

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи
УДК 577.352.26; 615.28

ОСТРОУМОВА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

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

03.01.03 – молекулярная биология

диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург
2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
- Цели и задачи исследования	7
- Научная новизна работы	8
- Теоретическая и практическая значимость работы	9
- Методология и методы исследования	10
- Основные положения, выносимые на защиту	10
- Достоверность полученных результатов	11
- Апробация работы	11
- Публикации	12
- Объем и структура диссертации	12
- Финансовая поддержка работы	12
- Личный вклад автора	12
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Влияние модификации физико-химических свойств липидного бислоя на транспорт ионов через ионные каналы	13
1.1.1. <i>Эффекты дипольного потенциала мембраны</i>	14
1.1.1.1. Зависимость свойств одиночных грамицидиновых каналов от дипольного потенциала мембраны	17
1.1.1.2. Каналообразующая активность аламетицина в мембранах с различным дипольным потенциалом	18
1.1.1.3. Изменение энергии связывания мелиттина с липидным бислоем при варьировании его дипольного потенциала	20
1.1.2. <i>Роль геометрических характеристик мембранообразующих липидов</i>	21
1.1.2.1. Влияние распределения профиля латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности бислоя на формирование тороидальных пор мелиттином	25
1.1.2.2. Зависимость каналообразующей активности магаинина от геометрии мембранообразующих молекул	26
1.1.2.3. Колициновые каналы в мембранах, сформированных с участием склонных к образованию неламеллярных фаз липидов	26
1.1.2.4. Роль соответствия длины гидрофобной части грамицидинового канала толщине углеводородного остова мембраны в порообразующей способности пептида	27
1.1.2.5. Влияние формы липидов на активность пор, образованных кателицидинами	29
1.1.2.6. Порообразующая способность актинопоринов в присутствии липидов нецилиндрической формы	29
1.1.2.7. Стабилизация открытого состояния аламетицинового канала в бислоях из липидов, имеющих форму инвертированных конусов	31
1.1.3. <i>Влияние фазового состояния липидов</i>	33
1.1.3.1. Аламетициновые каналы в фосфолипидных мембранах,	

включающих холестерин и сфингомиелин	36
1.1.3.2. Возможное взаимодействие актинопоринов с упорядоченными мембранными доменами	36
1.2. Дипольные модификаторы мембран	38
1.2.1. Флавоноиды	38
1.2.1.1. Классификация флавоноидов	38
1.2.1.2. Потенциальная фармакологическая активность флавоноидов	43
1.2.1.3. Действие флавоноидов на липидный бислой	48
1.2.2. Стирилпиридиновые красители	55
1.2.3. Тиреоидные гормоны	57
1.3. Краткая характеристика объектов исследования	59
1.3.1. Ионные каналы, формируемые липопептидами	59
1.3.1.1. Противогрибковые липодепсинанопептиды <i>Pseudomonas syringae</i>	59
1.3.1.2. Антимикробный липопептид сурфактин <i>Bacillus subtilis</i>	64
1.3.2. Ионные каналы, образуемые соединениями пептидной природы	66
1.3.2.1. Антимикробные пептиды <i>Cecropia</i>	66
1.3.2.2. Амилоидогенные и амилоидоподобные пептиды и белки	70
1.3.2.3. Альфа-токсин <i>Staphylococcus aureus</i>	74
1.3.3. Ионные каналы, образуемые макролидными полиеновыми антимикотиками	77
1.4. Липидопосредованная регуляция ионных каналов, формируемых экзогенными соединениями: проблемы и перспективы	83
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	88
2.1. Материалы	88
2.2. Реконструкция ионных каналов в плоские липидные бислои и регистрация токов проводимости	90
2.1.1. Проводимость одиночных каналов	94
2.1.2. Время жизни каналов	95
2.1.3. Стационарный макроскопический трансмембранный ток	96
2.1.4. Катион-анионная избирательность каналов	97
2.3. Определение изменений дипольного потенциала бислоев	98
2.4. Конфокальная флуоресцентная микроскопия липосом	100
2.5. Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия одноламеллярных везикул	101
2.6. Флуориметрия утечки кальцеина из липосом	102
Глава 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	104
3.1. Характеристика изменений физико-химических свойств липидных бислоев при адсорбции дипольных модификаторов мембран. Анализ структурно-функциональных связей	104
3.1.1. Дипольный потенциал липидных бислоев	104
3.1.1.1. Действие флавоноидов на дипольный потенциал мембран различного состава	105
3.1.1.2. Влияние стирилпиридиновых красителей на дипольный	

потенциал мембран	128
3.1.1.3. Диполь-модифицирующая способность гормонов щитовидной железы	131
3.1.2. <i>Фазовое разделение в липидном бислое</i>	134
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	134
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	139
3.1.2.3. Влияние дипольных модификаторов мембран на температуру плавления насыщенных липидов	142
3.1.3. <i>Проницаемость липидных бислоев для кальцеина</i>	147
3.2. Молекулярные механизмы функционирования ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами. Регуляторная роль дипольных модификаторов мембран	150
3.2.1. <i>Ионные каналы, формируемые синрингомицином E</i>	151
3.2.1.1. Синрингомициновые каналы в фосфолипидных бислоях	151
3.2.1.2. Синрингомициновые каналы в сфинголипид-содержащих мембранах	166
3.2.2. <i>Ионные каналы, образуемые сурфактином</i>	172
3.2.3. <i>Порообразующая способность цекропинов</i>	179
3.2.4. <i>Ионные каналы, индуцированные олигомерами амилоидных пептидов</i>	191
3.2.5. <i>Одиночная альфа-гемолизиновая пора</i>	198
3.2.6. <i>Каналообразующая активность полиеновых макролидных антибиотиков</i>	208
3.2.6.1. Симметричные полиеновые каналы	208
3.2.6.2. Асимметричные полиеновые каналы	222
3.3. Общие закономерности липидопосредованной регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами	233
Заключение	237
Выводы	240
Перечень принятых сокращений и условных обозначений	242
Список основных публикаций автора по теме диссертации	244
Список литературы	252

ВВЕДЕНИЕ

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 или 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 незранируемого ионами раствора скачка потенциала, обусловленного ориентацией диполей молекул липидов и молекул воды на границе раздела фаз и называемого ее дипольным потенциалом. Его роль в регуляции различных мембранных процессов, в том числе в функционировании 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 одноламеллярных 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, а, 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 класс 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 головок 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-гемолизиновой 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 липид-опосредованной 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, 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 одноламеллярные липосомы. Применение известной техники регистрации токов, протекающих через плоские липидные бислои, в присутствии ионофоров позволяет оценить эмпирические параметры, характеризующие изменения в распределении электрического поля на границах мембран и тем самым качественно и количественно охарактеризовать изменение дипольной компоненты граничного потенциала. 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 одноламеллярных 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, сирингомицином E и сурфактином, и 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 ее 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 сирингомицином 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 А-цикла, а также в 4'-положении В-цикла, увеличивают потенциал-чувствительность закрывания одиночной альфа-гемолизиновой 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.

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.

Финансовая поддержка работы

Работа проводилась при частичной финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (государственный контракт № П1372, соглашение № 8119), гранта Президента РФ (МК-1813.2012.4), грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№№12-04-31332, 12-04-33121, 15-34-20356), гранта Российского научного фонда (№ 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

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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Изучение процессов формирования и функционирования ионных каналов – одна из актуальных проблем современной молекулярной биологии и фармакологии. При этом участию липидного матрикса не всегда уделяется должное внимание. В большинстве случаев авторы ограничиваются описанием эффектов, хотя в литературе можно обнаружить и замечательные работы, содержащие некоторое систематическое изложение имеющихся данных [30, 46, 275, 424].

1.1. Влияние модификации физико-химических свойств липидного бислоя на транспорт ионов через ионные каналы

Следует особо отметить, что при взаимодействии любого экзогенного вещества с клеткой-мишенью, первичным этапом является его связывание с мембраной. Во многих случаях взаимодействие приводит к нарушению барьерных функций мембраны за счет образования ион-проницаемых трансмембранных пор. Это может быть первым шагом на пути разрушения мембраны и приводить к гибели клетки. Изучение принципов формирования и функционирования ионных каналов и выявление роли различных физико-химических факторов в процессах порообразования способствуют поиску потенциальных мишеней регуляции мембранной активности различных соединений, в том числе, обладающих цитотоксическими и фармакологическими свойствами.

Как уже отмечалось, к физико-химическим параметрам мембраны, способным влиять на ее проницаемость для ионов, прежде всего, следует отнести межфазный скачок электрического потенциала. Граничным потенциалом принято называть разность потенциалов между двумя параллельными поверхностями мембраны плоскостями, одна из которых расположена в объеме водной фазы, а другая – в центре бислоя. Этот скачок потенциала состоит из двух компонент, поверхностного и дипольного потенциалов [132]. Величина поверхностного потенциала отражает плотность заряженных групп на мембране и их экранирование противоионами электролита, создающими двойной электрический слой. Важно, что независимо от липидного состава гидрофобная область мембраны всегда оказывается положительной по отношению к объему водной фазы. Причиной является существование неэкранируемого ионами раствора скачка потенциала, называемого дипольным. Он обусловлен ориентацией диполей молекул мембранных липидов и молекул гидратной воды. Также необходимо учитывать механические свойства мембраны, под которыми может пониматься целый ряд взаимозависимых характеристик,

включающих текучесть липидного бислоя, профиль распределения латерального давления, определяемый формой мембранообразующих молекул, модуль упругости, поверхностное натяжение и др. В последнее время литературные данные указывают на необходимость принимать во внимание и латеральную (т.е. в плоскости мембраны) гетерогенность указанных свойств, обусловленную одновременным существованием в мембране липидных областей с различным агрегатным состоянием.

В этой главе мы постараемся дать обоснование постулату о том, что по отклику каналов на изменение параметров мембраны можно судить об их строении и свойствах. Среди свойств мембраны будут обсуждены только те характеристики, которые представляют интерес с точки зрения возможности их направленной регуляции, например, при введении в бислой соответствующего модификатора.

1.1.1. Эффекты дипольного потенциала мембраны

Как уже отмечалось, межфазный скачок потенциала на границах мембраны представляет собой сумму поверхностного и дипольного потенциалов. Фиксированные на поверхности мембраны заряды, в частности, диссоциирующие группы полярных головок мембранных липидов, ионизирующиеся группы аминокислотных остатков в составе мембранных белков и притягивающиеся к ним противоионы электролита создают двойной электрический слой. Теоретическое рассмотрение этого явления развито в работах Гуи и Чепмена, и впоследствии дополнено Штерном [294]. Поверхностный потенциал определяет локальные концентрации ионов, что обуславливает его влияние на проводимость каналов. Очевидно, что отрицательный поверхностный заряд мембраны должен приводить к уменьшению (увеличению) концентрации анионов (катионов) в примембранном слое. Этому соответствуют изменения проводимости высоко селективных каналов. Следует также отметить, что поверхностный потенциал играет существенную роль в антибактериальном действии многих белков и пептидов. Дело в том, что большинство антимикробных агентов несут положительный заряд, что обеспечивает их первичное взаимодействие с отрицательно заряженными мембранами клеток-мишеней. Изучению влияния поверхностного потенциала мембран на ионный транспорт посвящено большое число обзоров, например, [342, 452]. При этом роль другой компоненты граничного потенциала мембраны, ее дипольного потенциала, в регуляции различных мембранных процессов до сих пор не достаточно изучена.

Неэкранируемая компонента граничного потенциала, связанная с ориентацией диполей липидов и гидратной воды, называется дипольным потенциалом мембраны, ϕ_d .

Положительный потенциал воды почти полностью компенсируется отрицательным потенциалом липидной компоненты [8], и, в результате, между углеводородным остовом мембраны и объемом водной фазы возникает падение электрического потенциала, оцениваемое как 200÷400 мВ (рис. 1.1).

Связь между дипольным потенциалом мембраны, дипольным моментом молекул, расположенных на границе раздела фаз, поверхностной плотностью диполей и диэлектрической проницаемостью мембраны выражается уравнением Гельмгольца [73]:

$$\varphi_d = \frac{\mu_{\perp} n}{\varepsilon_0 \varepsilon}, \quad (1.1)$$

где $\mu_{\perp}$ – средняя проекция дипольного момента липидных молекул (с учетом ассоциированной воды) на нормаль к плоскости мембраны; n – поверхностная плотность диполей, ε – диэлектрическая проницаемость мембраны.

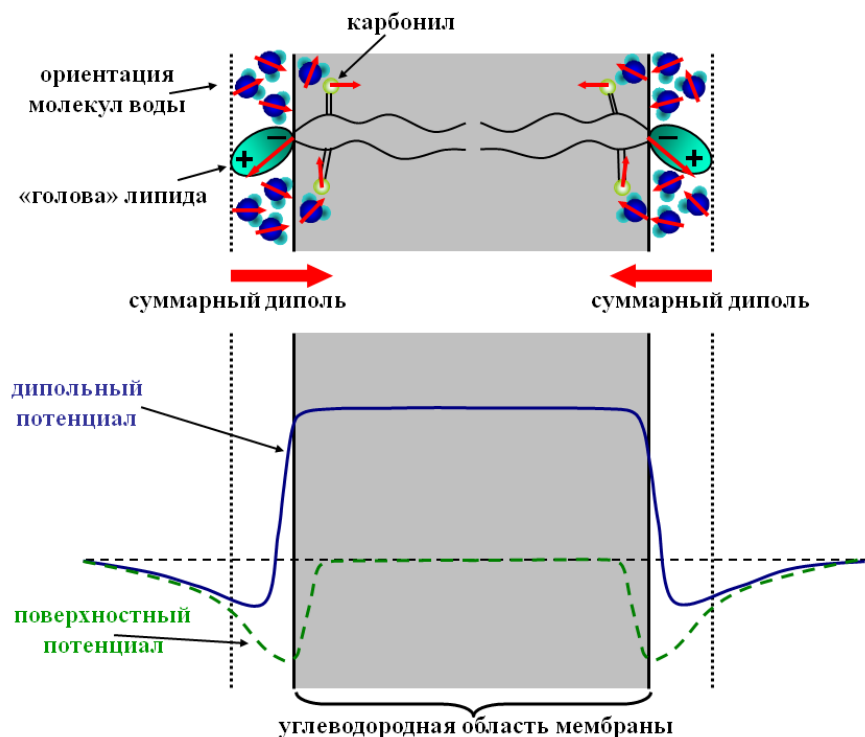


Рис. 1.1. Распределение электрического поля на границе мембраны.

Дипольный потенциал мембраны определяется ее липидным составом. Так, в случае фосфолипидов, существенную роль играют степень ненасыщенности, длина и число углеводородных цепей [100, 337, 404], а также вид эфирной связи [159]. Брокман с соавторами показали, что малые вариации в структуре предшественников и продуктов биodeградации сфинголипидов, церамидов, значительно влияют на дипольный потенциал включающих их мембран [74]. Также следует учитывать стеринный состав липидного

бислоя. В частности, холестерин (Хол), основной стерин мембран клеток млекопитающих, увеличивает дипольный потенциал [405, 187]. Причем зависимость дипольного потенциала Хол-содержащих мембран от концентрации стерина немонотонна [405]. Более того, недавно выявлена зависимость φ_d от стереоизомеризации холестерина [52]. При этом непосредственный предшественник холестерина на его биосинтетическом пути, 7-дегидрохолестрин, а также его эволюционный предшественник, эргостерин, на величину дипольного потенциала мембраны не влияют [177]. Кето-производные стеринов способны изменять величину дипольного потенциала, в частности, 6-кетохолестанол в значительной степени увеличивает, в то время как 7-кетохолестанол (7-КХ) слабо уменьшает φ_d [405]. Кроме того, включение в мембрану низкомолекулярных веществ амфифильной природы, как правило, обладающих существенным дипольным моментом и характеризующихся специфической ориентацией на границе раздела фаз мембрана-раствор, также приводит к изменению неэкранируемого скачка потенциала. Такие соединения принято называть дипольными модификаторами мембран, им посвящена глава 1.2.

Абсолютную величину дипольного потенциала мембраны, измерить невозможно, но ее можно оценить. Например, из сравнения проводимости мембраны в присутствии гидрофобных ионов с одинаковой структурой, но разным знаком заряда [29, 450]. На практике в большинстве случаев важно знать не столько абсолютную величину потенциала, сколько ее изменение вследствие каких-либо произошедших процессов, например, адсорбции дипольных модификаторов. Обзор имеющихся методов оценки относительного изменения дипольного потенциал приведен в работе Ванга [450]. Наиболее удобным объектом для экспериментального изучения являются плоские бислойные липидные мембраны. Существуют три разновидности методов, которые могут быть применены к этому типу объектов: измерения интенсивности флуоресценции потенциал-чувствительных красителей [101, 307], регистрация индуцированной ионофорами проводимости липидных бислоев [29, 106, 142] и метод компенсации внутримембранного поля [12, 13]. Все указанные способы имеют свои недостатки. В частности, одним из существенных и не всегда обоснованных допущений при оценке дипольного потенциала мембраны с помощью флуоресцентных потенциал-чувствительных красителей является предположение о том, что сам краситель на величину граничного потенциала не влияет. При этом к неоспоримым преимуществам этого метода следует отнести возможность его применения для измерения дипольного потенциала клеточных мембран [209, 394]. К недостаткам метода, основанного на исследовании проводимости липидных бислоев, стоит отнести допущение, что на величину проводимости не влияют другие факторы, не имеющие отношения к

электростатическим потенциалам, например, исключается зависимость подвижности заряженных комплексов от текучести мембраны. Третий способ, измерения разности граничных потенциалов асимметричных липидных бислоев путем регистрации внутримембранного поля, применим только для тех модификаторов, которые не способны проникать через мембрану. Учитывая возможное влияние флуоресцентных проб на величину дипольного потенциала мембраны и способность некоторых тестируемых дипольных модификаторов проходить через липидный бислой, в работе был использован метод определения изменения дипольного потенциала при адсорбции модификаторов с помощью измерения проводимости мембран. Наиболее значимые результаты были независимо подтверждены другим методом. Подробное описание приведено в главе 2.3.

Поскольку электрический потенциал углеводородного остова мембраны положителен относительно окружающей ее фазы, очевидно, что снижение дипольного потенциала приведет к падению энергетического барьера для проникновения через липидный бислой положительно заряженных ионов. Это может сопровождаться увеличением проводимости катион-селективных каналов. Дипольный потенциал также может влиять на энергию встраивания в мембрану каналобразующих веществ, характеризующихся значительным дипольным моментом и его ненулевой проекцией на нормаль к поверхности бислоя. Это приведет к изменению стационарного числа функционирующих каналов в мембране. Конкретные примеры будут рассмотрены ниже.

1.1.1.1. Зависимость свойств одиночных грамицидиновых каналов от дипольного потенциала мембраны

Грамицидин А – пептидный антибиотик, продуцируемый бактериями *Bacillus brevis*. В липидных бислоях и клеточных мембранах грамицидин формирует катион-селективные поры. Каждая пора диаметром 0.4 нм и длиной 2.5 нм образована двумя одиночными спиралями, ассоциированными «голова к голове» [31]. При исследовании вольт-амперных характеристик грамицидиновых каналов в мембранах различного состава Бусат с соавторами обнаружили, что проводимость одиночной поры приблизительно в два раза больше в бислоях, сформированных из глицеролмоноолеата, по сравнению с мембранами из дифитаноилфосфохолина [80]. Соответствующее различие дипольного потенциала указанных бислоев составляет около 100 мВ [159]. Это должно соответствовать 100-кратной разнице в проводимостях грамицидиновых каналов. Несоответствие расчетных и экспериментальных значений указывает на компенсацию части скачка потенциала за счет высокой поляризуемости воды внутри грамицидиновой

поры [211]. Рокицкая и др. [359], изучая влияние дипольных модификаторов мембран, флоретина, 6-кетохолестанола и RH 421, на свойства одиночных грамицидиновых каналов в дифитаноилфосфохолиновых мембранах, показали, что снижение дипольного потенциала мембраны за счет адсорбции флоретина приводит не только к росту проводимости, но и к увеличению времени жизни грамицидиновых каналов. Авторы предположили, что последнее может быть результатом перемещения индольных диполей триптофановых остатков грамицидина в области скачка потенциала при ассоциации-диссоциации грамицидиновых димеров. Увеличение проводимости канала при уменьшении дипольного потенциала авторы отнесли к высокой катионной (калиевой) специфичности грамицидиновых пор. При этом оказалось, что протонная проводимость грамицидиновых каналов падает при уменьшении дипольного потенциала мембраны [360]. Авторы цитируемой работы предположили, что одним из скорость-лимитирующих процессов транспорта протонов является движение в грамицидиновом канале "отрицательных ионных дефектов" в противоположную протоном сторону.

1.1.1.2. Каналообразующая активность аламетицина в мембранах с различным дипольным потенциалом

Аламетицин – линейный пептид, состоящий из 20 аминокислотных остатков, является продуктом жизнедеятельности гриба *Trichoderma viride*. Несмотря на то, что пептид природного происхождения в физиологических условиях незаряжен, молекула антибиотика характеризуется высоким дипольным моментом [126]. В бислойных липидных мембранах аламетицин образует потенциал-зависимые катион-селективные каналы многоуровневой проводимости. Аламетициновый канал устроен по принципу «бочонка». Согласно этой модели аламетициновая пора может увеличиваться в диаметре за счет встраивания в нее новых молекул пептида. Разные подуровни проводимости канала могут включать от четырех до одиннадцати α -спиралей аламетицина [259]. Предположение о влиянии дипольного потенциала мембраны на порообразующую активность аламетицина было выдвинуто еще в работах Латорре с соавторами [257, 258], однако детальное исследование было проведено Лучианом и Мереута значительно позже [274]. Они показали, что уменьшение дипольного потенциала бислоя из дифитаноилфосфохолина на 40 мВ за счет введения 500 мМ флоридина со стороны добавки антибиотика вызывает 20 %-рост амплитуды первого подуровня проводимости аламетицинового канала и четырех кратное увеличение каналообразующей активности пептида. При этом в бислоях, включающих 50 моль % 6-кетохолестанола,

увеличивающего дипольный потенциал мембраны, наблюдается уменьшение проводимости первого подуровня на 6 %, а флуктуации одиночных аламетициновых каналов отмечаются при большем (на 30 мВ) трансмембранном потенциале. Как и в случае грамицидина А, Лучиан и Мереута отнесли изменения проводимости аламетициновых пор к их преимущественно катионной селективности. Авторы также предположили механизм, связывающий активность пептида с дипольным потенциалом мембраны. Согласно выдвинутой гипотезе уменьшение скачка потенциала на границе раздела бислоя-раствор облегчает погружение в липидный бислой N-конца пептида, несущего частичный положительный заряд (рис. 1.2). В результате активность аламетицина увеличивается. Впоследствии Мереута и др. продемонстрировали качественно сходные эффекты при введении флорицина и RH 421 со стороны, противоположной добавке порообразующего пептида [298]. Они обнаружили, что *транс*-введение флорицина также вызывает заметный рост амплитуды подуровней проводимости аламетициновых пор и мембранной активности пептида. Добавка RH 421 приводит к обратным эффектам. Авторы связали наблюдаемые изменения с асимметрией скачка дипольного потенциала в мембране. Асимметрия обусловлена тем, что используемый дипольный модификатор, флорицин, не проникает через бислой.

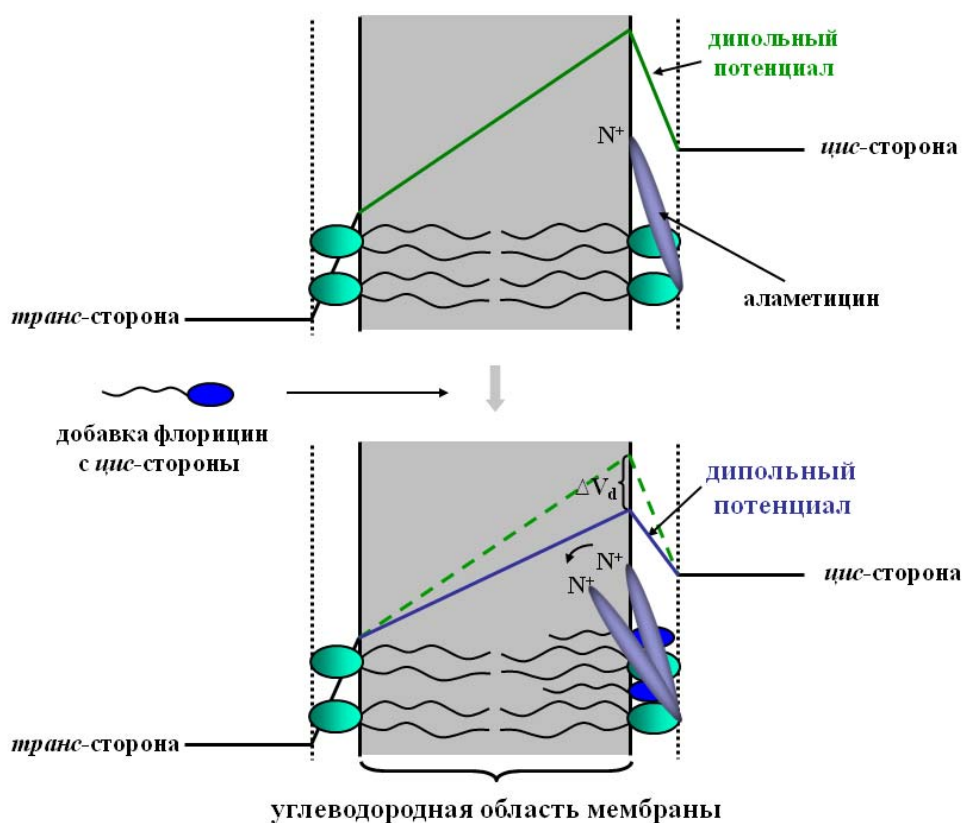


Рис. 1.2. Схематическое представление механизма увеличения порообразующей активности аламетицина при снижении дипольного потенциала цис-монослоя.

1.1.1.3. Изменение энергии связывания мелиттина с липидным бислоем при варьировании его дипольного потенциала

Мелиттин – небольшой линейный антибактериальный пептид, состоящий из 26 аминокислотных остатков. N-конец пептида преимущественно гидрофобен, в то время как C-конец, благодаря наличию участка с положительно заряженными аминокислотными остатками, гидрофилен. Мелиттин является основным компонентом яда медовой пчелы *Apis mellifera*. Несмотря на выраженную антибактериальную активность, пептид проявляет токсическое действие и в отношении клеток млекопитающих, в частности, он вызывает гемолиз эритроцитов [380]. Сродство положительно заряженного пептида к отрицательно заряженным липидам в 100 раз выше, чем к незаряженным [57]. В плоских липидных бислоях мелиттин формирует потенциал-зависимые ионные каналы многоуровневой проводимости [427].

Используя методы молекулярной динамики Зхан и Лазаридис [471] показали, что увеличение дипольного потенциала мембраны должно сопровождаться увеличением энергии связывания мелиттина с липидным бислоем. Как и в случае аламетицина (1.1.1.2), авторы связали наблюдаемые эффекты с погружением пептида в бислой N-концом. Интересно, что Алленде с соавторами продемонстрировали увеличение свободной энергии связывания мелиттина с мембраной при введении 6-кетохолестанола [25]. Однако предложенные авторами механизмы изменения активности пептида не включают увеличения дипольного потенциала мембраны в присутствии указанного стерина. В качестве ключевых факторов в цитируемой работе рассматриваются эластические свойства липидного бислоя.

Таким образом, литературные данные позволяют говорить о влиянии дипольного потенциала на функционирование каналов, формируемых соединениями пептидной природы. В основном, это проявляется в изменении барьера для проникающих через канал ионов и энергетических затрат на погружение в бислой пептидов, молекулы которых характеризуются некоторым дипольным моментом. Можно думать, что подобная зависимость будет наблюдаться и для других полярных соединений, а также в случае встраивания в мембрану заряженных агентов. При этом эффекты должны определяться именно электрическими свойствами порообразующих молекул независимо от их химической природы. Это обусловило наш интерес к формирующим каналы липопептидам, несущим заряд в физиологических условиях (1.3.1), и полиеновым макролидам, молекулы которых имеют полярную "голову" (1.3.3). Другим важным аспектом является возможность компенсации части дипольного потенциала внутри

канала. Можно думать, что этот эффект зависит не только от геометрических характеристик водной поры, но и от толщины "стенок" канала, электрические свойства которых существенно отличаются от свойств липидного бислоя. В случае низкомолекулярных порообразующих соединений основной вклад в компенсацию дипольных моментов вносит вода, заполняющая пору. Однако для каналов, формируемых белками или их олигомерами, необходимо также учитывать участие полярных групп, образующих стенки канала [280]. Особый интерес в этой связи представляет анализ роли дипольного потенциала в мембранной активности антимикробных пептидов и больших белковых токсинов (1.3.2).

1.1.2. Роль геометрических характеристик мембранообразующих липидов

Результаты большого числа экспериментальных и теоретических работ свидетельствуют о возможностях регуляции различных мембранных процессов путем изменения кривизны липидного бислоя, в том числе при образовании неламеллярных структур [161, 184, 185, 228]. Согласно Израелашвили с соавторами ключевым фактором, определяющим кривизну бислоя, является форма мембранообразующих липидных молекул [202, 203]. Усредненную «вероятностную» форму липидных молекул оценивают по параметру упаковки, P , равному отношению площадей поперечного сечения углеводородных «хвостов» и полярной «головы». Липиды с $P < 0.5$ имеют коническую форму и образуют мицеллы (рис. 1.3 А). Примером может служить лизофосфолипид. Значения параметра упаковки $0.5 < P < 1.0$ соответствуют цилиндрической форме молекул. Такие молекулы, например, диолеилфосфохолин, фосфоглицерин и сфингомиелин, образуют ламеллярные структуры, в том числе плоские бислои (рис. 1.3 Б). Липиды с $P > 1$, в частности, диолеилфосфоэтаноламин, дифитаноилфосфохолин, фосфатидная кислота, холестерин и кардиолипин, являются инвертированными конусами и формируют инвертированные гексагональные фазы липидов (рис. 1.3 В).

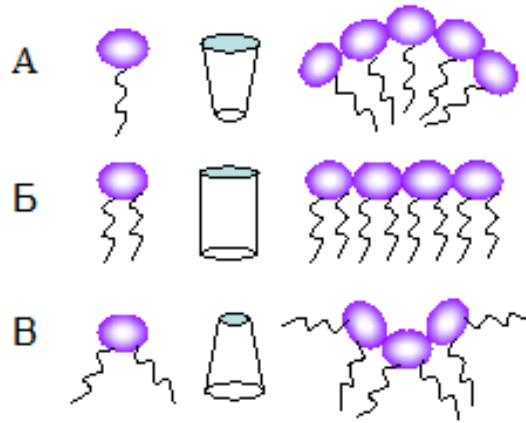


Рис. 1.3. Схематическое представление зависимости липидных структур от формы образующих их молекул. Отношение площадей поперечного сечения углеводородных «хвостов» и полярной «головы» менее 0.5 (**А**), от 0.5 до 1 (**Б**) и более 1 (**В**).

Грунер предложил характеризовать способность липидов формировать ламеллярные и неламеллярные структуры в терминах свободной энергии изгиба монослоя (ΔE) [175]:

$$\Delta E = k \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_0} \right)^2, \quad (1.2)$$

где k – модуль изгиба, R – радиус кривизны в области границы раздела фаз «липид-вода», R_0 – «внутренний» радиус кривизны липидного монослоя.

При $R = R_0$ липидный монослой характеризуется нулевой спонтанной кривизной и эластического напряжения в бислое не возникает. Если липиды имеют тенденцию к образованию неламеллярных структур, в образуемых ими бислоях возникает эластическое напряжение вследствие деформации характеризующихся некоторой спонтанной кривизной монослоев. Положительная и отрицательная кривизна определяются выпуклой и вогнутой поверхностями, соответственно. Это напряжение может быть обнаружено при исследовании профиля латерального давления, зависимости латерального давления от координаты вдоль оси, перпендикулярной плоскости бислоя [62, 83]. На рис. 1.4 представлены профили латерального давления в бислоях, сформированных из липидов цилиндрической формы и липидов, имеющих форму инвертированных конусов.

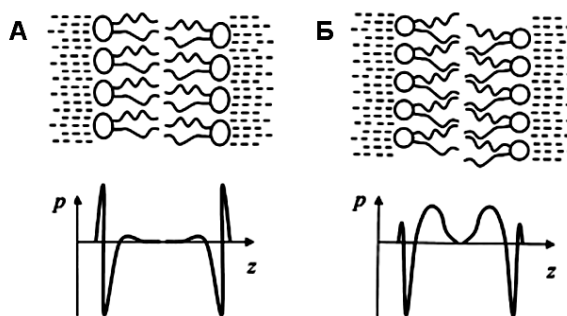


Рис. 1.4. Профили латерального давления (p) в бислоях, сформированных из липидных монослоев с нулевой (А) и отрицательной спонтанной кривизной (Б). По [62].

Профиль латерального давления определяет активность мембранных белков [131, 231, 293, 336, 361]. На рис. 1.5 показано, что энергия того или иного конформационного состояния белка (например, в открытом и закрытом состояниях) зависит от соответствия длины гидрофобного фрагмента белка и толщины углеводородного остова бислоя. В случае несоответствия между ними (А и В) в мембране возникают упругие деформации, направленные на его компенсацию. Очевидно, что в бислое из липидов цилиндрической формы будет стабилизирована конформация белка, характеризующаяся минимальным различием в длинах гидрофобных участков белка и мембраны (Б). В бислоях из мицеллообразующих липидов конической формы будет стабилизировано состояние, в котором длина гидрофобного фрагмента белка меньше, чем толщина гидрофобной области мембраны (А), а в мембранах из липидов, имеющих форму инвертированных конусов, — состояние, соответствующее превышению длины гидрофобной части белка толщины углеводородного кора (В). В таком контексте мембранные липиды можно рассматривать как молекулярные шапероны, обеспечивающие функционально значимый фолдинг интегральных белков [67].

Более детальный анализ зависимости свойств каналов от профиля латерального давления в мембране можно провести на модельных системах — реконструированных в бислойные липидные мембраны каналах, образованных некоторыми пептидами. Ниже приведены конкретные примеры такой зависимости.

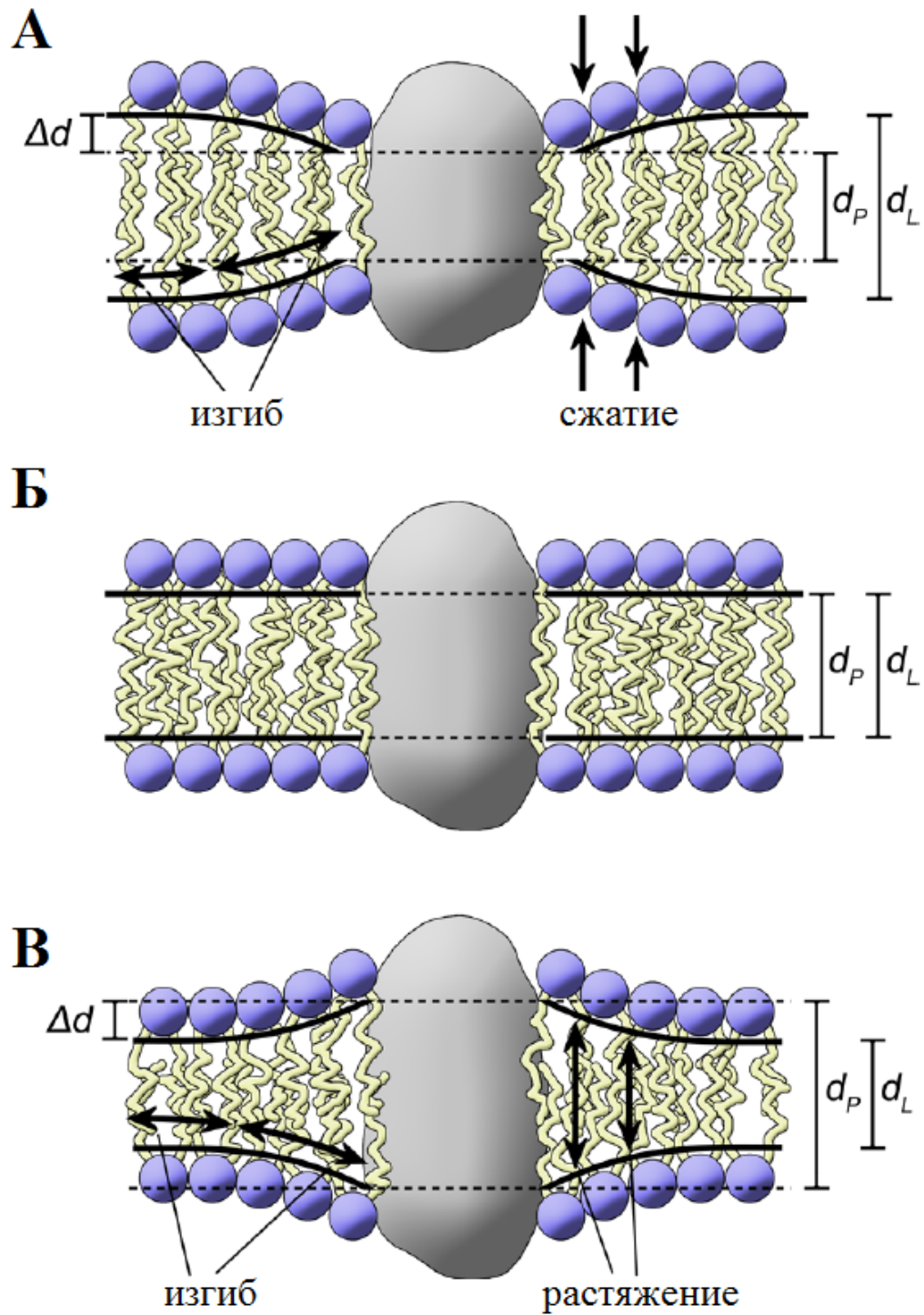


Рис. 1.5. Упругие деформации в бислое, возникающие при встраивании в него интегрального белка. (А) – длина гидрофобного фрагмента белка (d_P) меньше, чем толщина гидрофобной области мембраны (d_L); (Б) – длины гидрофобных участков белка и бислоя совпадают; (В) – длина гидрофобной части белка превышает толщину углеводородного кора. По [76].

1.1.2.1. Влияние распределения профиля латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности бислоя на формирование тороидальных пор мелиттином

Считается, что мелиттиновые каналы представляют собой тороидальные поры (рис. 1.6) с внешним и внутренним диаметрами 7-8 и 3.5-4.5 нм, соответственно [282, 331].

