаю введения в состав бислоя ДОФЭ.

Возможность применения СМЕ в фармакологических целях делает чрезвычайно актуальными исследования специфичности действия липопептида на различные клетки. В связи с этим представлял интерес вопрос о различии свойств СМЕ-каналов в мембранах грибковых клеток и плазматических мембранах клеток млекопитающих. Для того чтобы ответить на этот вопрос, было предпринято изучение СМЕ-каналов в липидных бислоях, включающих различные сфинголипиды и стерин. Для имитации липидного состава плазматических мембран клеток млекопитающих использовали эквимольную смесь ДОФС, ДОФЭ и Хол, содержащую 20 мол% СМ. Для моделирования мембран грибковых клеток в состав липидных бислоев из эквимольной смеси ДОФС, ДОФЭ и эргостерина (Эрг) включали 20 мол% фитосфингозина из *Saccharomyces cerevisiae* (СФС). Учитывая, что мембраны указанного состава подвержены латеральной сегрегации компонентов, интерес представляло исследование влияния дипольных модификаторов на характеристики инкорпорированных в них СМЕ-каналов. Рис. 6 демонстрирует флуктуации тока, соответствующие открыванию и закрыванию СМЕ-каналов в ДОФС:ДОФЭ:Хол:СМ-мембранах до и после введения дипольных модификаторов, флоретина и RH 421. Видно, что в присутствии диполь-модифицирующих агентов наблюдаются две популяции СМЕ-каналов. Каналы *I* типа ведут себя аналогично СМЕ-каналам в фосфолипидных бислоях: их проводимость и время жизни уменьшаются при введении флоретина и увеличиваются после добавки RH 421, т.е. являются функцией φ_d . Характеристики каналов *II* типа в отсутствие и при наличии тестируемых модификаторов совпадают. Ничего подобного не наблюдается в мембранах, содержащих Эрг и СФС, где зарегистрированы только каналы *I* типа.

Возможное объяснение существования в липидных бислоях, включающих СМ, не чувствительных к введению диполь-модифицирующих соединений каналов и их отсутствия в мембранах, сформированных с участием сфинголипидов сахаромидет, связано с различием латеральной организации мембран указанного состава. Бислои, включающие СМ, характеризуются более выраженной фазовой сегрегацией по

сравнению с СФС-содержащими мембранами и, в отличие от последних, могут содержать s_o -домены [25a].



Рис. 6. Одиночные элементарные СМЕ-каналы в ДОФС:ДОФЭ:Хол:СМ-мембранах в отсутствие дипольных модификаторов (контроль) и в присутствии 20 мкМ флоретина или 5 мкМ RH 421. Липидные бислои омываются 0.1 М KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет -150 мВ.

Неравномерное распределение дипольных модификаторов между областями мембраны, находящимися в различном агрегатном состоянии, может усиливать латеральную гетерогенность свойств мембраны, в том числе ее дипольного потенциала. Это неизбежно отразится на свойствах каналов, встроенных в упорядоченные и неупорядоченные липидные домены. Таким образом, полученные данные позволяют связывать регуляторную роль дипольных модификаторов в функционировании СМЕ-каналов с распределением дипольного потенциала на поверхности мембраны.

3.2.2. Ионные каналы, образуемые сурфактином [6a]. С учетом того, что рост дипольного потенциала мембраны вызывает снижение порообразующей способности положительно заряженного СМЕ, в том числе за счет изменения его коэффициента распределения между мембраной и водной фазой, можно предположить, что обратная зависимость будет наблюдаться в случае отрицательно заряженных каналобразующих агентов. Идеальным кандидатом для проверки выдвинутой гипотезы является сурфактин (СФ). Дело в том, что этот липопептид, продуцируемый *Bacillus subtilis*, в физиологических условиях имеет отрицательный заряд. Известно, что в плоских липидных бислоях СФ образует потенциал-независимые катион-селективные каналы разноуровневой проводимости [40]. В случае реализации предложенного сценария увеличение дипольного потенциала липидного бислоя, вызванное адсорбцией дипольных модификаторов, должно привести к увеличению числа СФ-каналов. Интерес к СФ также обусловлен его противоопухолевой, противовоспалительной, антибактериальной, противогрибковой, противовирусной, антимикоплазменной и антикоагуляционной активностью [41-45].

Из рис. 7 видно, что добавка флоретина вызывает падение стационарного макроскопического СФ-индуцированного трансмембранного тока (А), а введение RH 421 приводит к его увеличению (Б).

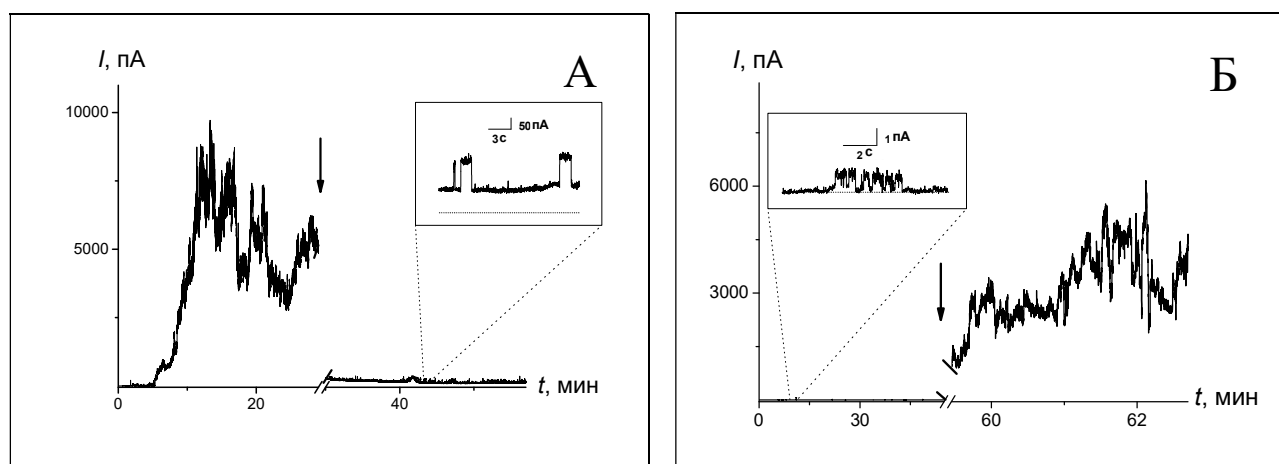


Рис. 7. Изменение стационарного СФ-индуцированного трансмембранного тока при действии дипольных модификаторов. Мембраны изготовлены из ДФФХ и омываются 1 М раствором KCl при pH 6.5. Моменты введения флоретина до концентрации 20 мкМ (А) или RH 421 до концентрации 10 мкМ (Б) в омывающие растворы указаны стрелками. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ (А) или 25 мВ (Б).

Принимая во внимание соответствующие изменения ϕ_d , можно прийти к заключению, что рост дипольного потенциала мембраны сопровождается увеличением СФ-индуцированного тока. Сравнение проводимостей одиночных каналов до и после добавки дипольных модификаторов позволяет заключить, что наблюдаемые изменения тока обусловлены, в том числе, изменением числа открытых СФ-пор. Полученные результаты полностью согласуются с предположением о влиянии незранируемого скачка потенциала на границе мембраны на коэффициент распределения липопептида между липидным бислоем и водной фазой и указывают на то, что увеличение ϕ_d сопровождается уменьшением энергетических затрат на погружение в мембрану отрицательно заряженных молекул сурфактина. Суммируя результаты исследования каналообразующей активности СМЕ и СФ, можно говорить о ключевой роли заряд-дипольных взаимодействий в регуляции функционирования липопептидных каналов.