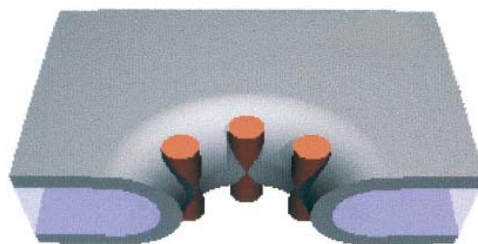


Рис. 1.6. Схематическое представление модели строения тороидальной пептид-липидной поры. По [463].

Апетрей с соавторами показали, что адсорбция на липидном бислое стирилпиридинового красителя RH 421 приводит к значительному росту каналообразующей активности мелиттина [38]. Авторы предположили, что наблюдаемый эффект обусловлен способностью этого красителя влиять на профиль латерального давления в бислое. Согласно Вохлert и Эдхольм [458] отталкивание между сонаправленными перпендикулярными компонентами дипольных моментов молекул красителя должно сопровождаться уменьшением плотности упаковки липидов в монослое и соответствующим увеличением площади, приходящейся на одну липидную молекулу. Описанные диполь-дипольные взаимодействия, а также электростатическое отталкивание между сульфонатными группами молекул красителя вносят свой вклад в возникновение дисбаланса между объемами, занимаемыми гидрофобной и гидрофильной областями модифицированной RH 421 мембраны. Поскольку образование тороидальных пор предполагает положительную кривизну их устьев [24], очевидно, что превалирование объема гидрофильной области мембраны над гидрофобной при адсорбции стирилпиридинового красителя будет способствовать формированию таких пор в мембране. Для проверки выдвинутого предположения Апетрей с соавторами [38] провели измерения с мицеллообразующим детергентом Тритоном X-100. Как и ожидалось, агент увеличивал каналообразующую активность мелиттина. Более того, экранирование отрицательного заряда сульфонатных групп красителя противоионами электролита при высокой концентрации соли в омывающем мембрану растворе (2.0 М NaCl)

сопровождается ослаблением действия RH 421 на активность мелиттина, что также хорошо согласуется с предположенной гипотезой.

1.1.2.2. Зависимость каналообразующей активности магаинина от геометрии мембранообразующих молекул

Магаинин – экстрагированный из кожи шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* пептид, включающий 23 аминокислотных остатка и проявляющий выраженное бактерицидное и противоопухолевое действие. В физиологических условиях молекула магаинина несет положительный заряд, что обуславливает взаимодействие пептида с отрицательно заряженными мембранами клеток-мишеней. Общепринятой моделью строения магаининового канала является пептид-липидная тороидальная пора [290]. По этой причине в липосомах, сформированных из кардиолипина или фосфатидной кислоты ($P > 1$), магаинин образует каналы при значительно большем соотношении пептид/липид по сравнению с липосомами из фосфоглицерина ($0.5 < P < 1.0$). Введение в мембранообразующий раствор фосфоэтаноламина ($P > 1$) сходным образом ингибирует порообразование [298]. Апетрей с соавторами показали, что, как и в случае, мелиттина, RH 421 увеличивает каналообразующую активность магаинина [38]. Авторы предположили, что, как и в случае мелиттина, превалирование объема гидрофильной области мембраны над гидрофобной при адсорбции стирилпиридинового красителя способствует формированию характеризующихся положительной кривизной тороидальных пор. Расчеты, проведенные Ву и Волквистом [459], согласуются с предположением о влиянии геометрических характеристик мембранообразующих молекул на формирование магаининовых каналов.

1.1.2.3. Колициновые каналы в мембранах, сформированных с участием склонных к образованию неламеллярных фаз липидов

Колицин – это белковый токсин, продуцируемый некоторыми штаммами *Escherichia coli* и подавляющий жизнеспособность других штаммов того же вида. Для колицина характерно несколько типов токсического действия, в том числе расщепление РНК и ДНК, а также образование потенциал-зависимых ионных каналов в мембранах клеток-мишеней [72]. В работе Собко с соавторами [397] показано, что активность колицина зависит от формы мембранообразующих липидов, а, следовательно, от профиля латерального давления в бислое. В частности, введение в омывающий мембрану раствор

мицеллообразующего миристоиллизифосфатидилхолина, вызывает значительную стимуляцию проводимости мембраны. Добавка к омывающему раствору олеиновой кислоты, имеющей форму инвертированного конуса, приводит к выраженному падению активности колицина. Аналогичный вывод был сделан и в более поздней работе Собко с коллегами [396] при сравнении каналообразующей способности колицина в липидных бислоях, сформированных из диолеилфосфохолина ($P \approx 1$) и диолеилфосфоэтаноламина ($P > 1$). Авторы цитируемых работ предположили, что лучше всего полученные результаты согласуются с предположением о том, что колициновый канал – это белок-липидная тороидальная пора.

1.1.2.4. Роль соответствия длины гидрофобной части грамицидинового канала толщине углеводородного остова мембраны в порообразующей способности пептида

Каналообразующая активность грамицидина А зависит от формы мембранообразующих липидов: в бислоях, сформированных из диолеилфосфоэтаноламина время жизни грамицидиновых каналов существенно ниже, чем в мембранах из диолеилфосфохолина [62, 277]. Дело в том, что толщина гидрофобного кора немодифицированной мембраны превышает длину гидрофобного участка образованного димером грамицидинового канала [56, 233] (рис. 1.7, верхняя панель). Это несоответствие приводит к деформации бислоя; – при формировании грамицидиновой поры липидные монослои вблизи пронизывающего мембрану канала испытывают сжатие и изгиб [129, 193]. Хван и др. [198] показали, что введение в омывающие мембрану растворы флавоноида генистеина вызывает рост каналообразующей способности грамицидина А, что выражается в увеличении как скорости обнаружения каналов в бислое, так и их времени жизни. Использование аналогов грамицидина, включающих 13, 15 или 17 аминокислотных остатков, а также мембранообразующих липидов с углеводородными "хвостами" различной длины (18, 20, и 22 атома углерода) позволило сделать вывод о связи выраженности эффекта генистеина со степенью несоответствия между длиной гидрофобного участка грамицидинового канала и толщиной гидрофобного кора липидного бислоя. На рис. 1.7 (средняя панель) представлена схематическая модель действия генистеина. Адсорбция флавоноида на мембране в области гидрофильных голов липидов облегчает формирование характеризующихся положительной кривизной липидных устьев грамицидиновой поры. По мнению авторов, более гидрофобный флавоноид даидзеин локализуется в мембране на большей глубине и поэтому обладает менее выраженным эффектом в отношении каналообразующей способности грамицидина

А. Сушина с соавторами предположили, что нейроактивный пептид GsMTx4 из яда тарантула *Grammostola spatulata* увеличивает каналообразующую активность грамицидина аналогичным генистеину образом (рис. 1.7, нижняя панель) [412].

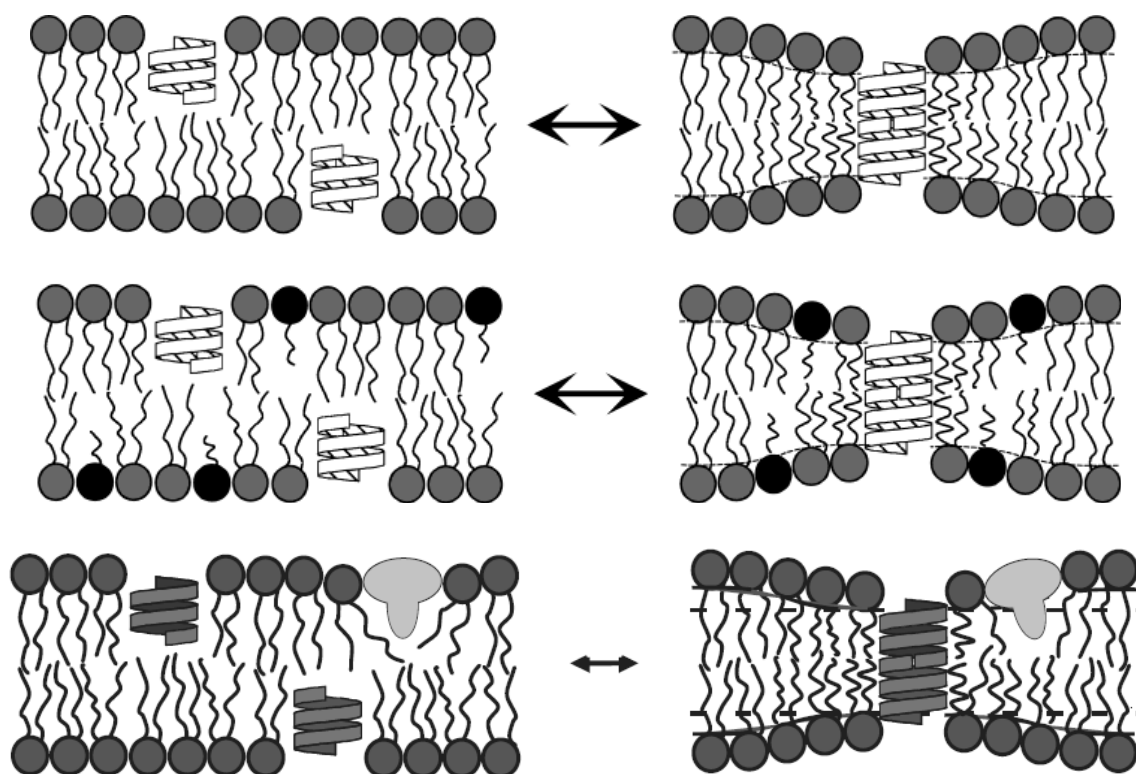


Рис. 1.7. Схематическое представление образования грамицидинового канала в отсутствие модифицирующих агентов (верхняя панель), в присутствии генистеина (средняя панель) и в присутствии пептида GsMTx4 (нижняя панель). Молекулы генистеина и пептида показаны черным и светло-серым цветом, соответственно. По [198, 412].

Можно предложить и альтернативное объяснение зависимости каналообразующей активности грамицидина от структурной геометрии мембранообразующих липидов (С.А. Акимов, личное сообщение). Поскольку наблюдаемый эффект определяется разностью энергий открытого и закрытого состояний канала, вполне возможным представляется вариант, когда липиды, формирующие неламеллярные фазы, оказывают влияние на энергию не конечного, а исходного состояния канала. В случае грамицидина А липиды, имеющие форму инвертированных конусов, могут стабилизировать относительно короткие мономеры грамицидина, тем самым сдвигая равновесие между димерами и мономерами в пользу последних.

1.1.2.5. Влияние формы липидов на активность пор, образованных кателицидинами

Еще одним ярким примером влияния формы мембранообразующих липидов на активность пептид-липидных тороидальных пор являются кателицидины. Эти пептиды являются важными компонентами иммунной системы миксин. Кателицидины проявляют выраженную антибактериальную активность, которая, в основном, связана с повышенным сродством положительно заряженных пептидов к отрицательно заряженной мембране бактерий [55]. Авторы цитируемой работы при изучении мембранной активности кателицидинов пришли к выводу, что кателицидины образуют пептид-липидные поры подобно магаинину (1.1.2.2). В соответствии с предложенной моделью действия пептидов включение в мембранообразующую смесь мицеллообразующих липидов лизофосфохолина и лизофосфоэтаноламина приводит к росту проницаемости липосом для флуоресцентного маркера, а введение в бислой липидов, имеющих форму инвертированных конусов, диолеилглицерола и олеиновой кислоты, вызывает обратный эффект [55].

1.1.2.6. Порообразующая способность актинопоринов в присутствии липидов нецилиндрической формы

Стихолизины I и II – белковые токсины с молекулярной массой около 20 кДа, отличающиеся друг от друга 13 аминокислотными заменами и продуцируемые актиниями *Stichodactyla helianthus*, обитающими в Карибском бассейне. В физиологических условиях эти актинопорины положительно заряжены [252]. В модельных липидных мембранах стихолизины формируют трансбислойные поры диаметром 2.2 нм [421]. Считается, что пора образована белковым тетрамером, причем у каждого протомера в мембрану погружена *N*-концевая α -спираль (рис. 1.8 А) [60].

Установлено, что сфингомиелин существенно увеличивает сродство стихолизинов к липидной фазе и их каналообразующую способность [433]. Кроме того, авторами цитируемой работы показано, что другие липиды также модулируют порообразующую активность стихолизинов I и II. Включение 5 моль % отрицательно заряженных липидов в липосомы, сформированные из эквимольной смеси диолеилфосфохолина и сфингомиелина, индуцирует утечку кальцеина из везикул. Эффект возрастает в ряду фосфосерин $\approx$ фосфоинозитол $\approx$ фосфоглицерол $\ll$ фосфатидная кислота $\approx$ кардиолипин. Можно заметить, что помимо ожидаемого увеличения активности положительно заряженных токсинов в присутствии отрицательно заряженных липидов, некоторое

увеличение наблюдалось также при введении в состав мембран незаряженного фосфоэтаноламина и положительно заряженного стеариламина.

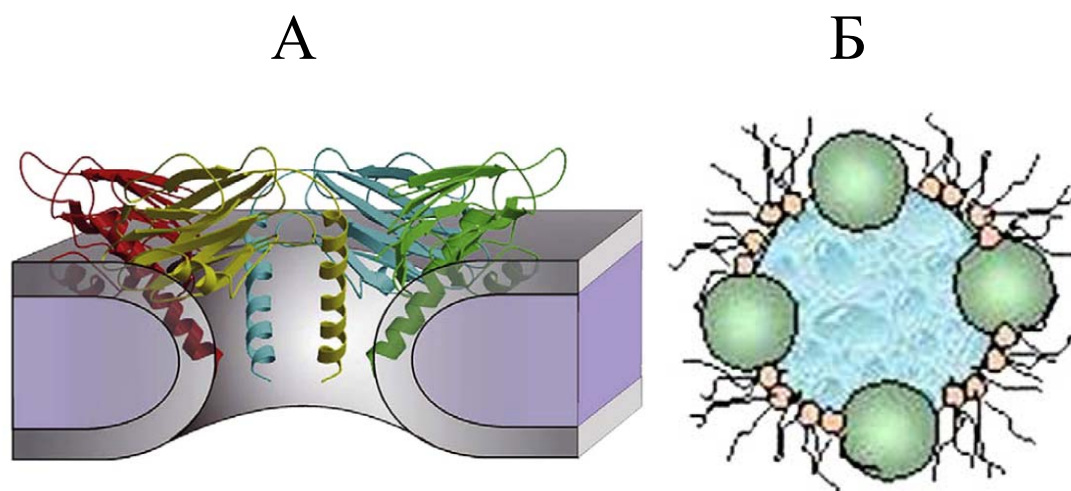


Рис. 1.8. Модель строения трансмембранных пор, образуемых стихолизинами. (А) – вид сбоку. Плоскость разреза проходит через ось симметрии канала. (Б) – вид сверху. Плоскость разреза параллельна плоскости липидного бислоя и расположена на расстоянии, равном полуширине мембраны, от границы раздела фаз. По [27].

Последнее не позволило Валкарсел с коллегами связать наблюдаемые эффекты только с электростатическим взаимодействием между стихолизином и бислоем. Они предположили, что токсины образуют белок-липидные поры. По мнению авторов, липиды нецилиндрической формы должны способствовать стабилизации таких пор. Способность индуцировать инвертированную гексогональную фазу возрастает в ряду фосфосерин < фосфоглицерол < кардиолипин < фосфатидная кислота. Указанный ряд хорошо согласуется с рядом влияния этих липидов на индуцированную стихолизинами утечку флуоресцентного маркера из липосом. Участие в формировании липидных пор липидов, имеющих форму инвертированных конусов, в частности, фосфоэтаноламина, Валкарсел с коллегами объяснили тем, что в плоскости, параллельной плоскости мембраны, белок-липидная пора характеризуется отрицательной кривизной (рис. 1.8 Б). Стеариламин имеет только одну углеводородную цепь и образует мицеллярные структуры, и поэтому должен способствовать формированию липидных пор, характеризующихся положительной кривизной в плоскости, перпендикулярной плоскости бислоя (рис. 1.8 А).

1.1.2.7. Стабилизация открытого состояния аламетицинового канала в бислоях из липидов, имеющих форму инвертированных конусов

Как уже было отмечено в параграфе 1.1.1.2 в липидных бислоях аламетицин образует ионные каналы многоуровневой проводимости. Многоуровневая проводимость обусловлена различным числом аламетициновых мономеров в составе проводящих олигомеров [259]. Установлено, что в мембранах, сформированных из липидов, склонных к образованию инвертированных гексагональных фаз, наблюдаются более высокие подуровни проводимости аламетициновых каналов по сравнению с бислоями, образованными из липидами цилиндрической формы [63, 228]. Вероятность появления более высоких уровней проводимости определена изменениями структурной геометрии: из мономеров аламетицина, характеризующихся цилиндрической формой (I на рис. 1.9), формируется «корсетная» пора (II на рис. 1.9). Изменение профиля латерального давления при переходе от мембран из диолеилфосфохолина к бислоям из диолеилфосфоэтаноламина (рис. 1.4) приводит к стабилизации открытого состояния аламетициновых каналов.

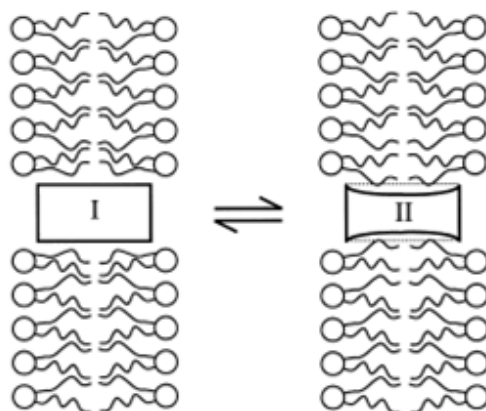


Рис. 1.9. Модель аламетициновой поры. Правая панель – закрытое состояние; левая панель – открытое состояние канала. По [62].

Левис и Кафизо [263] обнаружили, что с увеличением молярной фракции диолеилфосфоэтаноламина в мембранообразующей смеси диолеилфосфохолин:диолеилфосфоэтаноламин сродство аламетицина к мембране падает. Существование пептида в непроводящем состоянии (I на рис. 1.9) в мембранах, сформированных с участием диолеилфосфоэтаноламина, энергетически невыгодно, и равновесие сдвигается в сторону образования проводящих олигомеров (II на рис. 1.9) или десорбции пептида в водную фазу. Последнее обуславливает снижение сродства

аламетицина к бислою. Изменение каналаобразующей активности аламетицина в различных ганглиозид-содержащих мембранах Каппель с соавторами, помимо непосредственного пептид-липидного взаимодействия, отнесли к способности ганглиозидов индуцировать неламеллярные структуры в бислое [219].

Как отмечалось в параграфе 1.1.1.2, адсорбция стирилового красителя RH 421 на мембране приводит к падению каналаобразующей активности аламетицина, вызванному ростом дипольного потенциала липидного бислоя. В последствии Апетрей с соавторами [38] дополнили гипотезу предположением о двух возможных механизмах регуляции аламетицин-индуцированного тока RH 421: одновременной модуляцией под действием модификатора как электрических, так и эластических свойств мембраны. Наряду с ростом дипольного потенциала мембраны, увеличение латерального давления в гидрофильной области мембраны также может приводить к уменьшению вероятности открывания "корсетных" аламетициновых пор [38].

Суммируя представленные литературные данные относительно влияния латеральной компоненты давления на функционирование ионных каналов, формируемых различными экзогенными соединениями, можно заключить, что подобная зависимость должна наблюдаться для любых каналов, геометрические характеристики которых в открытом и закрытом состоянии существенно различаются. Таким образом, используя бислои с известным профилем латерального давления (например, сформированные из ДОФХ и ДОФЭ (рис. 1.4)), или агенты, способные его изменять (в частности дипольные модификаторы), можно судить о строении поры: ее конформации в открытом и закрытом состояниях. Например, введение конических липидов или модификаторов, сорбирующихся в полярной области мембраны, приведет к увеличению стационарного числа липидных пор, вне зависимости от типа образующих их соединений. Известно, что не только пептиды, но и некоторые противогрибковые липопептиды, формируют подобные поры (1.3.1.1).

Особый интерес для анализа роли липидного микроокружения представляют каналы с несколькими закрытыми или открытыми состояниями. Как будет показано ниже (1.3.3), в зависимости от способа введения (с одной или с обеих сторон мембраны) полиеновые макролиды формируют два различных типа каналов: асимметричные и симметричные. В обоих случаях начальным этапом является образование в мембране полиен-стериновых комплексов, а вот конечные состояния различны: асимметричный канал образован одиночной полиен-стериновой "полупорой", а симметричный –

формируется при ассоциации двух полупор, локализованных в противоположных монослоях. Анализ изменений активности асимметричных и симметричных полиеновых каналов при введении дипольных модификаторов, а также липидов, формирующих неламеллярные фазы, позволит ответить на вопрос о зависимости энергии исходного состояния от распределения латерального давления вдоль нормали к поверхности мембраны и выдвинуть предположения о различии геометрических характеристик двух открытых состояний.

Следует отметить, что латеральная компонента давления и ее распределение вдоль нормали к поверхности мембраны зависит не только от формы мембранных липидов, но и от их фазового состояния, определяя необходимость учета латеральной организации липидных бислоев.

1.1.3. Влияние фазового состояния липидов

Бислои из индивидуальных липидов при температуре ниже температуры плавления (T_m) липида пребывают в твердокристаллическом состоянии. В зависимости от наклона липидных молекул и способа упаковки углеводородных хвостов в твердом бислое выделяют несколько типов фаз: кристаллическую L_C , гель-фазу L_β и промежуточную риппл-фазу P_β , характерную для некоторых липидов, в частности, насыщенных фосфохолинов [89]. При температуре выше температуры основного фазового перехода липиды в бислое находятся в жидкоподобном состоянии – L_α . Фазовое поведение смеси липидов с различной температурой плавления существенно усложняется и в определенном температурном диапазоне, между температурами плавления индивидуальных липидов, в бислое может наблюдаться фазовое разделение: сосуществование твердой (s_o) и жидкой фаз (l_d), обогащенных липидом с высокой и низкой температурой плавления, соответственно. Введение к таким смесям некоторых стероидов, в частности, холестерина, усиливает их фазовую сегрегацию: возникает промежуточная жидкая упорядоченная фаза (l_o). Установлено, что коэффициент латеральной диффузии липидов в l_o -фазе в 2-3 раза меньше по сравнению с l_d -областями [26]. Считается, что биологическим мембранам также свойственна латеральная сегрегация компонентов. Хотя наличие гель-доменов не является уникальным свойством модельных мембран (они обнаружены и в плазматических мембранах живых клеток [39]), принято думать, что фазовое разделение в биологических мембранах, в основном, представлено двумя жидкими фазами ($l_d + l_o$) [75]. Поскольку в этом случае латеральной сегрегации подвержены не только мембранные липиды, но и белки, значительное распространение

приобрела модель, согласно которой в биологических мембранах возникают белок-липидные нанодомены (рафты). Эти области обогащены сфинголипидами и стеринами и находятся в l_o -состоянии. Интерес к рафтам вызван их предполагаемым участием в жизненно важных для клетки процессах, таких как: сортировка и доставка белков, клеточная сигнализация, иммунный ответ и другие [71, 135, 154, 158, 182, 201, 215, 254, 264, 286, 287, 304, 310, 328, 330, 333, 338, 339, 351, 391, 392, 414, 431, 436, 466, 473, 474]. Наиболее интересными, с нашей точки зрения, работами, посвященными экспериментальному и теоретическому исследованию рафтов, являются [32, 150, 239, 247, 406]. Однако даже само существование рафтов в клеточных мембранах до сих пор вопрос дискуссионный. Считается, что сложности с обнаружением рафтов в клеточных мембранах связаны с тем, что их размер может варьировать от нескольких единиц до сотен нанометров, и они чрезвычайно динамичны. В липидных же бислоях упорядоченные домены могут достигать значительно больших размеров, что делает возможным их визуализацию методами флуоресцентной микроскопии. Для этого используют гигантские одноламеллярные липосомы [455]. Фазовое разделение в липосомах можно наблюдать, если ввести в мембрану флуоресцентно-меченый липид. Большинство подобных меток предпочитают неупорядоченную жидкокристаллическую фазу, поэтому упорядоченные домены остаются неокрашенными. Принято считать, что домены неправильной формы находятся в гель-состоянии, в то время как круглые области представляют жидкую фазу. Круглая форма связана с тем, что домен стремится сократить длину своей границы. Дело в том, что толщина бислоя в l_o -области больше толщины окружающей неупорядоченной фазы (рис. 1.10), что приводит к появлению на границе l_o -доменов упругих деформаций, направленных на компенсацию скачка толщины и минимизацию длины границы раздела фаз.

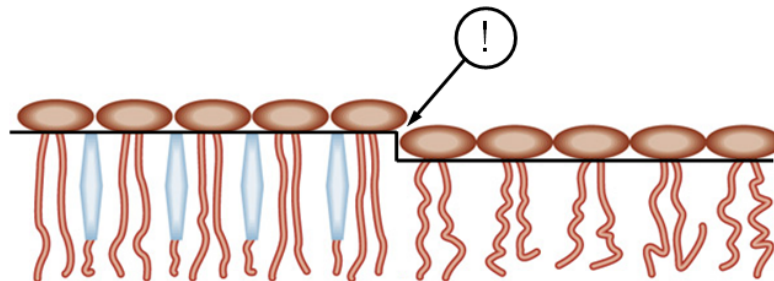


Рис. 1.10. Схематическое представление границы раздела жидкой упорядоченной (слева) и неупорядоченной (справа) липидных фаз. (!) Из-за разницы в толщине часть гидрофобной поверхности должна быть экспонирована воде. В результате возникают упругие деформации, направленные на компенсацию скачка толщины. По [247, 476] с изменениями.

Выраженность этого несоответствия зависит от вида мембранообразующих липидов, в том числе от формы их молекул (1.1.2) и длины углеводородных хвостов. Линейное натяжение стремится сократить длину границы, в результате домены округляются и сливаются. С другой стороны, энтропийный фактор и электростатическое отталкивание препятствуют слиянию доменов [150, 157, 247]. Эти две противоборствующие силы определяют размер рафтов (рис. 1.11). Низкомолекулярные амфифилы, в том числе дипольные модификаторы, по всей вероятности, способны влиять на этот баланс.



Рис. 1.11. Схематическое представление действия сил, определяющих размер жидких упорядоченных доменов в мембране. Под действием линейного натяжения l_o -домены сливаются (слева направо); энтропийный фактор способствует делению крупных доменов на более мелкие (справа налево). По [253] с изменениями.

В предыдущем параграфе обсуждалось, как профиль латерального давления определяет конформацию белка в бислое. Ключевым фактором является разность между длиной гидрофобного фрагмента интегрального белка и толщиной углеводородного кора. Эта разность зависит и от агрегатного состояния липида. На рис. 1.12 схематически показано, что распределение белка или пептида между упорядоченными и неупорядоченными доменами в мембране обусловлено минимальной разницей между длинами гидрофобных участков белка и бислоя. Рис. 1.12 А иллюстрирует случай, когда длина гидрофобной области пептида соответствует меньшей толщине неупорядоченной фазы, а рис. 1.12 Б – большей толщине упорядоченного домена.

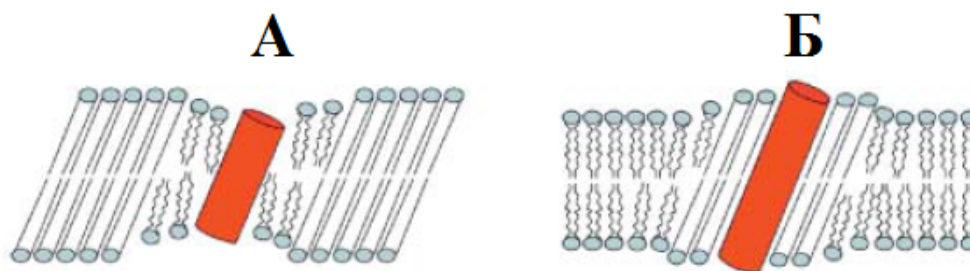


Рис. 1.12. Схематическое представление того, как соответствие гидрофобного участка каналаобразующего белка (пептида) толщине мембраны в области, находящейся в неупорядоченной (А) или упорядоченной фазе (Б), обуславливает его преимущественное распределение в соответствующую область. По [369] с изменениями.

1.1.3.1. Аламетициновые каналы в фосфолипидных мембранах, включающих холестерин и сфингомиелин

Результаты измерения проводимости аламетициновых олигомеров в мембранах, сформированных из смеси пальмитоилфосфохолина (ПОФХ), Хол и сфингомиелина (СМ), свидетельствуют в пользу модуляции каналообразующей активности аламетицина при изменении фазового состояния мембранообразующих липидов [95]. Оказалось, что проводимость 2 и 3 подуровней проводимости аламетициновых каналов в бислоях, содержащих ПОФХ:Хол:СМ (50:25:25 моль %) в 2.4 и 1.4 раза выше, чем в мембранах из ПОФХ и ПОФХ:Хол (67:33 моль %), соответственно. Изучение зависимости проводимости каналов от молярного соотношения ПОФХ, Хол и СМ в мембранообразующей смеси показало, что минимум проводимости приходится на соотношение липидов, отвечающее одновременному сосуществованию упорядоченной и неупорядоченной жидких фаз, по сравнению с гомогенными бислоями, находящимися в l_d или l_o -состояниях. Авторы связали полученные результаты с зависимостью каналообразующей активности аламетицина от профиля латерального давления в различных по липидному составу бислоях (1.1.2.5). Количественная оценка времени задержки при переключении между 2 и 3 подуровнем проводимости показала, что в неоднородных мембранах из ПОФХ, Хол и СМ ассоциация аламетициновых олигомеров происходит медленнее, чем в бислоях из ПОФХ или ПОФХ и Хол. По всей вероятности, наблюдаемые эффекты обусловлены более медленной латеральной диффузией агрегатов пептида в мембранах, содержащих упорядоченные домены.

1.1.3.2. Возможное взаимодействие актинопоринов с упорядоченными мембранными доменами

В параграфе 1.1.2.6 отмечено, что сродство стихолизинов к мембранам определяется присутствием в них сфингомиелина [27, 433]. Включение помимо сфингомиелина (50 моль %) в фосфохолиновый бислой холестерина (35 моль %) также увеличивает мембранную активность стихолизина II [113]. Поскольку указанная липидная смесь при комнатной температуре подвержена латеральной сегрегации компонентов и характеризуется фазовым разделением, приведенные данные могут указывать на преимущественное взаимодействие стихолизинов с упорядоченными мембранными доменами [27]. Аналогичные предположения были выдвинуты Барлик с соавторами [54] при изучении взаимодействия другого актинопорина, продуцируемого *Actinia equina*, эквинатоксина II со сфингомиелин- и холестерин-содержащими мембранами. Авторы

цитируемой работы предположили, что дефекты липидной упаковки на границе раздела упорядоченной и неупорядоченной липидной фаз (рис. 1.10) могут функционировать как сайты связывания и олигомеризации молекул актинопорина. В рамках выдвинутой гипотезы можно предложить альтернативное объяснение увеличению порообразующей способности стихолизинов в присутствии липидов нецилиндрической формы (1.1.2.6). Такие липиды могут изменять линейное натяжение на границе раздела липидных фаз, увеличивая число мест связывания для токсинов.

Таким образом, анализ имеющихся в литературе данных показывает, что, несмотря на широкое обсуждение возможного участия латеральной организации мембран в регуляции процессов порообразования экзогенными соединениями, прямых экспериментальных доказательств пока крайне мало. Очевидно, что латеральная сегрегация компонентов мембраны, может вызывать латеральную неоднородность (анизотропию) всех ее физико-химических свойств, включая как боковое давление, так и дипольную компоненту потенциала. Экспериментальные свидетельства этого явления можно получить, используя в качестве сенсора гетерогенности дипольного потенциала каналы, демонстрирующие в гомогенных по фазовому состоянию бислоях выраженную зависимость свойств от скачка потенциала.

1.2. Дипольные модификаторы мембран

Дипольными модификаторами мембран принято называть амфифильные соединения, введение которых в липидный бислой приводит к изменению величины его дипольного потенциала. К настоящему моменту в литературе можно обнаружить сведения о том, что к дипольным модификаторам мембран относятся некоторые флавоноиды, стирилпиридиновые красители, стеринны, тиреоидные гормоны, N-ацилгомосеринлактоны и местные анестетики. Эта интенсивно развивающаяся область науки находится на стадии накопления фактов, следует особо отметить и первые работы, систематизирующие имеющийся материал [15]. В этой главе будет кратко изложена классификация использованных в работе модифицирующих агентов и охарактеризована их мембранная активность.

1.2.1. Флавоноиды

Флавоноиды относятся к полифенолам растительного происхождения. Они участвуют в пигментации растений, играют существенную роль в клеточной сигнализации растений, однако, превалирующая биологическая функция связана с защитой растений от повреждающих факторов [167].

1.2.1.1. Классификация флавоноидов

Разнообразие флавоноидов велико, к настоящему моменту идентифицировано около 8000 соединений [15]. Общепринятая классификация флавоноидов основана на структурных различиях трехуглеродного фрагмента ($C_2-C_3-C_4$), соединяющего два ароматических кольца (А и В). В большинстве флавоноидов при участии пропанового мостика образуется гетероцикл – кольцо С (рис. 1.13).

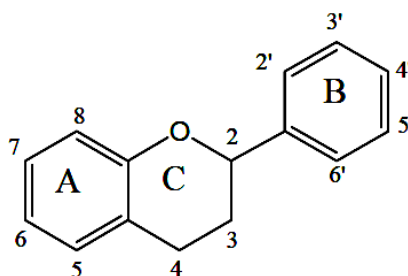


Рис. 1.13. Общая структура молекул флавоноидов. По [5].

Можно выделить 11 классов флавоноидов: халконы, флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванолы (дигидрофлавонолы), изофлавоны (изофлавоноиды), ауруны, антоцианы (антоцианины), флаваны (которые включают собственно флаваны и флаван-3-олы

(катехины)), лейкоантоцианидины (флаван-4-олы и флаван-3,4-диола) и неофлавоноиды (Таблица 1.1). В растениях флавоноиды чаще всего содержатся в виде гликозидов. В последних, как правило, моно- (D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, D-рамноза и D-арабиноза) или дисахариды (рутиноза, софороза и самбубиоза) соединены с фенольными гидроксильными группами β -связью.

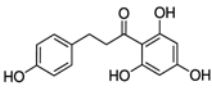
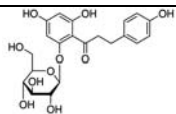
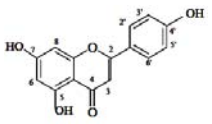
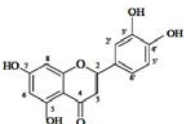
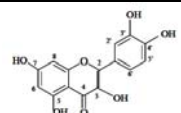
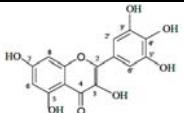
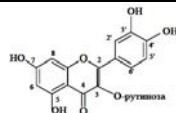
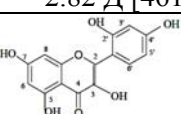
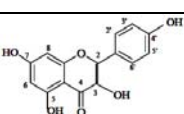
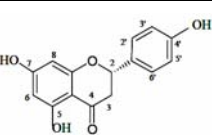
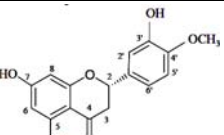
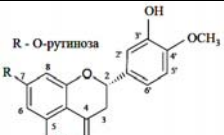
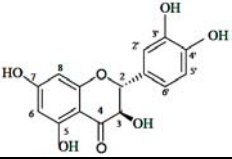
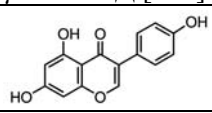
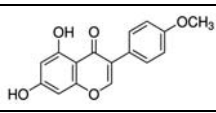
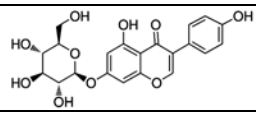
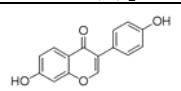
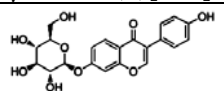
Халконы – это флавоноиды, не имеющие гетероцикла. В их молекулах ненасыщенный (собственно халконы) или насыщенный (дигидрохалконы) трехуглеродный фрагмент, соединяющий два ароматических кольца, содержит карбонильную группу. Наиболее изученными среди халконов являются *флоретин* и его гликозид *флорицин*. Большое количество флоретина содержат листья яблони, а флорицина – кора этих фруктовых деревьев.

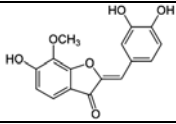
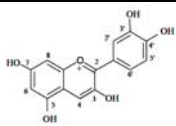
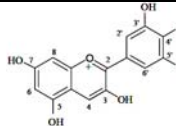
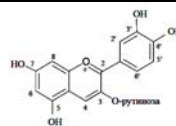
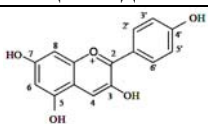
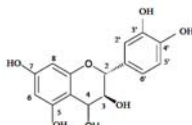
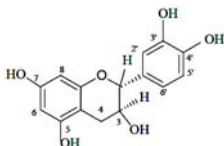
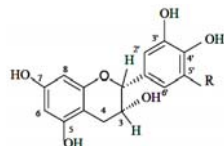
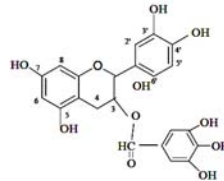
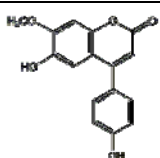
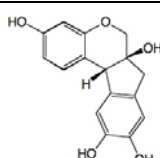
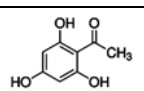
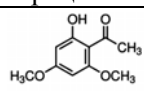
Флавоны характеризуются наличием двойной связи в шестичленном гетероциклическом кольце С, присутствием карбонильной группы в С₄-положении, а также тем, что ароматическое кольцо В присоединено ко второму углеродному атому. Среди гидроксильированных флавонов чаще всего встречаются *апигенин* и *лютеолин*. Этими флавонами богаты многие фрукты и овощи, а также ароматные травы, используемые для приготовления пищи. В качестве основных источников апигенина стоит упомянуть петрушку, лук, брокколи, томаты, сельдерей и лимон, а лютеолина – морковь, болгарский перец, сельдерей, мяту, розмарин, шалфей и чабрец.

По структуре **флавонолы** являются С₃-гидроксильированными флавонами. Это самые распространенные представители флавоноидов в природе, они встречаются как в виде агликонов, так и в виде разнообразных гликозидов. Среди флавонолов наиболее известны *кверцетин* и его гликозид *рутин*, а также *мирицетин*, *морин* и *кемпферол*. Среди пищевых источников кверцетина – чай, яблоки, красный репчатый лук, красный виноград, цитрусовые, томаты, брокколи. Мирицетин в значительных количествах присутствует в красном вине. Кемпферолом богаты чай, луковичные, каперсы, капуста, укроп, брокколи, виноград. Морин содержат листья гуаявы и плоды фустика.

В отличие от флавонов С-кольцо **флаванонов** не содержит двойной связи между углеродами во 2-м и 3-м положениях. Благодаря этому они имеют хиральный центр в С₂-положении и способны к стереоизомеризации. В большинстве случаев флаваноны представлены рацемической смесью энантиомеров с преобладанием левовращающих форм. В качестве примеров можно привести *нарингенин* и *гесперетин*, а также гликозид последнего *гесперидин*. Указанными флаванонами богаты цитрусовые, нарингенин также присутствует в кожуре томатов.

Таблица 1.1. Химическая структура и дипольный момент (μ)* некоторых флавоноидов

классы флавоноидов	агликон		гликозид
халконы			
	флоретин $\mu = 3.25$ Д [107]; 2.54 Д [461]		флорицин
флавоны			
	апигенин $\mu = 3.78$ Д [37]; 6.46 Д [461]	лютеолин $\mu = 4.90$ Д [37]; 5.21 Д [461]	
флавонолы			
	кверцетин $\mu = 2.71$ Д [37]; 4.32 Д [364]; 2.82 Д [461]	мирицетин $\mu = 1.50$ Д [37]; 5.84 Д [461]	рутин $\mu = 2.53$ Д [364]; 7.69 Д [334]; 3.43 Д [461]
			
	морин	кемпферол $\mu = 2.29$ Д [37]; 3.14 Д [461]	
флаваноны			
	нарингенин $\mu = 5.12$ Д [461]	гесперетин	гесперидин
флаванонолы			
	таксифолин $\mu = 1.30$ Д [461]		
изофлавоноиды			
	генистеин $\mu = 3.47$ Д [461]	биоханин А	генистин $\mu = 5.13$ Д [461]
			
	даидзеин $\mu = 3.18$ Д [461]		даидзин

ауроны			
	лептосидин		
антоцианидины			
	цианидин	дельфинидин	керацианин
			
	пеларгонидин $\mu = 2.56$ Д [461]		
флаван-3,4-диолы			
	лейкоцианидин		
флаван-3-олы			
	катехин $\mu = 1.50$ Д [364]; 5.79 Д [461]	R–H–эпикатехин $\mu = 2.02$ Д [364]; 5.16 Д [461] R–OH–эпигаллокатехин	эпикатехин галлат $\mu = 4.00$ Д [364]
неофлавоноиды			
	меланеттин	брацилин	
гидроксиацетофеноны			
	2',4',6'-тригидрокси-ацетофенон (ТГАФ)	2'-гидрокси-4',6'-диметокси-ацетофенон (ГДМАФ)	

* – Приведены рассчитанные методами квантовой химии величины дипольного момента наиболее стабильных конформеров молекул флавоноидов в вакууме

Еще одним классом довольно распространенных, но лабильных флавоноидов являются **флаванолы**, т.е. C₃-гидроксилированные флаваноны. Таким образом, в структуре флаванолов имеется уже два хиральных центра в C₂-и C₃-положениях, что обуславливает возможность образования четырех диастереоизомеров. Самым популярным объектом исследования среди флаванолов является *таксифолин*, добываемый из древесины разных видов лиственницы.

Изофлавоноидами называются флавоноиды, ароматическое В-кольцо которых присоединено к третьему атому углерода. Большая часть природных изофлавоноидов представлена гликозидами изофлавонов, в качестве примеров которых следует привести *генистин*, *ононин* и *даидзин* – гликозиды *генистеина*, *биоханина А* и *даидзеина*, соответственно. Основным источником изофлавонов являются бобы сои.

Особую группу составляют **ауруны**, флавоноиды с пятичленным гетероциклическим кольцом С. Эти полифенольные соединения менее широко распространены в природе и значительно хуже изучены. Первым открытым ауруном был *лептосидин*, присутствующий в цветах кореопсиса [160].

Антоцианидины характеризуются свободной валентностью кислорода в пирановом кольце. Их молекулы имеют положительный заряд. В растениях антоцианидины встречаются чаще всего в гликозилированной форме (антоцианы). Типичными примерами являются *цианидин* и его гликозид *керацианин*, а также *дельфинидин* и *пеларгонидин*. Цианидин – это пигмент большинства красных ягод (виноград, черника, ежевика, голубика, вишня, клюква, малина и др.). Дельфинидин придает синеватую окраску некоторым сортам винограда и плодам граната. Пеларгонидин присутствует в красной фасоли и некоторых ягодах, обеспечивая оранжевые оттенки.

Гетероциклическое кольцо флаванов не содержит ни двойных связей, ни присоединенных карбонильных групп. В зависимости от места и степени гидроксирования С-кольца выделяют собственно флаваны, флаван-3-олы, флаван-4-олы и **флаван-3,4-олы**. Предшественниками последних в метаболическом пути являются антоцианы, поэтому их также принято называть лейкоантоцианидинами. Например, *лейкоцианидин* содержится в обыкновенной фасоли. **Флаван-3-олы** также называют катехинами. Это одна из наиболее исследованных групп флавоноидов, включающая большое разнообразие соединений. Отсутствие двойной связи между углеродами во 2-м и 3-м положениях приводит к появлению двух хиральных центров на этих атомах и, следовательно, к образованию четырех диастереоизомеров, *транс*-конфигурации которых называют *катехинами*, а *цис* – *эпикатехинами*. Катехинами богаты чай и бобы какао.

К числу **неофлавоноидов** относятся несколько групп полифенольных соединений, характеризующихся общей особенностью – присоединением ароматического кольца В в С₄-положении. В частности, к неофлавоноидам причисляют 4-арилкумарины (например, *меланеттин*) и 4-арилхроманы (например, *брацилин*), обнаруживаемые у представителей семейства бобовых.

В Таблице 1.1 также представлены структуры некоторых гидроксильных производных ацетофенона, не имеющих непосредственного отношения к флавоноидам, но использованных в работе в качестве их аналогов меньшего размера.

1.2.1.2. Потенциальная фармакологическая активность флавоноидов

Повышенный интерес к флавоноидам обусловлен многочисленными свидетельствами их положительного влияния на здоровье человека. Число работ, посвященных исследованию биологической активности флавоноидов, растет с каждым годом (рис. 1.14). Таблица 1.2 – попытка резюмировать имеющиеся к этому моменту данные.

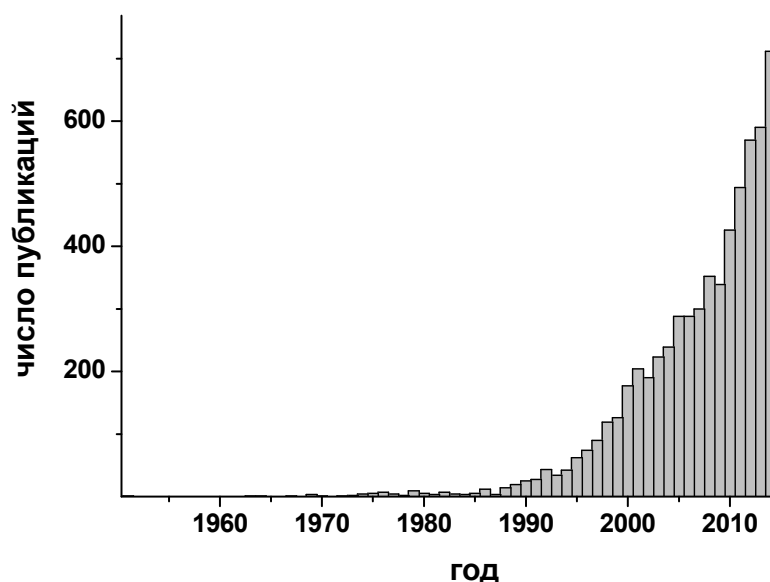


Рис. 1.14. Число исследований биологической активности флавоноидов. Данные представлены согласно базы данных PubMed.

Анализируя Таблицу 1.2 можно заключить, что механизмы влияния флавоноидов весьма многообразны, однако, в большинстве случаев, первичной мишенью их действия является клеточная мембрана, с которой и запускаются различные сигнальные каскады. Изменение физико-химических свойств мембраны под действием флавоноидов также может влиять на скорость окисления липидов и белков, обуславливая выраженную антиоксидантную активность растительных полифенолов. Эти факты определяют необходимость изучения реакционной способности флавоноидов по отношению как к самому липидному бислою, так и его белковым компонентам.

Таблица 1.2. Потенциальная фармакологическая активность флавоноидов. С изменениями и дополнениями из обзора [15].

характер биологического действия и возможное фармакологическое применение	наиболее активные флавоноиды	предполагаемые механизмы действия и возможные молекулярные мишени
антиоксидантное (кардио- и вазопротекторное, лечение онкологических заболеваний и атеросклероза, защита от УФ-радиации и действия химических окислителей)	эпикатехин, эпигаллокатехин, эпикатехин-галлат, эпигаллокатехин-галлат, мирицетин, кверцетин, лютеолин, кемпферол, фисетин, генистеин, рутин, морин, производные нарингенина и гесперетина, бутеин, саппанхалкон, оканин, броуссохалкон, 3-гидроксиксантоангелол, ксантохумол, флорицин, брацилин, производные кумарина	снижение концентрации продуктов перекисного окисления (способность служить ловушками для свободных радикалов, а также хелатировать ионы металлов, участвующих в перекисном окислении), регуляция экспрессии белков антиоксидантной / оксидантной системы (супероксиддисмутазы, глутатион-пероксидазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы, NADPH-оксидазы)
противовоспалительное (лечение аллергических и иммунных заболеваний, таких как аллергия, астма, ревматоидный артрит, некоторые виды дерматитов, рассеянный склероз, энцефаломиелит, а также в комплексной терапии рака и атеросклероза)	эпигаллокатехин-галлат, кемпферол, мореллофлавонол, артонин Е, кризин, изоликвиртигенин, кураринон, кураридин, морусин, кверцетин, софорофлаваноны G и А, катехин, байкалеин, ресвератрол, генистеин, глицитеин, текторигенин, охенитил-ферулат, розмарол, апигенин, фисетин, лютеолин, моусин, анадантофлавонол, кирсилиол, гинкгетин, кенусанон А, гингерол, гинкгетин, нарингенин, флоретин, флорицин, цианидин-3-Оβ-D-гликозид, дельфинидин, сульфуретин, брацилин, 4-арилкумарины, гесперидин	подавление продукции провоспалительных цитокинов, в частности, фактора некроза опухолей (ФНО-α) и интерлейкина 6 (подавление активности NF-κB и ингибирование ферментов сигнальной цепи арахидоновой кислоты, таких как фосфолипаза A2, циклооксигеназы ЦОГ-1 и ЦОГ-2, липооксигеназы 5-ЛОГ, 12-ЛОГ и 15-ЛОГ)
антимутагенное и антиканцерогенное (в отношении рака прямой кишки, желудка, поджелудочной железы, печени, простаты, шейки матки, легких, лейкемии, меланомы, глиомы, нейробластомы, лимфомы)	эпигаллокатехин-галлат, кемпферол, кверцетин, апигенин, лютеолин, мирицетин, байкалеин, ресвератрол, генистеин, силибин, даидзеин, флавопиридол, флавокаин, диосмин, гесперетин, бутеин, нарингенин, флорицин, ксантоангелол, изоликвиртигенин, ксантохумол,	индукция апоптоза (активация сигнального пути TRAIL, в том числе рецепторов клеточной смерти DR4/DR5, каспаз-3, -8, Bcl/Bax, цитохрома C, деградация сурвивина и ингибирование Akt); активация супрессоров опухолей (p53, Rb, PTEN), регуляция активности ионных каналов (MaxiK)

	ликохалкон, дельфинидин, цианидин, синтетические ауруны, брацилин, производные кумарина	
нейропротекторное (в терапии когнитивных нарушений и нейродегенеративных заболеваний, снижение риска инсульта, лечение интоксикации, в качестве седативных средств, анксиолитиков, антидепрессантов и антиконвульсантов)	эпикатехин, эпигаллокатехин-галлат, кверцетин, нарингенин, нарингин, пикногенол, генистеин, силимарин, силибин, лютеолин, 7,8-дигидроксифлавонон, ликуритигенин, 2'-метокси-6-метилфлавонон, морин, рутин, гесперидин, глабридин, байкалеин, апигенин, троксерутин, икариин, абакоптерин Е, даидзеин, даидзин, фисетин, нобелитин, кемпферол, кризин, троксерутин, мангиферин, ресвератрол, мирицетин, цианидин-О-3-глюкозид, гесперидин	защита от окислительного стресса, способность хелатировать металлы переменной валентности, регуляция протеинкиназ, модуляция опиоидных рецепторов и рецепторов ГАМК, глутамата и ацетилхолина, ингибирование моноаминоксидазы А, регуляция агрегации амилоидных белков
кардио- и вазопротекторное (лечение атеросклероза, дислипидемий, гипертензии, ишемической болезни сердца, антикоагулянтная терапия)	таксифолин, астильбин, кверцетин, катехины и катехин-галлаты, гесперидин, нарингенин, флоретин, кемпферол, эриодиктиол, дельфинидин-3-глюкозид, цианидин-3-О-β-глюкозид, брацилин, кумарин, варфарин, аденокумарол, бродифакум	гиполипидемическое (регуляция через PPAR-α и PGC1-α), ингибирование ферментов синтеза холестерина (HMG-CoA-редуктазы), сдерживание процессов воспаления (нормализация уровня ФНО-α, снижение экспрессии NF-κB, уменьшение экспрессии провоспалительных цитокинов) и подавление окислительного стресса (увеличение экспрессии белков антиоксидантной системы, в частности супероксиддисмутазы); антагонизм норадреналину, активация гуанилатциклазы; снижение уровня тромбосанов, антагонизм витамина К (ингибирование витамин-К-эпоксидредуктазы)
влияние на метаболический синдром (лечение ожирения, а также в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета II типа, анорексии)	кверцетин, рутин, нарингин, нарингенин, флоретин, даидзеин, генистеин, эпигаллокатехин-галлат, изорамнетин, цианидин-О-3-глюкозид	подавление адипогенеза (ингибирование экспрессии генов C/EBP-α, PPAR-γ, Wnt/β-катенин; разобщение в мембране митохондрий); ингибирование процессов воспаления (нормализация уровня ФНО-α); снижение инсулинорезистентности (регуляция секреции адипокинов, активация AMP-зависимой протеинкиназы α)
антидиабетический эффект (в	диосмин, нафтихалкон, мирицетин, морин,	гипогликемическое действие (ингибирование IR-киназы и

комплексной терапии сахарного диабета II типа)	кепферол, цианидин-О-3-глюкозид, цианидин-О-3-галактозид, пеларгонин-О-3-глюкозид, сульфуретин, брацилин, флоретин, флорицин, нафтилхалкон, гесперетин, нарингенин, генистеин	соответствующего сигнального пути, ингибирование альдозоредуктазы, ингибирование глюконеогенеза и высвобождения глюкозы при увеличении активности фосфофруктокиназы 2 и пируваткиназы, подавление всасывания сахаров в кишечнике; повышение транскрипции PPAR); снижение инсулинорезистентности (активация AMP-зависимой протеинкиназы α , увеличение экспрессии GLUT4); защита β -клеток поджелудочной железы (препятствие образованию амилоидных фибрилл из амилина, увеличение экспрессии антиапоптозных белков Akt и Bcl-2.)
бактерицидное (преодоление резистентности к антибиотикам) в отношении <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	пандуратин А, изобавахалкон, бартерицин А, сканденон, кемпферол-рамнозид, сепиканин А, изолюпалбигенин, флавоон, 3'-О-метилдиплакол, ликохалкон А, галандин, эпигаллокатехин-галлат, эпикатехин-галлат, кверцетин, апигенин, морин, силимарин, байкалеин, силибин, римантадин, амантидин, сакуранетин, бутеин, изоликвиртигенин, фисетин, нарингенин, эриодиктиол, таксифолин, ликохалконы, асебогенин, 2',4'-аллиокси-6'-метокси-халконы, 6,7-дигидроксиауроны	повреждение клеточной мембраны; подавление активности β -лактамазы, гиразы бактериальной ДНК, топоизомераз I и II, D-Ala-D-Ala-лигазы, АТФ-синтазы F_1F_0 , хоризмат-синтазы; нарушение синтеза мембранных липидов бактерий (FabG, HpFabZ, Rv0636, KAS)
противовирусное в отношении вирусов гриппа А и В, энцефалита В, вируса Эпштейна-Барр, гепатита С, ВИЧ	кверцетин-3-О- β -D-глюкуронид, кемпферол, нарингенин, ксантохумол, сульфуретин, ауреусидин, производное бутилиндола, гиспидол, дипиранокумарины (каланолиды)	подавление репликации (связывание с вирусными частицами и вирусной РНК, ингибирование интегразы и обратной транскриптазы), подавление индукции вирусом сверхэкспрессии CDK4-киназы; препятствие сборки вирусных частиц за счет регуляции метаболизма липидов (активация PPAR- α), ингибирование проникновения вируса и высвобождения вирусных частиц посредством снижения активности нейраминидазы
гормональное действие (лечение гипертиреоза, рака груди,	сульфуретин, ауреусидин, 4,6,4'-тригидроксиаурон, генистеин, эквол, димеры	подавление продукции гормонов щитовидной железы (связывание с йодотиронин-дейодиназой), миметики

купирование симптомов менопаузы)	4-арилкумаринов	эстрогенов
антипаразитарная (в отношении возбудителей лейшманиоза, трипаносомоза, малярийного плазмодия)	4',6'-дигидроксиаурон, 6-метоксиаурон, 4,6,4'-триацетокси-3',5'-диметоксиаурон, 4-арилкумарины	ингибирование фумарат-редуктазы
противогрибковое действие в отношении <i>Microsporum canis</i> , <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus gattii</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Alternaria alternata</i>	синтетические производные халкона, вогонин	увеличение проницаемости мембраны путем ее разжижения

1.2.1.3. Действие флавоноидов на липидный бислой

- Дипольный потенциал мембран

В 1976 г. Андерсен с соавторами [29] обнаружили, что дигидрохалкон флоретин значительно увеличивает катионную и уменьшает анионную проводимость мембран, модифицированных переносчиками (нонактином, валиномицином и др.) или липофильными ионами (тетрафенилборатом, ТФБ^- , и тетрафениларсониумом, ТФА^+). Сходные результаты были получены позднее Мельником с коллегами [296]. Авторы цитируемых работ предположили, что введение флоретина в мембрану приводит к уменьшению ее дипольного потенциала. По мнению Бехингера и Силинга [58] это происходит как за счет переориентации собственных диполей липидных молекул, так и изменения гидратации бислоя. Чех и Бенц предположили, что адсорбция флоретина на мембране сопровождается изменением плотности упаковки липидных молекул, от которой зависит проекция вектора дипольного момента липидной молекулы на нормаль к поверхности липидного бислоя [105]. Альтернативным объяснением может быть интеркаляция молекул флоретина в гидрофильную область мембраны и ориентация их диполей в противоположном исходному полю направлении (рис. 1.15). Подобное предположение сделано при допущении, что адсорбированные диполи не влияют друг на друга и на конформацию сорбирующихся молекул [107]. Понимая всю условность такого подхода, следует отметить его удобство и простоту при описании эффектов флоретина.

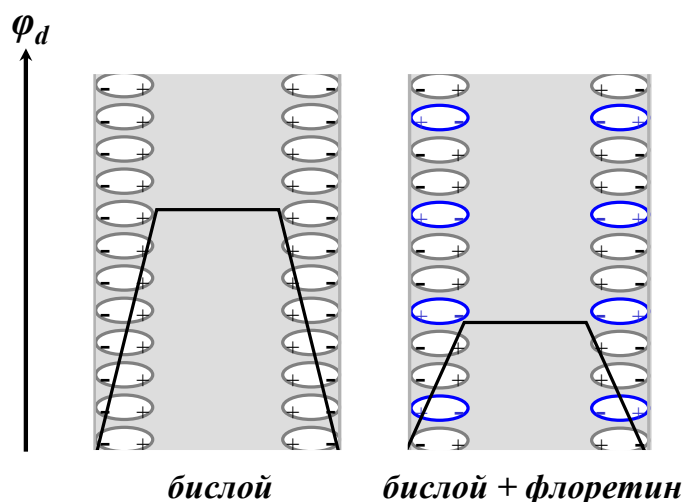


Рис. 1.15. Схема, иллюстрирующая механизм уменьшения дипольного потенциала мембраны под действием флоретина. По [29].

Поскольку потенциал углеводородного остова мембраны положителен относительно окружающей бислой водной фазы, падение скачка потенциала в присутствии флавоноида будет сопровождаться снижением энергетического барьера для проникновения через мембрану катионов и его увеличением для транспорта анионов. Количественная оценка изменения дипольного потенциала может быть проведена по формуле (2.13). Изучение зависимости эффекта флоретина от pH омывающего раствора позволило заключить, что за падение скачка потенциала на границе раздела фаз ответственна незаряженная форма флавоноида [29].

При сравнении скоростей транслокации гидрофобных анионов и катионов Франклин и Кафизо определили величину уменьшения дипольного потенциала везикул из яичного фосфохолина при включении 15 моль % флоретина, которая составила около 220 мВ [147]. Сходная оценка величины максимального $\Delta\varphi_d$ в присутствии флоретина (190 ± 10 мВ) дана Полем с соавторами для липидных бислоев из дифитаноилфосфохолина с использованием метода компенсации внутримембранного поля [341]. Несколько меньшая величина изменения скачка потенциала (около 160 мВ) получена в работах Чеха с коллегами, исследовавших проницаемость везикул из яичного фосфохолина для дипикриламина [106, 107]. Еще меньшее значение (90 мВ при 100 мкМ) получили Хидака и Асами с использованием диэлектрической спектроскопии [187]. При измерении флоретин-индуцированного уменьшения дипольного потенциала мембраны установлено, что этот флавоноид способен проникать через липидный бислой [13, 341, 441].

Действие флавоноидов на дипольный потенциал мембран, обусловлено не только химическими особенностями строения самого модифицирующего агента, но и липидным составом бислоя. Так, в работе [29] было показано, что в присутствии в мембране холестерина способность флоретина увеличивать катионный ток больше, а уменьшать анионный – меньше, чем в бислоях, не содержащих стерин. Гликозид флоретина флорицин и два его более коротких синтетических аналога, дигидроксиацетофеноны, приводили к увеличению мембранной проводимости, обусловленной K^+ -нонактином, однако их эффекты были менее выражены, чем в случае флоретина. Это свидетельствует о менее выраженных диполь-модифицирующих свойствах аналогов флоретина по сравнению с "родительской" молекулой. Данные Хе с соавторами свидетельствуют в пользу изменения дипольного потенциала мембран при введении алкиламинотетил-производных рутина [181]. Изучение изменения дипольного потенциала монослоев при адсорбции синтетических производных дубильной кислоты позволило выявить среди них два наиболее активных диполь-модифицирующих соединения: дубильную кислоту и пента-О-галлоил- α -D-глюкозу [194]. Величины максимального уменьшения скачка

граничного потенциала ДПФХ-монослоев при введении дубильной кислоты и пента-О-галлоил- α -D-глюкозы составляют 150 и 270 мВ, соответственно. Еще большей эффективностью эти полифенолы обладают в отношении монослоев из яичного фосфохолина.

Систематическое исследование зависимости диполь-модифицирующей способности флоретина от липидного состава и агрегатного монослоя было выполнено в работе [249]. Установлено, что эффективность флоретина в отношении монослоев, находящихся в жидкокристаллическом состоянии, определяется видом азотистого основания в фосфолипидной головке и падает в ряду холин > этаноламин > глицерин. В гель-состоянии дипольный потенциал димиристоилфосфоэтаноламиновых монослоев остается интактным в присутствии флоретина, в то время как в случае димиристоилфосфохолина (ДМФХ) наблюдается значительное снижение φ_d . Введение холестерина в монослой из яичного фосфоэтаноламина приводит к ослаблению диполь-модифицирующей способности флоретина. Вместе с тем, выраженность действия флоретина не зависит от вида эфирной связи между жирнокислотными остатками с глицерином (наличия карбонильной группы). Авторы заключили, что уменьшение дипольного потенциала под действием флоретина включает нейтрализацию или переориентацию других дипольных фрагментов, локализованных в интерфазной области, в частности, фосфатной группы фосфолипидов. В этом контексте результаты могут указывать и на иное распределение поляризованной воды вокруг фосфатных групп при адсорбции флавоноида.

В 1980 г. Стрихарц с коллегами [411] выявили, что флоретин подавляет калиевую и натриевую проводимость мембраны гигантского аксона кальмара. В качестве одного из возможных механизмов ингибирования катионной проводимости авторами было предложено модулирование воротных процессов калиевых каналов при изменении дипольного потенциала мембраны флоретином. Аналогичные результаты были получены Цери и др. [108] при изучении электрических свойств портняжной мышцы лягушки. Авторы обнаружили увеличение проницаемости сарколеммы для хлора и уменьшение для калия. Наблюдаемые явления по мнению авторов также могли быть отнесены к диполь-модифицирующей способности флоретина.

В работе Антоненко с соавторами [36] влияние флоретина на скорость обмена катион- H^+ , вызванного нигерицином, и анион/ OH^- , обусловленного трибутилтином, также обсуждается в терминах модификации флавоноидом дипольного потенциала мембраны.

- *Фазовые превращения мембранообразующих липидов*

Еще в 1988 году Фавзи с соавторами [136] пришли к выводу, что инактивация фосфолипазы А2 под действием кверцетина опосредована его разжижающим действием в отношении липидного бислоя. В качестве обоснования предложенной гипотезы авторы привели результаты исследования плавления дистеароилфосфоэтаноламина (ДСФЭ) в присутствии кверцетина. Они показали, что в присутствии 50 мкМ флавоноида в липидной дисперсии снижаются температура ($\Delta T_m = -0.3$ °С), кооперативность (характеризуемая шириной пика на полувысоте: $\Delta T_{1/2} = 3$ °С) и энтальпия ($\Delta \Delta H_m = -6.3$ кДж/моль) плавления ДСФЭ.

Сравнивая влияние кверцетина, гесперетина, нарингенина и рутина на плавление дипальмитоилфосфохолина (ДПФХ), Сайа и др. [365] установили, что в отличие от рутина, кверцетин, гесперидин и нарингенин взаимодействуют с ДПФХ и вызывают сдвиг термограммы в сторону меньших T_m .

Лехтонен и соавторы [262] обнаружили, что величина уменьшения температуры фазового перехода в присутствии даидзеина зависит от вида мембранообразующего фосфолипида. Введение даидзеина к липосомной суспензии из ДМФХ приводит к падению как температуры (на 1.5 °С при эквимольном соотношении флавоноид:липид), так и энтальпии главного фазового перехода (на 10 кДж/моль). Подобные, но меньшие по величине, эффекты наблюдаются и в случае ДПФХ ($\Delta T_m = -0.3$ °С и $\Delta \Delta H_m = -6.9$ кДж/моль при 0.65:1.00 соотношении флавоноид:липид). Близкий аналог даидзеина генистеин обладает сходными свойствами ($\Delta T_m = -0.9$ °С и $\Delta \Delta H_m = -6.4$ кДж/моль). В присутствии даидзеина и генистеина также снижается температура (T_p) и энтальпия (H_p) перехода ДПФХ в риппл-фазу (предпереход), при этом в присутствии флавоноидов пика на термограммах, соответствующего предпереходу ДМФХ, не наблюдается. Характер взаимодействия даидзеина с ДМФС оказывается отличным от сценария его влияния на ДМФХ: добавка флавоноида вызывает падение T_m и слабое увеличение H_m .

Гониотаки и др. [164] сравнили эффекты кверцетина, рутина, изоскутеллареина и дигликозида последнего на главный фазовый переход ДПФХ при соотношении флавоноид к липиду, равном 2 к 9. Эффективность снижения энтальпии плавления убывает в ряду рутин > кверцетин > изоскутеллареин > дигликозид изоскутеллареина. При столь малых соотношениях флавоноид к липиду авторам не удалось выявить достоверных различий T_m .

По данным Лондоньо-Лондоньо с коллегами [272] увеличение концентрации геперидина и гесперитина во внутреннем объеме липосом до 16.4 mM приводит к уменьшению температуры главного фазового перехода ДМФХ на 0.5 °С, энтальпия

перехода при этом возрастает ($\Delta H_m \approx 0.3$ Дж/г). Большую эффективность агликона по сравнению с гликозидом авторы связали с большей гидрофобностью первого, что позволяет ему глубже проникать в бислой. Анализируя термограммы, авторы пришли к заключению о некотором увеличении кооперативности перехода. Влияние этих флавоноидов на предпереход было различно: в присутствии агликона пик, соответствующий плавлению риппл-фазы, пропадал, а при введении гликозида энтальпия предперехода ДМФХ возрастала.

Чех с коллегами [107] обнаружили, что введение 50 моль % флоретина в мембранообразующую смесь приводит к снижению температуры плавления ДМФХ на 10 °С. Наблюдаемый эффект зависит от pH раствора: чем выше pH, тем меньше ΔT_m . Поскольку с увеличением pH процентное соотношение числа молекул флоретина в заряженной и незаряженной форме растет, полученные результаты указывают на то, что на фазовый переход ДМФХ влияет незаряженная форма флавоноида. Выраженное уменьшение T_m сопровождается незначительным уменьшением кооперативности перехода. Поскольку после добавки флоретина пик на эндотерме остается симметричным, авторы предположили одинаковое распределение флоретина между гель- и жидкокристаллической фазами.

Аунер с соавторами [47] пришли к выводу, что исчезновение в присутствии флоретина пика, соответствующего предпереходу ДПФХ, обусловлено взаимодействием флавоноида с полярными головами фосфолипидов и изменением наклона их ацильных цепей. Авторы показали, что введение 30 моль % флоретина на этапе формирования мультисамельных липосом вызывает значительное падение T_m приблизительно на 6 °С и увеличение ΔH_m более чем на 10 кДж/моль. Снижение кооперативности перехода, наблюдающееся в виде уширения пика на термограмме (соответствующего главному фазовому переходу), по мнению авторов, свидетельствует о том, что флоретин способен интеркалировать в бислой и уменьшать число липид-липидных взаимодействий.

Целый ряд флавоноидов был протестирован в работе Тараховского с коллегами [419]. Под действием рутина (при эквимольном соотношении флавоноид:липид) эндотерма ДМФХ мультисамельных липосом практически не меняется. Незначительное влияние наблюдается в случае мирицетина и катехина. Более существенные изменения возникают в присутствии кверцетина и таксифолина. Наибольшим эффектом (уменьшением T_m почти на 10 °С) обладает флоретин. Авторы предположили, что наблюдаемые различия связаны с различной гидрофобностью и конформацией изученных флавоноидов. В другой работе Тараховский с соавторами [16]

показали, что с увеличением концентрации таксифолина как во внешнем омывающем липосомы растворе, так и в их внутреннем объеме, температура плавления липида уменьшается, в то время как ширина перехода значительно увеличивается. Последнее свидетельствует об уменьшении кооперативности перехода. Использование электронной микроскопии мультислойных липосом в технике замораживания-скалывания позволило заключить, что таксифолин способен проникать через липидный бислой.

Авторы всех процитированных выше работ единогласны во мнении, что способность флавоноидов влиять на процессы плавления мембранообразующих липидов связана с их способностью встраиваться в липидный бислой. Интеркаляция молекул флавоноидов между липидами мембраны приводит к увеличению подвижности ацильных цепей и соответствующему падению температуры и кооперативности фазового перехода. Очевидно, что чем глубже погружается флавоноид в бислой, тем сильнее выражены его эффекты. В свою очередь глубина погружения должна зависеть от гидрофобности интеркалирующего агента. Кроме того, существенную роль в указанных процессах должна играть и ориентация молекул флавоноида в бислое.

Хух с соавторами изучали влияние дубильной кислоты и ее производных на фазовые переходы ДПФХ [194]. Авторами было установлено, что дубильная кислота и пента-О-галлоил- α -D-глюкоза способствуют образованию $L_{\beta I}$ гель-фазы, характеризующейся взаимным проникновением жирнокислотных цепей, а также меньшей толщиной бислоя и большей площадью, приходящейся на одну липидную молекулу, по сравнению с L_{β} гель-фазой. Другие протестированные полифенольные соединения подобного эффекта не оказывают. В отсутствие модифицирующих агентов формирование $L_{\beta I}$ гель-фазы возможно только в случае высоко гидратированного бислоя из диалкильных фосфохолинов (в молекулах которых жирнокислотные остатки образуют с глицеролом простую эфирную связь). Можно думать, что образование $L_{\beta I}$ фазы диацильными липидами со сложноэфирной связью обусловлено взаимодействием их карбониллов с дубильной кислотой или пента-О-галлоил- α -D-глюкозой, а также возможными изменениями гидратации бислоя в присутствии этих полифенолов. Следует также отметить, что выраженность диполь-модифицирующей способности производных дубильной кислоты коррелирует с их способностью влиять на фазовые превращения липидов: среди протестированных соединений только дубильная кислота или пента-О-галлоил- α -D-глюкоза существенно изменяют φ_d и T_m .

- *Проницаемость мембраны для флуоресцентных маркеров*

Оллила с коллегами изучали взаимодействие некоторых флавонов, апигенина, лютеолина и акацетина, а также флавонолов, рамнетина, кверцетина, морина и мирицетина, с модельными мембранами [324]. Ими установлено, что акацетин, рамнетин, апигенин (около 20 %) и, в меньшей степени, морин (16 %) увеличивают проницаемость липосом из яичного фосфохолина для флуоресцентного маркера кальцеина. Лютеолин слабо влияет на утечку кальцеина из везикул (5 %). В присутствии кверцетина и мирицетина утечки маркера не наблюдается. Авторы пришли к выводу, что выраженность эффекта определяется числом и положением гидроксильных, а также наличием в молекуле флавоноида метоксильных групп. Как правило, чем меньше гидроксильных содержит молекула, тем сильнее флавоноид влияет на проницаемость мембраны. Присутствие метоксильной группы увеличивает гидрофобность молекулы и выраженность эффекта, в частности, при одинаковом числе гидроксильных групп метоксилированный рамнетин более активен по сравнению с лютеолином. По всей вероятности, гидроксильное в 2'-положении также способствует увеличению проницаемости мембран. Так, морин, имеющий ОН-группу в 2'-положении, вызывает заметную утечку флуоресцентного маркера из везикул, в отличие от его 3'-гидроксильного аналога, кверцетина, который такой способностью не обладает.

Шрода и др. исследовали влияние бензиловых производных генистеина на утечку кальцеина из везикул, сформированных из фосфохолина яичного желтка. Они показали, что в микромолярном диапазоне выраженность утечки коррелирует с дипольным моментом дополнительного бензильного фрагмента молекулы [403]. По сведениям Йуна с соавторами даже высоко гидрофильный гликозид кверцетина, изокверцетрин, в миллимолярных концентрациях способен дезинтегрировать липидный бислой, вызывая полное высвобождение флуоресцентного маркера из липосом [468].

Литературные данные указывают на то, что в основе многих эффектов флавоноидов лежит их взаимодействие с клеточными мембранами. Однако остается неясным, почему отличающиеся по структуре агенты обладают сходной мембранной активностью. Поскольку эти соединения характеризуются значительным дипольным моментом (Таблица 1.1), можно полагать, что наиболее общим для них является влияние на распределение электрического поля на границах мембран. Однако к настоящему моменту единственным общепризнанным фактом остается диполь-модифицирующая способность флоретина, в то время как работ, посвященных исследованию эффектов других флавоноидов, практически нет. Более того, некоторые авторы склонны связывать

эффекты флоретина с открытостью трехуглеродной цепи, соединяющей ароматические кольца, что определяет уникальную способность халкона принимать конформацию «прищепки» при образовании водородных связей с молекулами липидов [419]. Для выяснения молекулярных механизмов мембранного действия флавоноидов требуется детально изучить и количественно описать структурно-функциональные взаимодействия достаточно широкого круга соединений с мембранами различного состава. Это обуславливает необходимость исследования диполь-модифицирующих свойств флавоноидов, в молекулах которых трехуглеродный фрагмент входит в состав гетероцикла. Среди существующих способов контроля изменений дипольного потенциала, наиболее перспективными для решения задач данного исследования являются методики, основанные на измерении электрических характеристик плоских липидных бислоев. Поскольку большинство флавоноидов имеют собственный дипольный момент, такая возможность является принципиально важной и существенным образом повлияла на выбор экспериментальных методик, использованных в данной работе.

Обнаруженная несколькими группами исследователей способность флоретина, помимо снижения дипольного потенциала мембраны, также влиять на плавление ацильных цепей мембранных липидов, порождает целый ряд дополнительных вопросов: насколько эти свойства взаимосвязаны, какие механизмы лежат в основе наблюдаемых изменений, каким образом снижение температуры плавления индивидуальных липидов должно отразиться на характере фазового разделения в многокомпонентном бислое. Все эти вопросы требуют ответа и могут быть решены с использованием современных методик исследования модельных липидных систем, наиболее широко применяемыми из которых являются дифференциальная сканирующая калориметрия и конфокальная флуоресцентная микроскопия.

1.2.2. Стирилпиридиновые красители

Все большее число работ свидетельствует в пользу того, что биологические красители могут модифицировать дипольный потенциал модельных и клеточных мембран.

Стирилпиридиновые красители имеют в качестве хромофорной системы полиметиновую цепочку, представляющую собой систему сопряженных двойных связей, фланкированную пиридином и диалкиламиноарильной группой [169]. Красители серий RH содержат на одном конце диалкиламинофенил (рис. 1.15), а серии ANEP – диалкиламинонафтил. На другом конце молекулы может находиться алкилсульфат,

алкилфосфат или алкиламин (у на рис. 1.16). Все представленные на рис. 1.17 красители электронейтральны, поскольку содержат два разноименно заряженных гетероатома.

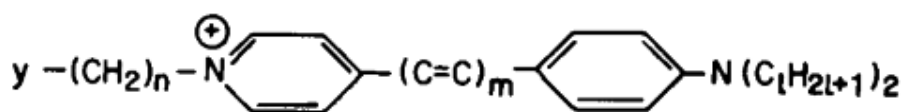


Рис. 1.16. Общая структурная формула стирилпиридиновых красителей серии RH.

Стирилпиридиновые красители серий RH и ANEP относятся к быстрым потенциал-чувствительным мембранным красителям, оптический отклик которых происходит за время порядка миллисекунд, а спектральный профиль и/или интенсивность флуоресценции зависит от трансмембранного электрического поля [145, 172, 270, 447]. Электрочувствительность красителей обусловлена взаимодействием электрического поля с делокализованным в системе сопряженных двойных связей положительным зарядом. В результате наблюдается электрохромный сдвиг спектров поглощения и флуоресценции [268-270, 315]. Показано, что спектральные характеристики потенциал-чувствительных красителей зависят от их микроокружения [288]. Использование стирилпиридиновых красителей открывает широкие возможности прижизненного мониторинга различных мембрано-ассоциированных процессов в возбудимых клетках [9, 236]. Несмотря на то, что спектральные свойства стирилпиридиновых красителей достаточно полно охарактеризованы, механизмы их взаимодействия с биологическими мембранами не до конца изучены. Серьезным ограничением применения стирилпиридиновых красителей для потенциометрического картирования мембран является возможность влияния самих наносенсоров на распределение электрических зарядов в бислое [280].