3.2.3. Порообразующая способность цекропинов [18a]. Для изучения регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, образуемых пептидами, были выбраны антимикробные пептиды насекомых, цекропины. Молекулы цекропинов А (ЦА) и Б (ЦБ) представляют собой последовательности двух α -спиральных доменов, соединенных «шарниром». В физиологических условиях N-концевой домен обладает амфипатическими свойствами и имеет положительный заряд, в то время как С-концевой домен является более гидрофобным и несет меньший (ЦА) или нулевой заряд (ЦБ) [46]. Подобная структурная организация необходима для проявления цекропинами широкого спектра противомикробной активности, включающего практически все клинически важные грамотрицательные и некоторые грамположительные бактерии [46]. Несмотря на то, что цекропины были одними из первых идентифицированных антимикробных пептидов, молекулярные механизмы взаимодействия этих пептидов с клеточными мембранами до сих пор остаются дискуссионными. В настоящее время в литературе

обсуждаются две возможные модели, объясняющие антимикробное действие цекропинов. Согласно первой модели, сорбция молекул цекропина на мембране приводит к образованию на ее поверхности пептидного «ковра» [47]. Согласно другой модели, цекропины образуют в мембранах патогенных клеток поры [48].

В работе установлено, что при введении с одной стороны липидного бислоя эти антимикробные пептиды образуют хорошо воспроизводимые ионные каналы с несколькими подсостояниями проводимости (рис. 8).

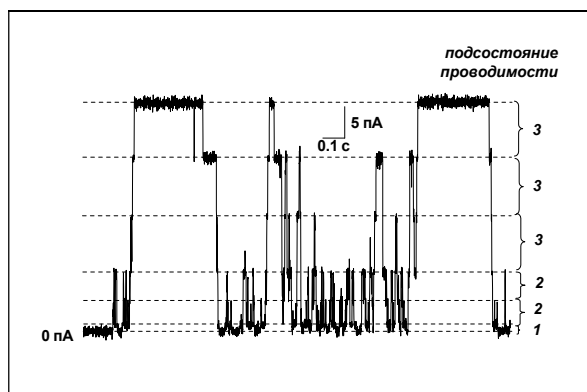


Рис. 8. Одиночные ЦА-каналы в липидных бислоях из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ. Цифрами от 1 до 3 отмечены подсостояния проводимости ЦА-каналов. Мембрана омывается 0.1 М раствором KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 25 мВ.

Обнаружено, что дипольные модификаторы влияют на каналообразующую активность цекропинов (табл. 2).

Таблица 2. Отношения ЦА-индуцированных макроскопических (I_{∞}/I_{∞}^0) и средних токов, протекающих через одиночные ЦА-каналы (i_{SC}/i_{SC}^0), после и до введения дипольных модификаторов, а также вызванные тестируемыми модификаторами изменения дипольного потенциала бислоев из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ. Мембраны омываются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Измеряемый параметр	Дипольный модификатор			
	20 мкМ		5 мкМ	
	Флоретин	Мирицетин	RH 237	RH 421
I_{∞}/I_{∞}^0	0.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1	9.3 ± 3.9	7.2 ± 4.9
i_{SC}/i_{SC}^0	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2
$\Delta\varphi_d$, мВ	-90 ± 10	-20 ± 5	100 ± 5	60 ± 10

Флоретин вызывает уменьшение стационарного макроскопического цекропин-индуцированного трансмембранного тока, мирицетин практически не меняет I_{∞} , а стирилпиридиновые красители серии RH увеличивают цекропин-индуцированный ток. Сопоставление величин отношений макроскопических (I_{∞}/I_{∞}^0) и средних токов, протекающих через одиночные ЦА-каналы (i_{SC}/i_{SC}^0), после и до введения тестируемых модификаторов показывает, что изменения макроскопического тока в присутствии флоретина и стирилпиридиновых красителей обусловлены, в основном, изменением числа открытых пор. Некоторое снижение i_{SC} , наблюдаемое после добавки этих модификаторов, может быть результатом их влияния на механические свойства бислоя.

Сравнение величин I_{∞}/I_{∞}^0 и $\Delta\varphi_d$, вызванных адсорбцией флавоноидов и стирилпиридиновых красителей, позволяет заключить, что увеличение φ_d сопровождается ростом стационарного тока и, следовательно, числа открытых ЦА-каналов в мембране. Отсутствие влияния мирицетина, по-видимому, обусловлено незначительной модуляцией дипольного потенциала ДОФС:ДОФЭ-мембран при его введении. Аналогичные результаты получены для ЦБ. Таким образом, можно сделать вывод о том, что рост φ_d вызывает уменьшение энергии образования цекропиновых каналов. Методами молекулярной динамики показано, что цекропины могут формировать поры двух типов: при погружении в мембрану N- или C-концевой спирали, соответственно [49]. Учитывая высокий интегральный положительный заряд N-концевого домена, в первом случае при увеличении дипольного потенциала мембраны следовало бы ожидать падения каналобразующей активности пептида. Наблюдаемый рост макроскопического цекропин-индуцированного тока в присутствии модификаторов, увеличивающих φ_d , указывает на то, что предпочтительным способом формирования пор цекропинами является встраивание в бислой их C-концевых спиралей. Доминирование в мембране каналов этого типа может быть обусловлено большей стабильностью C-концевой части молекулы цекропина по сравнению с N-концевой спиралью при взаимодействии с отрицательно заряженным бислоем [50].

3.2.4. Ионные каналы, индуцированные олигомерами амилоидных пептидов [7a, 23a]. Распространенной гипотезой, связывающей нейротоксичность β -амилоидов и их мембранное действие, является предположение о формировании олигомерами β -амилоидов ионных каналов [51-54]. В работе были изучены возможности регуляции дипольными модификаторами мембран порообразующей способности β -амилоидов на примере фрагмента 25-35 β -амилоидного пептида (А β П (25-35)). На рис. 9 (А) представлена типичная запись флуктуаций трансмембранного тока, соответствующих открыванию и закрыванию одиночных А β П (25-35)-каналов. Видно, что амилоидные каналы характеризуются большим разбросом проводимостей. По этой причине для дальнейшего анализа использовали величину индуцированного пептидом стационарного макроскопического тока.

Установлено, что добавка флоретина в мембраноомывающие растворы вызывает значительный рост стационарного трансмембранного тока, индуцированного А β П (25-35) (рис. 9, Б). При этом другие тестируемые дипольные модификаторы, флорицин, генистеин, кверцетин, ТГАФ, RH 237 и RH 421, на I_{∞} практически не влияют. Эти факты не дают возможности связать увеличение каналобразующей активности А β П (25-35) в присутствии флоретина с индуцированным этим флавоноидом уменьшением φ_d . Поскольку генистеин, обладающий сходным с флоретином разжижающим действием на мембраны, не увеличивает I_{∞} , изменение механических свойств мембраны также можно

исключить как возможное объяснение роста АβП (25-35)-индуцированного тока в присутствии флоретина.