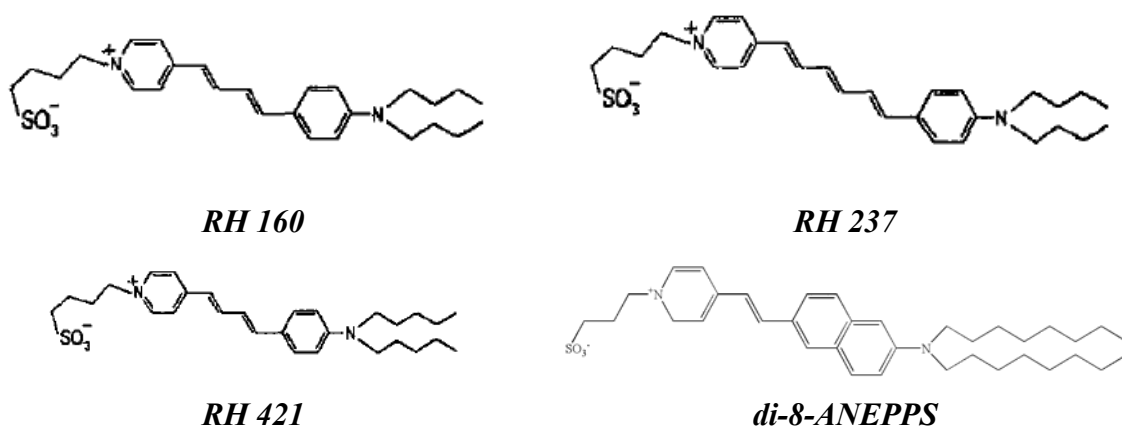


Рис. 1.17. Химическая структура некоторых стирилпиридиновых красителей серии RH и ANEP.

Малков и Соколов показали, что RH-красители увеличивают ϕ_d фосфохолиновых мембран и эта способность падает в ряду RH 421, RH 237 и RH 160 [280]. Согласно Пассечнику и Соколову [332] глубина погружения хромофора в липидный бислой возрастает в ряду RH 160, RH 421 и RH 237.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о необходимости пересмотра методик клеточной биологии, использующих стирилпиридиновые красители серии RH в качестве потенциал-чувствительных зондов. Сходство структур стирилпиридиновых красителей серий RH и ANEP порождает вопрос о применимости с этой целью зондов на основе ANEP. С другой стороны, выявленная способность RH-красителей увеличивать дипольный потенциал фосфолипидных бислоев, открывает широкие перспективы их приложения наряду с флавоноидами для изучения роли дипольного потенциала в функционировании ионных каналов, в том числе образованных экзогенными соединениями. Для этого необходимы модификаторы, встраивание дипольных моментов которых в бислой приводит к противоположному по знаку изменению дипольного потенциала по отношению к установленному для флавоноидов. Применение с этой целью стирилпиридиновых красителей обуславливает необходимость провести количественную оценку влияния ряда стирилпиридиновых красителей на липидные бислои различного фосфолипидного, стеринного и сфинголипидного состава.

1.2.3. Тиреоидные гормоны

Гормоны щитовидной железы, тироксин и трийодтиронин относятся к йодированным производным тирозина и отличаются только числом галогеновых заместителей: четыре и три атома иода в молекуле, соответственно (рис. 1.18). Некоторые исследователи склонны считать, что действие тиреоидных гормонов на физико-химические свойства клеточных мембран может быть одним из ключевых механизмов их биологической активности, не связанной с регуляцией генома [59, 204]. Несмотря на то, что это предположение было высказано достаточно давно, сведений, касающихся механизмов мембранного действия гормонов щитовидной железы, в литературе пока мало.

Впервые уменьшение дипольного потенциала мембран при введении гормонов щитовидной железы было продемонстрировано в работе Цыбульской с соавторами [432]. Они показали, что тироксин и трийодтиронин увеличивают проницаемость липидных бислоев из лецитина и холестерина для комплекса калий-нонактин и уменьшают

проницаемость таких мембран для отрицательно заряженного гидрофобного иона СССР⁻. Эти результаты можно интерпретировать как падение положительного скачка потенциала на границе раздела фаз водный раствор-бислой.



Рис. 1.18. Химическая структура иодосодержащих гормонов тирокина и трийодтиронина.

Иссе и др. [204] также показали, что тиреоидные гормоны уменьшают дипольный потенциал монослоев из фосфохолина яичного желтка, причем диполь-модифицирующая способность коррелирует с содержанием иода в молекулах гормонов: эффективность падает в ряду тироксин (тетраиодтиронин), трийодтиронин, диiodтиронин. Позднее авторы обнаружили, что гормоны щитовидной железы также уменьшают дипольный потенциал монослоев из дифитаноилфосфохолина (ДФФХ) и ПОФХ. Используя дифференциальную сканирующую калориметрию больших мультисамплярных липосом из ДФФХ, Иссе с соавторами [205] установили, что тироксин и трийодтиронин способны проникать через бислой. Введение этих гормонов в процессе формирования липосом приводит к снижению температуры главного фазового перехода приблизительно на 1 °С. При этом наблюдается падение кооперативности и энтальпии перехода. Способность тиреоидных гормонов проникать через мембрану была также подтверждена при исследовании тушения флуоресценции родамина трийодтиронином при смешивании ПОФХ-липосом, нагруженных флуоресцентным маркером и гормоном, соответственно.

Литературные свидетельства диполь-модифицирующего действия тиреоидных гормонов ставят вопрос о возможной физиологической роли подобных эффектов. Можно предположить, что изменение дипольного потенциала мембраны под действием гормонов щитовидной железы способно вызвать модуляцию функционирования встроенных в мембрану ионных каналов, в том числе входящих в состав сигнальных систем клетки. Проверка высказанного предположения потребует отдельного комплексного исследования, но одним из косвенных доказательств в пользу подобной гипотезы может быть демонстрация возможностей липид-опосредованной регуляции ионных каналов, образованных экзогенными соединениями, при введении тиреоидных гормонов в модельные липидные системы.

1.3. Краткая характеристика объектов исследования

В этой подглаве будет дана характеристика использованных в работе каналообразующих соединений и их мембранотропного действия. Основные критерии выбора определялись задачами исследования и включали наличие фармакологической или токсической активности, а также разнообразие химического строения порообразующих экзогенных соединений. Нами были протестированы агенты, обладающие выраженным антимикробным действием в отношении патогенных грибов (полиеновые макролидные антимикотики из *Streptomyces*, нистатин, амфотерицин Б и филипин; липодепсинанопептид из *Pseudomonas syringae*, сирингомицин Е; липопептид из *Bacillus subtilis*, сурфактин) или бактерий (пептиды из *Hyalophora cecropia* цекропин А и Б). Также использовали цитотоксины: основной токсин *Staphylococcus aureus*, α -гемолизин, и амилоидогенные белки и пептиды нейронального происхождения. По химической структуре описываемые мембранотропные соединения можно разделить на три группы: липопептиды, пептиды(белки) и полиены. Молекулярная масса порообразующих агентов варьировала от 1 до 30 кДа.

1.3.1. Ионные каналы, формируемые липопептидами

1.3.1.1. Противогрибковые липодепсинанопептиды *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae – бактериальные возбудители большого числа однодольных и двудольных растений [173]. Эти фитопатогенные бактерии продуцирует неспецифические по отношению к растению-хозяину токсины, которые можно разделить на шесть групп: вискозины, сирингомицины, амфизины, путисолвины, толаазины и сирингопептины. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* производят два вида вызывающих некроз липодепсипептидов: сирингомицины и сирингопептины. Последние относятся к липодепсинанопептидам: их молекулы содержат пептидную голову, представляющую собой девять замкнутых в кольцо аминокислотных остатков, и углеводородный хвост [152, 376]. Молекулярная масса в зависимости от соединения варьирует от 1100 до 1300 Да. Наиболее изученным среди фитотоксинов *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* является сирингомицин Е (СМЕ) ($M_w = 1226$). Его химическая структура представлена на рис. 1.19.

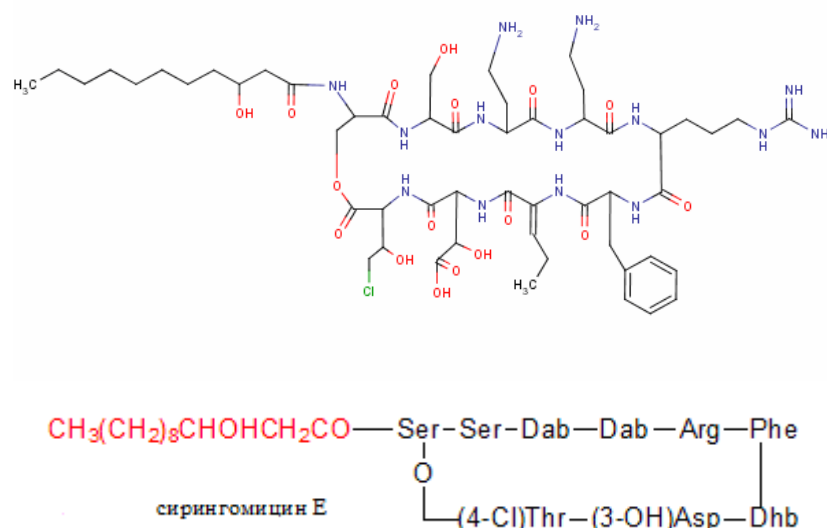


Рис. 1.19. Химическая структура сирингомицина E. Обозначения неординарных аминокислот: Dab – 2,4-диаминомасляная кислота; Dhb – 2,3-дегидроаминомасляная кислота; Asp(3-OH) – 3-гидроксиаспарагиновая кислота; Thr(4-Chl) – 4-хлортреонин. По [477].

СМЕ играет важную роль в растительно-микробных взаимодействиях, повышая вирулентность бактерий [375]. Кроме того, он обладает заметным противогрибковым действием [199], которое сильно зависит от наличия хлора в С-концевой части молекулы [170]. Благодаря своей фунгицидной активности, СМЕ используется для обработки урожая фруктов в послеуборочный период [79]. Более того, СМЕ проявляет активность и в отношении возбудителей грибковых заболеваний человека: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Candida kefir* [114, 417]. Однако до настоящего времени попытки применения СМЕ в фармакологических целях успеха не возымели из-за возможного развития побочных эффектов, в частности, выраженной гемолитической активности [199]. Проблема неспецифичности влияния лекарственных препаратов во многом обусловлена сходством их механизмов действия на различные биологические объекты. В первую очередь это касается порообразующих соединений, мишенью действия которых являются мембраны различных клеток. Показано, что СМЕ образует ионные каналы в модельных [17, 137, 138, 197] и клеточных мембранах [84]. Установлено, что индуцированный липопептидом трансмембранный ток пропорционален концентрации СМЕ в шестой степени, что говорит об участии шести молекул фитотоксина в архитектуре поры [138]. На олигомеризацию молекул СМЕ в процессе формирования пор в мембране также указывает и отличный от единицы коэффициент Хилла, полученный в экспериментах по изучению вызванного липопептидом гемолиза эритроцитов [19].

Формируемые СМЕ поры характеризуются обусловленной положительным зарядом липопептида преимущественно анионной селективностью, многоуровневой проводимостью, асимметрией и нелинейностью вольт-амперных характеристик, а также потенциал-чувствительностью открывания(закрывания) каналов [17, 223, 278]. На рис. 1.20 видно два подсостояния проводимости СМЕ-каналов: "малые" и "большие". При исследовании катион-анионной селективности и размера СМЕ-пор разной проводимости было показано, что "большие" каналы являются кластерами, т.е. результатом кооперативного открывания(закрывания) элементарных ("малых") каналов [17, 223]. Показано, что синхронность открывания элементарных каналов в кластерах зависит от величины трансмембранного напряжения [10, 11, 326].

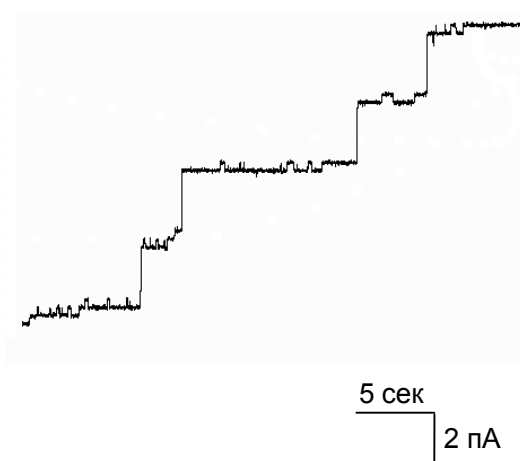


Рис. 1.20. Флуктуации тока, соответствующие открыванию(закрыванию) одиночных каналов, формируемых СМЕ в плоских липидных бислоях из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ. Мембраноомывающий раствор: 0.1 М NaCl (pH 6). Трансмембранная разность потенциалов составляла -100 мВ. СМЕ введен в омывающий раствор с одной стороны бислоя (цис). По [17].

Детальные исследования взаимодействия СМЕ с липидными бислоями свидетельствуют о ключевой роли компонентов мембраны в формировании СМЕ-каналов. Так, на основании изучения потенциал-зависимости проводимости "малых" СМЕ-каналов в заряженных и незаряженных липидных бислоях (рис. 1.21), а также в разбавленных и концентрированных растворах электролита, было высказано предположение об асимметрии строения СМЕ-поры и участии мембранных липидов в ее архитектуре [7, 278, 325]. Исследование потенциал-чувствительности открывания-закрывания СМЕ-каналов (рис. 1.22) позволило подтвердить эту гипотезу [4, 278].

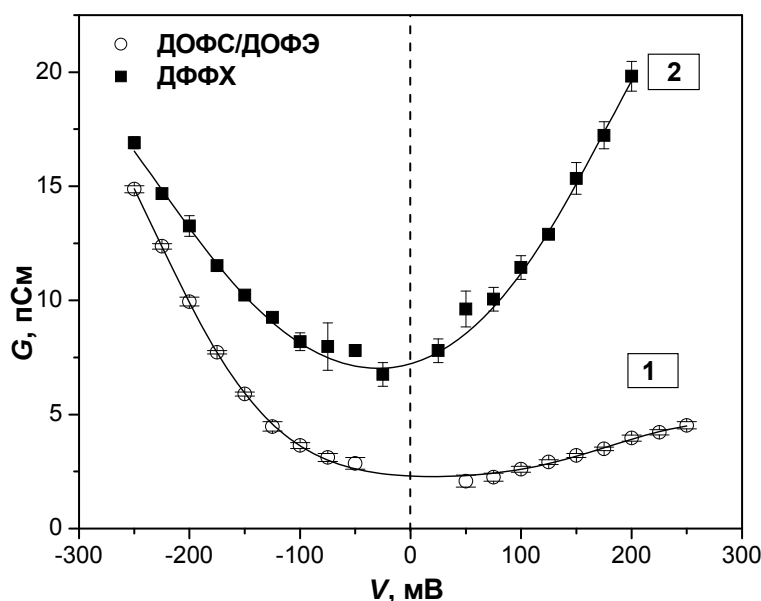


Рис. 1.21. Вольт-амперные характеристики "малых" СМЕ-каналов в отрицательно-заряженных (1) и незаряженных (2) мембранах. Липидные бислои омывались 0.1 М NaCl, рН 6.0. Форма вольтамперных кривых обусловлена распределением заряда в канале. Участие липидов в формировании СМЕ-пор определяет различие профилей потенциальной энергии в каналах, образованных в заряженных и незаряженных бислоях. По [278].

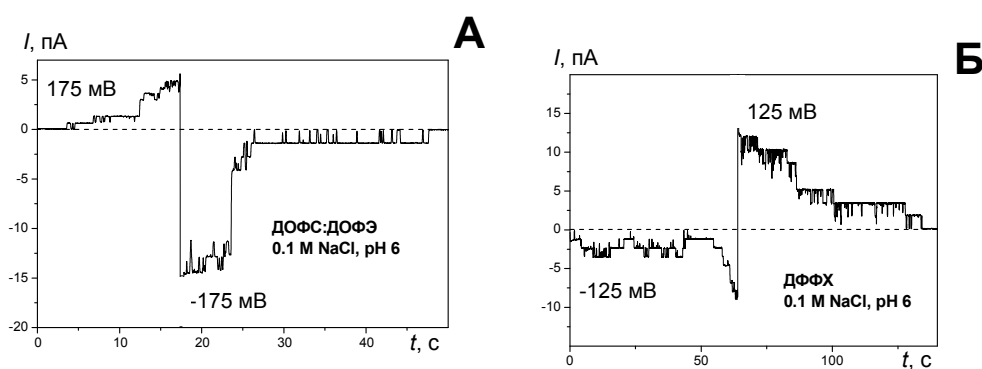


Рис. 1.22. Потенциал-чувствительность открывания(закрывания) СМЕ-каналов. (А) В отрицательно заряженных мембранах каналы открываются при приложении положительного, а закрываются при подаче отрицательного трансмембранного потенциала. (Б) В незаряженных мембранах происходит реверсия потенциал-чувствительности СМЕ-каналов: каналы открываются при приложении отрицательного, а закрываются при подаче положительного трансмембранного потенциала. Мембраноомывающий раствор: 0.1 М NaCl (рН 6.0). По [278].

Результаты изучения взаимодействия липопептидов *Pseudomonas syringae* с липосомами различного липидного состава методом электронного парамагнитного резонанса также находятся в соответствии с предположением об активной роли липидных

молекул в формировании СМЕ-поры [415]. По мнению Малева с соавторами, СМЕ-канал является асимметричной пептид-липидной порой, одно из устьев (*цис*-) которой образовано молекулами липопептида, а другое (*транс*-) – мембранными липидами (рис. 1.23) [278].

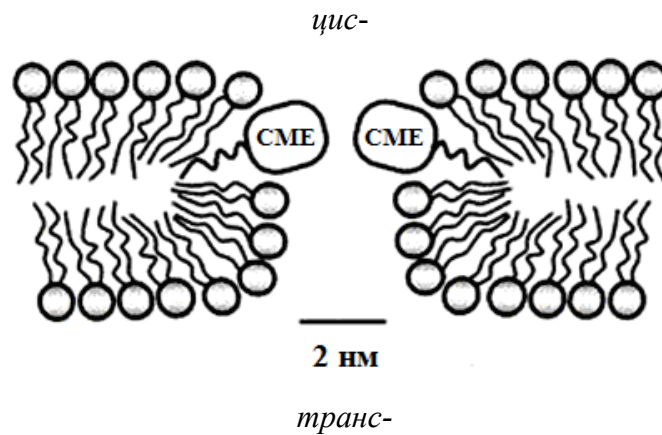


Рис. 1.23. Модель строения СМЕ-канала. По [278].

Благодаря использованию различных генетических [171, 410, 416] и биофизических подходов [66, 137] наглядно продемонстрирована ключевая роль стерина и сфинголипидов в процессах формирования и функционирования СМЕ-каналов. Установлено, что концентрация СМЕ, ингибирующая рост дрожжей, значительно выше в присутствии в среде стерина по сравнению с их отсутствием. При этом защитное действие холестерина оказалось сильнее, чем у эргостерина. Более того, обнаружено, что СМЕ не влияет на рост эргостерин-дефицитных мутантов [214]. При изучении влияния стерина на скорость выхода ^{86}Rb из эритроцитов под действием СМЕ получены сходные результаты: потеря холестерина приводит к увеличению скорости выхода изотопа [66]. Аналогичные результаты были получены при исследовании каналообразующей активности СМЕ в липидных бислоях, включающих различные стеринны [137]. Установлено, что мутантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, синтезирующие С4-негидроксилированные сфинголипиды, не восприимчивы к СМЕ [171]. Результаты Стока с соавторами также указывают на роль длины углеводородных хвостов, а также наличия маннозилдиинозитола в голове сфинголипидной молекулы в процессе ингибирования СМЕ роста сахаромидет [410]. Также показано, что общий уровень сложных сфинголипидов влияет на чувствительность дрожжевых клеток к СМЕ [428]. По мнению Хама и коллег, наблюдаемые эффекты скорее связаны с преимущественным распределением липопептида в упорядоченные мембранные домены, обогащенные

стеринами и сфинголипидами [178]. По всей вероятности, химическая модификация стериновых и сфинголипидных молекул, как и увеличение их содержания, сопровождается существенным изменением физических и структурных свойств упорядоченных доменов, что отражается на взаимодействии СМЕ с клеточными [200] и модельными мембранами [224].

Подытоживая представленные в этом подпараграфе материалы, следует отметить, что, несмотря на многолетнее изучение сирингомициновых каналов, множество вопросов до сих пор остаются открытыми. В частности, не ясны механизмы синхронизации элементарных каналов в кластерах. Зависимость этих процессов от трансмембранного напряжения позволяет предполагать участие заряженных и(или) дипольных групп в работе воротного механизма, обеспечивающего кооперативное открывание каналов. Результаты изучения отклика сирингомициновых каналов на варьирование дипольного потенциала мембран с помощью дипольных модификаторов могли бы пролить свет на природу многоуровневой проводимости этих каналов. Подтверждения также требует гипотеза о строении сирингомициновых каналов, постулирующая образование в мембране асимметричных липопептид-липидных пор. Наиболее важным в плане перспектив использования сирингомицина Е и его аналогов в клинической фармакологии является вопрос о связи селективности действия этих липопептидов со стериновым и сфинголипидным составом клеточных мембран.

1.3.1.2. Антимикробный липопептид сурфактин *Bacillus subtilis*

Некоторые штаммы *Bacillus subtilis* продуцируют поверхностноактивный циклический гептапептид – сурфактин. Молекула с массой 1036 Да содержит остаток 3-гидрокси-13-метилтетрадекановой кислоты и пептидное лактоновое кольцо из семи аминокислотных остатков, два из которых в физиологических условиях несут отрицательный заряд. В зависимости от того, какой аминокислотный остаток образует лактонную связь с остатком жирной кислоты L-Leu, L-Val или L-Ile, можно выделить А, В и С форму сурфактина, соответственно. На рис. 1.24 представлена химическая структура сурфактина А (СФ).

Сурфактин является одним из самых мощных биосурфактанов, снижая поверхностное натяжение воды от 72 до 27 мН/м [40]. Выраженные поверхностно-активные свойства обуславливают возможность его применения в экологической промышленности для очистки воды и почвы [316]. СФ также проявляет

противоопухолевую, противовоспалительную, антибактериальную, противогрибковую, противовирусную и антимикоплазменную активность [81, 393, 443, 444]. Кроме того, исследования, проведенные Кикуши и Хасуми, указывают на допустимость применения СФ в антикоагуляционной терапии [230].

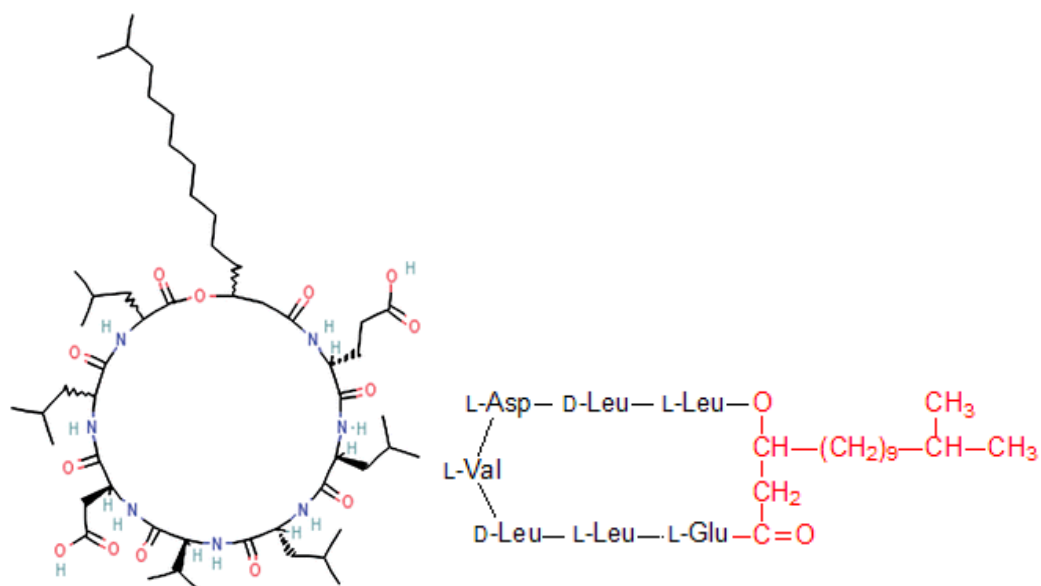


Рис. 1.24. Химическая структура сурфактина А. По [400].

Данные, полученные при исследовании СФ-индуцированной проницаемости липосом из пальмитоолеилфосфохолина для различных флуорофоров, свидетельствуют о различии механизмов действия липопептида на мембраны в зависимости от соотношения липид:СФ [85, 183]. Введение относительно высоких концентраций липопептида сопровождается образованием мицелл и полным высвобождением маркера. Авторы цитируемых работ склонны считать, что при малых концентрациях СФ утечка маркера из липосом обусловлена увеличением текучести мембран. Однако, в работе [382] было показано, что в плоских липидных бислоях из глицеролмоноолеата, СФ образует потенциал-независимые катион-селективные каналы разноразмерной проводимости. СФ-индуцированный трансмембранный ток пропорционален квадрату концентрации липопептида, что хорошо согласуется с данными Карилло с соавторами, которые показали, что утечка карбоксифлуоресцеина из липосом также пропорциональна квадрату концентрации СФ [85]. Эти результаты доказывают, что минимальной единицей, обеспечивающей проницаемость мембран для ионов или флуоресцентных маркеров, является димер липопептида. В работе [85] было показано, что липиды с $P > 1$, диолеилфосфоэтаноламин и холестерин, имеющие форму инвертированных конусов, ослабляют действие СФ. Эти результаты можно интерпретировать как указание на формирование липопептидом тороидальных пор.

Можно заключить, что механизмы мембранного действия сурфактина пока изучены слабо. Накопление достаточного количества экспериментального материала, в первую очередь, результатов исследования зависимости порообразующей способности липопептида от липидного состава мембран, позволит предложить гипотетическую модель строения сурфактиновых каналов и выявить способы их модуляции.

1.3.2. Ионные каналы, образуемые соединениями пептидной природы

1.3.2.1. Антимикробные пептиды *Cecropia*

Цекропины стали одними из первых идентифицированных антимикробных пептидов. Их обнаружили при изучении иммунной реакции шелкопряда (*Hyalophora cecropia*, *Antheraea pernyi* и *Bombyx mori*) [195, 196, 347, 408, 422]. Цекропины содержат от 31 до 39 ординарных L-аминокислотных остатков, молекулярная масса пептидов составляет около 4 кДа. Как правило, молекула состоит из двух доменов, скрепленных «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 или нулевой заряд (рис. 1.25) [140, 141]. «Шарнир» между доменами образован остатками глицина и пролина, эта область консервативна во всех известных цекропинах. В водном растворе полипептидная цепь неструктурирована, а в присутствии липосом характеризуется высоким процентом α -спирализации. Общая организация, представляющая собой последовательность двух спиралей, соединенных «шарниром», необходима для проявления цекропинами широкого спектра противомикробной активности [140].

Цекропин А

Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Asn-Ile-Arg-Asp-Gly-Ile-Ile-
Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-Ala-Val-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-Ala-Lys-NH₂

Цекропин Б

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-Gly-Ile-Val-
Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-Leu-NH₂

Рис. 1.25. Аминокислотные последовательности цекропинов А и Б. Красным цветом выделены положительно, синим – отрицательно заряженные аминокислотные остатки; глицин-пролиновый участок, образующий «шарнир», подчеркнут.

Цекропины характеризуются широким спектром антибактериальной активности, включающим практически все клинически важные грамотрицательные и некоторые грамположительные бактерии [140, 141, 308] за исключением *Staphylococcus aureus* [445]. Эти пептиды также эффективны в отношении *Leishmania* [94], *Candida albicans* [34, 308] и *Plasmodium falciparum* [69]. Более того, цекропины проявляют противоопухолевое действие [88, 92, 384, 413]. При этом цекропины обладают низкой токсичностью по отношению к нормальным эукариотическим клеткам и относительно слабой гемолитической активностью [308, 445]. Растущая устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам предусматривает развитие альтернативных антимикробных стратегий. Одним из возможных подходов к решению этой проблемы является поиск новых природных антибактериальных пептидов насекомых, амфибий и др. Например, Ким и др. показали, что изолированный из *Papilio xuthus* цекропиноподобный пептид, папилиоцин, включающий 37 аминокислотных остатков, является мощным антибактериальным и противовоспалительным агентом [232]. Еще одним перспективным подходом является разработка инновационных антибиотиков с использованием природных молекул в качестве шаблона для проектирования более мощных аналогов. В частности, ЦБ1а-пептид, сконструированный из трех повторяющихся афипатических N-концевых доменов цекропина Б (ЦБ), продемонстрировал многообещающую активность в отношении нескольких клеточных линий рака [218, 460]; гибрид цекропина А (ЦА) и мелиттина проявил более выраженные антибактериальные свойства по сравнению с негибридизованными пептидами [22, 139, 374]; гибрид саркотоксина I и ЦБ оказался активным в отношении цекропин-устойчивых бактериальных штаммов, включая *Staphylococcus aureus* [212]. ПЭГ-ЦАЛЛ пептид, состоящий из фрагментов кателицидина ЛЛ-37 и ЦА, конъюгированного с полиэтиленгликолем, был разработан для лечения легочных инфекций [311], а создание конструкции на основе лизоцима и цекропина из *Musca domestica* способствовало расширению спектра антибактериального действия гибридного белка по сравнению с родительскими молекулами [273].

Большинство исследователей склонны связывать антимикробное действие цекропинов с их мембранотропными эффектами. Несмотря на то, что вторичная структура и биологическая активность цекропинов охарактеризованы множеством методов, молекулярные механизмы взаимодействия пептидов с клеточными мембранами до сих пор остаются предметом для спекуляций. На основании того, что цекропины, синтезированные из D-аминокислот, и ретро-молекулы, имеющие обратную аминокислотную последовательность, полностью сохраняют свои антибактериальные свойства, была отвергнута гипотеза о существовании в мембране специфических

хиральных рецепторов [446]. В настоящее время в литературе обсуждаются две возможные модели, объясняющие антимикробное действие цекропинов (рис. 1.26). Согласно первой модели, сорбция молекул цекропина на мембране приводит к образованию на ее поверхности пептидного "ковра" (рис. 1.26 А). Согласно другой модели, цекропины образуют в мембранах патогенных клеток поры. Точная архитектура пор неизвестна, приводятся доказательства в пользу формирования как пептид-липидных тороидальных пор (рис. 1.26 Б), так и аламетицин-подобных каналов по типу "бочонка" (рис. 1.26 В) [371].

Кристенсен и др. показали, что некоторые природные и синтетические цекропины образуют в плоских липидных бислоях слабо анион-селективные ионные каналы [98]. Авторы предположили, что поры формируются путем ассоциации нескольких положительно заряженных N-терминальных спиралей. Непосредственная регистрация методом пэтч-кламп токов от модифицированных ЦБ мембран раковых клеток также свидетельствуют в пользу образования пор [464]. По данным Сильвестро с соавторами в зависимости от концентрации ЦА способен формировать два типа пор: при малых отношениях пептид:липид образуются ионные каналы; с увеличением концентрации пептида возрастает вероятность появления мультимерных пор, размер которых достаточен для прохождения инкапсулированных в липосомы маркерных молекул [388, 389].

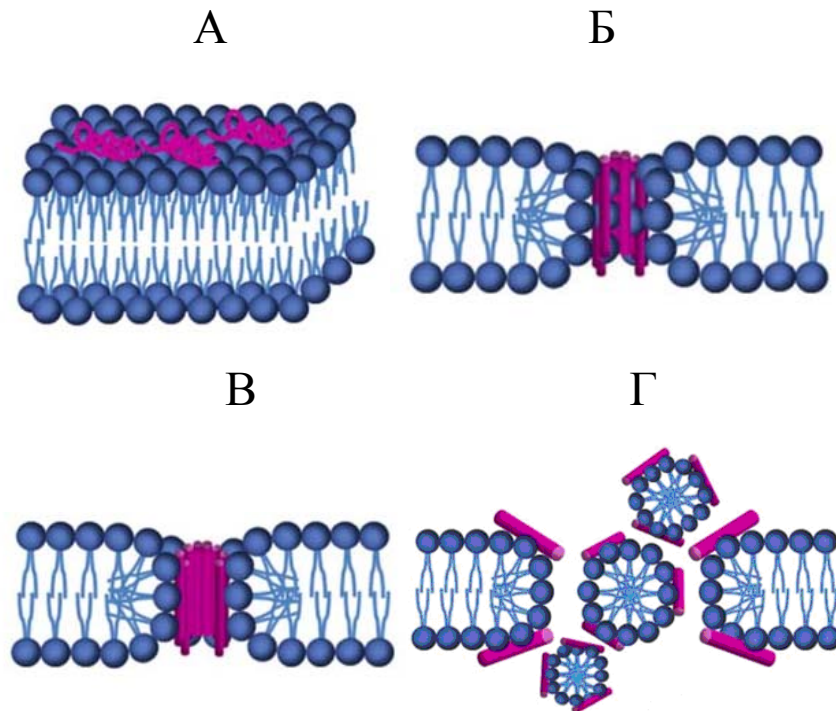


Рис. 1.26. Схематическое представление возможных вариантов действия цекропинов на биологические мембраны. (А) — образование пептидного "ковра" на поверхности липидного бислоя, (Б) — формирование тороидальных пор, (В) — образование канала по принципу "бочонка", (Г) — дезинтеграция клеточной мембраны под действием цекропина. По [387] с изменениями.

Гипотетическая модель строения цекропиновых каналов была разработана Дуреллом с соавторами [128]. Уэйд и др. обнаружили, что характеристики ионных каналов, образованных *L*- и *D*-энантиомерами цекропина, идентичны [446]. Данные, полученные для цекропин-мелиттинового гибрида свидетельствуют в пользу формирования тороидальных пор [22, 299]. Результаты кинетических исследований двух синтетических аналогов цекропина, имеющих две амфипатические и две гидрофобные спирали, соответственно, указывают на то, что катионные пептиды (сконструированные из N-концевых доменов родительской молекулы) формируют трансмембранные поры, а гидрофобный пептид, скорее всего, образует на поверхности бислоя пептидный "ковёр" [90, 402, 451]. Модель "ковра" предполагает, что молекулы накапливаются на мембране, располагаясь параллельно ее поверхности. Когда этот "ковёр" становится слишком плотным, мембрана распадается (рис. 1.26 Г) [378]. Этот механизм был впервые предложен Штайнером и др. [407] на основании того, что концентрация пептида, необходимая для лизиса половины патогенных клеток, достаточна для того, чтобы молекулы ЦА покрыли "ковром" всю поверхность бактериальных клеток. В качестве аргумента в литературе также приводятся результаты спектроскопических исследований мембраносвязанных цекропинов, указывающие на то, что основная популяция молекул пептида не погружена в гидрофобную область бислоя [284, 344, 350]. В этой связи следует отметить, что довольно трудно провести различие между "ковром" и тороидальными порами. Формирование пор может происходить на раннем этапе мембранного распада, который является заключительным этапом в модели "ковра" [371, 379]. Популяция связанных с поверхностью мембраны пептидов в параллельной ориентации может находиться в равновесии с небольшой долей встроенных в бислой молекул, способных формировать поры. На фоне превалирующего сигнала от параллельно ориентированных молекул погруженные в мембрану пептиды могут быть необнаружимы методами ЯМР- и флуоресцентной спектроскопии.

В литературе до сих пор продолжается активная дискуссия относительно механизмов действия цекропинов на мембраны клеток-мишеней. Ставится под сомнение даже само существование образуемых этими пептидами каналов. Безусловно, это требует самой тщательной проверки. В случае же, если гипотеза «пор» найдет свое подтверждение, возникнет необходимость в детальном исследовании механизмов функционирования цекропиновых каналов. Анализ вклада различных физико-химических факторов позволит выдвинуть первые предположения об архитектуре каналов и провести сравнение с молекулярно-динамической картиной.

1.3.2.2. Амилоидогенные и амилоидоподобные пептиды и белки

К нейродегенеративным заболеваниям относят множество разнородных расстройств нервной системы, в основе патогенеза которых лежит прогрессирующая гибель нейронов. Наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием является болезнь Альцгеймера. По данным Центра психического здоровья Российской академии медицинских наук до 10 % населения крупных мегаполисов в возрасте 60-65 лет страдают деменцией альцгеймеровского типа. Этиология данного расстройства не до конца изучена и на сегодняшний день эффективных способов лечения не найдено. Считается, что ведущую роль в этиологии играют наследственные факторы, но реализация предрасположенности зависит от действия экзогенных факторов. Установлено, что аутосомно-доминантные формы болезни Альцгеймера вызваны мутациями в четырех генах на 1, 14, 19 и 21 хромосомах [2]. Последний кодирует белок-предшественник β -амилоида, включающий 695–770 аминокислотных остатков. В нормальных клетках этот белок под воздействием α -секретаз подвергается протеолизу с образованием водорастворимых фрагментов, которые играют трофическую роль. Нарушение секретазного процессинга вследствие точечных мутаций в самом предшественнике или активации β - и γ -секретаз приводит к гиперсекреции и накоплению нерастворимых склонных к быстрой фибриллярной агрегации форм β -амилоидов. Гены на 14 и 1 хромосомах, мутации в которых вызывают семейные формы болезни Альцгеймера с ранней манифестацией, кодируют пресенилины. Есть основания думать, что пресенилин-1 и пресенилин-2 функционируют как γ -секретазы [115]. Соответственно, мутации в генах пресенилинов должны сопровождаться гиперпродукцией β -амилоидных пептидов. В качестве альтернативного варианта развития патологии в литературе обсуждается нарушение кальциевой сигнализации в клетке [319, 355]. Полиморфизм гена аполипопротеина Е, локализованного на 19 хромосоме, является причиной развития большинства спорадических и некоторых наследственных (манифестирующих в пожилом возрасте) случаев болезни Альцгеймера. Показано, что этот белок также может влиять на процесс расщепления предшественника β -амилоидов [186].

Считается, что молекулярные механизмы токсичности β -амилоидных пептидов могут включать несколько возможных путей их взаимодействия с липидным бислоем мембраны: (1) связывание мономеров или олигомеров β -амилоидных пептидов с поверхностью мембраны и образование агломератов без нарушения целостности бислоя (рис. 1.27 А); (2) погружение пептидов в мембрану, сопровождающееся повреждением бислоя (рис. 1.27 Б); (3) формирование ионных каналов в мембране (рис. 1.27 С).