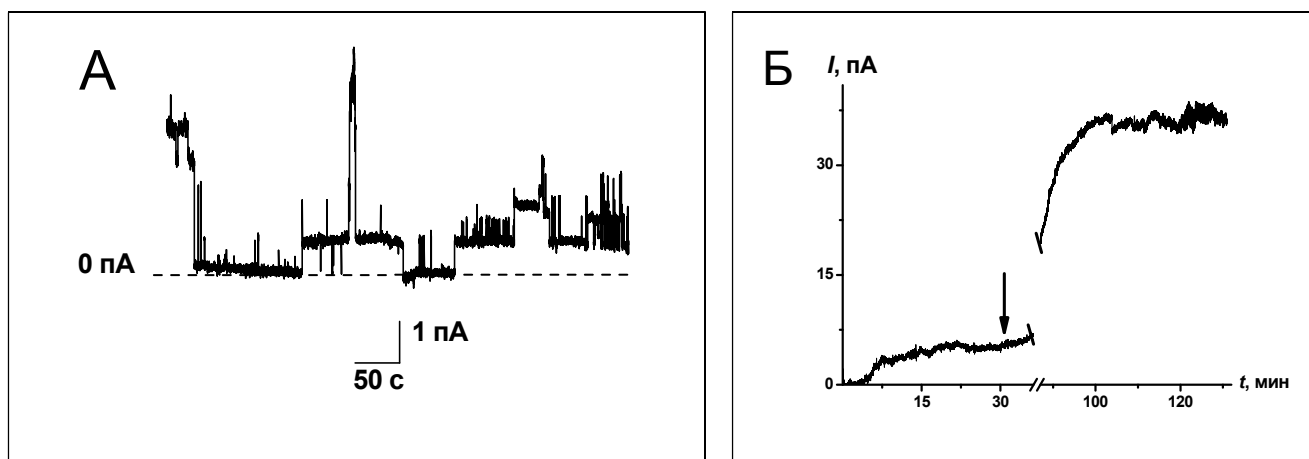


Рис. 9. (А) – Одиночные ионные каналы, образуемые фрагментом 25-35 β-амилоидного пептида. (Б) – Влияние флоретина на стационарный ток, индуцированный АβП (25-35). Момент введения флоретина до 20 мкМ в мембраноомывающие растворы отмечен стрелкой. Липидные бислои изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и омываются раствором 0.1 М КСl при рН 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Поскольку молекула АβП (25-35) имеет положительный заряд, есть основания полагать, что наблюдаемый рост каналаобразующей активности пептида при введении флоретина является результатом электростатического взаимодействия АβП (25-35) с отрицательно заряженной формой дипольного модификатора. Для проверки выдвинутого предположения был проведен скрининг амилоидных и амилоидоподобных пептидов и белков, имеющих различный суммарный заряд молекул. Среди амилоидных пептидов были протестированы АβП (1-42), АβП (25-35) [Ala²⁸], пресенилин-1-N и фрагмент 106-126 белка приона человека. В качестве амилоидоподобных белков были использованы BASP1 и GAP-43. Эти белки являются близкими по своим свойствам нейрональными белками, локализованными на внутренней поверхности плазматической мембраны аксонных окончаний. Показано, что BASP1 и GAP-43 образуют олигомерные комплексы, которые по своей структуре и характеристикам весьма схожи с олигомерами амилоидных белков, в том числе подобно β-амилоидам BASP1 способен формировать катион-селективные каналы многоуровневой проводимости [7a]. Обнаружено, что, аналогично АβП (25-35), флоретин вызывает рост каналаобразующей активности положительно заряженных пептидов: фрагмента 106-126 белка приона человека, а также фрагментов нейрональных белков BASP1 и GAP-43, мур-BASP1 (1-13), мур-BASP1 (1-19) и GAP-43(1-40). При этом добавка флоретина не приводит к изменению I_{∞} , индуцированного нейтральными и отрицательно заряженными белками и пептидами: АβП (25-35) [Ala²⁸], АβП (1-42), пресенилином-1-N, GAP-43 (41-242) и BASP1. Эти результаты указывают на электростатическую природу взаимодействия флоретина с АβП (25-35). Результаты электронной микроскопии свидетельствуют о влиянии

флоретина на характер агрегации АβП (25-35): введение флоретина блокирует формирование пептидом длинных фибрилл, вместо которых наблюдаются более короткие фибриллярные агрегаты [23a]. Независимым подтверждением гипотезы о модификации агрегационного статуса амилоидогенных пептидов флоретином могут служить результаты проведенной в работе оценки проницаемости моноламеллярных везикул для кальцеина, демонстрирующие уменьшение временного параметра, характеризующего "медленную" компоненту утечки, в присутствии этого флавоноида.

На основании совокупности полученных данных можно говорить о ключевой роли электростатических взаимодействий в агрегационной и порообразующей активности β-амилоидов.

3.2.5. Одиночная альфа-гемолизиновая пора [9a]. Актуальность исследования порообразующей способности α-гемолизина обусловлена высокой вирулентностью и легко приобретаемой устойчивостью золотистого стафилококка к антимикробным препаратам. По данным ВОЗ, этот возбудитель является наиболее частой причиной развития внутрибольничных инфекций. В модельных и клеточных мембранах α-гемолизин (α-ГЛ) формирует пронизывающий бислой и выступающий над ним гептамерный комплекс грибовидной формы [55,56]. К наиболее значимым электрофизиологическим характеристикам α-ГЛ-поры следует отнести потенциал-чувствительность ее закрывания: при приложении высокого (по абсолютной величине) трансмембранного напряжения канал закрывается [57,58]. Следует отметить, что пора закрывается не полностью, на очень короткое время канал переходит в состояние, проводимость которого в несколько раз меньше, чем открытого (рис. 10, контроль).

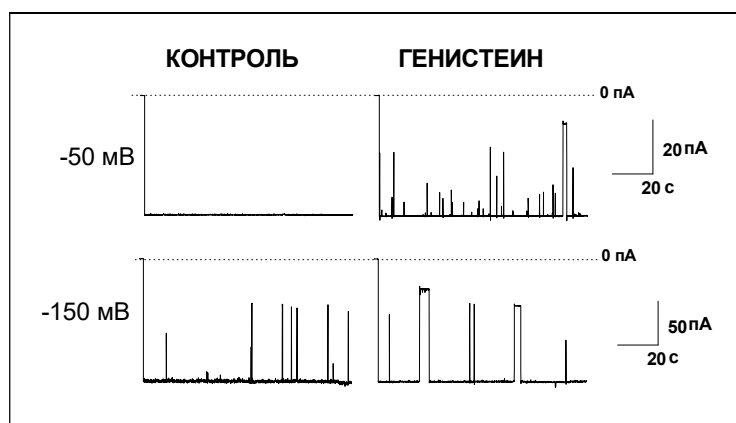


Рис. 10. Запись флуктуаций одиночной α-ГЛ поры при различном трансмембранном напряжении до и после введения 20 мкМ генистеина. Липидные бислои изготовлены из ДФФХ и омываются 1 М раствором KCl при pH 7.5. Трансмембранное напряжение указано на рисунке.

Молекулярные механизмы потенциал-зависимого закрывания α-ГЛ-поры до сих пор остаются невыясненными. Есть основания полагать, что это происходит в результате взаимодействия полярных аминокислотных остатков, образующих сенсор напряжения канала, с трансмембранным полем. Для проверки этого предположения в работе было предпринято детальное изучение потенциал-чувствительности закрывания α-ГЛ-поры в присутствии дипольных модификаторов мембран. Результаты измерений представлены в табл. 3. Видно, что флавоноиды, флоретин, генистеин, кверцетин,

мирицетин, таксифолин и катехин, увеличивают потенциал-чувствительность закрывания α -ГЛ-канала.

Для примера на рис. 10 (*генистеин*) показаны записи флуктуаций α -ГЛ-канала между открытым и закрытым состояниями при различном трансмембранном напряжении в присутствии генистеина. Видно, что события закрывания поры наблюдаются как при $V = -150$ мВ, так и при $V = -50$ мВ. Следует обратить внимание, что в отсутствие каких-либо модификаторов (*контроль*) при $V = -50$ мВ канал постоянно находится в открытом состоянии. Представленные в табл. 3 результаты позволяют сделать вывод о том, что индуцированные модификаторами изменения φ_d не оказывают влияния на потенциал-чувствительность закрывания α -ГЛ-поры. Об этом свидетельствуют неизменность характеристик α -ГЛ-канала после введения дипольных модификаторов, флорицина, биоханина А и RH 421, и увеличение потенциал-чувствительности закрывания поры после добавки соединений, не обладающих диполь-модифицирующими свойствами, таксифолина, катехина и даидзеина. Нечувствительность α -ГЛ-поры к дипольному потенциалу может быть результатом компенсации скачка потенциала гиперполяризованными молекулами воды и полярными аминокислотными остатками, формирующими стенки канала [4,59].

Таблица 3. Потенциал-чувствительность одиночной α -ГЛ поры в присутствии различных дипольных модификаторов и родственных им соединений. Мембраны сформированы из ДФФХ и омываются 1.0 М раствором KCl при pH 7.5.

Флавоноид	Концентрация, мкМ ^а	$ V $, мВ ^б
—	—	100 ± 25
<i>флоретин</i>	20	5 ± 5
<i>генистеин</i>	10	
<i>кверцетин</i>	20	
<i>мирицетин</i>	15	
<i>таксифолин</i>	20	
<i>катехин</i>	15	
<i>даидзеин</i>	50	125 ± 25
<i>генистин</i>	90	
<i>флорицин</i>	80	100 ± 25
<i>биоханин А</i>	80	
<i>ТГАФ</i>	80	
<i>RH 421</i>	10	

^а — для модификаторов, увеличивающих потенциал-чувствительность закрывания α -ГЛ канала (флоретин, генистеин, кверцетин, мирицетин, таксифолин и катехин), указана пороговая концентрация; для неактивных (даидзеин, генистин, флорицин, биоханин А, ТГАФ и RH 421) — максимальная из тестируемых.

^б — минимальная абсолютная величина трансмембранного напряжения, при котором наблюдается закрывание α -ГЛ-поры.

Установленная корреляция рассматриваемых эффектов со структурой тестируемых флавоноидов (рис. 1) позволила утверждать, что изменение свойств канала происходит при взаимодействии его сенсора напряжения с флавоноидами,

гидроксильными в 5-м положении А-цикла и в 4'-м положении В-цикла. Учитывая, что все флавоноиды, увеличивающие потенциал-чувствительность закрывания α -ГЛ-поры, также гидроксильными в 7-м положении А-цикла, нельзя исключить участие этой гидроксильной группы в связывании с каналом. Для установления стехиометрии взаимодействия была исследована зависимость времени жизни α -ГЛ-канала в открытом состоянии от концентрации 5-, 7- и 4'-гидроксильных флавоноидов. Коэффициент наклона линейного участка роста указанных зависимостей равен трем. Это указывает на то, что три молекулы флавоноида связываются с одним α -ГЛ-каналом, т.е. одна молекула флавоноида может связываться сразу с двумя соседними протомерами α -ГЛ. Проведенный анализ структуры α -ГЛ-канала и других белков, комплексированных с различными 5-, 7- и 4'-гидроксильными флавоноидами, позволил предположить, что сенсор напряжения локализуется в глицин-богатом регионе с цитоплазматической стороны β -складчатости.

3.2.6. Каналообразующая активность полиеновых макролидных антибиотиков. В этом разделе рассмотрены механизмы регуляции дипольными модификаторами ионных каналов, образуемых соединениями непептидной природы, полиеновыми макролидами. Интерес к полиеновым антибиотикам обусловлен тем, что они уже много десятилетий используются в клинической практике для лечения системных микозов. К сожалению, их применение в терапевтических целях сопряжено с повышенным риском развития большого числа серьезных побочных эффектов, таких как нефропатия, анемия, тромбофлебит, аритмия, гипокалиемия и др. [60,61]. Современные фармацевтические подходы направлены на снижение токсичности полиеновых макролидов за счет включения в состав лекарственного препарата липидных компонент [62]. Точная архитектура формируемых полиеновыми антимикотиками пор, так же как и их связь с антимикробной активностью, до сих пор остаются предметом научных дискуссий. По-видимому, на начальном этапе полиеновые молекулы связывают мембранные стеринны, а затем образовавшиеся полиен-стериновые комплексы формируют поры. Поскольку полиеновые макролиды не способны проникать через липидный бислой [63], в зависимости от того, введен ли антибиотик с обеих или только с одной стороны мембраны, полиены формируют два различных типа каналов: симметричные и асимметричные, соответственно.

3.2.6.1. Симметричные полиеновые каналы [11а, 12а, 13а, 17а, 20а, 21а, 22а, 27а]. В этой части работы приводятся результаты сравнительного исследования влияния различных дипольных модификаторов на симметричные полиеновые каналы. Установлено, что введение флавоноидов, флоретина и кверцетина, вызывает уменьшение, а стирилпиридиновых красителей, RH 160, RH 237 и RH 421, – увеличение трансмембранного тока, протекающего через одиночные амфотерициновые (АМБ) каналы в ДФФХ:Хол-бислях (67:33 мол%). На этом основании можно заключить, что увеличение φ_d приводит к росту проводимости АМБ-каналов. Полученный результат

можно объяснить, если принять во внимание преимущественно анионную селективность симметричных АМБ-каналов: рост положительного потенциала внутри мембраны должен сопровождаться снижением энергетического барьера для проникающих анионов и, следовательно, вызывать увеличение проводимости канала, что наблюдается в эксперименте.

По данным [64], положительный полюс диполя АМБ глубже погружен в липидный бислой по сравнению с отрицательным полюсом. На этом основании можно было предполагать, что рост φ_d сопровождается уменьшением каналообразующей активности полиенов. Вопреки ожиданиям, обнаружено, что дипольный потенциал не является ключевым фактором, регулирующим число полиеновых каналов в мембране. Введение флоретина вызывает значительный рост стационарного АМБ-индуцированного трансмембранного тока, проходящего через ДФФХ:Хол-бислой. При этом на полиен-индуцированный макроскопический ток, протекающий через ДФФХ:Эрг-мембраны, флоретин действия не оказывает. Стирилпиридиновый краситель RH 421 практически не меняет проводимости модифицированных АМБ ДФФХ:Хол-бислов, а его введение в растворы, окружающие ДФФХ:Эрг-мембраны, приводит к существенному увеличению I_{∞} . Влияния на I_{∞} в Хол- и Эрг-содержащих мембранах других флавоноидов и стирилпиридиновых красителей не наблюдается, кроме некоторого уменьшения тока в случае введения кверцетина в растворы, омывающие ДФФХ:Эрг-бислой. Таким образом, полученные результаты не позволяют связывать интегральный полиен-индуцированный ток с φ_d . Другой возможной причиной наблюдаемых эффектов может быть изменение свойств полиен- и стерин-обогащенных мембранных микродоменов в присутствии дипольных модификаторов. Методом флуоресцентной конфокальной микроскопии в работе продемонстрировано существование полиен-индуцированных упорядоченных доменов [20a]. Поскольку изменения каналообразующей активности АМБ в присутствии разжижающих твердокристаллические области биоханина А и генистеина не наблюдаются, модификацию сценария фазовой сегрегации в бислой, вызванную введением модификаторов, также нельзя рассматривать в качестве основной причины изменения стационарного АМБ-индуцированного трансмембранного тока.

Благодаря участию своих полярных групп в сети водородных связей, а также двойных связей в π - π -электронных взаимодействиях, дипольные модификаторы могут служить дополнительными ориентирующими или дезориентирующими факторами, влияя на силы Ван-дер-Ваальса, возникающие между полиеновой и стериновой молекулами. Известно, что благодаря более жесткой молекулярной геометрии Эрг его комплекс с АМБ оказывается более энергетически выгодным по сравнению с комплексом АМБ с Хол [65]. По-видимому, флоретин способен стабилизировать АМБ-Хол комплекс, а RH 421 влияет на взаимодействия между АМБ и Эрг. В случае правомерности предложенного сценария существенную регуляторную роль должна

играть форма взаимодействующих молекул. Для подтверждения этого предположения было предпринято детальное изучение каналообразующей активности АМБ в липидных бислоях, включающих фосфолипиды различной формы.

Как видно на рис. 11, флоретин вызывает рост стационарного АМБ-индуцированного тока, протекающего через бислой, содержащие ДОФХ, а RH 421 – ДФФХ. На АМБ модифицированные мембраны, включающие другие фосфолипиды, флоретин и RH 421 не действуют. Молекулы ДФФХ имеют форму инвертированных конусов, ДОФС характеризуются конической, а ДОФХ – цилиндрической формой [66]. Можно предположить, что последние по форме лучше соответствуют относительно жесткой «палочкообразной» молекуле АМБ. Сильное взаимодействие АМБ-ДОФХ приводит к ослаблению взаимодействия АМБ-Эрг. По-видимому, молекулы флоретина способны стабилизировать подобные комплексы, как и комплекс АМБ-Хол. Стерическое несоответствие между молекулой АМБ и фосфолипидами, склонными к образованию неламеллярных структур (ДФФХ и ДОФС), ослабляет их взаимодействие с АМБ и существенной дестабилизации АМБ-Эрг комплекса не происходит. Можно полагать, что ДФФХ, имеющий разветвленные ацильные «хвосты», практически не взаимодействует с АМБ и не влияет на стабильность АМБ-Эрг комплекса, с которым связывается RH 421.