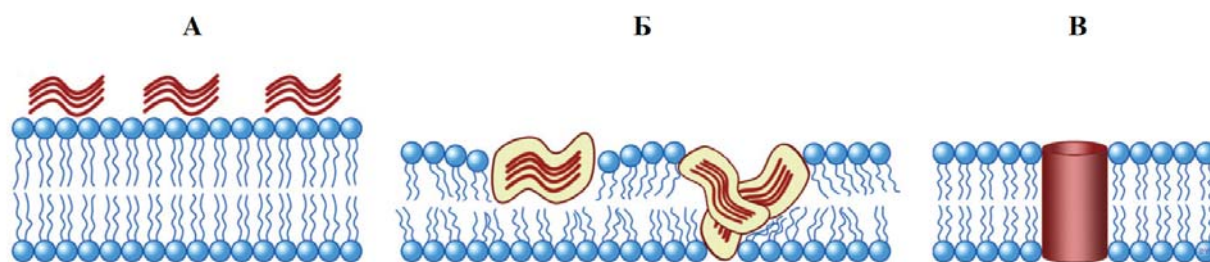


Рис. 1.27. Схематическое представление действия β -амилоидных пептидов на липидный бислой. (А) – связывание мономеров и олигомеров происходит без повреждения мембраны; (Б) – проникновение пептида в бислой сопровождается последующим повреждением мембраны; (В) – результатом взаимодействия пептида с бислоем является образование трансмембранных пор. По [125].

Методом рентгеноструктурного анализа Диез с соавторами [122] установили локализацию фрагментов 1-42 и 25-35 β -амилоидного пептида в отрицательно заряженных мембранах из димиристоилфосфохолина и димиристоилсерина. Первый пептид погружен в углеводородную область мембраны. При этом обнаружено три фракции мембраносвязанного β -амилоидного фрагмента 25-35, две из которых расположены в области гидрофильных голов липидов, а оставшаяся часть представляет собой встроенные в бислой пептидные молекулы.

Связывание β -амилоидных пептидов с мембраной и действие на липидный бислой зависит от их агрегационного состояния [245, 317]. Обнаружена корреляция между размером агрегатов и уменьшением текучести мембраны: в отличие от мономеров фибриллярные олигомеры ограничивают подвижность ацильных хвостов мембранообразующих липидов [244, 245]. Напротив, несколько групп авторов продемонстрировали способность амилоидов индуцировать неспецифическое увеличение текучести и проницаемости мембран [48, 96, 227, 398]. Используя метод молекулярной динамики Локхарт и Климов [267] также показали, что мономеры β -амилоидного пептида уменьшают плотность упаковки димиристоилфосфохолина в бислой.

Распространенной гипотезой, связывающей нейтоксичность β -амилоидов и их мембранное действие, является предположение о формировании олигомерами ионных каналов. Причем, наибольшей порообразующей и токсической активностью обладают олигомеры среднего размера (рис. 1.28) [345].

Так, показано, что многие β -амилоидные пептиды и пресенелины способны формировать в модельных липидных мембранах потенциал-независимые ионные каналы преимущественно катионной селективности [41, 43, 118, 190, 301, 302, 319, 348, 470]. С использованием методов молекулярной динамики был предположен полиморфизм β -амилоидных каналов, которые могут быть образованы как β -структурами, так и α -

спиральными участками [425]. Кольцевые структуры β -амилоидных агрегатов, обнаруженные с помощью атомно-силовой микроскопии, также свидетельствуют в пользу возможности формирования трансмембранных пор (рис. 1.29) [206, 250, 265, 348]. Гетерогенность размера таких структур [123, 226, 255, 256] может определять многоуровневую проводимость и различную селективность β -амилоидных каналов [41-43, 189, 242, 301]. Данные молекулярной динамики также указывают на образование подсостояний проводимости каналов за счет изменения степени олигомеризации мономеров амилоидного пептида [127].

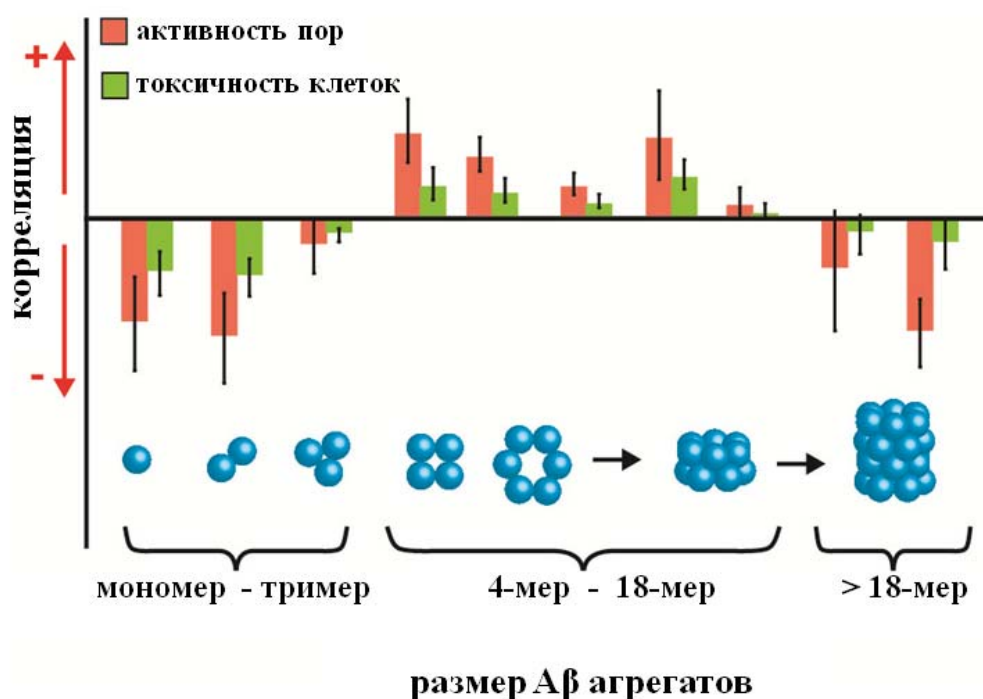


Рис. 1.28. Связь между размером олигомеров β -амилоидов, их порообразующей способностью и нейротоксичностью. По [345].

Многие авторы приписывают холестерину ключевую роль в мембранной активности амилоидов [119, 120, 122, 134, 216, 465]. В работе [381] показано, что введение холестерина в ДОФХ- и ДПФХ-мембраны увеличивает их сродство к фрагменту 1-40 β -амилоидного пептида. Аналогичные результаты были получены Дролле с соавторами при изучении взаимодействия фрагмента 1-42 β -амилоидного пептида с ДОФХ-бислоями, включающими 20 моль % холестерина [125]. Стоит также отметить, что в присутствии холестерина амилоид-индуцированная кальциевая проводимость мембраны оказывается выше по сравнению с бесхолестериновым бислоем [18]. По мнению Ди Скала с коллегами механизм формирования амилоидных пор может включать образование водородной связи

между аминокислотными остатками Asn27 и Lys28 β -амилоидного пептида и холестерином [120]. По всей вероятности, канал образован пептид-холестериновыми комплексами по принципу "бочонка", причем Glu22 и Asp23 обращены в центр поры, в то время как холестерин находится с внешней стороны трансмембранного канала. Такая пора обладает избирательностью для ионов кальция, что согласуется с кальциевой проницаемостью. Сходные модели строения каналов предложены и для других фрагментов β -амилоида [346, 467]. Предполагается, что в случае фрагментов 1-40 и 1-42 β -амилоидного пептида в водную пору направлены остатки Glu3, Asp7 и Glu11 [121]. Теоретическое моделирование допускает участие мембранных липидов в формировании трансмембранных пор β -амилоидами [127, 425]. По данным Чукейр с соавторами фрагмент 1-42 β -амилоидного пептида преимущественно аккумулируется в упорядоченных мембранных доменах [97].

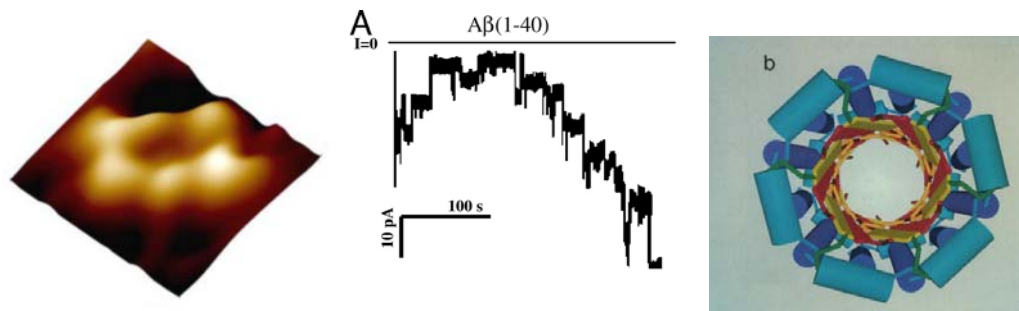


Рис. 1.29. Структура и электрическая активность ионного канала, образованного фрагментом 1-40 β -амилоида. Слева направо: изображение порообразующего олигомера, полученное методом атомно-силовой микроскопии, флуктуации тока через одиночные ионные каналы и одна из теоретических моделей строения поры (вид сверху). По [127, 348].

Прионные болезни – прогрессирующие нейродегенеративные заболевания, связанные с преобразованием в результате конформационных изменений нормального клеточного прионного белка в аномальный патогенный. Прионный белок представляет собой металл-связывающий белок, который предположительно вовлечен в регуляцию содержания металлов. Фрагмент 106-125 этого белка способен формировать β -амилоидные фибриллы, что определяет рост нейротоксичности в процессе старения [225]. Лин с соавторами [266] показали, что аналогично амилоидным пептидам в липидных бислоях фрагмент 106-126 прионного белка формирует катион-селективные ионные каналы многоуровневой проводимости. Недавно в литературе появились косвенные свидетельства роли липидных рафтов в мембранной активности фрагмента 106-126 прионного белка [449].

Как видно из обзора литературы по этому вопросу, проблема связи мембранотропного действия амилоидов с их нейротоксичностью не исчерпывается «канальной» гипотезой. И, тем не менее, установление молекулярных механизмов образования этими пептидами ионных каналов могло бы стать недостающим ключом к пониманию патофизиологической роли порообразования амилоидами. На наш взгляд, первоочередным вопросом, который может быть решен в рамках работы с модельными системами, является влияние агрегационного статуса пептидов на их способность формировать каналы.

1.3.2.3. Альфа-токсин *Staphylococcus aureus*

Альфа-гемолизин золотистого стафилококка – порообразующий экзотоксин белковой природы, секретируемый в виде водорастворимого мономера с молекулярной массой 33.2 кДа и включающий 293 аминокислотных остатка [148, 149]. 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 клеточной мембране α -гемолизин (α -ГЛ) формирует пронизывающий бислоем и выступающий над ним гептамерный комплекс (рис. 1.30) [166]. Структура гептамера определена методом рентгеновской кристаллографии с разрешением 0.19 нм [399]. Реконструированный в мембрану комплекс имеет грибовидную форму, максимальный диаметр и высота гептамера составляют около 10 нм. Внутри комплекса находится водная пора, диаметр которой в зависимости от координаты вдоль длинной оси гептамера колеблется от 1.4 до 4.6 нм. 14 антипараллельных β -тяжей (по 2 от каждой субъединицы) формируют трансмембранную часть поры. На стороне β -складчатости, обращенной к липидам, располагаются гидрофобные аминокислотные остатки, которые образуют "ремень" шириной 3 нм, обеспечивающий комплементарность поверхности этого участка поры неполярной области бислоя. Множественные взаимодействия между протомерами, представляющие как дисульфидные и водородные связи, так и гидрофобные контакты, обеспечивают высокую стабильность комплекса.

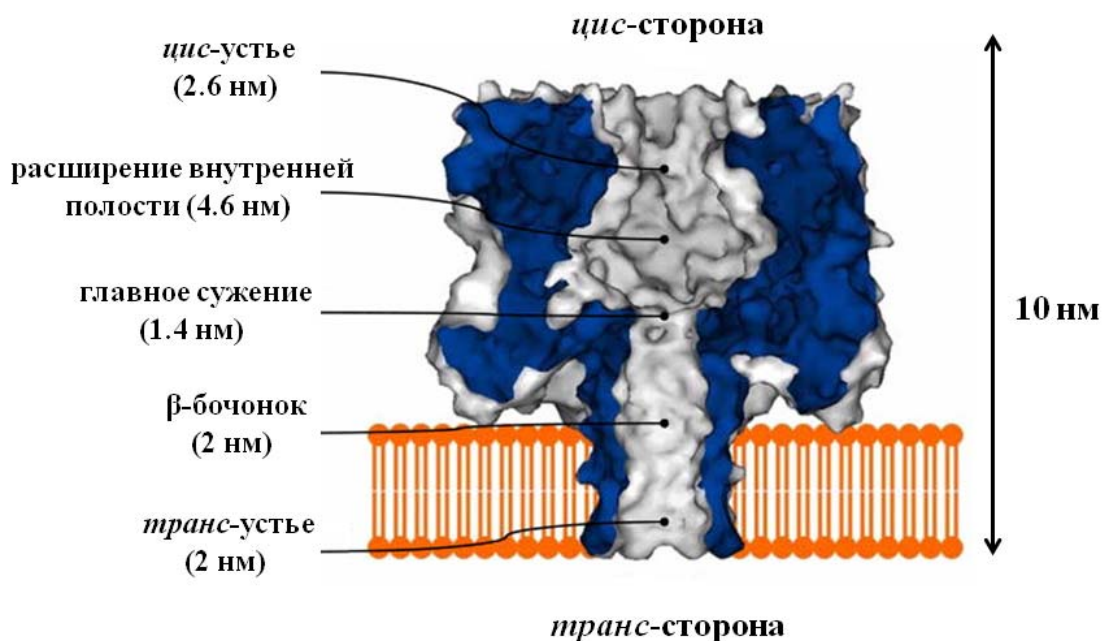


Рис. 1.30. Предполагаемая структура α -гемолизинового канала. По [176].

К электрофизиологическим характеристикам α -гемолизиновой поры следует отнести потенциал-чувствительность закрывания: при приложении высокого напряжения канал закрывается [240, 241]. Следует отметить, что пора закрывается не полностью, на очень короткое время канал переходит в состояние, проводимость которого в 10 раз меньше, чем открытого (рис. 1.31, левая панель). При этом диаметр поры уменьшается меньше, чем в два раза [241]. Молекулярные механизмы потенциал-зависимого закрывания α -гемолизиновой поры до сих пор не ясны. Касьянович и Безруков показали, что при уменьшении pH омывающих мембрану растворов время жизни канала в закрытом состоянии увеличивается [220]. Результаты применения методов молекулярной динамики позволили Аксиментьеву и Шультену выдвинуть предположение о том, что семь остатков His в 144 положении каждого из протомеров образуют pH-сенсор поры, расположенный вблизи *цис*-устья β -складчатости. Реакция сенсора на модификацию pH влечет за собой изменение проводимости и селективности α -ГЛ канала [21]. Сонг с соавторами [399] предположили, что уменьшение проводимости α -ГЛ в присутствии двух- и трехвалентных ионов [297] может включать стерический блок канала при связывании ионов с остатками Glu111, локализованными вблизи сужения между β -бочонком и внутренней полостью поры. Протонирование этих остатков будет способствовать разрушению ионных пар между Glu111 и Lys147 и последующему расширению канала в области главного сужения. В качестве альтернативного варианта можно рассматривать взаимодействие ионов с глицин-богатым участком с *транс*-стороны β -складчатости, в частности с остатками

Asp127 и Asp128. Мухаммед и Мовилинью [305] установили, что одновременная замена Lys на Asp в 147 и 131 позициях приводит к разрушению катион-анионных пар с разных сторон β -бочонка. В результате потенциал-чувствительность α -ГЛ канала увеличивается (рис. 1.31). Приведенные результаты указывают на возможную локализацию сенсора напряжения α -ГЛ поры.

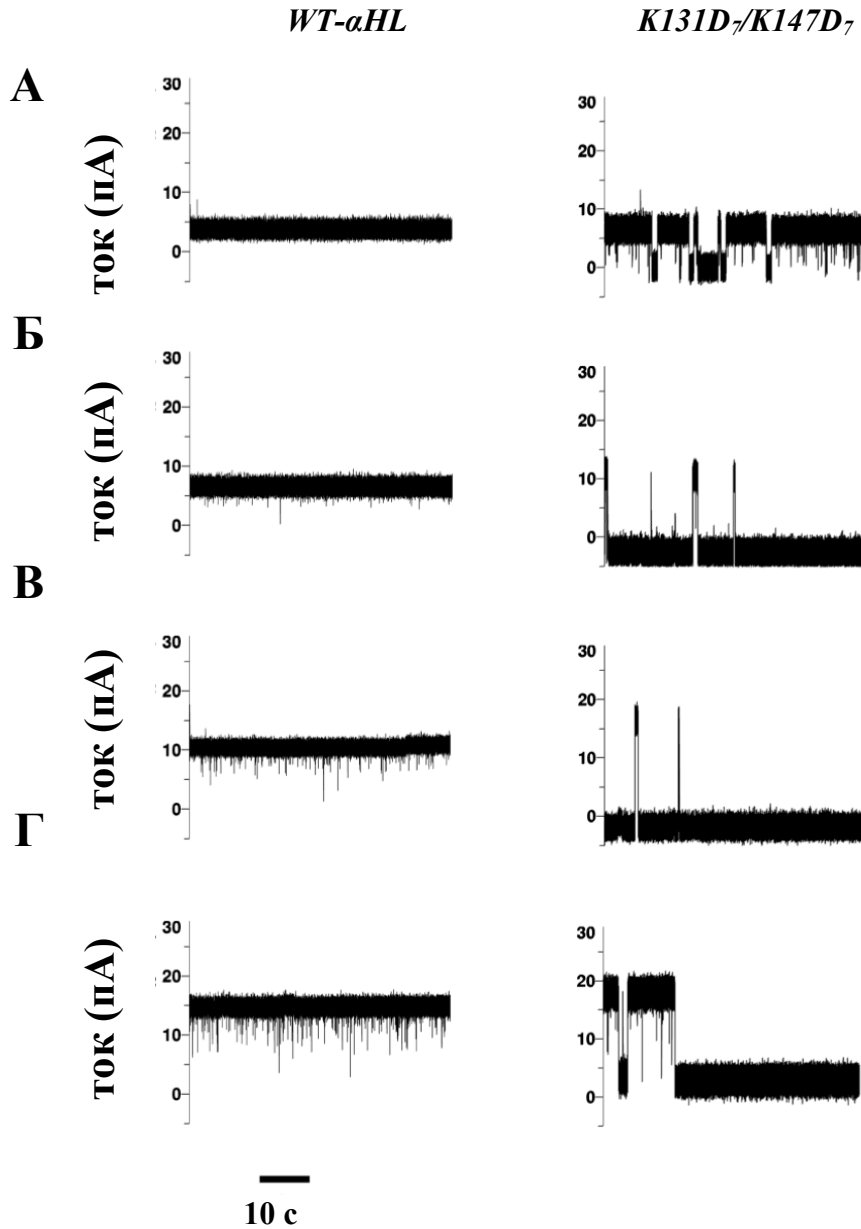


Рис. 1.31. Потенциал-зависимость закрывания одиночного канала, образованного α -ГЛ в ДФФХ-мембранах. Левая панель (*WT- α HL*) – α -ГЛ с нативной аминокислотной последовательностью. Правая панель (*K131D₇/K147D₇*) – проведена одновременная замена Lys на Asp в 147 и 131 позициях. Трансмембранное напряжение составляет 20 (**А**), 40 (**Б**), 60 (**В**) и 80 (**Г**) мВ. Липидный бислой омывается 0.15 М KCl, pH 7.4. По [305].

По сей день поры, формируемые альфа-гемолизином золотистого стафилококка, остаются излюбленными модельными объектами для исследователей по всему миру,

уступая, пожалуй, только грамицидиновым каналам. Несмотря на повышенный интерес электрофизиологов, природа закрытого состояния альфа-гемолизиновой поры, как и точная локализация сенсора напряжения в канале до сих пор остаются загадками. Поскольку переход альфа-гемолизинового канала в состояние с малой проводимостью можно рассматривать как ослабление токсичности действия α -ГЛ, решение этого вопроса является одним из способов борьбы с патогеном.

1.3.3. Ионные каналы, образуемые макролидными полиеновыми антимикотиками

В 60-х годах XX-го века был обнаружен еще один класс порообразующих соединений непептидной природы – полиеновые макролиды. Их продуцентами являются стрептомицеты (*Actinomycetes*). Полиеновые макролиды высокотоксичны в отношении грибковых клеток. На их основе созданы самые эффективные противогрибковые препараты, поэтому уже много десятилетий полиеновые антибиотики используются в клинической практике для лечения системных микозов. Более того, полиеновые макролиды характеризуются противоопухолевой, антипаразитарной и противовирусной активностью. Также обсуждаются возможности их применения для лечения прионных нейропатий [246, 279, 295, 475]. К сожалению, использование полиеновых антибиотиков в терапевтических целях сопряжено с повышенным риском развития большого числа серьезных побочных эффектов, таких как нефропатия, анемия, тромбофлебит, аритмия, гипокалиемия и др. [104, 383]. Современные фармацевтические подходы направлены на снижение токсичности полиеновых макролидов за счет включения в состав лекарственного препарата липидных компонент [426].

К настоящему моменту известно более 200 наименований полиеновых антибиотиков. Молекулярная масса соединений составляет около 1 кДа. Основу молекулы составляет макролидное кольцо, содержащее жесткую гидрофобную полиеновую (как правило, состоящую из нескольких сопряженных двойных связей) и гидрофильную (включающую гидроксильные и карбонильные группы) цепи [180]. С одной стороны молекулы находятся карбоксильная группа и остаток микозамина или перозамина. Классификация полиеновых макролидов основана на числе конъюгированных двойных связей, определяющих хромофорные свойства веществ, и наличии ароматической группировки. В соответствии с первым структурным признаком полиеновые антибиотики можно разделить на триены, тетраены, пентаены, гексаены, гептаены и октаены, а в соответствии со вторым – на неароматические и ароматические соединения. К последним

относятся антибиотики, которые помимо аминсахара имеют дополнительную ароматическую группировку.

Наиболее часто используемыми в клинической практике и наиболее изученными представителями полиеновых антибиотиков являются неароматический гептаен амфотерицин Б (АМБ) и неароматический тетраен нистатин (НС). Природный нистатин представляет собой смесь, основным компонентом которой является нистатин А₁ [1]. Химические структуры АМБ и НС очень близки, макролидные кольца содержат по 38 атомов углерода, различие заключается в прерывности системы сопряженных двойных связей и положении гидроксильных групп в гидрофильной области (рис. 1.32). Относительно простой в химическом отношении является молекула неароматического метилпентаена филипина (ФЛ). Его лактонное кольцо включает всего 28 углеродных атомов, при этом ФЛ не содержит аминсахарного остатка. Как и в случае НС природный ФЛ – это смесь, в которой преобладает ФЛ III (рис. 1.32).

Все исследователи сходятся во мнении, что противогрибковое действие полиеновых антибиотиков определяется их мембранной активностью, а ключевым фактором является присутствие стерина в мембранах клеток-мишеней. Расхождения, в основном, касаются механизмов мембранного действия полиеновых макролидов. Доминирующая концепция основана на формировании трансмембранных пор в мембранах грибковых клеток (рис. 1.33 А) [35]. Альтернативная гипотеза связывает нарушение жизнедеятельности клеток-мишеней с экстракцией мембранных стерина полиенами (рис. 1.33 Б) [33, 168, 420].

Точная архитектура образуемых полиеновыми антимикотиками пор, также как и их связь с антимикробной активностью полиеновых макролидов, до сих пор остаются предметом научных дискуссий. По всей вероятности, на начальном этапе полиеновые молекулы связывают мембранные стерина, а затем образовавшиеся полиен-стериновые комплексы формируют цилиндрическую «полупору». Остатки микозаминов и карбоксильные группы полиеновых молекул, ориентированных перпендикулярно поверхности мембраны, оказываются заякорены в водной фазе, их гидроксильные цепи выстилают водную пору внутри бислоя, а полиеновые фрагменты взаимодействуют с молекулами стерина. По разным оценкам в такую структуру может входить от 8 до 10 молекул антибиотика и столько же молекул стерина [3].

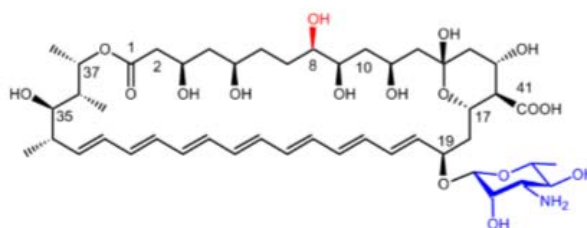
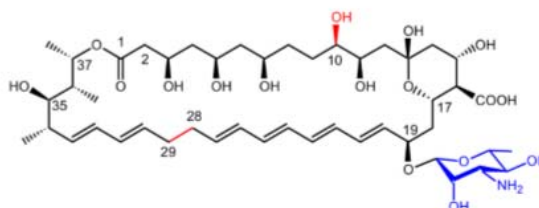
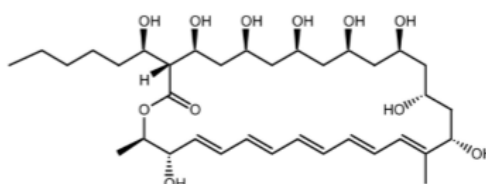
Амфотерицин В**Нистатин А1****Филипин III**

Рис. 1.32. Химическая структура амфотерицина В, нистатина А₁ и филипина III. Структурные различия амфотерицина В и нистатина А₁ выделены цветом. По [472].

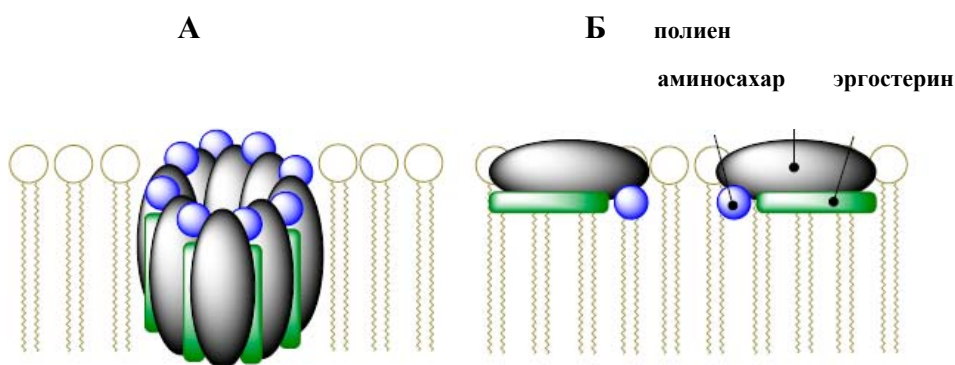


Рис. 1.33. Возможные механизмы действия полиеновых антибиотиков на мембрану. (А) – формирование трансмембранных пор полиен-стериновыми комплексами; (Б) – связывание и экстракция молекул стерина полиеновыми молекулами. По [327].

При введении антибиотика с обеих сторон мембраны две симметричные полупоры собираются по разные стороны бислоя и ассоциируют путем образования водородных связей между гидроксилами полиеновых молекул, находящихся в противоположных липидных моно слоях, образуя симметричный канал (рис. 1.34 А) [35, 70, 285]. В случае

добавки полиена с одной стороны мембраны асимметричный канал формирует полупора, локализованная со стороны введения антибиотика (рис. 1.34 Б) [221, 235]. Поскольку длина полупоры приблизительно в два раза меньше, чем толщина бислоя, мембрана вблизи канала претерпевает стресс [68]. Свойства симметричных и асимметричных полиеновых каналов различны [77, 235, 285]. В частности, симметричные каналы характеризуются преимущественно анионной, в то время как асимметричные – катионной избирательностью. Проводимость и время жизни симметричных каналов значительно превышают аналогичные характеристики для асимметричных пор. Существенные различия наблюдаются и в величинах концентраций антибиотика, необходимых для наблюдения флуктуаций проводимости.

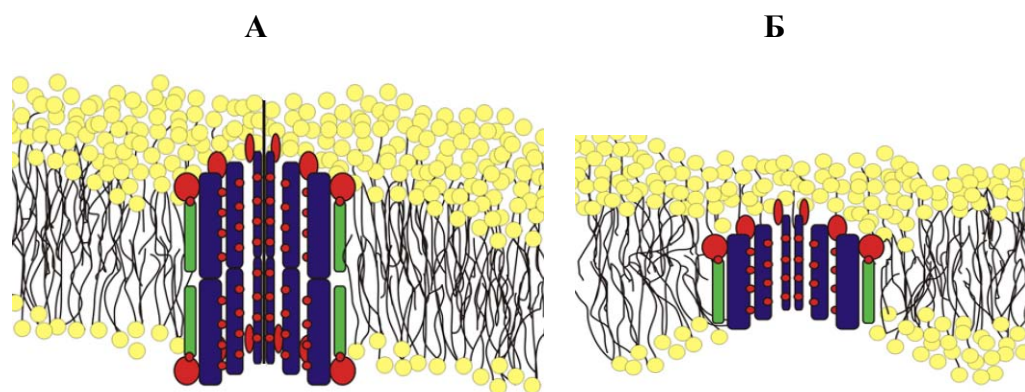


Рис. 1.34. Модель строения симметричного (А) и асимметричного (Б) полиенового канала. По [217].

Стерин-зависимая модель действия полиеновых макролидов предполагает, что специфичность антибиотиков в отношении различных клеток определяется стеринным составом их мембран. Однако нерешенным вопросом является, обусловлена ли наблюдаемая специфичность различной стабильностью комплексов полиенов со стеринами [53, 289, 321, 322] или влиянием стерина на латеральную сегрегацию компонентов мембраны и физико-химические свойства микродоменов [109, 165, 352, 440].

Данные молекулярного моделирования подтверждают первую гипотезу [321, 322]. Комплекс полиен-стерин образован за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий и сети водородных связей между гидроксильной группой стерина и полярной «головой» АМБ. Благодаря более жесткой молекулярной геометрии эргостерина его комплекс с АМБ оказывается более энергетически выгодным и стабильным по сравнению с комплексом полиенового антибиотика с холестерином (рис. 1.35). В случае эргостерина π - π -электронное взаимодействие между двойной связью в боковой цепи стерина и полиеновым хромофором АМБ может быть дополнительной точкой взаимодействия,

определяющей взаимную ориентацию молекул стерина и полиена и максимизацию вандер-ваальсовых сил притяжения. В случае холестерина энергия комплексообразования больше ввиду отсутствия двойных связей в боковой цепи и стероидном ядре, а также за счет компенсации энтропийных потерь, связанных с уменьшением конформационной гибкости боковой цепи.

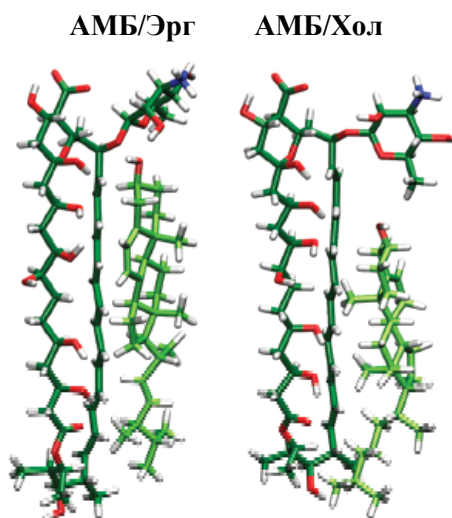


Рис. 1.35. Амфотерицин В – эргостериновый (АМБ/Эрг) и амфотерицин В – холестеринный (АМБ/Хол) комплексы. По [321].

Базой для второй модели служат свидетельства неравномерного распределения полиеновых молекул в плоскости мембраны [109, 165, 179, 352]. Показано, что полиеновые макролиды обладают более высоким сродством к стерин-обогащенным упорядоченным мембранным доменам [109] или предпочитают промежуточную фазу [165, 352]. Разные физико-химические свойства эргостерин- и холестерин-содержащих доменов могут обуславливать неодинаковую селективность действия полиеновых антимикотиков на мембраны клеток грибов и человека, определяя их терапевтическую и токсическую активность, соответственно. Более того, сами полиеновые антибиотики, также как и стерины, способны влиять на фазовое разделение в липидном бислое, причем результат их действия во многом определяется видом мембранообразующего стерина [109, 155, 329].

Данные литературы относительно мембранной активности полиеновых макролидов весьма противоречивы. Среди нерешенных вопросов – существование пор, их точная архитектура, связь с антимикробной активностью, причины специфичности действия полиеновых макролидов на включающие различные стерины клеточные мембраны, механизмы формирования и функционирования асимметричных и

симметричных полиеновых каналов. Помимо фундаментального интереса, ответы на некоторые из поставленных вопросов имеют огромный практический потенциал, в частности, выявление роли липидного матрикса в каналообразующей активности полиеновых антибиотиков может иметь принципиальное значение для разработки и применения их липосомных лекарственных форм.

1.4. Липидоопосредованная регуляция ионных каналов, формируемых экзогенными соединениями: проблемы и перспективы

На основании анализа литературных данных можно предложить общую схему, демонстрирующую, что уже известно о липид-опосредованной регуляции ионных каналов, формируемых экзогенными соединениями, а что еще предстоит выяснить (рис. 1.36).

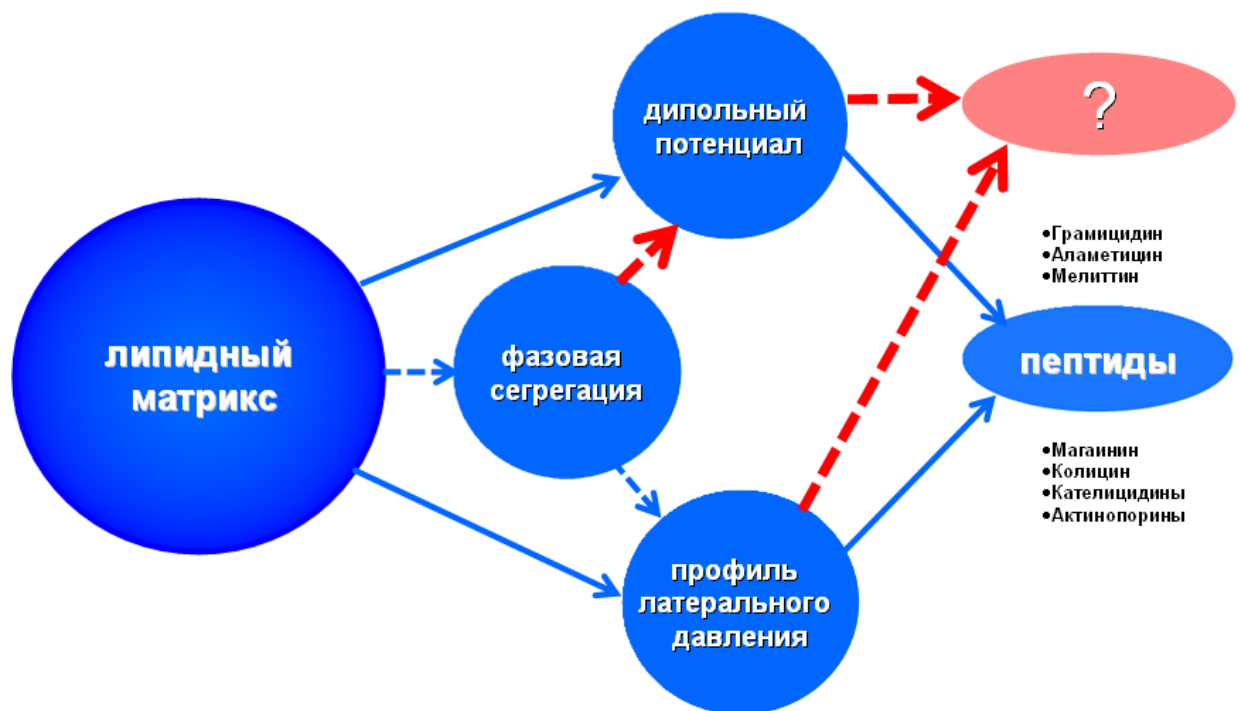


Рис. 1.36. Схема, иллюстрирующая роль липидного матрикса мембран в каналообразующей активности антимикробных агентов и токсинов: обзор литературных данных.

Все обнаруженные нами сведения о влиянии физико-химических свойств мембраны на активность ионных каналов, образуемых экзогенными соединениями, можно отнести к модуляции распределения электрического потенциала на границе мембраны или к изменению латеральной компоненты давления внутри липидного бислоя. Следует оговориться, что в рамках настоящей работы мы не обсуждаем эффекты поверхностного потенциала мембраны, которые достаточно хорошо исследованы, а концентрируем свое внимание на менее изученных свойствах мембраны: дипольном потенциале, латеральном давлении и фазовом разделении.

Литературные данные позволяют говорить о действии дипольного потенциала на барьер для проникающих через грамицидиновые каналы катионов и энергию погружения в бислой некоторых пептидов, включая аламетицин и, возможно, мелиттин (1.1.1). На наш

взгляд, ограниченность литературных примеров свидетельствует о недооцененности эффектов, обусловленных изменением дипольного потенциала. Другой причиной является то, что общепринятого экспериментального подхода для исследования вклада дипольного потенциала мембран в регуляцию ионных каналов, пока нет, и, следовательно, сформированная с его помощью экспериментальная и теоретическая база тоже отсутствует. Анализ литературных данных показывает, что с этой целью могли бы с успехом применяться дипольные модификаторы мембран, в частности, флавоноиды (1.2.1).

Общие физические представления позволяют связывать чувствительность ионных каналов к дипольному потенциалу с электрическими свойствами порообразующих молекул, следовательно, подобная зависимость должна наблюдаться для большого числа полярных соединений, а также в случае встраивания в мембрану заряженных агентов независимо от их химической природы. Это обусловило выбор объектов исследования. Нас заинтересовали заряженные в физиологических условиях липопептиды (1.3.1) и полиеновые макролиды, полярные "головы" которых характеризуется некоторым дипольным моментом (1.3.3). Для расширения круга объектов пептидной природы мы также протестировали цекропины (1.3.2.1). Учитывая, что многие антимикробные пептиды имеют положительный заряд, можно ожидать, что снижающие дипольный потенциал мембраны модификаторы, в частности, флавоноиды, при совместном применении могут оказывать синергетическое действие, облегчая встраивание антимикробных агентов в мембрану и, тем самым, увеличивая их порообразующую способность в отношении мембран патогенных клеток-мишеней. Ниже этот факт был нами подробно исследован. При оценке эффектов дипольного потенциала важным аспектом является возможность его компенсации водой внутри поры или полярными группами, образующими стенки канала. Увеличение молекулярной массы порообразующего соединения должно сопровождаться ослаблением влияния дипольного потенциала на энергетический барьер для проникающих через каналы ионов, а, следовательно, на проводимость одиночных пор. Проверка выдвинутого предположения потребовала проведения сравнительного анализа роли дипольного потенциала в мембранной активности коротких антимикробных пептидов и больших белковых токсинов (1.3.2).

Другим ключевым фактором регуляции каналообразующей активности антимикробных агентов и токсинов является распределение латеральной компоненты давления вдоль нормали к плоскости мембраны, связанное в первую очередь с геометрическими характеристиками мембранообразующих молекул (1.1.2). Такой способ

модуляции наблюдается для каналов, открытое и закрытое состояния которых существенно различаются по кривизне образуемых поверхностей. Липиды, характеризующиеся конической формой, могут снижать энергию начального или конечного состояния, смещая равновесие в ту или иную сторону. Согласно литературным данным от распределения латеральной компоненты давления вдоль нормали к плоскости мембраны зависит активность большого числа пептид- или белок-липидных пор, включая формируемые грамицидином, мелиттином, магаинином, колицином, кателицидинами и, вероятно, актинопоринами (1.1.2). Как правило, авторы процитированных в обзоре работ связывают увеличение трансмембранного тока со стабилизацией коническими липидами конечного (открытого) состояния пор. Поскольку результат (увеличение или уменьшение числа открытых каналов) зависит от разности энергий их конечного и начального состояний, с равным успехом имеющиеся результаты можно объяснить дестабилизацией закрытого состояния, например, в случае, если толщина углеводородного остова мембраны превышает длину гидрофобного фрагмента неактивного мономера пептида (1.1.2.4). Это дает основание предположить, что сходным образом будет модулироваться порообразующая активность агентов, способных формировать мицеллы. К таким соединениям относятся липопептиды (1.3.1). На ключевую роль геометрических факторов в порообразующей способности полиенов может указывать необходимость участия мембранных стеринов в формировании каналов полиеновыми макролидными антибиотиками (1.3.3). При анализе роли эластических свойств мембраны в каналобразующей активности экзогенных соединений в качестве достойной альтернативы коническим липидам могут выступать дипольные модификаторы мембран, сорбирующиеся в области полярных головок мембранных липидов и вызывающие дисбаланс между объемами или давлениями в гидрофильной и гидрофобной частях бислоя.

Несмотря на широкое обсуждение возможного участия латеральной организации мембран в регуляции процессов порообразования экзогенными соединениями, прямых экспериментальных доказательств пока мало (1.1.3) и мы подробно исследовали этот фактор в разделах 3.2.1.2 и 3.2.6. Очевидно, что разделение компонентов в плоскости мембраны, может вызывать латеральную неоднородность всех физико-химических свойств липидного бислоя, включая как латеральное давление, так и дипольную компоненту потенциала. Экспериментальные свидетельства этого явления можно получить, используя в качестве сенсора гетерогенности дипольного потенциала каналы, демонстрирующие в гомогенных по фазовому состоянию бислоях выраженную зависимость свойств от скачка потенциала.

Актуальность обозначенной научной проблемы, противоречивость литературных сведений, наличие нерешенных вопросов относительно механизмов функционирования ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами, потенциальная практическая значимость результатов определили основную *цель* настоящей работы – 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 класс 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. Проверить гипотезу о латеральной неоднородности дипольного потенциала мембран, подверженных фазовому разделению, и оценить последствия неравномерного распределения дипольного потенциала вдоль поверхности бислоя для функционирования ионных каналов, образованных антимикробными агентами.

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

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

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

Выбор *методов исследования* был продиктован поставленными задачами. Для получения надежных результатов, позволяющих количественно охарактеризовать влияние дипольных модификаторов мембран на их свойства, и выяснить принципы регуляции ион-проницаемых нанопор, образуемых токсинами и антимикробными соединениями, необходимо широкое варьирование условий эксперимента, что в случае лабильных клеточных мембран не представляется возможным. Поэтому для решения поставленных задач были использованы модельные липидные мембраны, плоские липидные бислои и одноламеллярные липосомы. Использование известной техники регистрации токов, протекающих через плоские липидные бислои, в присутствии ионофоров позволяет 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 модификаторов. Для описания фазовых превращений в мембранах под действием дипольных модификаторов применен целый комплекс методов: в качестве модельных мембран использованы липосомы, фазовое состояние которых охарактеризовано методами дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и конфокальной флуоресцентной микроскопии. Дополнительно проведена флуориметрия индуцированной дипольными модификаторами утечки маркера из липидных везикул. В ходе выполнения работы с использованием метода регистрации токов проводимости при фиксации трансмембранного напряжения проведено всестороннее экспериментальное и теоретическое изучение инкорпорированных в модельные липидные мембраны ионных каналов различной природы в присутствии дипольных модификаторов и их структурных аналогов, не изменяющих величину дипольного потенциала мембран. Более подробное описание материалов и методов исследования приведено ниже (Глава 2).

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

В работе использовали следующие реактивы:

➤ мембранообразующие липиды: 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДФФС), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДФФЭ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДОФЭ), 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДМФХ), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ), холестерин (Хол), эргостерин (Эрг), 7-дегидрохолестерин (ДХол), стигмастерин (Стигм) и 5 α -адростан-3 β -ол (Андр), N-стеароил-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae* (СФС), сфингомиелин из мозга свиней (СМ), N-стеароил-D-эритро-сфинганин (СЭС), L- α -фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат из мозга свиней (ПИП₂) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамин) (ЛР-ДПФЭ) (“Avanti Polar Lipids”, США); 6-кетохолестанол (6-КХ), 7-кетохолестанол (7-КХ) и 1-олеоил-*rac*-глицерол (ГМО) (“Sigma”, США). Химические структуры фосфолипидов, стеринов и сфинголипидов показаны на рис. 2.1;

➤ электролиты и буферы: аспартат натрия (NaAsp), глюконат натрия (NaGlc) (“Fluka”, США), NaCl, KCl, MOPS, HEPES, MES (“Sigma”, США);

➤ порообразующие соединения: сурфактин (СФ), цекропин А (ЦА), цекропин Б (ЦБ), α -гемолизин *Staphylococcus aureus* (α -ГЛ), амфотерицин Б (АМБ), нистатин (НС), филиппин (ФЛ), фрагмент 1-42 β -амилоидного пептида (А β П (1-42)), фрагмент 25-35 β -амилоидного пептида (А β П (25-35)), фрагмент 25-35 β -амилоидного пептида с аминокислотной заменой в положении 35 (А β П (25-35) [Gly³⁵]), фрагмент 25-35 β -амилоидного пептида с аминокислотной заменой в положении 28 (А β П (25-35) [Ala²⁸]), пресенилин-1-N (ПС-1) и фрагмент 106-126 белка приона человека (ПР (106-126)) (“Sigma”, США). Липодепсипептид *Pseudomonas syringae syringae* сириномицин Е (СМЕ), предоставленный доктором Д. Такемото (Utah State University, США), был выделен и очищен согласно [65]. Амилоидоподобные белки нейронального происхождения BASP1 и GAP-43 и их фрагменты (BASP1 (1-13), myr-BASP1 (1-13), myr-BASP1 (1-19), GAP-43(1-10), GAP-43(1-40), GAP-43(41-52) и GAP-43 (41-242)) были предоставлены В.В. Захаровым (ПНПФ, Санкт-Петербург, Россия).

➤ дипольные модификаторы мембран и родственные им соединения: флоретин, флорицин, рутин, генистин, генистеин, кверцетин, мирицетин, биоханин А, ($\pm$) гидрат катехина, ($\pm$) гидрат таксифолина, даидзеин, 2',4',6'- моногидрат

тригидроксиацетофенона (ТГАФ), 2'-гидрокси-4',6'-диметокси-ацетофенон (ГДМАФ), L-тироксин и 3,3',5'-трийодо-L-тиронин, RH 421, di-8-ANEPPS ("Sigma", США), RH 160 и RH 237 ("Molecular Probes", США);

➤ другие реагенты: флуоресцентный маркер кальцеин, детергент тритон X-100 ("Sigma", США), пентан, этанол, метанол, хлороформ, диметилсульфоксид (ДМСО), гексадекан и сквален ("Sigma", США).

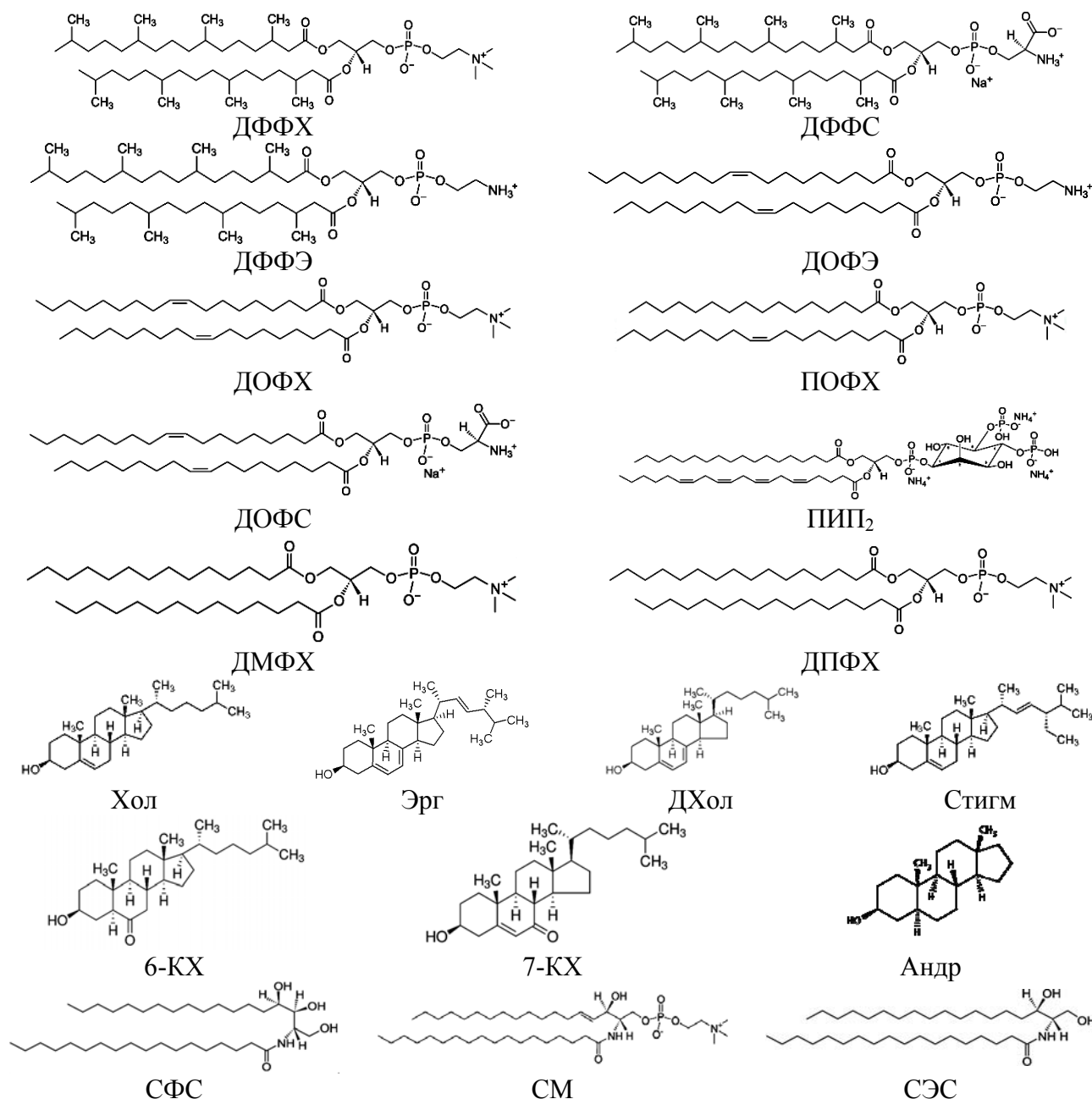


Рис. 2.1. Химические структуры использованных в работе липидов.

В работе использовали бидистиллированную и деионизованную воду. Для calorиметрических измерений воду дополнительно дегазировали.

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 [306] (рис. 2.2). Объем каждого отсека составлял 1.5 мл, диаметр отверстия в тефлоновой пленке толщиной 10 мкм был около 50 мкм. Отверстие в тефлоновой пленке предварительно обрабатывали гексадеканом или скваленом. Монослои создавали на поверхности водных отсеков из раствора 1÷10 мг/мл липида (липидной смеси) в пентане. Для формирования монослоев использовали индивидуальные фосфолипиды (ГМО, ДФФХ, ДФФС, ДФФЭ, ДОФХ, ПОФХ, ДОФЭ или ДОФС); липидные смеси ДОФС:ДОФЭ и ДФФС:ДФФЭ в эквимолярном соотношении; фосфолипид:стерин (Хол, Эрг, ДХол, Стигм, Андр, 6-КХ или 7-КХ) в различном соотношении (5:95 моль %, 33:67 моль %, 67:33 моль %), фосфолипид:стерин:сфинголипид (СМ, СФС или СЭС) в соотношении 53:27:20 моль % и смесь ДОФС:Хол:ПНП₂ в соотношении 62:33:5 моль %.

Экспериментальные условия подбирались отдельно для каждого каналообразующего агента (таблица 2.1). Каналоформеры добавляли в *цис*- (одностороннее введение) или в оба отсека экспериментальной ячейки (двустороннее введение).

Измерение токов проводимости выполняли в режиме фиксации потенциала. Подачу трансмембранного напряжения (V) и отведение сигнала с мембраны осуществляли с помощью хлорсеребряных электродов (Ag/AgCl), соединенных с растворами камеры через агарозные мостики (1.5 % агарозы в 2 М KCl). Трансмембранное напряжение, вызывающее поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры, считали положительным.

Электрические измерения выполняли при комнатной температуре.

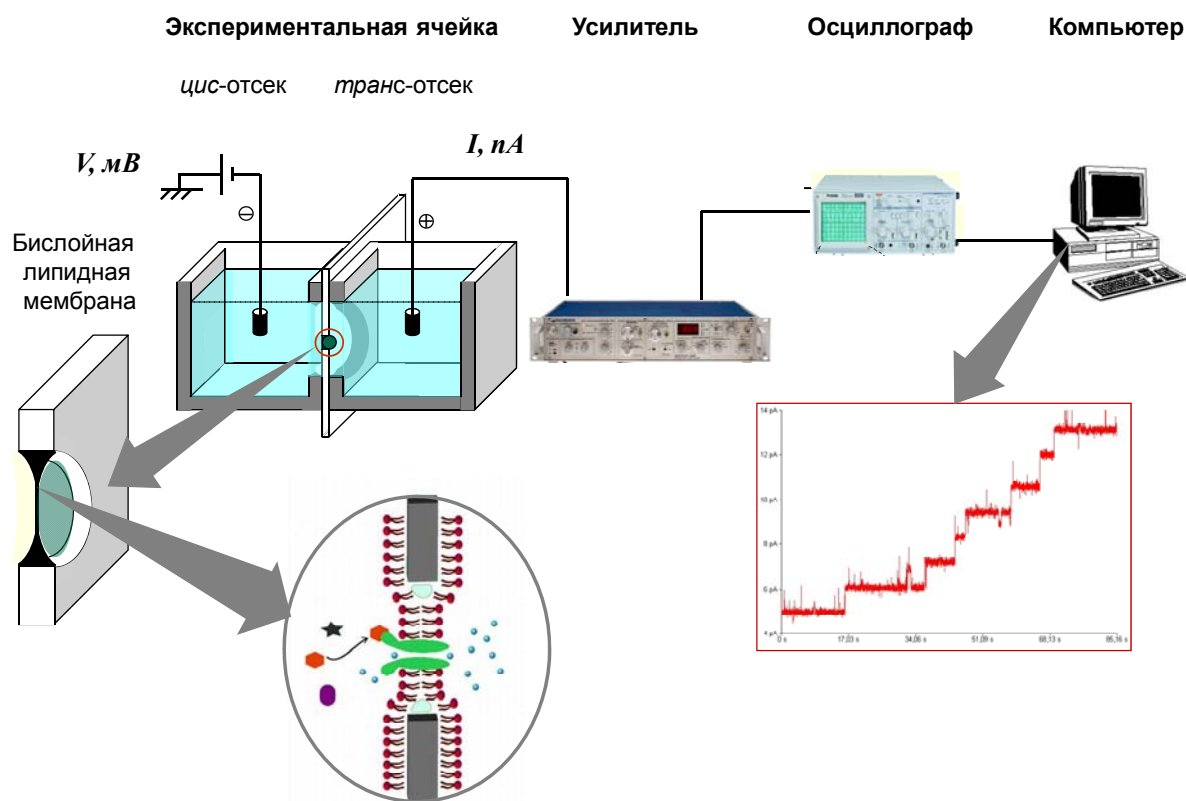


Рис. 2.2. Устройство экспериментальной установки.

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 проводимости использовали программный пакет Clampfit 9.0 ("Axon Instruments", США). Треки фильтровали с помощью 8-полярного фильтра Бесселя с частотой 100 Гц. Статистический анализ полученных данных выполняли в Origin 8.0 ("OriginLab", США).

Таблица 2.1. Экспериментальные условия при исследовании каналообразующей активности различных соединений.

каналообразующий агент	молекулярный вес, Да	исходный раствор	способ введения в камеру	концентрация электролита в омывающем растворе	буферная смесь и кислотность раствора	концентрация агента в омывающем мембрану растворе
CME*	1100	1 мМ в воде (pH 3)	одностороннее (цис-)	0.1 M KCl	5 mM HEPES pH 7.4	1 ÷ 5 мкМ
				0.1 ÷ 1.0 M NaCl	5 mM MOPS pH 6.0	
				0.4 M NaGlc 0.4 M NaAsp		
CФ	1036	1 мМ в этаноле	двустороннее	0.1 M KCl	5 mM HEPES pH 7.4	0.2 ÷ 0.4 мкМ
ЦА	4004	0.25 мМ в воде	одностороннее (цис-)	0.1 M KCl	5 mM HEPES pH 7.4	1 ÷ 5 мкМ
ЦБ	3836					
АМБ [#]	924	10 ⁻⁴ М в ДМСО	двустороннее	2.0 M KCl	5 mM HEPES pH 7.0	10 ⁻⁸ ÷ 10 ⁻⁶ М
НС [#]	926	10 ⁻³ М в ДМСО	одностороннее (цис-)			20 ÷ 40 мкМ
		10 ⁻⁴ М в ДМСО	двустороннее			10 ⁻⁸ ÷ 10 ⁻⁶ М
ФЛ [#]	655	10 ⁻⁴ М в этаноле	двустороннее			

α -ГЛ [§]	33200	1.5 мМ в 8 М растворе мочевины	одностороннее (цис-)	0.1 М KCl 1.0 М KCl	5 мМ HEPES pH 7.5	10 ÷ 40 нМ
ПС-1	≈1000	2 мг/мл в воде	одностороннее (цис-)	0.1 М KCl	5 мМ HEPES pH 7.4	50 ÷ 100 мкг/мл
фрагмент 106-126 белка приона человека	1912	1 мМ в воде	одностороннее (цис-)	0.1 М KCl	5 мМ HEPES pH 7.4	20 ÷ 50 мкМ
фрагменты амилоидного β - пептида	985 ÷ 1100	1 ÷ 2 мМ в буфере	одностороннее (цис-)	0.1 М KCl	5 мМ HEPES pH 7.4	50 ÷ 100 мкМ
фрагмент 25-35 амилоидного β - пептида	1060	2 мМ в буфере	одностороннее (цис-)	0.1 М KCl	5 мМ MES pH 4.0	50 ÷ 150 мкМ
BASP1, GAP-43 и их олигомеры	≥22000-25000	0.2 ÷ 3.5 мг/мл в воде	одностороннее (цис-)	0.1 М KCl	5 мМ HEPES pH 7.4	5 ÷ 100 мкг/мл
фрагменты BASP1 и GAP-43	1600 ÷ 4600	2 ÷ 5 мМ в воде				2 ÷ 400 мкМ

* – проводимость СМЕ-каналов в мембранах, омываемых растворами NaGlc (NaAsp), мала, поэтому использовали 0.4 М концентрацию электролитов, близкую к пределу их растворимости.

– регистрация одиночных полиионных каналов в более разбавленных растворах электролита затруднена в виду их малой проводимости.

\$ – мочевины использовали для предотвращения олигомеризации α -ГЛ в растворе. Пороговую концентрацию токсина подбирали таким образом, чтобы реконструировать в мембрану только один α -ГЛ канал.

2.1.1. Проводимость одиночных каналов

Проводимость каналов (g) вычисляли как отношение тока, проходящего через одиночный канал, (i) к трансмембранному напряжению. Гистограммы флуктуаций тока строили для значений трансмембранных токов, определяемых по изменениям амплитуды тока при открывании(закрывании) одиночных каналов. Критерием отбора флуктуаций тока являлось его ступенчатое изменение. Выборка (N), используемая для анализа при фиксированном значении V , составляла от 100 до 5000 событий для каналов с одним выделенным подуровнем проводимости (АМБ) и от 4000 до 70000 для каналов с многоуровневой проводимостью (СМЕ, СФ, ЦА, ЦБ). При изучении потенциал-чувствительности перехода α -ГЛ канала из открытого в низкопроводящие состояния ограничивались выборкой в $50 \div 150$ событий. Для построения гистограмм вычисляли приведенные к ширине столбца гистограммы частоты ($n/(Nh)$). Аппроксимацию пиков проводили плотностью распределения Гаусса. При таком подходе площадь под пиком равна вероятности появления соответствующего подуровня проводимости канала. Проверку гипотезы о законе распределения проводили с помощью критерия χ^2 ($P < 0.05$).

- *Многоуровневая проводимость*

- а) Сирингомициновые каналы*

На гистограммах флуктуаций токов, протекающих через одиночные СМЕ-каналы, первый пик, с минимальным средним значением тока (i), обусловлен открыванием(закрыванием) элементарных каналов. Другие пики характеризуются средними значениями тока (i_k), кратными минимальному: $i_k = k \cdot i$, где k – номер пика, равный числу элементарных каналов, кооперативно открывающихся в составе кластеров соответствующего типа. Возможность случайного совместного открывания(закрывания) k -элементарных каналов оценивали по [356]. Установлено, что при $k \geq 3$ этой вероятностью можно пренебречь. Для того чтобы описать влияние трансмембранного напряжения и дипольного потенциала на кооперативность функционирования СМЕ-каналов в кластерах, определяли среднее нормированное число синхронно функционирующих каналов:

$$m = \frac{\sum_{k \geq 3} (k \rho_k)}{\sum_{k \geq 3} \rho_k}, \quad (2.1)$$

где ρ_k – площадь под k -тым пиком.

Относительное число кластеров в общем пуле открытых каналов, обуславливающих некоторый макроскопический ток, находили как:

$$S = \frac{N_c}{N_c + n_e}, \quad (2.2)$$

где N_c – число открытых кластеров, n_e – число элементарных каналов.

б) Сурфактиновые и цекропиновые каналы

Многоуровневая проводимость СФ- и ЦА(ЦБ)-каналов имеет отличную от СМЕ природу: каналы бóльшей проводимости не обусловлены синхронным открыванием пор с малой проводимостью, а являются результатом увеличения числа мономеров липопептида или пептида в составе образующих поры проводящих олигомеров. Поэтому для анализа проводимостей сурфактиновых и цекропиновых каналов использовали средний нормированный трансмембранный ток, протекающий через одиночные каналы, i_{sc} , рассчитываемый как:

$$i_{sc} = \sum_k i_k p_k, \quad (2.3)$$

где i_k – среднее значение тока для k -го пика.

Обоснованность использования величины i_{sc} определяется сходством кинетических характеристик различных подсостояний проводимости каналов.

Среднюю нормированную проводимость рассчитывали как:

$$g_{sc} = \frac{i_{sc}}{V} \quad (2.4)$$

2.1.2. Время жизни каналов

Для определения времени жизни каналов (времени их нахождения в открытом состоянии) рассматривали записи флуктуаций тока через мембраны с одним встроенным каналом. Ограничивались выборкой в $50 \div 1100$ событий. При построении гистограмм число промежутков разбиения определяли по формуле Старджесса ($\kappa = 1 + 3.3 \log(N)$, где N – общее число событий); вычисляли относительные частоты и фитировали полученное распределение плотностью показательного распределения с параметром, равным среднему времени жизни канала (τ_{on}). Проверку гипотезы о законе распределения проводили с помощью критерия χ^2 ($P < 0.05$).

2.1.3. Стационарный макроскопический трансмембранный ток

Для характеристики изменения каналообразующей активности использовали среднее отношение стационарных макроскопических трансмембранных токов (I_{∞}/I_{∞}^0), индуцированных открыванием большого числа каналов после (I_{∞}) и до введения дипольных модификаторов (I_{∞}^0). Проводили несколько независимых экспериментов ($3 \div 9$) и вычисляли среднюю величину I_{∞}/I_{∞}^0 (среднее $\pm$ SE).

Стационарное число открытых каналов в мембране (N_{op}) определяли по отношению стационарного макроскопического трансмембранного тока и амплитуды одиночного канала.

- *Стационарное число открытых СМЕ-каналов и их воротный заряд*

Согласно [3a] выражение для стационарного числа открытых СМЕ каналов (N_{op}) при варьировании дипольного потенциала мембраны (φ_d) может быть представлено в виде:

$$\ln N_{op}(V, \infty, \varphi_d) = A(\varphi_d) + \frac{q(\varphi_d)eV}{kT}, \quad (2.5)$$

где $q(\varphi_d)$ – эффективный воротный заряд СМЕ-канала, характеризующий смещение заряженных и полярных групп, образующих сенсор напряжения (воротный механизм), при потенциал-зависимом открывании поры [188, 191, 278, 372]; e – модуль заряда электрона ($e = 1.6 \cdot 10^{-19}$ Кл); k – постоянная Больцмана ($k = 1.38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К); T – термодинамическая температура ($T = 294$ К).

Потенциал-независимая компонента в выражении (2.5) ($A(\varphi_d)$) является функцией нескольких величин, характеризующих распределение липопептида между мембраной и водной фазой, кластерную организацию СМЕ-каналов, а также конформационные перестройки при формировании водных пор каналов:

$$A(\varphi_d) = \ln \rho'(\varphi_d) + 6 \ln C + \ln \left[1 + \frac{m(\varphi_d)S(\varphi_d)}{1 - S(\varphi_d)} \right] - \frac{\Delta U_{str}(\varphi_d)}{kT}, \quad (2.6)$$

где $\rho'(\varphi_d)$ – параметр, определяемый коэффициентом распределения липопептида между мембраной и водным раствором и агрегацией молекул СМЕ на поверхности бислоя; C – концентрация липопептида в омывающем мембрану растворе; $\Delta U_{str}(\varphi_d)$ – химическая составляющая работы по образованию СМЕ-поры.

Величины $q(\varphi_d)$ и $A(\varphi_d)$ могут быть найдены путем линеаризации зависимости $\ln N_{op}(\frac{eV}{kT})$ как тангенс угла наклона прямой и отсекаемый по оси ординат отрезок. Погрешности определения $q(\varphi_d)$ и $A(\varphi_{d1}) - A(\varphi_{d2})$ не превышали 20 %.

В некоторых случаях для характеристики изменения каналообразующей активности также сравнивали пороговые концентрации порообразующего агента, необходимые для наблюдения одиночных каналов до $C(\varphi_{d1})$ и после введения дипольных модификаторов $C(\varphi_{d2})$. Проводили несколько независимых экспериментов ($5 \div 10$) и вычисляли среднюю величину $\frac{C(\varphi_{d2})}{C(\varphi_{d1})}$ (среднее $\pm$ SD).

2.1.4. Катион-анионная избирательность каналов

Катион-анионную селективность каналов изучали при 10- или 3-кратном трансмембранном градиенте концентрации электролита. Экспериментальные условия при исследовании катион-анионной селективности каналов, формируемых различными каналообразующими агентами, приведены в Таблице 2.2.

Число переноса анионов (t^-) (при нормировке $t^- + t^+ = 1$, где t^+ – число переноса катионов) рассчитывали согласно уравнению Гендерсона [309]:

$$V^{rev} = \left(\frac{kT}{e} \right) (1 - 2t^-) \ln \left(\frac{C_{цис}}{C_{транс}} \right), \quad (2.7)$$

где V^{rev} – потенциал реверсии, который соответствует нулевому трансмембранному току, $C_{цис}/C_{транс}$ – отношение концентраций электролита с *цис*- и *транс*- стороны мембраны.

Таблица 2.2. Экспериментальные условия при исследовании катион-анионной селективности пор, образуемых различными соединениями.

канало- образующий агент	концентрация электролита в <i>цис</i> -отсеке	концентрация электролита в <i>транс</i> -отсеке
<i>СМЕ</i>	0.4 М NaGlc (NaAsp)	0.04 М NaGlc (NaAsp)
<i>СФ</i>	1.0 М KCl	0.1 М KCl
<i>ЦА</i>	1.0 М KCl	0.1 М KCl
<i>АМБ (НС)</i>	2.0 М KCl	0.2 М KCl
<i>α-ГЛ</i>	1.0 М KCl	0.1 М KCl
<i>ВАСР1</i>	0.5 М KCl	0.05 М KCl

2.3. Определение изменений дипольного потенциала бислоев

Учитывая, что диффузия в мембране комплекса "ион-переносчик" является скоростью лимитирующим процессом только в разбавленных растворах, при измерении $\Delta\varphi_d$ плоские липидные бислои (2.2.1.) формировали в 0.1 М растворах KCl при pH 7.4 (5 mM HEPES-KOH).

Ионофоры, нонактин или валиномицин (рис. 2.3), из стока в спирте добавляли в омывающие растворы с обеих сторон мембраны до конечной концентрации $10^{-7} - 10^{-6}$ М. Известно, что флоретин менее эффективен в отношении трансмембранного тока, индуцированного K^+ -валиномицином, чем K^+ -нонактином в фосфолипидных и стерин-содержащих мембранах [29], поэтому в экспериментах по измерению уменьшения дипольного потенциала мембраны при введении флавоноидов и иодосодержащих гормонов щитовидной железы использовали нонактин. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что стирильный краситель RH 421 менее эффективен в отношении трансмембранного тока, индуцированного K^+ -нонактином, чем K^+ -валиномицином в ДФФХ-бислоях, поэтому в экспериментах по измерению увеличения дипольного потенциала мембраны, вызванного адсорбцией стирилпиридиновых красителей, применяли валиномицин.

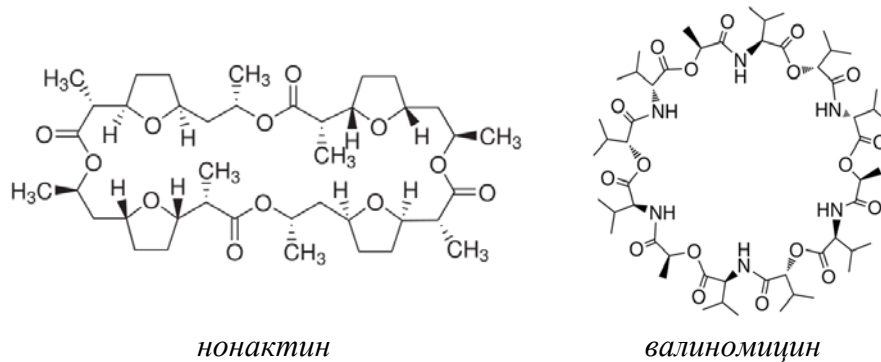


Рис. 2.3. Химическая структура ионофоров

Проводимость бислоя (G) находили по отношению стационарного трансмембранного тока к трансмембранному потенциалу (как правило, равному 50 мВ). Изменение дипольного потенциала ($\Delta\varphi_d$) при введении модификаторов определяли как:

$$\frac{G_m}{G_m^0} = \exp\left(\frac{e\Delta\varphi_d}{kT}\right), \quad (2.8)$$

где G_m^0 и G_m – значения стационарной K^+ -проводимости бислоя, индуцированной нонактином до и после введения модификатора [29]. Условия применимости этого выражения для расчета величин $\Delta\varphi_d$ будут обсуждаться в разделе (3.1.1.1).

Экспериментальные условия при измерении изменения дипольного потенциала плоских липидных бислоев при введении различных модификаторов резюмированы в Таблице 2.3.

Таблица 2.3. Экспериментальные условия при измерении изменения дипольного потенциала плоских липидных бислоев при введении различных модификаторов.

класс дипольных модификаторов	представители	химическая структура	исходный раствор	концентрация в камере
флавоноиды	флоретин, флорицин, генистин, генистеин, даидзеин, кверцетин, мирицетин, рутин, биоханин А, таксифолин, катехин, ДГАФ, ТГАФ	таблица 1.1	20 мМ в этаноле или ДМСО	2.5 ÷ 150 мкМ
стирилпиридиновые красители	RH 160, RH 237, RH 421, di-8-ANEPPS	рис. 1.17	10 мМ в этаноле	1 ÷ 10 мкМ
тиреоидные гормоны	тироксин, трийодотиронин	рис. 1.18	15 мМ в ДМСО	2 ÷ 50 мкМ

Конечная концентрация растворителя (этанол, метанол и/или ДМСО) в камере не превышала 0.1 %. В такой концентрации растворители не нарушают целостность и стабильность плоских липидных бислоев. В отсутствие ионофоров дипольные модификаторы (флавоноиды, стироловые красители и иодосодержащие гормоны) в указанных концентрациях не влияли на проводимость и стабильность липидных бислоев.

Проводили несколько независимых экспериментов (3 ÷ 7) и вычисляли среднюю величину $\Delta\varphi_d$ для каждой из экспериментальных систем (среднее $\pm$ SD).

Для описания адсорбции флавоноидов и иодосодержащих гормонов на поверхности липидных бислоев использовали выражение:

$$\Delta\varphi_d(C) = \frac{\Delta\varphi_d(\infty)C}{C + K}, \quad (2.9)$$

где $\Delta\varphi_d(C)$ – уменьшение дипольного потенциала мембран при концентрации (C) модификатора в омывающем растворе, $\Delta\varphi_d(\infty)$ – максимальное изменение дипольного потенциала мембран при $C \rightarrow \infty$, K – константа десорбции модификатора. Выражение (2.9) при некоторых условиях может быть получено на основе простой изотермы адсорбции и получило широкое распространение в литературе как «изотерма Ленгмюра»

[107, 112]. Мы в дальнейшем будем также использовать этот термин, а условия его применимости подробно обсуждены ниже в разделе (3.1.1.1).

За погрешность измерения $\Delta\varphi_d(\infty)$ принимали максимальную экспериментальную погрешность измерения $\Delta\varphi_d(C)$, а погрешность определения K вычисляли как погрешность отношения $(\frac{\Delta\varphi_d(\infty)}{\Delta\varphi_d(C)})$. Сравнение эффективности различных дипольных модификаторов проводили на основании величин $\Delta\varphi_d(\infty)$ и K .

Поскольку для используемых концентраций стирилпиридиновых красителей насыщения по току не наблюдается, при описании их адсорбции использовали линейную зависимость:

$$\Delta\varphi_d(C) = \beta C. \quad (2.10)$$

Для сравнения диполь-модифицирующих свойств стирилпиридиновых красителей серии RH определяли коэффициент наклона (β) прямой, аппроксимирующей зависимость увеличения дипольного потенциала бислов от концентрации модификатора в омывающем растворе.

2.4. Конфокальная флуоресцентная микроскопия липосом

Гигантские одноламеллярные липосомы формировали в электрическом поле с использованием коммерческого прибора "Nanion vesicle prep pro" (Германия) на паре стекол, покрытых проводящей смесью оксида индия и оксида олова (ИТО). Визуализацию фазового разделения липосомных мембран проводили путём введения флуоресцентного зонда, ЛР-ДПФЭ, в исходный 11 мМ липидный раствор в хлороформе. Концентрация ЛР-ДПФЭ в каждом образце составляла 1 моль %.

Для формирования липосом в центр резинового кольца на проводящей поверхности одного ИТО стекла наносили 18 мкл исходного липидного раствора. После испарения хлороформа вносили 250 мкл водного раствора 0.5 М сорбитола, и накрывали другим ИТО стеклом. На стёкла подавалось переменное напряжение с амплитудой 3 В и частотой 10 Гц в течение 1 часа при температуре 25 °С (стандартный протокол). Полученную липосомную суспензию разделяли на аликвоты. В экспериментальные образцы вводили дипольные модификаторы (флавоноиды до концентрации 400 мкМ или стирилпиридиновые красители до концентрации 10 мкМ) и(или) каналобразующие агенты (полиеновые антибиотики до концентрации 50 ÷ 500 мкМ или фрагменты амилоидного β -пептида до концентрации 200 мкМ). В контрольные образцы вводили 1

об.% этанола. Растворитель в указанной концентрации не влиял на фазовое разделение в липосомных мембранах. Аликвоты уравнивали в течение 30 минут при комнатной температуре. 10 мкл полученной липосомной суспензии помещали между предметным и покровным стеклами. Деформации липосом не наблюдали.

Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив 100×/1.4 HCX PL в "Leica" TCS SP5' конфокальной лазерной системы "Apo" ("Leica Microsystems", Германия). Наблюдение препаратов проводили при комнатной температуре (постоянную температуру во время наблюдения поддерживали с помощью воздушного термостата). Свечение ЛР-ДПФЭ регистрировали при длине волны возбуждения 543 нм (гелий-неоновый лазер).

Известно, что ЛР-ДПФЭ в липидных бислоях, подверженных фазовому разделению, преимущественно встраивается в жидкую неупорядоченную фазу, а упорядоченные домены остаются неокрашенными [213]. Как уже было отмечено в параграфе 1.1.3, форма доменов обусловлена балансом между линейным натяжением, стремящимся уменьшить длину границы домена, и силами упругости, препятствующими его деформации. Поскольку доминирование первого фактора приводит к образованию доменов правильной круглой формы, их наличие в мембране свидетельствует об одновременном существовании в мембране двух жидких несмешивающихся фаз [93, 117, 157, 260, 368, 453]. При этом твердые домены характеризуются неправильной дендритической или звездоподобной формой [49, 50, 454]. Такой подход позволяет дискриминировать две упорядоченные фазы на основании морфологии неокрашенных ЛР-ДПФЭ доменов [314, 439]: домены правильной круглой формы относят к жидкой упорядоченной фазе (l_o), а неправильной дендритической формы – к гель-фазе (s_o). Таким образом, липосомы в поле зрения разделяли на три группы и вычисляли процентное содержание в образце: 1) гомогенные липосомы без видимого фазового разделения (l_d); 2) липосомы с неокрашенными доменами круглой формы (рафтами) (l_o); 3) липосомы с неокрашенными доменами неправильной формы (гель-домены) (s_o). Для каждой системы проводили как минимум 9 независимых экспериментов.