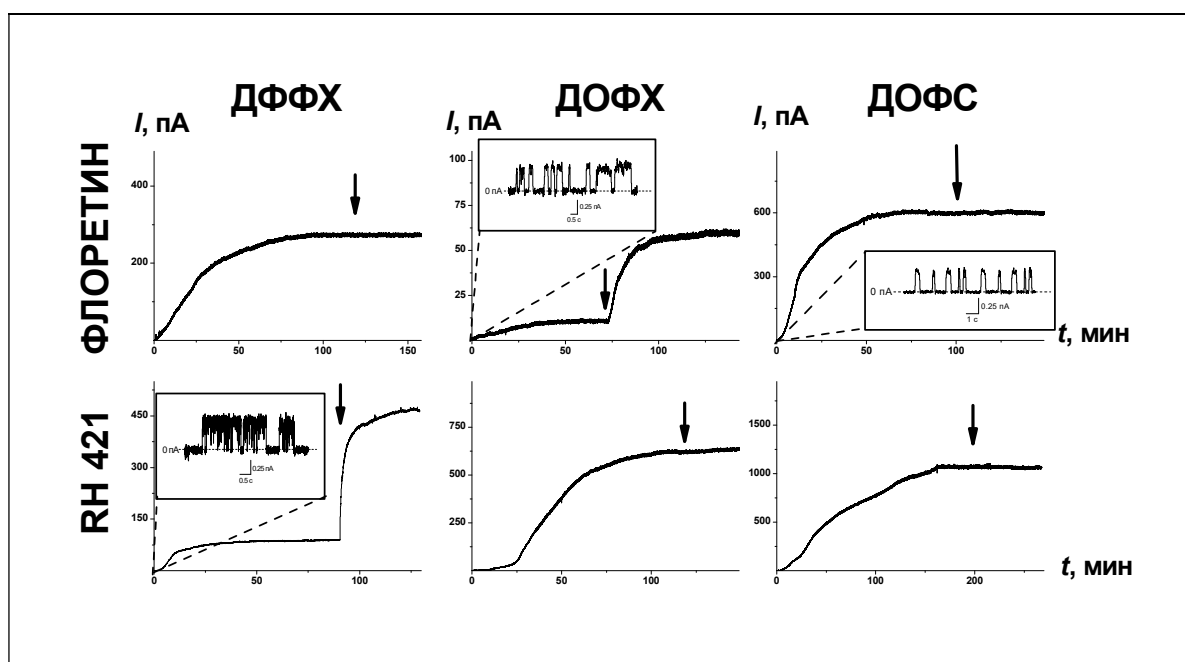


Рис. 11. Изменение стационарного АМБ-индуцированного трансмембранного тока при действии дипольных модификаторов. Мембраны изготовлены из смеси фосфолипидов (указаны над соответствующими треками) и Эрг (67:33 мол%), оmyваются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Моменты введения флоретина до концентрации 20 мкМ (верхняя панель) или RH 421 до концентрации 5 мкМ (нижняя панель) в оmyвающие растворы отмечены стрелками. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

В работе установлено, что тип сфинголипида, входящего в состав модельных мембран, также влияет на эффекты дипольных модификаторов. На основании

совокупности полученных данных можно утверждать, что ключевая роль в каналообразующей активности полиеновых макролидных антибиотиков при их двустороннем относительно мембраны введении принадлежит стабильности полиен-стериновых комплексов и определяется влиянием других компонентов мембраны (фосфолипидов, сфинголипидов и дипольных модификаторов) на энергию комплексообразования.

3.2.6.2. *Асимметричные полиеновые каналы [20а, 22а, 27а]*. Поскольку толщина бислоя превышает длину полиеновой молекулы приблизительно в два раза, можно ожидать, что часть асимметричного полиенового канала образована мембранными липидами. Подобная модель строения канала предполагает, что решающую роль в регуляции асимметричных полиеновых каналов играет дисбаланс между объемами гидрофильной и гидрофобной областей мембраны. Учитывая обнаруженную способность флоретина, биоханина А и мирицетина индуцировать фазовый переход липидов из ламеллярной в гексагональную фазу за счет встраивания в полярную область бислоя или адсорбции вблизи поверхности мембраны, было высказано предположение, что введение этих агентов должно сопровождаться увеличением стационарного числа открытых асимметричных полиеновых каналов в мембране. Полученные результаты подтвердили справедливость этого предположения (табл. 4).

Таблица 4. Среднее отношение стационарного макроскопического тока, индуцированного *цис*-введением нистатина, после и до введения различных дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Липидные бислои изготовлены из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 мол%) и омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ. Концентрация флавоноидов и стирилтиридиновых красителей в околосмембранных растворах составляет 20 и 5 мкМ, соответственно.

Дипольный модификатор	I_{∞}/I_{∞}^0
флоретин	$3 \div 46$
флорицин	$4 \div 210$
биоханина А	5 ± 120
мирицетин	$4 \div 270$
кверцетин	$19 \div 41$
таксифолин	$6 \div 250$
генистеин	$2 \div 6$
даидзеин	1
катехин	1
ТГАФ	1
RH 421	$4 \div 93$

Так, установлено, что флоретин, биоханин А и мирицетин вызывают увеличение стационарного макроскопического тока, индуцированного *цис*-введением нистатина (НС). Рост тока в присутствии таксифолина, не влияющего на дипольный потенциал мембраны, и RH 421, увеличивающего φ_d , исключает связь наблюдаемых эффектов с уменьшением дипольного потенциала, обусловленным добавкой флоретина, биоханина

А и мирицетина. Различное влияние указанных флавоноидов на фазовое разделение в липидных бислоях не позволяет однозначно утверждать, что модуляция каналаобразующей активности НС обусловлена изменением латеральной организации мембран под действием модификаторов. Наиболее вероятно, что ключевая роль в регуляции асимметричных полиеновых каналов дипольными модификаторами мембран принадлежит геометрическим характеристикам бислоя. Увеличение тока после введения таксифолина, RH 421 и ряда других флавоноидов (флорицина, кверцетина и генистеина) указывает на то, что перечисленные соединения, также как флоретин, биоханин А и мирицетин, способны увеличивать объем полярной области мембраны и уменьшать энергию формирования липидных устьев асимметричных нистатиновых пор. Наиболее убедительными данными в пользу предлагаемой модели действия дипольных модификаторов на асимметричные полиеновые каналы стали результаты изучения влияния одностороннего введения дипольных модификаторов. Так, в работе показано, что введение со стороны антибиотика модификаторов, не способных преодолевать мембранный барьер (флорицина, биоханина А, мирицетина и RH 421), не оказывает действия на активность НС. Отличная ситуация, выражающаяся в значительном увеличении стационарного полиен-индуцированного тока, наблюдается в случае введения модификаторов с противоположной стороны, т.е. со стороны липидного устья поры.

В настоящее время внимание фармацевтического производства сосредоточено на липосомных лекарственных формах полиеновых макролидов [62]. Считается, что они обладают меньшей токсичностью. Принимая во внимание, что дипольные модификаторы действуют на асимметричные каналы со стороны, противоположной введению антибиотиков, для фармакологии представляют интерес соединения, способные проникать через клеточные мембраны. К таким агентам, прежде всего, относится флоретин. В работе обнаружен синергизм действия флоретина и полиеновых антибиотиков, АМБ или НС, на высвобождение флуорофора из моноламеллярных везикул. Как и ожидалось, не проникающие через бислои биоханин А и кверцетин подобного эффекта не оказывают. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что флоретин можно рассматривать в качестве потенциального синергиста терапевтического действия полиеновых макролидов.

3.3. Общие закономерности липид-опосредованной регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами [29а, 30а]. В подглаве резюмированы полученные в работе результаты, сформулированы общие представления о роли липидного матрикса в функционировании ионных каналов, формируемых антимикробными агентами и токсинами, а также о возможностях их регуляции дипольными модификаторами мембран. Сделанные обобщения представлены в разделе «Заключение».

Заключение. Проведенные в работе исследования показывают, что регуляторная роль дипольных модификаторов разнообразна и включает изменение не только распределения электрического поля на границах мембран, но и доменной структуры липидного бислоя, а также вероятное изменение трансмембранного распределения латеральной компоненты давления. Более того, показана возможность непосредственного взаимодействия дипольных модификаторов с ионными каналами.

В ходе работы среди флавоноидов обнаружены ранее неизвестные дипольные модификаторы. Изучены и количественно описаны структурно-функциональные связи для широкого круга соединений флавоноидного типа с липидными бислоями различного состава. На основании этих данных разработана модель, постулирующая два различных механизма изменения дипольного потенциала под действием флавоноидов: посредством интеркаляции их диполей в липидный бислой и модификации состояния гидратации мембранных липидов. Развита в работе модель открывает широкие перспективы для дальнейших изысканий в этом направлении с использованием современных методов исследования тонкой структуры липидного бислоя, включая построение его молекулярно-динамической картины.

Впервые подробно исследована способность флавоноидов влиять на доменную структуру и фазовое разделение в мембранах. Комплексное исследование липосомных систем посредством калориметрических, микроскопических и флуориметрических измерений позволило продемонстрировать взаимозависимость изменений дипольного потенциала мембран, их проницаемости и характера фазового разделения при введении флавоноидов, способных интеркалировать в липидный бислой. Согласно полученным данным, погружение модификаторов в мембрану сопровождается увеличением подвижности ацильных «хвостов» липидов, разрушением упорядоченных доменов в мембране и ростом проницаемости бислоя для флуорофора. На основании полученных данных предложена классификация флавоноидов по функциональным характеристикам их взаимодействия с липидным бислоем, учитывающая существование трех различных типов таких соединений, которые а) уменьшают дипольный потенциал мембраны и вызывают разупорядочение липидов в бислой; б) только уменьшают дипольный потенциал; в) не влияют на распределение электрического поля на границах мембраны и ее фазовое состояние. Помимо флавоноидов количественно охарактеризовано влияние на физико-химические свойства мембран различного состава и ряда других дипольных модификаторов, стирилпиридиновых красителей и тиреоидных гормонов.

Разнообразие механизмов мембранотропного действия дипольных модификаторов делает их эффективными инструментами, позволяющими выяснить молекулярные механизмы формирования и функционирования ионных каналов. Эти средства были использованы для проведения большого объема исследований инкорпорированных в модельные мембраны ионных каналов различной природы. К наиболее значимым результатам исследования здесь следует отнести установление

дипольной природы воротного механизма, обеспечивающего кооперативное открывание сирингомициновых каналов; предложенную модель строения цекропиновых каналов; определение наиболее вероятной локализации сенсора напряжения в альфа-гемолизиновой поре; выявление различий геометрических характеристик открытого и закрытого состояний полиеновых каналов. В последнем случае удалось распространить широко обсуждаемую в литературе «геометрическую» гипотезу функционирования пептид-липидных пор на их полиеновые аналоги. Полученные результаты доказывают, что дипольные модификаторы, как и мембранные липиды, могут функционировать как молекулярные шапероны, обеспечивающие стабильность того или иного состояния канала.

Поиск фундаментальных закономерностей регуляции функционирования ионных каналов невозможен без сравнительного подхода с использованием современных методов экспериментальных исследований. Накопленный к настоящему моменту материал, полученный, в основном, на модельных системах, позволяет определить основные принципы управления ионными каналами, формируемыми экзогенными соединениями, с помощью дипольных модификаторов мембран. К ним относятся: универсальность, отражающая независимость липидопосредованных путей регуляции от химической природы порообразующих и диполь-модифицирующих агентов; комплексность, обусловленная множественностью изменяемых дипольными модификаторами параметров мембран; и амплификация, заключающаяся в усилении неоднородности свойств мембран.

Эффективность развитого в работе подхода, базирующегося на использовании дипольных модификаторов мембран для изучения функционирования ионных каналов, открывает перспективы дальнейшего изучения широкого круга проблем молекулярной биологии. Созданная теоретическая и экспериментальная база может быть применена для исследования липидопосредованной регуляции нативных каналов клеточных мембран.

Полученные в работе результаты исследования каналообразующей активности антибиотиков и токсинов в присутствии дипольных модификаторов мембран представляют практический интерес и могут быть использованы в медицинских приложениях, в частности, в области разработки новых лекарственных препаратов и их липосомных форм. Выявлены соединения, способные увеличивать активность противогрибковых полиеновых макролидных антибиотиков, применяющихся для лечения тяжелых инвазивных микозов. Обнаружено, что некоторые употребляемые в пищу полифенолы растительного происхождения способны подавлять формирование пор альфа-гемолизином золотистого стафилококка. Учитывая, что этот патоген возглавляет список возбудителей внутрибольничных инфекций, обнаруженные эффекты могут быть важны для разработки способов снижения его негативного воздействия на организм человека. Выявлен агент, способный изменять порообразующую способность

и агрегационный статус и, возможно, токсичность ряда амилоидогенных пептидов, ассоциированных с нейродегенеративными патологиями. Практический интерес представляют также сведения об индукции полиморфного фазового перехода в присутствии флавоноидов. Для установления структурной организации образующейся в присутствии флавоноидов небислойной фазы потребуются специальные исследования, но уже сейчас ясно, что это явление может быть использовано в методиках молекулярной биологии, например, для увеличения эффективности трансфекции.

Выводы

1. Разработаны принципы классификации флавоноидов по функциональным характеристикам взаимодействия с липидным бислоем. Можно выделить три класса соединений:
 - уменьшающие дипольный потенциал мембраны и вызывающие разупорядочение липидов в бислое;
 - снижающие потенциальный барьер для катионов в полярной области мембраны;
 - не оказывающие непосредственного влияния на распределение электрического поля на границах мембраны и ее фазовое состояние.
2. Дипольные модификаторы мембран могут быть предложены в качестве инструментов для изучения механизмов функционирования ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами в модельных липидных мембранах. Их применение позволяет установить регуляторную роль дипольного потенциала, геометрических характеристик мембранообразующих молекул и характера фазовой сегрегации в бислое.
3. Скачок потенциала в полярной области мембраны играет критическую роль в регуляции порообразующей активности антимикробных липопептидов и пептидов, которая состоит в изменении заряд-дипольных и диполь-дипольных взаимодействий в этой области, а именно:
 - дипольный потенциал мембраны влияет на проводимость ион-селективных каналов посредством изменения энергетического барьера для проникающих через канал ионов;
 - воздействие этого потенциала на воротный механизм приводит к изменениям времени жизни, кооперативности открывания ионных каналов и их потенциал-чувствительности;
 - рост дипольного потенциала мембраны сопровождается уменьшением и увеличением каналаобразующей активности положительно и отрицательно заряженных липопептидов, соответственно; в случае интеркаляции в

мембрану молекул (доменов) пептидов результат определяется ориентацией их дипольных моментов в липидном бислое.