2.5. Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия одноламеллярных везикул

Липосомы приготавливали способом, описанным в 2.4, с некоторыми изменениями. Для этого в центр резинового кольца на проводящей поверхности одного ИТО стекла наносили $0.5 \div 1.0$ мкмоль исходного раствора ДПФХ ($5 \div 10$ мг/мл в хлороформе). После испарения хлороформа вносили 250 мкл буферного раствора (5 мМ

HEPES, pH 7.4), и накрывали другим ИТО стеклом. На стёкла подавалось переменное напряжение с амплитудой 3 В и частотой 10 Гц в течение 1 часа при температуре 50 °С. Полученную липосомную суспензию доводили до 800 мкл буферным раствором. Конечная концентрация липида составляла от 0.5 до 1.0 мМ. В экспериментальные образцы вводили флавоноиды, стирилпиридиновые красители или тиреоидные гормоны из 20 или 10 мкМ растворов в этаноле или ДМСО до концентрации 70, 15 и 50 мкМ, соответственно. Растворители в использованной концентрации не оказывали влияния на фазовый переход ДПФХ [243]. Контрольные образцы не модифицировали. Термограммы липосомных суспензий, $C_p(T)$, получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра μ DSC7 ("Setaram", Франция). Соответствующее количество липосомной суспензии помещали в одну ячейку и нагревали с постоянной скоростью 0.2 К/мин при постоянном давлении 1 атм, во вторую ячейку помещали буферный раствор. Воспроизводимость температурной зависимости теплоемкости достигали путем повторного нагревания образца сразу после охлаждения. Пики на термограммах характеризовали температурой максимума (T_m) и шириной на полувывоте ($T_{1/2}$), отвечающей кооперативности фазового перехода (размеру ячейки).

2.6. Флуориметрия утечки кальцеина из липосом

Проницаемость больших моноламеллярных липосом для кальцеина определяли путем измерения интенсивности флуоресценции красителя, вытекающего из везикул. Липосомы диаметром 100 нм получали методом экструзии с использованием мини-экструдера ("Avanti Polar Lipids", США). Раствор липида в хлороформе помещали в вials, после чего растворитель удаляли потоком азота. Липидную плёнку гидратировали буфером (35 мМ кальцеина, 10 мМ HEPES, pH 7.4) и подвергали пятикратному замораживанию-размораживанию. Полученную суспензию мультиламеллярных липосом пропускали 13 раз через поликарбонатную мембрану с диаметром пор 100 нм ("Nucleopore TM", США) для получения одноламеллярных липосом одинакового размера. Кальцеин, не захваченный липосомами, удаляли с помощью гель-фильтрации на колонке заполненной сефадекс-75. В качестве элюента использовали свободный от флуоресцентного красителя буфер (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7.4). Полученную липосомную суспензию разбавляли до концентрации липида 10 мкМ. Кальцеин, находящийся внутри липосом в концентрации 35 мМ, испытывает самотушение. Поскольку омывающий липосомы раствор не содержит кальцеина, проницаемость мембраны можно оценить по интенсивности флуоресценции вытекающего из везикул красителя.

Липосомную суспензию разделяли на аликвоты. Контрольные образцы не модифицировали. В экспериментальные образцы вводили флавоноиды, полиеновые антибиотики или фрагмента амилоидного β -пептида и инкубировали 1 час в темноте при комнатной температуре. Далее измеряли интенсивность флуоресценции высвобожденного из липосом кальцеина с помощью спектрофлюориметра "Флюорат Панорама-02" (при длине волны возбуждения 490 нм, эмиссии 520 нм). Растворители в соответствующих концентрациях не влияли на проницаемость везикул для кальцеина. В конце эксперимента в раствор добавляли ТХ-100 до концентрации 10 мМ из водного раствора в концентрации 100 мМ. Этот детергент вызывает разрушение липосомных мембран и полное высвобождение захваченного красителя.

Величину утечки R (%) определяли по формуле:

$$R = \frac{I - I_0}{\frac{I_{\max}}{0.9} - I_0} \cdot 100\%, \quad (2.11)$$

где I и I_0 – интенсивности флуоресценции раствора в присутствии и отсутствие мембраноактивного соединения, $I_{\max}$ – интенсивность флуоресценции раствора после добавки ТХ-100 (множитель 0.9 введён для учёта разбавления образца).

Глава 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты и их обсуждение структурированы таким образом, чтобы сначала ознакомить читателя с количественными характеристиками влияния использованных в работе низкомолекулярных амфифилов на физико-химические свойства модельных мембран (3.1), а затем – с результатами изучения молекулярных механизмов транспорта ионов через ионные каналы с помощью охарактеризованных модификаторов мембран (3.2). Изложение сопровождается краткими справками с обоснованием выбора тех или иных экспериментальных условий. В конце каждого параграфа приводится краткое резюме наиболее значимых результатов. Подглава 3.3 посвящена обобщению всех полученных результатов с целью выявления общих закономерностей липидопосредованной регуляции формирования и функционирования ионных каналов с помощью дипольных модификаторов мембран.

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

Параграф написан по работам [10а, 14а, 15а, 17а, 19а, 24а, 25а *Списка основных публикаций автора по теме диссертации*]. В этом параграфе приведены количественные характеристики влияния дипольных модификаторов, относящихся к флавоноидам, стирилпиридиновым красителям и тиреоидным гормонам, на дипольный потенциал (φ_d) фосфолипидных, стерин- и сфинголипид-содержащих мембран. Бóльшая часть результатов получена методом регистрации индуцированной ионофорами проводимости плоских липидных бислоев [106,142]. На основании сравнения структур родственных соединений и их способности влиять на дипольный потенциал мембран выявлены особенности молекул модификаторов, ответственные за изменение величины дипольного потенциала мембраны 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 (1.2.1.2) [15]. Поскольку эти соединения характеризуются значительным дипольным моментом [37,461], есть основания полагать, что наиболее общим свойством для флавоноидов является их влияние на распределение электрического поля на границах мембран. В биохимии флавоноидов широко документирована способность флоретина уменьшать дипольный потенциал мембраны [29,107], 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 [419]. Это определило целесообразность исследования эффектов флавоноидов, в молекулах которых пропановый фрагмент входит в состав гетероцикла. Для решения поставленной задачи нами было предпринято сравнительное исследование диполь-модифицирующего действия флавоноидов, относящихся к различным структурным классам, халконов (флоретина и флорицина), флавонолов (кверцетина, мирицетина и рутина), флаванолов (таксифолина), изофлавонов (генистеина, биоханина А, генистина и даидзеина), флаван-3-олов (катехина), а также короткого полифенола, содержащего только один ароматический цикл (2',4',6'-тригидрокси-ацетофенона (ТГАФ)). (Используемая в этом подпараграфе классификация флавоноидов приведена в параграфе 1.2.1.)

а) Изменение дипольного потенциала фосфолипидных бислоев при адсорбции флавоноидов

В этой части работы для формирования плоских липидных бислоев были использованы синтетические фосфолипиды: ДФФХ, ДОФХ, ДОФЭ и ДОФС (рис. 2.1). Указанный набор позволяет варьировать как профиль латерального давления в модельных мембранах, так и их заряд. ДОФХ характеризуется близкой к цилиндрической формой, ДОФЭ и ДФФХ имеют форму инвертированных конусов, а ДОФС – коническую (1.1.2). ДФФХ имеет полностью насыщенные разветвленные ацильные цепи. ДФФХ бислоем находится в жидкокристаллическом состоянии в широком диапазоне температур и поэтому часто используется для создания высоко стабильных моделей клеточных

мембран. Подобные липиды с разветвленными углеводородными цепями обнаружены в мембранах архей [462]. Фосфатидилсерины и фосфатидилэтаноламины достаточно широко распространены в биологических мембранах. Помимо структурной функции этим фосфоглицеридам приписывают и ряд специфических, в частности, фосфохолины выполняют ряд важных функций в эндоплазматическом ретикулуме, обеспечивая секрецию белка, гомеостаз холестерина и др. [248]. Фосфосерины в физиологических условиях несут отрицательный заряд. Они несимметрично распределены между монослоями плазматической мембраны: ими богат цитоплазматический монослой. Экспонирование фосфосеринов на поверхности мембраны является сигналом к фагоцитозу апоптотической клетки, транслокация фосфосеринов из внутреннего во внешний монослой плазматической мембраны тромбоцитов запускает каскад свертывания крови, кроме того фосфосерины являются специфическим антагонистом ряда ферментов, например, протеинкиназы С. Экспонирование фосфоэтаноламинов на поверхности клетки регулирует цитокинез, а скачок латерального давления в бислое, обусловленный присутствием фосфоэтаноламинов, обеспечивает правильную укладку мембранных белков [437, 438].

На рис. 3.1 А показана кинетика изменения трансмембранного тока, индуцированного K^+ -нонактином, с ростом концентрации флоретина в омывающем ДФФХ-мембрану растворе. Видно, что в диапазоне концентраций модификатора от 0 до 70 мкМ трансмембранный ток растет, дальнейшее увеличение концентрации флавоноида в околосмембранном растворе не приводит к изменению тока – он достигает насыщения. Согласно [29], наблюдаемый рост проводимости мембраны обусловлен падением ее дипольного потенциала, вызванным адсорбцией молекул флоретина. Авторы цитируемой работы предложили оценивать изменение дипольного потенциала, пользуясь формулой (2.8). Применимость этого выражения ограничена целым рядом допущений. В частности, в данную формулу включена только дипольная компонента граничного потенциала ($\Delta\phi_d$), хотя количество ионов в мембране (и ее проводимость) может зависеть не только от электростатических причин, но и от плотности упаковки мембранных липидов, собственной структуры ионофора, его подвижности и т.п. В случаях, если мембрана содержит заряженные липиды или их состояние ионизации меняется адсорбированными молекулами, в выражении (2.8) должно быть учтено также падение потенциала в диффузной части двойного электрического слоя вблизи мембраны.

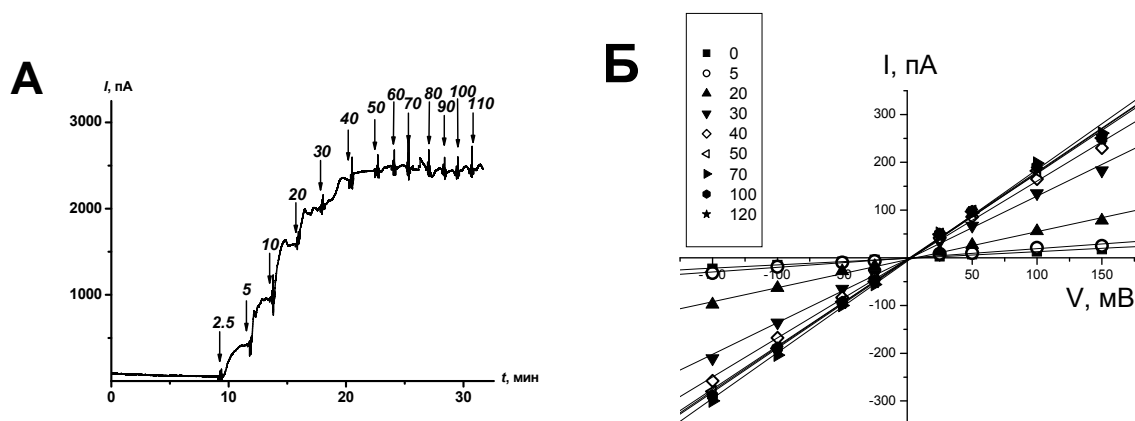


Рис. 3.1. (А) – Изменение K^+ -нонактин-индуцированного стационарного трансмембранного тока после введения в мембраноомывающие растворы флоретина до концентрации в диапазоне от 2.5 до 110 μM . Моменты введения флоретина указаны стрелками, над которыми приведены соответствующие концентрации. $V = 50 \text{ мВ}$. (Б) – Зависимость проводимости мембраны от трансмембранного напряжения до и после добавки флоретина до концентрации в околосмембранном растворе от 5 до 120 μM . Мембраны сформированы из ДФФХ и омываются 0.1 М КСl при pH 7.4.

Независимым подтверждением того, что флоретин индуцированное уменьшение дипольного потенциала вносит основной вклад в изменение энергетического барьера для гидрофобных катионов, может быть совпадение результатов, полученных различными методами. В качестве альтернативного способа оценки изменения дипольного потенциала мембраны при адсорбции флоретина мы использовали флуориметрию di-8-ANEPPS [102, 174]. Считается, что спектр флуоресценции этого красителя чувствителен к изменению потенциала на некоторой глубине в липидном бислое. Измерения соотношения интенсивностей флуоресценции при длине волны испускания 670 нм позволяет избежать влияния вязкостных свойств мембраны [102]. В дополнение нами было показано, что введение самого зонда не сказывается на величине дипольного потенциала бислоя (3.1.1.2). Результаты, полученные с помощью di-8-ANEPPS, хорошо согласуются с электрофизиологическими данными измерения проводимости липидных бислоев, что позволяет считать, что вклад других причин в наблюдаемые эффекты незначителен. Другим важным допущением при использовании формулы (2.8) является предположение о том, что скорость-лимитирующей стадией транспорта является перенос комплекса «ион-ионофор» через углеводородную область бислоя. Подобное условие может не выполняться, например, при высоких концентрациях модификатора, для которых наблюдается насыщение. Так, можно предположить, что дипольный потенциал мембраны продолжает уменьшаться и при концентрациях более 70 μM , но ввиду того, что скорость-лимитирующим процессом в этом случае является какая-либо другая стадия

транспорта, например, адсорбция иона на бислое, зарегистрировать происходящие изменения таким способом невозможно. На рис. 3.1 Б можно видеть, что в случае комплекса K^+ -нонактин вольт-амперные характеристики остаются линейными во всем изученном диапазоне концентраций флоретина, в том числе, при концентрациях, отвечающих насыщению. Это означает, что эффект насыщения не связан с тем, что перенос комплекса ион-ионофор через углеводородную область мембраны перестал быть скоростью-лимитирующей стадией транспорта, а, скорее, обусловлен заполнением всех центров связывания. Обоснованность возможности применения формулы (2.8) позволила нам представить полученные результаты в виде зависимостей величины уменьшения дипольного потенциала фосфолипидных бислоев ($-\Delta\varphi_d$) от концентрации (C) различных флавоноидов в омывающих мембраны растворах (рис. 3.1). Де Леви с соавторами [112] и Чех с соавторами [107] показали, что адсорбция флоретина на мембране в первом приближении может быть описана изотермой адсорбции Ленгмюра (2.9) с характеристическими параметрами: максимальное изменение дипольного потенциала при бесконечно большой концентрации флавоноида ($-\Delta\varphi_d(\infty)$) и его константа десорбции (диссоциации или равновесия) (K). Строго говоря, формула (2.9) не является прямым следствием изотермы Ленгмюра. Важным допущением при использовании этой аппроксимации является предположение о независимости константы десорбции от величины дипольного потенциала, что, вообще говоря, может быть не так. Однако удовлетворительная аппроксимация представленных на рис. 3.2 зависимостей $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$ от $1/C$ прямыми линиями наглядно демонстрирует применимость выражения (2.9) для описания адсорбции на фосфолипидных бислоях всех тестируемых флавоноидов и говорит о том, что вкладом диполь-дипольных взаимодействий можно пренебречь. В работе не ставится задачи представить более строгие доказательства справедливости этой формулы, которую далее для простоты изложения мы будем называть изотермой Ленгмюра. К преимуществам такого описания следует отнести возможность качественно и количественно сопоставить характеристики практически всего спектра исследованных веществ, оценить их эмпирическими параметрами и установить структурно-функциональные связи, как это будет показано ниже.

Таблица 3.1 суммирует результаты, полученные при обработке рис. 3.2 и 3.3. При этом, константы десорбции исследуемых модификаторов были определены как тангенсы угла наклона зависимостей $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$ от $1/C$ к оси абсцисс.

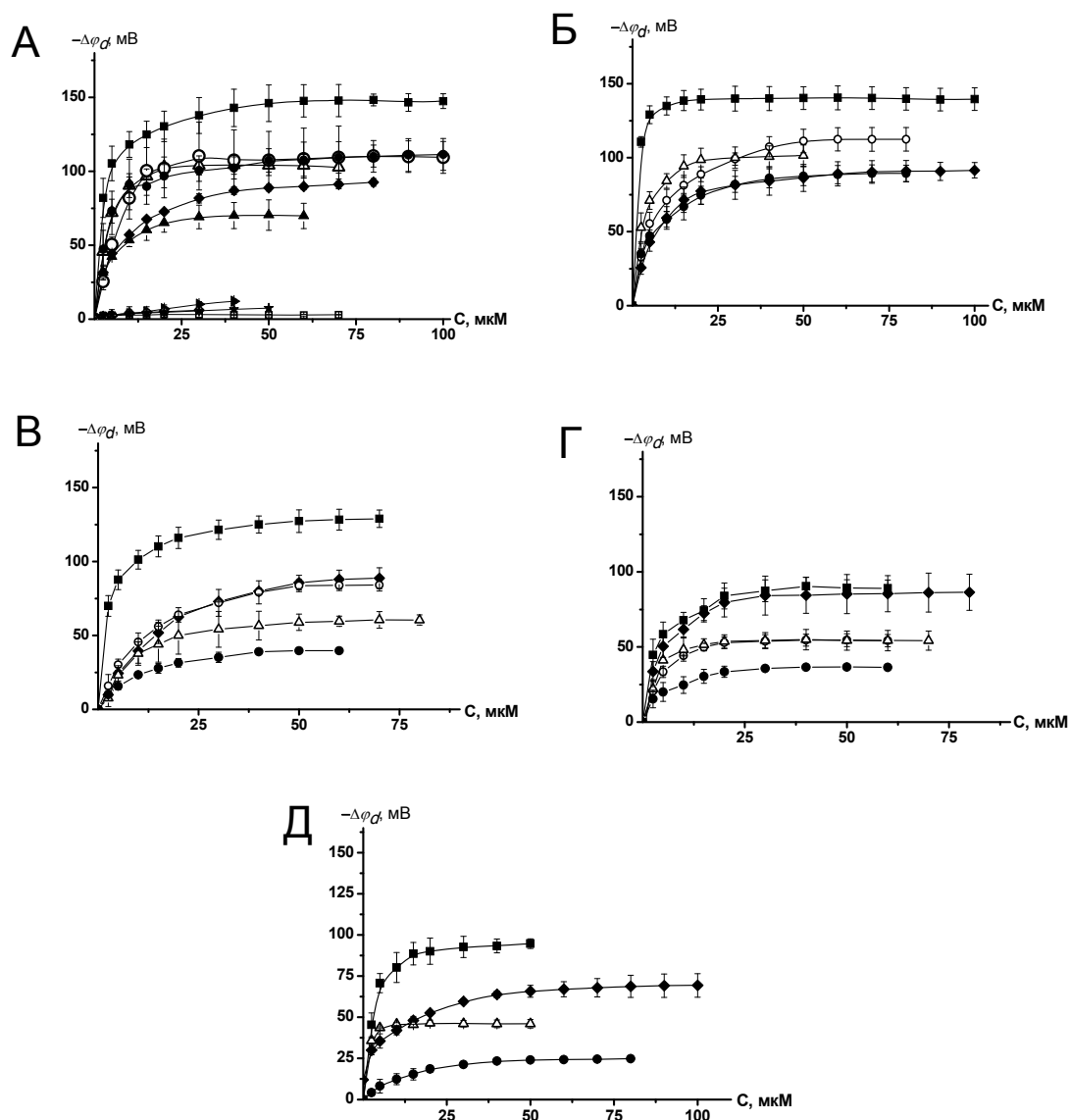


Рис. 3.2. Зависимость уменьшения дипольного потенциала мембраны ($-\Delta\varphi_d$) от концентрации (C) в омывающих фосфолипидные бислои растворах флоретина (■), флорицина (◆), кверцетина (Δ), мирицетина ($\bullet$), генистеина ($\blacktriangle$), биоханина А ($\circ$), генистеина ($\diamond$), катехина ($\square$), таксифолина ($\star$) и 2',4',6'-тригидроксиацетофенона (ТГАФ) ($\blacktriangleright$). Мембраны изготовлены из ДФФХ (А), ДОФХ (Б), ДОФЭ (В), ДОФС (Г) и эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ (50:50 моль %) (Д); омываются 0.1 М раствором KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

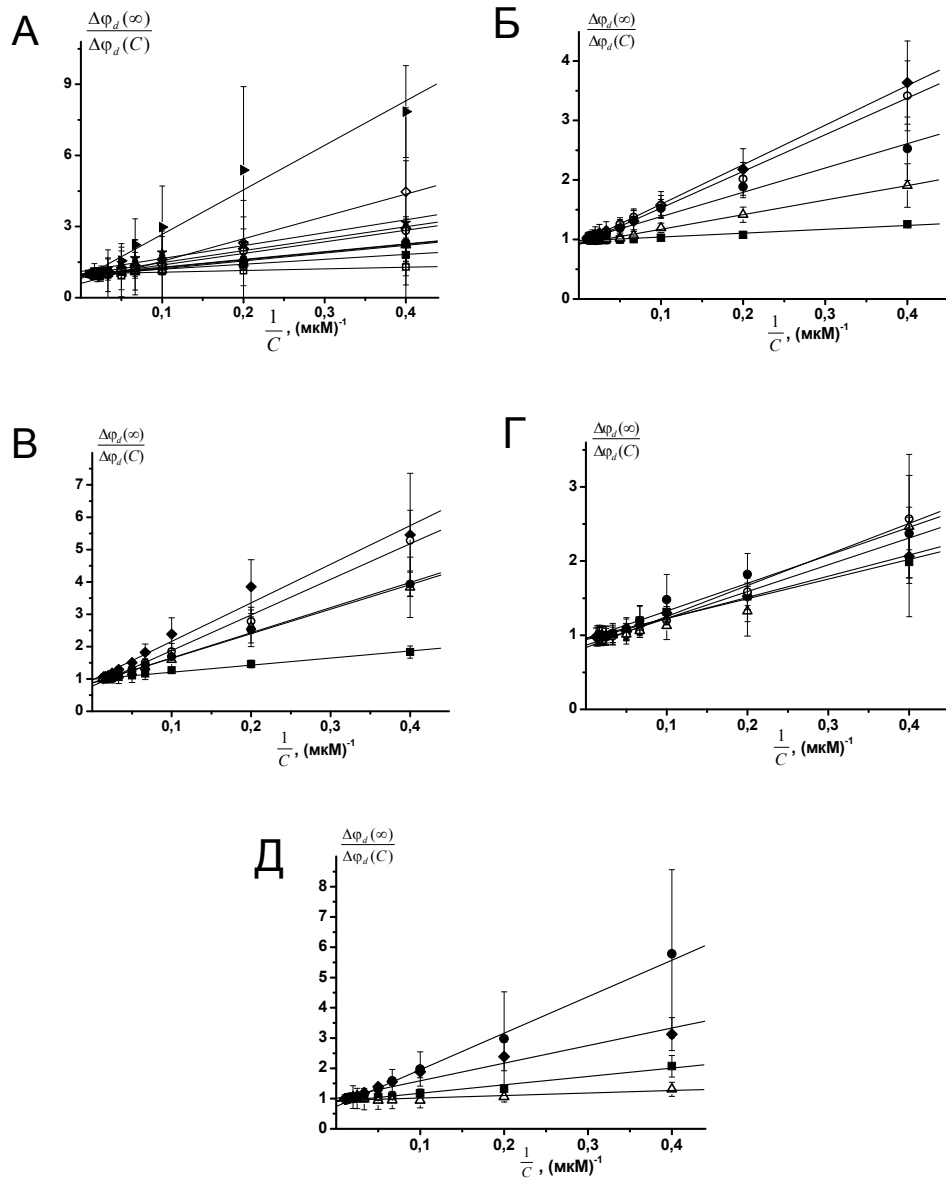


Рис. 3.3. Зависимость $\frac{\Delta\varphi_d(\infty)}{\Delta\varphi_d(C)}$ от $\frac{1}{C}$. Все условия и обозначения соответствуют указанным в подписи к рис. 3.2.

Таблица 3.1. Характеристические параметры изотерм адсорбции Ленгмюра для флавоноидов на различных фосфолипидных бислоях.

состав мембраны		ДФФХ	ДОФХ	ДОФЭ	ДОФС	ДОФС:ДОФЭ
– $\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ						
халконы	флоретин	147 ± 7	140 ± 8	128 ± 8	90 ± 6	94 ± 9
	флорицин	92 ± 4	91 ± 10	88 ± 8	85 ± 12	68 ± 7
флавонолы	кверцетин	104 ± 7	100 ± 9	60 ± 11	54 ± 9	46 ± 6
	мирицетин	111 ± 11	89 ± 9	39 ± 4	36 ± 6	24 ± 4
	рутин	42 ± 6	–	–	–	–
изофлавоны	биоханин А	109 ± 11	112 ± 8	84 ± 9	54 ± 7	–
	генистеин	70 ± 10	–	–	–	43 ± 5
	генистин	7 ± 2	–	–	–	–
	даидзеин	20 ± 6				
флаваноолы	катехин	6 ± 2	–	–	–	–
флаванонолы	таксифолин	2 ± 1	–	–	–	–
гидрокси-ацетофеноны	ТГАФ	15 ± 4	–	–	–	5 ± 1
	ГДМАФ	50 ± 5	–	–	–	–
K, мкМ						
состав мембраны		ДФФХ	ДОФХ	ДОФЭ	ДОФС	ДОФС:ДОФЭ
халконы	флоретин	2.0 ± 0.5	0.7 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.7 ± 0.8	2.8 ± 0.2
	флорицин	5.1 ± 0.2	6.2 ± 1.1	13.0 ± 0.9	3.0 ± 0.6	7.8 ± 0.4
флавонолы	кверцетин	3.3 ± 0.5	2.5 ± 0.6	7.5 ± 1.7	2.3 ± 1.1	0.7 ± 0.1
	мирицетин	3.3 ± 0.2	4.8 ± 0.9	8.1 ± 0.7	3.7 ± 0.8	12.1 ± 0.3
	рутин	10.8 ± 0.5	–	–	–	–
изофлавоны	биоханин А	2.1 ± 0.3	6.4 ± 0.9	9.9 ± 1.1	3.2 ± 0.5	–
	генистеин	1.3 ± 0.2	–	–	–	7.2 ± 0.5
	генистин	8.7 ± 2.4	–	–	–	–
	даидзеин	8.8 ± 0.2				
флаваноолы	катехин	2.3 ± 1.3	–	–	–	–
флаванонолы	таксифолин	7.9 ± 4.3	–	–	–	–
гидрокси-ацетофеноны	ТГАФ	26.4 ± 5.6	–	–	–	16.9 ± 2.0
	ГДМАФ	10.2 ± 0.4	–	–	–	–

Анализируя Таблицу 3.1 можно заметить, что:

1) Халконы (флоретин и флоридин), флавонолы (кверцетин и мирицетин) и некоторые изофлавоны (биоханин А и генистеин) в значительной мере уменьшают величину дипольного потенциала ДФФХ мембран. Аналогичный вывод был сделан на основании проведенной нами флуориметрической оценки $-\Delta\phi_d$, обусловленного адсорбцией мирицетина и генистеина, с помощью di-8-ANEPPS.

Результаты измерений $-\Delta\phi_d$ в присутствии мирицетина методом компенсации внутримембранного поля (1.1.1), выполненные В.С. Соколовым, хорошо согласуются с нашими данными (рис. 3.4). Близость значений уменьшения потенциала после добавки мирицетина, определенных методами ионофор-индуцированной проводимости и компенсации внутримембранного поля может указывать на то, что при одностороннем введении флавонол не способен переходить на другую сторону бислоя. В случае, если бы этот флавонол проникал через бислой, значения, измеренные методом компенсации внутримембранного поля, были бы заниженными по сравнению с результатами измерения проводимости.

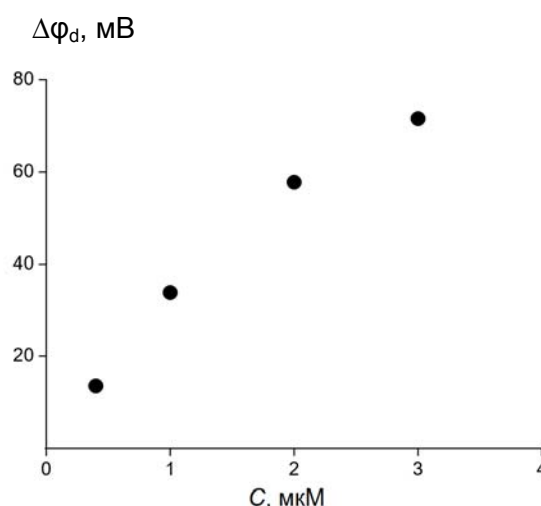


Рис. 3.4. Зависимость уменьшения дипольного потенциала мембраны ($-\Delta\phi_d$) от концентрации мирицетина в растворе с одной стороны мембраны (C). ДФФХ-бислой омывается 0.1 М раствором KCl при pH 7.5. Измерение граничного потенциала проведено методом компенсации внутримембранного поля. Рисунок представлен с разрешения В.С Соколова.

Флавонол рутин и гидроксидиметоксиацетофенон (ГДМАФ) обладают меньшей диполь-модифицирующей способностью в отношении этих бислоев. Изофлавоны (генистин и даидзеин), флаванол (катехин), флаванонол (таксифолин) и тригидроксиацетофенон (ТГАФ) практически не влияют на величину дипольного потенциала ДФФХ-мембран.

Сравнение полученных результатов и структур тестируемых агентов (1.2.1.1, Таблица 1.1) позволяет сделать вывод, что эффект флавоноидов, прежде всего, зависит от гидрофобности их молекул. Так, введение более гидрофобного халкона (флоретина по сравнению с флорицином), флавонола (кверцетина по сравнению с рутином), изофлавонона (гидрофобность убывает в ряду биоханин А, генистеин и генистин) или ацетофенона (ГДМАФ по сравнению с ТГАФ) вызывает большее изменение дипольного потенциала. Последнее связано с большей глубиной погружения в мембрану более гидрофобных аналогов. Исключение составляет относительно гидрофобный изофлавонон даидзеин, который практически не влияет на величину дипольного потенциала мембраны. Наиболее вероятно, что две гидроксильные группы, расположенные на противоположных концах молекулы даидзеина, препятствуют его погружению в бислои, в отличие от биоханина А, две гидроксильные группы которого расположены поблизости и способны образовывать внутримолекулярную водородную связь, обеспечивая возможность интеркаляции этого изофлавонона в мембрану [349].

Можно заключить, что характер связывания атомов C_2 и C_3 (Таблица 1.1) также играет существенную роль в диполь-модифицирующей способности флавоноидов. Если эти атомы углерода связаны двойной связью, т.е. находятся в состоянии sp^2 -гибридизации, что обуславливает компланарность (плоскостное расположение) всей молекулы и единое электронное сопряжение всех колец (кверцетин и мирицетин), наблюдается выраженное влияние молекулы на величину дипольного потенциала. Если между атомами C_2 и C_3 имеется одинарная связь, то компланарность нарушается, следствием чего является потеря диполь-модифицирующих свойств флавоноидом (таксифолин и катехин).

2) При введении флавонолов (кверцетина и мирицетина) дипольный потенциал ДОФХ-мембран снижается сильнее, чем в случае ДОФЭ-бислоев. Подобной зависимости не наблюдается для флоретина, флорицина и биоханина А. Большое число гидроксильных групп кверцетина и мирицетина определяет их локализацию вблизи поверхности мембраны. По этой причине разница абсолютных величин уменьшения ϕ_d ДОФХ- и ДОФЭ-мембран при введении флавонолов не может быть отнесена к скачку латерального давления в гидрофобной области ДОФЭ-бислоя (рис. 1.4). На это указывает и совпадение эффектов для мембран из ДФФХ и ДОФХ, имеющих форму инвертированных конусов и цилиндров, соответственно. Благодаря компланарности и относительно большому числу -ОН-групп, кверцетин и мирицетин могут взаимодействовать с головками сразу нескольких соседних фосфолипидов [324] и, вероятно, влиять на дипольный потенциал мембраны, в основном, посредством изменения состояния гидратации мембраны (количества и(или) ориентации гидратной воды). Меньший эффект флавонолов в

отношении ДОФЭ-мембран может быть обусловлен меньшей гидратацией этих бислоев по сравнению с ДОФХ-мембранами [243, 292]. Аналогичное объяснение можно предложить и для случая ДОФС-бислоев [207].

Более гидрофобные флоретин и биоханин А интеркалируют в бислой. Можно представить, что ориентация дипольных моментов их молекул оказывается таковой, что величина положительного потенциала внутри углеводородного кора мембраны падает (упрощенность подобного представления уже обсуждалась выше (1.2.1.3)). Независимость эффекта от вида незаряженного липида (ДФФХ, ДОФХ или ДОФЭ), а, следовательно, от скачка латерального давления в углеводородном регионе, указывает на локализацию этих флавоноидов в полярной области мембраны. Данные ЯМР-спектроскопии хорошо согласуются с этим предположением [107]. Флорицин, экспонирующий остаток сахара водному раствору, не способен значительно погружаться в область полярных головок мембранных липидов.

3) Эффективность халконов (в большей степени флоретина и в меньшей степени флорицина), а также изофлавона, биоханина А, зависит от заряда мембранообразующих липидов: максимальное изменение дипольного потенциала мембран, сформированных из незаряженных фосфолипидов (ДФФХ, ДОФХ или ДОФЭ), в несколько больше, чем максимальное $\Delta\varphi_d$ бислоев, сформированных с участием отрицательно заряженного ДОФС (ДОФС и ДОФС:ДОФЭ). Аналогичный результат был получен Лайрион и Дисальво [249] при сравнении адсорбции флоретина на монослоях из димиристоилфосфатидилхолина и димиристоилфосфатидилглицерола, характеризующихся отсутствием и наличием отрицательного заряда, соответственно. Учитывая, что все исследованные флавоноиды имеют близкие значения pK_a – от 7.3 до 7.7 [208, 261; 354, 367] и, следовательно, долю заряженных молекул при pH 7.4, наблюдаемый эффект может быть обусловлен электростатическим отталкиванием между отрицательно заряженным бислоем и отрицательно заряженной формой флавоноидов. Однако, при исследовании pH-зависимости Андерсеном с соавторами [29] было установлено, что уменьшение дипольного потенциала обусловлено адсорбцией на мембране не отрицательно заряженной, а нейтральной формы флоретина. Это дает основания считать, что более вероятной причиной наблюдаемых различий является изменение распределения латеральной компоненты давления при переходе к ДОФС-мембранам, обусловленное электростатическим отталкиванием сериновых остатков [153]. Последнее может приводить к изменению ориентации дипольных моментов флоретина и биоханина А в бислое.

4) Константа десорбции (K) обратно пропорциональна сродству флавоноида к мембране. Очевидно, что сродство флавоноидов к липидной фазе должно зависеть от их гидрофильности. Это обуславливает некоторое увеличение константы десорбции для гликозидов, флорицина, рутина и генистина, по сравнению с их агликонами, флоретином, кверцетином и генистеином. Аналогичный вывод можно сделать и для гидроксиацетофенонов: более гидрофобный ГДМАФ имеет меньшую константу десорбции по сравнению с ТГАФ.

б) Влияние флавоноидов на величину дипольного потенциала стерин-содержащих фосфолипидных бислоев

Как известно, стерины широко распространены в плазматических мембранах эукариотических клеток, в то время как мембраны прокариот их не содержат. Так, холестерин является одним из важнейших компонентов мембран эукариотических клеток и составляет 25–50 % общего мембранного липида в зависимости от типа клетки [363]. Роли Хол в метаболизме посвящены многочисленные обзоры, например, [429]. Любое значительное уменьшение его концентрации в организме может привести к серьезным проблемам со здоровьем. Например, биохимической основой синдрома Смита-Лемли-Опица является нарушение синтеза Хол, вызванное недостаточной активностью или отсутствием фермента 7-дегидрохолестерин-редуктазы, который катализирует превращение 7-дегидрохолестерина (7-ДХол) в Хол, восстанавливая двойную связь между атомами C_7 и C_8 в кольцевой системе (рис. 2.1 "Материалы и методы"). Синдром Смита-Лемли-Опица характеризуется различными симптомами, в том числе микроцефалией, умственной отсталостью, синдактилией. Тяжесть указанных симптомов коррелирует с величиной снижения концентрации холестерина [343].

Эргостерин (Эрг) является основным стеринном в мембранах грибов, а также некоторых простейших и насекомых [353]. Эрг отличается от Хол наличием двух дополнительных двойных связей, одна из которых находится в кольцевой системе между атомами C_7 и C_8 , а вторая – в боковой углеводородной цепи между атомами C_{22} и C_{23} . Боковая цепь Эрг также содержит дополнительную метильную группу в C_{24} -положении (рис. 2.1 "Материалы и методы"). К растительным стеринам, фитостеринам, относятся ситостерин, кампестерин и стигмастерин (Стигм) (рис. 2.1 "Материалы и методы"). Накопление поглощенных с пищей фитостеринов в организме, обусловленное нарушением их деградации в печени, вызывает ситостеролемию, заболевание, характеризующееся атеросклерозом и повреждением (ксантомами) сухожилий [64].

На рис. 3.5 представлены величины уменьшения дипольного потенциала сформированных с участием различных стерина ДФФХ-мембран при адсорбции флоретина. Были использованы Хол, Эрг, 7-ДХол, Стигм и 5 α -андростан-3 β -ол (Андр), стерин, не имеющий боковой углеводородной цепи и двойных связей в кольцевой системе (рис. 2.1 "Материалы и методы").