4. Фазовая сегрегация компонентов мембраны приводит к неоднородному распределению дипольного потенциала в латеральном направлении и, тем самым, обуславливает различия в характеристиках ионных каналов, встроенных в упорядоченные и неупорядоченные липидные домены.
5. Встраивание в мембрану дипольных модификаторов или липидов, склонных к образованию неламеллярных фаз, приводит к изменению активности липидных пор, формируемых не только пептидами, как считалось ранее, но также липопептидами и полиеновыми макролидами. Влияние микроокружения сводится к изменению энергии закрытого и (или) открытого состояния канала, которая зависит от структурной геометрии липидов и модификаторов вблизи канала.
6. Возможно прямое электростатическое взаимодействие флавоноидов с ионными каналами. Таким образом флоретин изменяет агрегационный статус и каналобразующую активность бета-амилоидных пептидов, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Связывание 5-, 7- и 4'-гидроксилированных флавоноидов с сенсором напряжения альфа-гемолизиновой поры вызывает увеличение потенциал-чувствительности ее закрывания. Сенсор напряжения альфа-гемолизинового канала предположительно локализуется в глицин-богатом регионе с цитоплазматической стороны бета-складчатости.
7. Синергизм действия антимикробных агентов и дипольных модификаторов целесообразно учитывать при разработке оптимальных условий их применения в фармакологических целях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1a. **Ostroumova O.S.**, Kaulin Y.A., Gurnev A.P., Schagina L.V. Effect of agents modifying the membrane dipole potential on properties of syringomycin E channels // *Langmuir*. – 2007. – Vol. 23 (13). – P. 6889–6892.
- 2a. **Ostroumova O.S.**, Malev V.V., Bessonov A.N., Takemoto J.Y., Schagina L.V. Altering the activity of syringomycin E via the membrane dipole potential // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 24 (7). – P. 2987–2991.
- 3a. **Остроумова О.С.**, Щагина Л.В., Малев В.В. Влияние дипольного потенциала липидных бислоев на свойства ионных каналов, образованных циклическим липодепептидом сириномицином Е // *Биологические мембраны*. – 2008. – Том 25 (5). – С. 388–400.
- 4a. **Остроумова О.С.**, Щагина Л.В. Влияние флоретина на сфинголипидсодержащие мембраны, модифицированные сириномицином Е // *Биологические мембраны*. – 2009. – Том 26 (4). – С. 287–292.
- 5a. **Остроумова О.С.**, Ефимова С.С., Щагина Л.В. Проводимость фитотоксиновых каналов в присутствии больших органических ионов // *Цитология*. – 2009. – Том 51 (8). – С. 670–675.
- 6a. **Ostroumova O.S.**, Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. Surfactin activity depends on the membrane dipole potential // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26 (19). – P. 15092–15097.
- 7a. **Ostroumova O.S.**, Schagina L.V., Mosevitsky M.I., Zakharov V.V. Ion channel activity of brain abundant protein BASP1 in planar lipid bilayers // *FEBS J*. – 2011. – Vol. 278 (3). – P. 461–469.
- 8a. Ефимова С.С., **Остроумова О.С.**, Малев В.В., Щагина Л.В. Транспорт больших органических анионов через сириномициновые каналы в мембранах, содержащих дипольные модификаторы // *Цитология*. – 2011. – Том 53 (5). – С. 450–456.
- 9a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Schagina L.V. 5- and 4'-hydroxylated flavonoids affect voltage gating of single alpha-hemolysin pore // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2011. – Vol. 1808 (8). – P. 2051–2058.
- 10a. 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 (26). – P. 9908–9914.
- 11a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Schagina L.V. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7 (1). – P. e30261.
- 12a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Chulkov E.G., Schagina L.V. The interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7 (9). – P. e45135.
- 13a. Михайлова Е.В., Ефимова С.С., **Остроумова О.С.** Влияние RH 421 на активность амфотерицина в клеточных и модельных мембранах // *Цитология*. – 2013. – Том 55 (2). – С. 136–139.
- 14a. **Остроумова О.С.**, Ефимова С.С., Щагина Л.В. Изменения дипольного потенциала фосфолипидных мембран при адсорбции флавоноидов // *Биофизика*. – 2013. – Том 58 (3). – С. 474–480.
- 15a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Schagina L.V. Phloretin induced reduction in dipole potential of sterol containing bilayers // *J. Membr. Biol*. – 2013. – Vol. 246 (12). – P. 985–991.
- 16a. **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.

- 17a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Mikhailova E.V., Schagina L.V. The interaction of dipole modifiers with amphotericin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition // *Eur. Biophys. J.* – 2014. – Vol. 43 (4-5). – P. 207–215.
 - 18a. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Channel forming activity of cecropins in lipid bilayers. Effect of agents modifying the membrane dipole potential // *Langmuir.* – 2014. – Vol. 30 (26). – P. 7884–7892.
 - 19a. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** The influence of halogen derivatives of thyronine and fluorescein on the dipole potential of phospholipid membranes // *J. Membr. Biol.* – 2014. – Vol. 247 (8). – P. 739–745.
 - 20a. 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.
 - 21a. Ефимова С.С., Щагина Л.В., **Остроумова О.С.** Исследование каналообразующей активности полиеновых антибиотиков в липидных бислоях с использованием дипольных модификаторов // *Акта Натура.* – 2014. – Том 6 (4). – С. 72–85.
 - 22a. 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 (1). – P. 192–199.
 - 23a. Ефимова С.С., Захаров В.В., **Остроумова О.С.** Влияние дипольных модификаторов на каналообразующую активность амилоидных и амилоидоподобных пептидов в липидных бислоях // *Цитология.* – 2015. – Том. 57 (2). – С. 144–152.
 - 24a. Ефимова С.С., **Остроумова О.С.** Модификаторы дипольного потенциала липидных бислоев // *Акта Натура.* – 2015. – Том 7 (4). – С. 73–82.
 - 25a. Efimova S.S., Malev V.V., **Ostroumova O.S.** Effects of dipole potential modifiers on heterogenic lipid bilayers // *J. Membr. Biol.* – 2016. – Vol. 249. – doi:10.1007/s00232-015-9852-3.
 - 26a. Efimova S.S., Zakharova A.A., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Two types of syringomycin E channels in sphingomyelin-containing bilayers // *Eur. Biophys. J.* – 2016. – Vol. 45 (1). – P. 91-98.
 - 27a. Chulkov E.G., **Ostroumova O.S.** Phloretin modulates the rate of channel formation by polyenes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2016. – Vol. 1858 (2). – P. 289–294.
- Глава в книге:
- 28a. Malev V.V., **Ostroumova O.S.**, Takemoto J.Y., Schagina L.V. Voltage-dependent ion channels induced by cyclic lipodepsipeptides in planar lipid bilayers: structure, properties, and resemblance to native channels. In: A. Leitmannova Liu (Ed.), *Advances in planar lipid bilayers and liposomes.* – Amsterdam: Elsevier. – 2008. – Vol. 8. – P. 59–106.
- Обзор:
- 29a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Malev V.V. Modifiers of membrane dipole potentials as tools for investigating ion channel formation and functioning. In: K.W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology.* – 2015. – P. 245–297.
- Учебное пособие:
- 30a. **Остроумова О.С.**, Ефимова С.С., Малев В.В., Щагина Л.В. Современные проблемы биофизики. Ионные каналы в модельных липидных мембранах: Учеб. пособие. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2013. – 122 с.

Список цитируемой литературы

- [1]. Montal M., Muller P. // *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. – 1972. – Vol. 65. – P. 3561-3566. [2]. Andersen O.S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. // *J. Gen. Physiol.* – 1976. – Vol. 67. – P. 749-771. [3]. Cseh R., Hetzer M., Wolf K., Kraus J., Bringmann G., Benz R. // *Eur. Biophys. J.* – 2000. – Vol. 29. – P. 172-183. [4]. Malkov D.Y., Sokolov V.S. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1996. – Vol. 1278. – P. 197-204. [5]. Veatch S.L., Keller S.L. // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 85. – P. 3074-3083. [6]. Muddana H.S., Chiang H.H., Butler P.J. // *Biophys. J.* – 2012. – Vol. 102. – P. 489-497. [7]. Heerklotz H., Seelig J. // *Eur. Biophys. J.* – 2007. – Vol. 36. – P. 305-314. [8]. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрашилов Б.С., Музафаров Е.Н. – Пущино: Synchronobook, 2013. – 310 с. [9]. Xu Y.C., Leung S.W., Yeung D.K., Hu L.H., Chen G.H., Che C.M., Man R.Y. // *Phytochemistry*. – 2007. – Vol. 68. – P. 1179-1188. [10]. Aparicio S. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. – Vol. 11. – P. 2017-2038. [11]. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. // *Mol. Cell Biochem.* – 2008. – Vol. 314. – P. 65-71. [12]. de Levie R., Rangarajan S.K., Seelig P.F., Andersen O.S. // *Biophys. J.* – 1979. – Vol. 25. – P. 295-300. [13]. Ollila F., Halling K., Vuorela P., Vuorela H., Slotte J.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 399. – P. 103-108. [14]. Цыбульская М.В., Антоненко Ю.Н., Тропша А.Е., Ягужинский Л.С. // *Биофизика*. – 1984. – Т. 29. – С. 801-805. [15]. Petruk A.A., Marti M.A., Alvarez R.M. // *J. Chem. B.* – 2009. – Vol. 113. – P. 13357-13364. [16]. Issé B.A., Yunes Quartino P., Fidelio G.D., Farias R.N. // *Chem. Phys. Lipids*. – 2013. – Vol. 175-176. – P. 131-137. [17]. Auner B.G., O'Neill M.A., Valenta C., Hadgraft J. // *Int. J. Pharm.* – 2005. – Vol. 294. – P. 149-155. [18]. Тараховский Ю.С. – М.: Издательство ЛКИ, 2011. – 280 с. [19]. Rokitskaya T.I., Antonenko Y.N., Kotova E.A. // *Biophys. J.* – 1997. – Vol. 73. – P. 850-854. [20]. Busath D.D., Thulin C.D., Hendershot R.W., Phillips L.R., Maughan P., Cole C.D., Bingham N.C., Morrison S., Baird L.C., Hendershot R.J., Cotton M., Cross T.A. // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 75. – P. 2830-2844. [21]. Luchian T., Mereuta L. // *Langmuir*. – 2006. – Vol. 22. – P. 8452-8457. [22]. Mereuta L., Asandei A., Luchian T. // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – P. e25276. [23]. Matsuzaki K., Sugishita K., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K., Epand R.M. // *Biochem.* – 1998. – Vol. 37. – P. 11856-11863. [24]. Allende D., Simon S.A., McIntosh T.J. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores // *Biophys. J.* – 2005. – Vol. 88. – P. 1828-1837. [25]. Hwang T.C., Koeppe R.E., Andersen O.S. // *Biochem.* – 2003. – Vol. 42. – P. 13646-13658. [26]. Sobko A.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Zakharov S.D., Cramer W.A. // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 576. – P. 205-210. [27]. Sobko A.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Zakharov S.D., Cramer W.A. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 14408-14416. [28]. Basañez G., Shinnar A.E., Zimmerberg J. // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol. 532. – P. 115-120. [29]. Valcarcel C.A., Dalla Serra M., Potrich C., Bernhart I., Tejuca M., Martinez D., Pazos F., Lanio M.E., Menestrina G. // *Biophys. J.* – 2001. – Vol. 80. – P. 2761-2774. [30]. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – Vol. 1790. – P. 809-816. [31]. De Lucca A.J., Walsh T.J. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43. – P. 1-11. [32]. Takemoto J.Y., Brand J.G., Kaulin Y.A., Malev V.V., Schagina L.V., Blasko K. In: G. Menestrina, M. Dalla Serra, P. Lazarovici (Eds.), *Pore forming peptides and protein toxins*. – London: Taylor&Francis. – 2003. – P. 260-271. [33]. Feigin A.M., Takemoto J.Y., Wangspa R., Teeter J.H., Brand J.G. // *J. Membr. Biol.* – 1996. – Vol. 149. – P. 41-47. [34]. Щагина Л.В., Каулин Ю.А., Фейгин А.М., Такемото Д., Бранд Д., Малев В.В. // *Биол. мембр.* – 1998. – Том 15. – С. 433-446. [35]. Kaulin Y.A., Schagina L.V., Bezrukov S.M., Malev V.V., Feigin A.M., Takemoto J.Y., Teeter J.H., Brand J.G. // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 74. – P. 2918-2925. [36]. Остроумова О.С., Гурьев Ф.А., Такемото Д., Щагина Л.В., Малев В.В. // *Цитология*. – 2005. – Том 47. – С. 338-343. [37]. Остроумова О.С., Малев В.В., Щагина Л.В. // *Биол. мембр.* – 2006. – Том 23. – С. 412-419. [38]. Ostroumova O.S., Malev V.V., Kaulin Yu.A., Gurnev Ph.A., Takemoto J.Y., Schagina L.V. // *FEBS Letters*. – 2005. – Vol. 579. – P. 5675-5679. [39]. Malev V.V., Schagina L.V., Gurnev P.A., Takemoto J.Y., Nestorovich E.M., Bezrukov S.M. // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 82. – P. 1985-1994. [40]. Sheppard J.D., Jumarie C., Cooper D.G., Laprade R. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1991. – Vol. 1064. – P. 13-23. [41]. Vollenbroich D., Ozel M., Vater J., Kamp R.M., Pauli G. // *Biologicals*. – 1997. – Vol. 25. – P. 289-297. [42]. Vollenbroich D., Pauli G., Ozel M., Vater J. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – P. 44-49. [43]. Kikuchi T., Hasumi K. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2002. – Vol. 1596. – P. 234-245. [44]. Singh P., Cameotra S.S. // *Trends*

Biotechnol. – 2004. – Vol. 22. – P. 142-146. [45]. Byeon S.E., Lee Y.G., Kim B.H., Shen T., Lee S.Y., Park H.J., Park S.C., Rhee M.H., Cho J.Y. // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 18. – P. 1984-1989. [46]. Fink J., Boman A., Boman H.G., Merrifield R.B. // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1989. – Vol. 33. – P. 412-421. [47]. Shai Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1462. – P. 55-70. [48]. Christensen B., Fink J., Merrifield R.B., Mauzerall D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 5072-5076. [49]. Durell S.R., Raghunathan G., Guy H.R. // *Biophys. J.* – 1992. – Vol. 63. – P. 1623-1631. [50]. Chen H.M., Lee C.H. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2001. – Vol. 19. – P. 193-199. [51]. Arispe N., Pollard H.B., Rojas E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 10573-10577. [52]. Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 567-571. [53]. Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B., Kagan B., Ghiso J., Lal R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 10427-10432. [54]. Demuro A., Smith M., Parker I. // *J. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 195. – P. 515-524. [55]. Gouaux E. // *J. Struct. Biol.* – 1998. – Vol. 121. – P. 110-122. [56]. Song L., Hobaugh M.R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J.E. // *Science.* – 1996. – Vol. 274. – P. 1859-1866. [57]. Korchev Y.E., Alder G.M., Bakhramov A., Bashford C.L., Joomun B.S., Sviderskaya E.V., Usherwood P.N., Pasternak C.A. // *J. Membr. Biol.* – 1995. – Vol. 143. – P. 143-151. [58]. Korchev Y.E., Bashford C.L., Alder G.M., Kasianowicz J.J., Pasternak C.A. // *J. Membr. Biol.* – 1995. – Vol. 147. – P. 233-239. [59]. Jordan P.C. // *Biophys. J.* – 1983. – Vol. 41. – P. 189-195. [60]. Craven P.C., Gremillion D.H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1985. – Vol. 27. – P. 868-871. [61]. Shigemi A., Matsumoto K., Ikawa K., Yaji K., Shimodozono Y., Morikawa N., Takeda Y., Yamada K. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2011. – V. 38. – P. 417-420. [62]. Torrado J.J., Espada R., Ballesteros M.P., Torrado-Santiago S. // *J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 97. – P. 2405-2425. [63]. Касумов Х.М. – М.: Наука, 2009. – 512 с. [64]. Czub J., Baginski M. // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – Vol. 110. – P. 16743-16753. [65]. Neumann A., Baginski M., Czub J. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132. – P. 18266-18272. [66]. Bezrukov S.M. // *Current Opinion in Colloid. Interface Sci.* – 2000. – Vol. 5. – P. 237-243.

Список используемых сокращений и обозначений

ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин
ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин
ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин
ДОФС – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин
ДОФЭ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин
СФС – N-стеароил-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae*
СМ – сфингомиелин
Хол – холестерин
Эрг – эргостерин
ЛР-ДПФЭ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамин)
ТГАФ – 2',4',6'- моногидрат тригидроксиацетофенона
СМЕ – сириномицин Е
СФ – сурфактин
ЦА – цекропин А
ЦВ – цекропин В
АβП – фрагмент β-амилоидного пептида
α-ГЛ – α-гемолизин *Staphylococcus aureus*
АМВ – амфотерицин В

НС – нистатин
 ϕ_d – дипольный потенциал мембраны
K – константа десорбции
C – концентрация мембранотропного агента
 l_d – жидкая неупорядоченная фаза
 l_o – жидкая упорядоченная фаза
 s_o – твердая упорядоченная фаза
 T_m – температура плавления липида
 $T_{1/2}$ – ширина пика на полувысоте
R – относительная величина утечки флуорофора из липосом
V – поданное на мембрану напряжение
m – среднее нормированное число синхронно функционирующих каналов
g – проводимость одиночных каналов
 τ_{on} – время жизни одиночных каналов
 i_{sc} – средний нормированный трансмембранный ток, протекающий через одиночные каналы
 I_{∞} – стационарный ток, протекающий через плоский липидный бислой
 N_{op} – стационарное число открытых каналов
A – параметр, характеризующий коэффициент распределения порообразующего агента между мембраной и водной фазой
q – эффективный воротный заряд канала