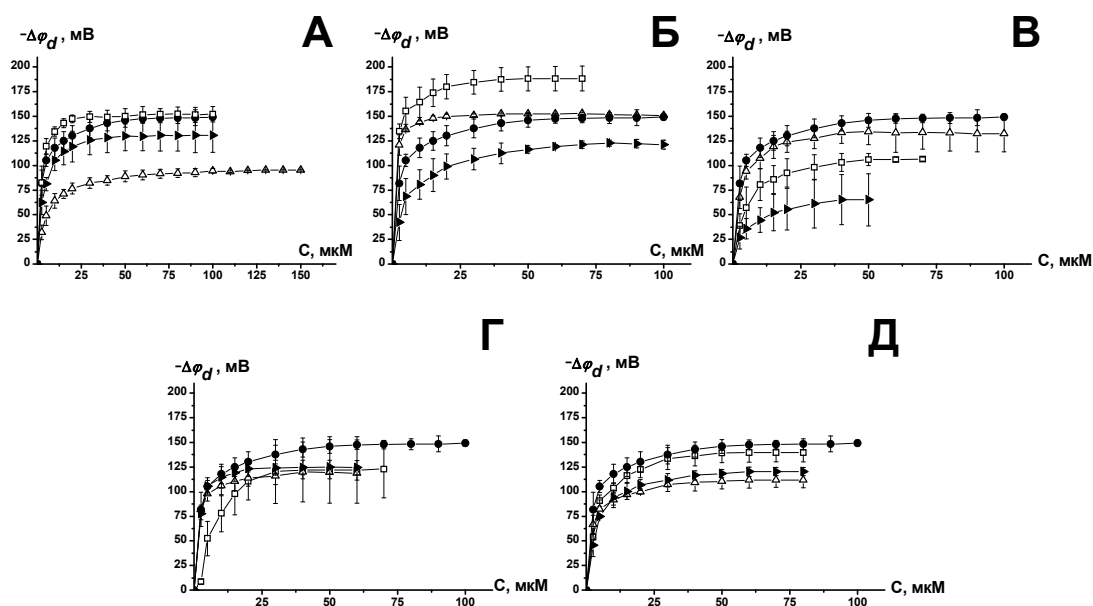


Рис. 3.5. Зависимость уменьшения дипольного потенциала мембраны ($-\Delta\varphi_d$) от концентрации флоретина (C) в околосмембранных растворах. Мембраны изготовлены из ДФФХ и содержат 0 (●), 5 (□), 33 (Δ) или 67 (▴) моль % стерина: Хол (А), Эрг (Б), 7-ДХол (В), Стигм (Г) и Андр (Д). Бислои омываются 0.1 М раствором KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Из полученных данных следует, что величина уменьшения дипольного потенциала мембраны под действием флоретина определяется видом и концентрацией стерина в мембране. На рис. 3.5 А видно, что эффективность флоретина в отношении мембран, содержащих 33 моль % Хол, заметно меньше по сравнению с ДФФХ мембранами в отсутствие стерина и бислоями, сформированными с участием 5 или 67 моль % Хол. На рис. 3.5 Б видно, что флоретин наиболее эффективен в отношении ДФФХ мембран, содержащих 5 моль % Эрг, дальнейшее увеличение концентрации стерина вызывает снижение диполь-модифицирующей способности халкона. 7-ДХол оказывает значительное влияние на снижение флоретином дипольного потенциала ДФФХ бислоев

только в концентрации 67 моль % (рис. 3.5 В). Присутствие в мембране Стигм (рис. 3.5 Г) или Андр (рис. 3.5 Д) практически не сказывается на изменении φ_d флоретином.

Изображенные на рис. 3.5 кривые удовлетворительно описываются изотермой адсорбции Ленгмюра. На это указывает линейность зависимостей $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$ от $1/C$, представленных на рис. 3.6. В Таблице 3.2 представлены характеристические параметры изотермы адсорбции Ленгмюра для стерин-содержащих мембран. Можно сделать вывод, что $-\Delta\varphi_d(\infty)$ зависит от вида мембранообразующего стерина и его концентрации. При этом сродство ($1/K$) флоретина к различным стерин-содержащим мембранам практически одинаково.

Зависимость эффективности флоретина от вида стерина может быть связана с различной способностью стеринов упорядочивать и конденсировать бислои. Можно привести несколько аргументов в пользу выдвинутого предположения. Во-первых, в соответствии с уравнением Гельмгольца дипольный потенциал мембран прямо пропорционален поверхностной плотности диполей [143, 144, 390, 404], а $\Delta\varphi_d$, вызванное адсорбцией флоретина, может зависеть от первоначального значения дипольного потенциала [107]. Во-вторых, ориентация молекул флоретина в липидном бислое, определяющая проекцию его дипольного момента на нормаль к поверхности мембраны, также может зависеть от ее механических свойств. Из литературных данных известно, что способность упорядочивать и конденсировать мембранные липиды падает в ряду Эрг, Хол, 7-ДХол [61, 103, 377]. Указанный ряд совпадает с рядом эффективности флоретина в отношении мембран, содержащих 5 моль % Эрг, Хол и 7-ДХол (Таблица 3.2).

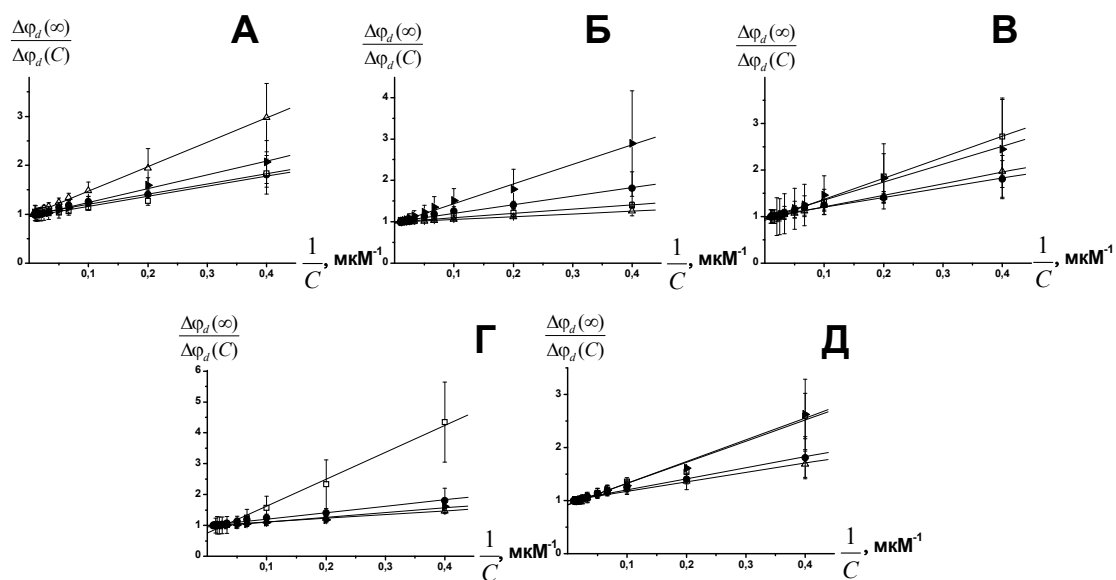


Рис. 3.6. Зависимость $\frac{\Delta\varphi_d(\infty)}{\Delta\varphi_d(C)}$ от $\frac{1}{C}$. Все условия и обозначения соответствуют указанным в подписи к рис. 3.5.

Таблица 3.2. Характеристические параметры изотермы адсорбции Ленгмюра для флоретина в различных стерин-содержащих мембранах.

концен- трация стерина, моль %	параметр	стерин				
		Хол	Эрг	7-ДХол	Стигм	Андр
0	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	147 ± 7				
	K , мкМ	2.0 ± 0.5				
5	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	152 ± 8	188 ± 12	106 ± 6	122 ± 34	140 ± 10
	K , мкМ	2.1 ± 0.4	1.1 ± 0.2	4.3 ± 1.4	7.7 ± 3.8	3.4 ± 0.5
33	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	95 ± 4	152 ± 9	133 ± 20	120 ± 7	112 ± 8
	K , мкМ	5.0 ± 0.8	0.7 ± 0.3	2.4 ± 0.6	1.2 ± 0.2	2.2 ± 0.5
67	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	129 ± 18	122 ± 5	65 ± 27	125 ± 8	120 ± 5
	K , мкМ	3.0 ± 0.7	5.2 ± 1.4	4.3 ± 2.2	1.5 ± 0.3	3.3 ± 0.1

Зависимость $-\Delta\varphi_d(\infty)$ от концентрации стерина может быть связана с латеральной организацией стерин-содержащих мембран. Фазовая диаграмма фосфолипид-стериновой смеси характеризуется сосуществованием жидкой неупорядоченной (l_d) и жидкой упорядоченной (l_o) фаз при концентрации стерина более 25 моль % [423]. Согласно Гоньи и др. [163] ПОФХ-мембраны, содержащие 5 моль % Хол, гомогенны; находятся в l_d -состоянии. При концентрации Хол 33 моль % наблюдается сосуществование жидких упорядоченной и неупорядоченной фаз ($l_d + l_o$). Преобладание одной фазы над другой зависит от концентрации Хол, и при концентрациях от 50 до 67 моль % вся мембрана переходит в l_o -состояние. Способность инициировать жидкую упорядоченную фазу зависит не только от концентрации, но и от вида мембранообразующего стерина. Эрг более эффективен, а Андр менее эффективен в этом отношении по сравнению с Хол [103, 156]. При этом считается, что предшественник Хол в биосинтетическом пути, 7-ДХол, такой способностью вообще не обладает [20]. Согласно Тараховскому и др. [419] флоретин-индуцированные изменения дипольного потенциала обусловлены формированием водородных связей между гидроксилами флавоноида и фосфатными группами липидов. Возможность их образования зависит от агрегатного состояния липида: в гель-состоянии Р = О группы липидов не доступны для молекул флоретина [124]. Последнее обуславливает различные изменения дипольного потенциала l_d и l_o фаз при адсорбции флоретина.

На рис. 3.7 представлены зависимости уменьшения дипольного потенциала мембран, изготовленных из ДФФХ:Хол (67:33 моль %) и ДФФХ:Эрг (67:33 моль %), от концентрации различных флавоноидов в омывающих мембраны растворах. Можно заметить, что флоридин, кверцетин, мирицетин, биоханин А, генистеин и ТГАФ одинаково эффективны в отношении Хол- и Эрг-обогащенных мембран. На рис. 3.8 приведены зависимости $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$ от $1/C$ для систем, представленных на рис. 3.7.

В Таблице 3.3 приведены параметры изотерм Ленгмюра для адсорбции различных флавоноидов на стерин-содержащих мембранах, являющиеся результатом обработки представленных на рис. 3.7 данных.

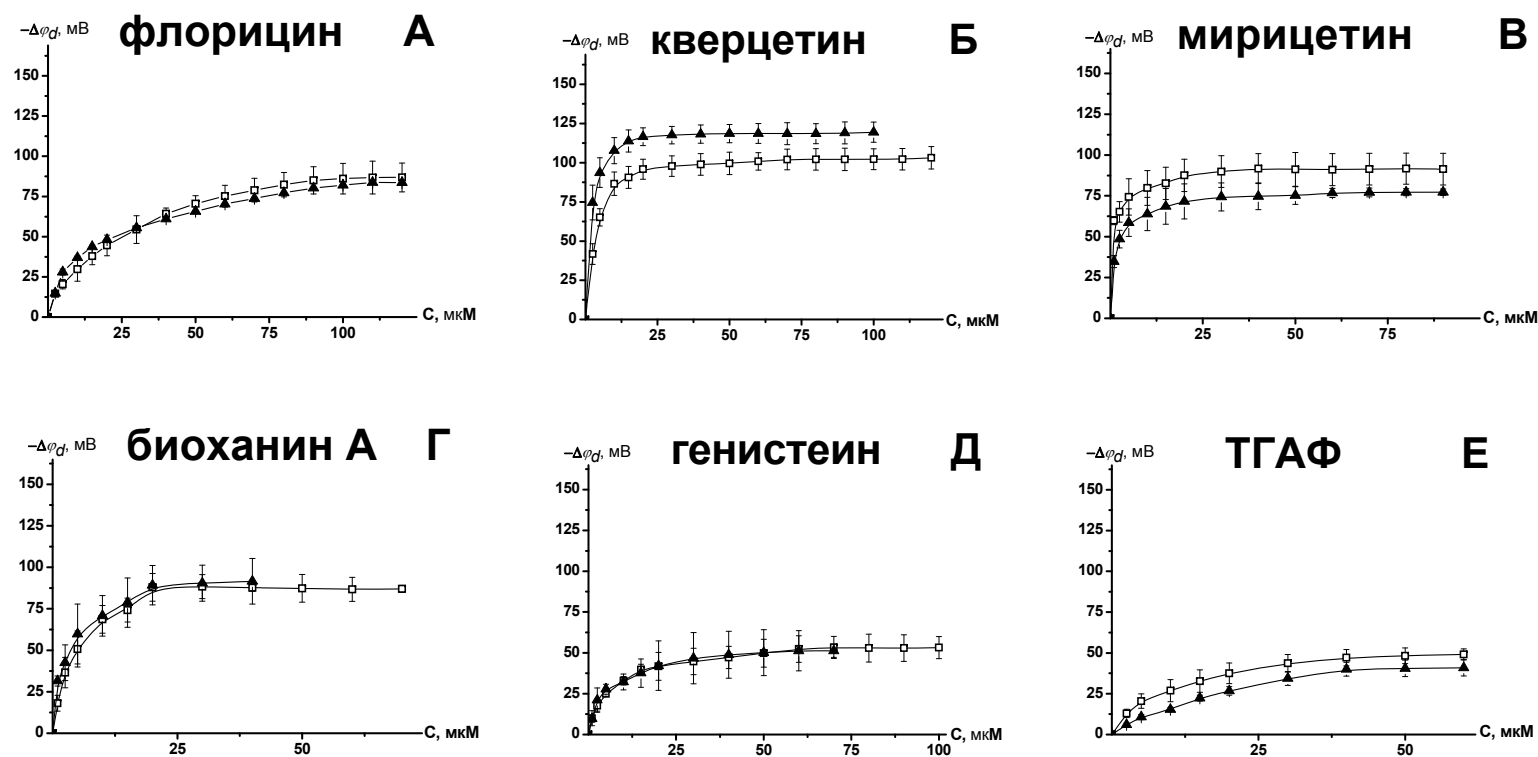


Рис. 3.7. Зависимость уменьшения дипольного потенциала мембраны ($\Delta\varphi_d$) от концентрации флорицина (А), кверцетина (Б), мирицетина (В), биоханина А (Г), генистеина (Д) и ТГАФ (Е) в околосмембранных растворах. Мембраны изготовлены из ДФФХ:Хол (67:33 моль %) (□) и ДФФХ:Эрг (67:33 моль %) (▲) в растворах 0.1 М КСl (рН 7.4). Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

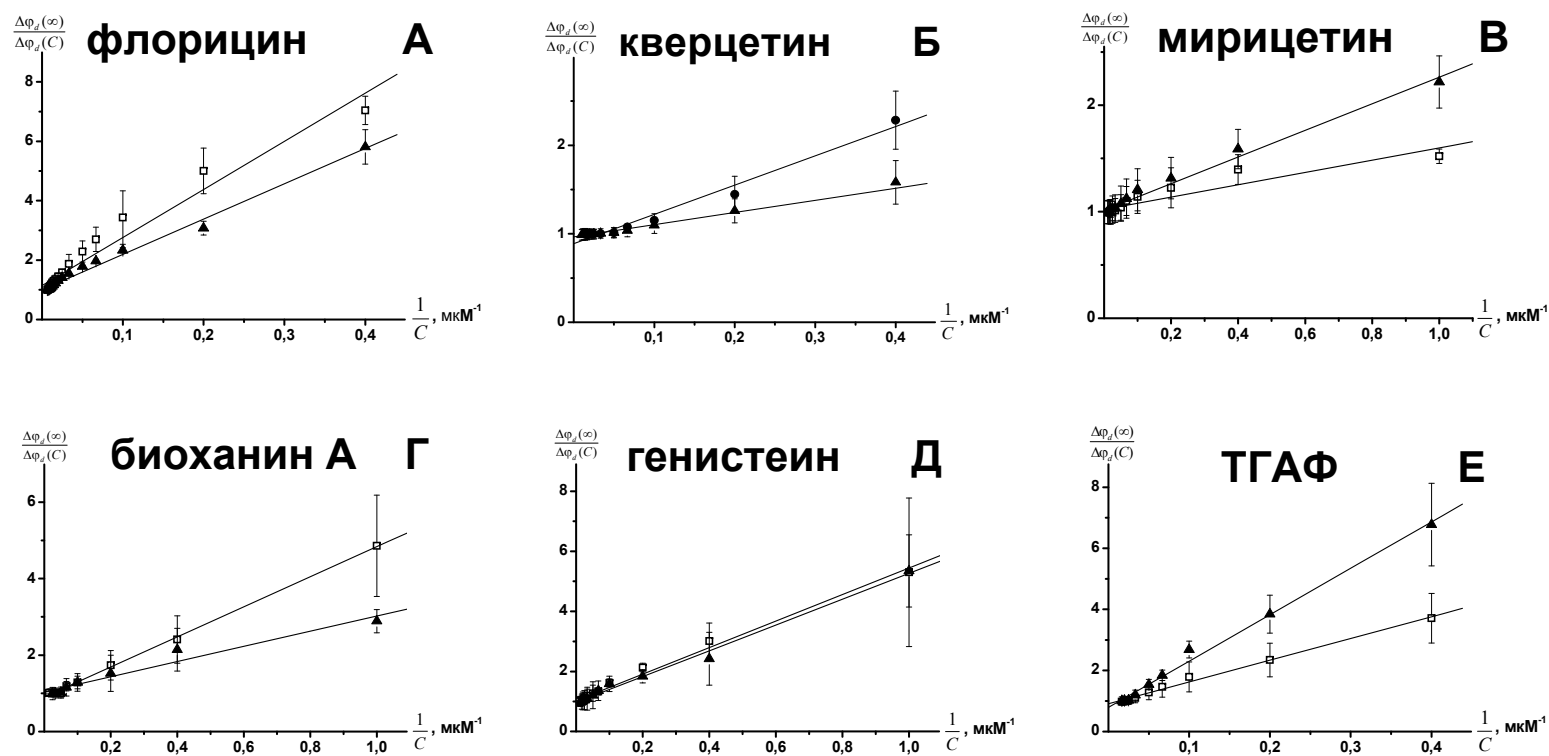


Рис. 3.8. Зависимость $\frac{\Delta\varphi_d(\infty)}{\Delta\varphi_d(C)}$ от $\frac{1}{C}$. Все условия и обозначения соответствуют указанным в подписи к рис. 3.7.

Таблица 3.3. Характеристические параметры изотермы адсорбции Ленгмюра для различных флавоноидов на ДФФХ-бислоях, содержащих 33 моль % Хол или Эрг.

состав мембраны		ДФФХ:Хол		ДФФХ:Эрг	
параметр		$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	K , мкМ	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	K , мкМ
халкон	флорицин	102 ± 9	13.3 ± 0.9	86 ± 1	11.8 ± 0.5
флавонолы	кверцетин	102 ± 7	3.6 ± 0.5	118 ± 7	1.5 ± 0.5
	мирицетин	91 ± 10	1.5 ± 0.2	77 ± 11	3.1 ± 0.5
изофлавоны	биоханин А	87 ± 9	3.9 ± 0.8	91 ± 14	2.0 ± 0.4
	генистеин	53 ± 9	4.4 ± 0.7	51 ± 12	4.3 ± 0.9
гидроксиацетофенон	ТГАФ	48 ± 5	7.1 ± 1.7	41 ± 5	15.2 ± 1.9

Сравнивая данные, приведенные в Таблицах 3.1 и 3.3, можно заметить, что флорицин, кверцетин и мирицетин практически одинаково уменьшают дипольный потенциал ДФФХ-мембран в отсутствие и в присутствии 33 мол% стерина, в то время как биоханин А и генистеин чуть менее эффективны в отношении φ_d стерин-содержащих бислоев по сравнению с ДФФХ-мембранами. Полученные результаты указывают на большее погружение изофлавонов в бислой, обеспечивающее зависимость их диполь-модифицирующих свойств от плотности упаковки липидов в мембранах, сформированным без и с участием стерина. ТГАФ более эффективен в отношении бислоев, включающих стерина, по сравнению с мембранами без стерина. На большее сродство ТГАФ к стерин-богатым бислоям указывают меньшие значения констант десорбции.

В случае мембран, включающих Хол или Эрг, константы десорбции флоридина и ТГАФ оказываются несколько выше, чем других протестированных флавоноидов. Вероятно, это обусловлено высокой гидрофильностью флоридина и ТГАФ.

в) Влияние флавоноидов на дипольный потенциал сфинголипид-содержащих фосфолипидных бислоев

Минимальным набором, используемым для имитации липидного состава клеточных мембран при формировании липидных бислоев, является тройная смесь: фосфолипид, стерин и сфинголипид. На рис. 3.9 приведены зависимости уменьшения дипольного потенциала мембран, сформированных с участием стерина (Хол или Эрг) и различных сфинголипидов, от концентрации флавоноидов (флоретина, флоридина,

кверцетина и мирицетина) в околосмембранных растворах. В этой части работы использованы сфингомиелин из мозга свиней (СМ), N-стеароил-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae* (СФС), а также синтетический сфинголипид N-стеароил-D-эритро-сфинганин (СЭС). Выбор последнего обусловлен его структурными отличиями от СФС, в частности, отсутствием гидроксильной группы в С₄-положении (рис. 2.1 "Материалы и методы"). Идковиак-Балдис и др. [200] показали, что благодаря увеличению числа водородных связей между липидами С₄-гидроксилирование сфинголипида приводит к конденсации мембраны и влияет на структурные свойства липидных микродоменов [271].

В Таблице 3.4 представлены параметры изотермы адсорбции Ленгмюра, $-\Delta\phi_d(\infty)$ и K , полученные при обработке кривых, представленных на рис. 3.10.

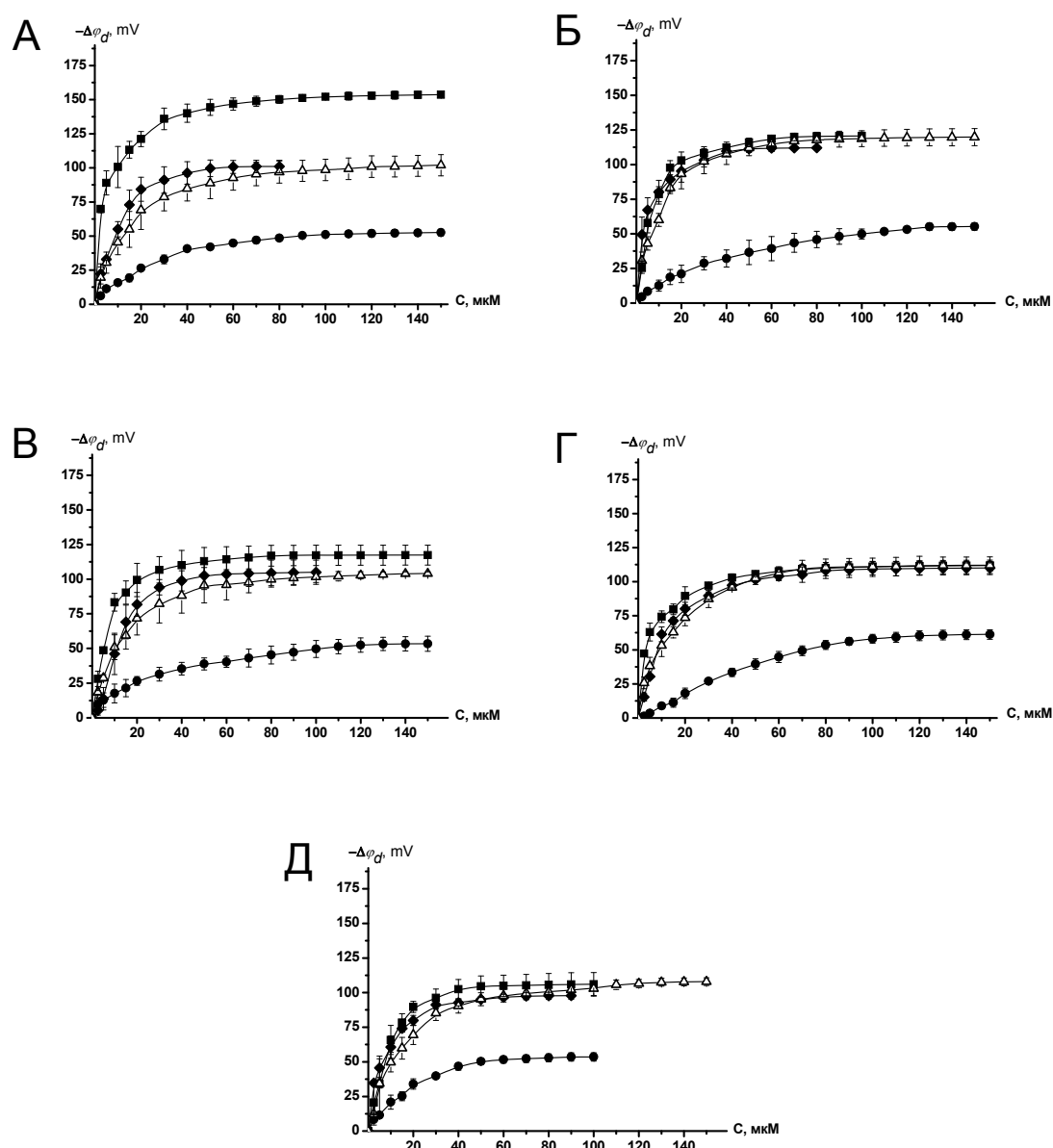


Рис. 3.9. Зависимость уменьшения дипольного потенциала ($-\Delta\varphi_d$) мембран, сформированных с участием стерина и сфинголипидов, от концентрации в мембраноомывающих растворах флоретина (■), флоритина (●), кверцетина (◆) и мирицетина (Δ). Мембраны сформированы из 40 мол % ПОФХ, 40 мол % сфинголипида и 20 мол % стерина: ПОФХ:СМ:Хол (А), ПОФХ:СМ:Эрг (Б), ПОФХ:СМ:7-ДХол (В), ПОФХ:СФС:Хол (Г), ПОФХ:СЭС:Хол (Д) и омываются 0.1 М растворами КСl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

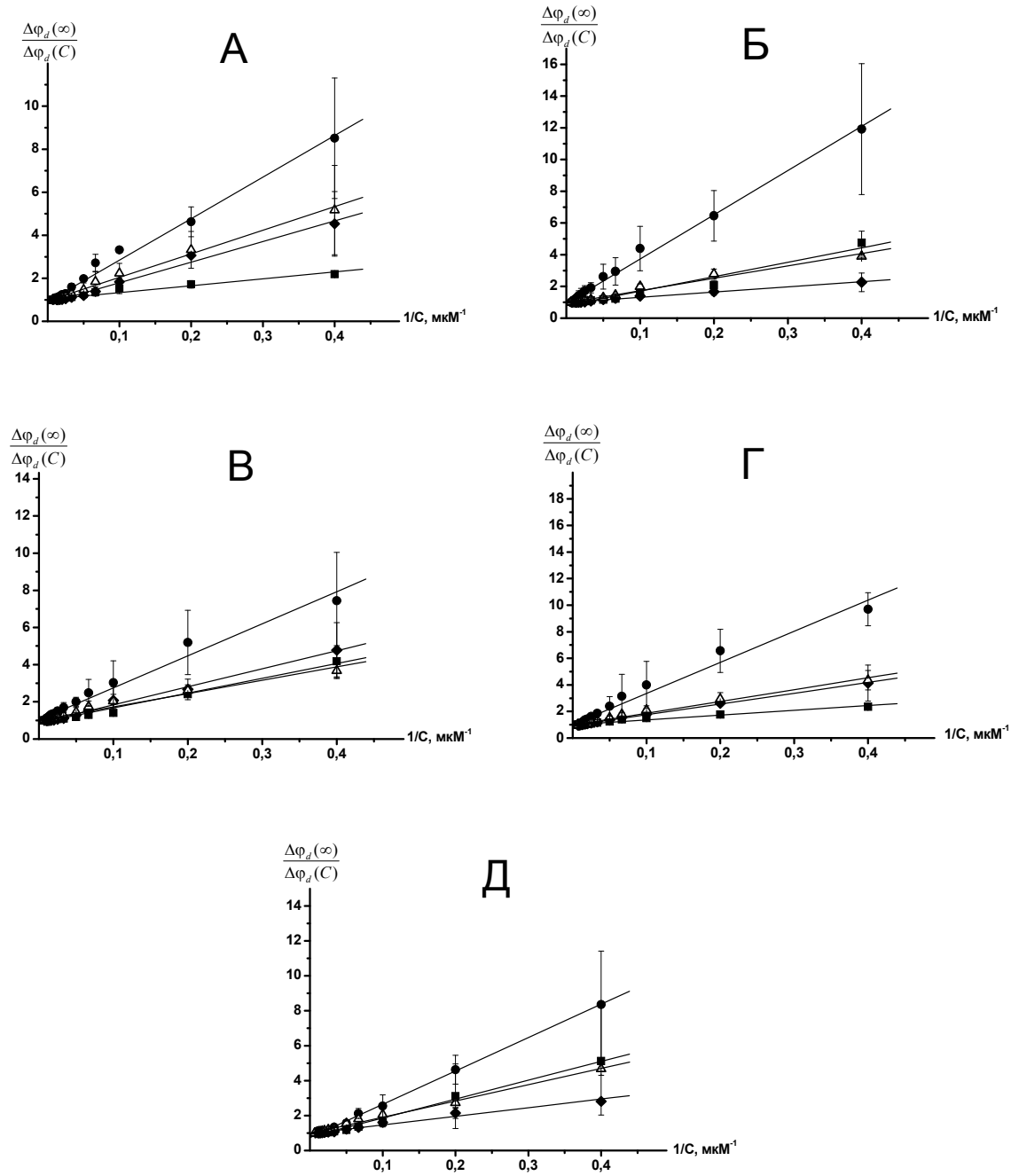


Рис. 3.10. Зависимость $\frac{\Delta\varphi_d(\infty)}{\Delta\varphi_d(C)}$ от $\frac{1}{C}$. Все условия и обозначения соответствуют указанным в подписи к рис. 3.9.

Таблица 3.4. Характеристические параметры изотермы адсорбции Ленгмюра для флавоноидов в бислоях, сформированных с участием стерина и сфинголипидов.

состав мембраны (40:40:20 моль %)	параметр	флавоноид			
		флоретин	флорицин	кверцетин	мирицетин
ПОФХ:СМ:Хол	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	154 ± 9	52 ± 5	101 ± 10	102 ± 14
	K , мкМ	3.2 ± 0.2	19.3 ± 0.5	9.5 ± 0.3	11.5 ± 1.3
ПОФХ:СМ:Эрг	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	120 ± 7	55 ± 9	112 ± 8	120 ± 10
	K , мкМ	9.1 ± 0.6	27.8 ± 0.6	3.3 ± 0.2	7.8 ± 0.3
ПОФХ:СМ:7-ДХол	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	117 ± 11	53 ± 7	105 ± 12	104 ± 13
	K , мкМ	7.9 ± 0.2	18.2 ± 0.8	9.6 ± 0.9	7.2 ± 0.4
ПОФХ:СФС:Хол	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	112 ± 7	61 ± 5	115 ± 6	112 ± 9
	K , мкМ	3.6 ± 0.2	21.2 ± 2.4	8.8 ± 0.1	8.9 ± 0.3
ПОФХ:СЭС:Хол	$-\Delta\varphi_d(\infty)$, мВ	106 ± 9	53 ± 6	100 ± 8	108 ± 8
	K , мкМ	10.8 ± 0.3	19.1 ± 0.9	4.9 ± 0.2	11.4 ± 0.2

Данные Таблицы 3.4 показывают зависимость способности флоретина уменьшать дипольный потенциал мембраны от ее стеринового и сфинголипидного состава. Этот флавоноид наиболее эффективен в отношении ПОФХ:СМ:Хол-бислоев. Замена Хол на Эрг или 7-ДХол, а также СМ на СФС или СЭС приводит к снижению диполь-модифицирующего действия флоретина. Зависимость способности флоретина уменьшать дипольный потенциал от вида мембранообразующего стерина наблюдается и в случае бинарных смесей ДФФХ с различными стеринами (Таблица 3.2). При этом диполь-модифицирующее действие кверцетина и мирицетина не определяется стеринным и сфинголипидным составом мембраны (Таблицы 3.2 и 3.4). Наблюдаемые различия связаны с разницей в механизмах действия флавоноидов на дипольный потенциал мембран. Эффекты относительно гидрофильных флавоноидов (кверцетина и мирицетина), влияющих на φ_d посредством изменения гидратации бислоя, нечувствительны к модификации механических свойств мембраны стеринами и сфинголипидами. Восприимчивость диполь-модифицирующих свойств флоретина к стерinovому и сфинголипидному составу можно объяснить влиянием этих компонентов на латеральную организацию мембраны.

Анализируя Таблицу 3.4 можно также отметить, что флорицин менее эффективно уменьшает дипольный потенциал сфинголипид-содержащих мембран по сравнению с бислоями из фосфолипидов (Таблица 3.1) или мембранами, сформированными с участием стерина (Таблица 3.3). Это может быть связано с уменьшением сродства гликозида

флоретина к сфинголипид-обогащенным бислоям: соответствующие константы десорбции оказываются выше по сравнению с однокомпонентными и бикомпонентными мембранами.

Резюмируя представленные в этом подпараграфе результаты, можно заключить, что:

1) Адсорбция на мембране халконов (флоретина и флорицина), флавонолов (кверцетина, мирицетина и рутина), а также некоторых изофлавонов (биоханина А и генистеина) приводит к падению дипольного потенциала мембран.

2) Как правило, более гидрофобные флавоноиды обладают более выраженным эффектом. Существенное значение также оказывают расположение гидрофильных заместителей в молекулах и конформация молекул модификаторов. Достаточно удаленные друг от друга гидрофильные заместители препятствует погружению молекулы флавоноида в бислой, в этом случае рассматриваемый агент на дипольный потенциал мембраны не влияет. Присутствие двойной связи в гетероцикле высокогидроксилированных агентов обеспечивает компланарность бензольных колец в их молекулах и выраженные диполь-модифицирующие свойства. Флавоноиды, не имеющие двойной связи между атомами С-2 и С-3, диполь-модифицирующим действием не обладают.

3) Полученные данные указывают на различие механизмов изменения дипольного потенциала мембраны при адсорбции халконов и изофлавонов с одной стороны и флавонолов с другой. Мы полагаем, что гидрофобные молекулы халконов и изофлавонов способны интеркалировать в полярную область мембраны и уменьшать дипольный момент за счет ориентации собственных диполей в направлении, противоположном результирующему полю до их введения. Более гидрофильные и плоские молекулы флавонолов, адсорбируясь на поверхности мембраны и образуя множество водородных связей с мембранными липидами, влияют на состояние гидратации бислоя. В первом случае диполь-модифицирующий эффект флавоноидов зависит от плотности упаковки липидных молекул и сценария фазовой сегрегации в бислое, а во-втором – от исходной гидратации мембраны.

3.1.1.2. Влияние стирилпиридиновых красителей на дипольный потенциал мембран

Для изучения роли дипольного 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 (1.2.2).

а) Влияние стирилпиридиновых красителей на дипольный потенциал фосфолипидных и стерин-содержащих бислоев

Увеличение дипольного потенциала ДФФХ-мембран прямо пропорционально концентрации стирилпиридиновых красителей в омывающих растворах в диапазоне от 0 до 15 мкМ [280]. На рис. 3.11 приведены зависимости величины увеличения дипольного потенциала стерин-содержащих бислоев от концентрации RH 160, RH 237 и RH 421 в околосмембранных растворах.

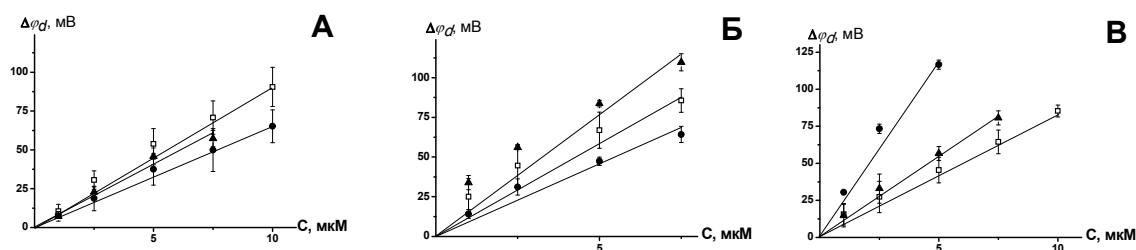


Рис. 3.11. Зависимость увеличения дипольного потенциала стерин-содержащих мембран ($\Delta\varphi_d$) от концентрации (C) в омывающих бислои растворах RH 160 (А), RH 237 (Б) и RH 421 (В). Мембраны изготовлены из ДФФХ (●), ДФФХ:Хол (67:33 моль %) (□) и ДФФХ:Эрг (67:33 моль %) (▲) и омываются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

В Таблице 3.5 представлены результаты линейаризации полученных зависимостей в соответствии с выражением $\Delta\varphi_d(C) = \beta \cdot C$, где β – константа, характеризующая диполь-модифицирующие свойства красителя.

Таблица 3.5. Коэффициент наклона (β , мВ/мкМ) линейной зависимости увеличения дипольного потенциала мембран от концентрации стирилпиридиновых красителей.

состав мембраны	стириловый краситель			
	RH 421	RH 237	RH 160	di-8-ANEPPS
ДФФХ	26.1 ± 4.2	9.2 ± 0.7	6.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1
ДФФХ:Хол (95:5 моль %)	13.2 ± 1.6	–	–	–
ДФФХ:Хол (67:33 моль %)	8.7 ± 0.9	14.6 ± 1.8	10.0 ± 0.5	–
ДФФХ:Эрг (67:33 моль %)	12.9 ± 2.2	15.4 ± 2.3	9.1 ± 0.1	–
ДОФС:ДОФЭ (50:50 мол %)	9.5 ± 0.5	18.6 ± 1.9	–	–

Результаты, представленные в Таблице 3.5, позволяют построить ряды эффективности стирилпиридиновых красителей для мембран различного состава. Способность увеличивать дипольный потенциал ДФФХ-бислоев убывает в ряду RH 421 > RH 237 > RH 160 >> di-8-ANEPPS. Отсутствие эффекта у di-8-ANEPPS, вероятно, обусловлено меньшим плечом диполя молекулы, определяемым меньшей длиной углеводородной цепочки между отрицательно заряженной сульфогруппой и положительным зарядом в пиридиновом комплексе (рис. 1.17). На ориентации и глубине погружения красителя в бислой также должна сказываться бо́льшая длина ацильных хвостов di-8-ANEPPS по сравнению с RH 421. Результаты изучения адсорбции красителей серии RH на ДФФХ-бислоях хорошо согласуются с данными Малкова и Соколова [280]. В случае стерин-содержащих мембран ряд эффективности видоизменяется: RH 237 > RH 421 $\approx$ RH 160. Можно также заметить, что способность RH 421 увеличивать дипольный потенциал уменьшается с ростом концентрации холестерина в мембране. Эффективность стирилпиридиновых красителей должна зависеть как от плоскости адсорбции, так и от ориентации в мембране. Согласно [332] глубина погружения в ДФФХ-бислой возрастает в ряду RH 160 < RH 421 < RH 237. Минимальное среди тестируемых красителей погружение RH 160 в мембрану обусловлено меньшей длиной его полиенового фрагмента по сравнению с RH 237 и меньшей длиной углеводородных «хвостов» по сравнению с RH 421 (рис. 1.17). Наибольшая эффективность RH 421 в отношении ДФФХ-мембран при промежуточной плоскости его адсорбции связана с наиболее близкой к нормали ориентацией диполя красителя в этих бислоях [332]. Вероятно, ориентация модификатора изменяется в более упорядоченных и конденсированных стерин-содержащих бислоях, что приводит к изменению ряда эффективности красителей. Наличие отрицательного заряда у молекул липида (ДОФС) также влияет на ориентацию красителей в мембране, вероятно, за счет взаимодействия с отрицательно заряженной сульфогруппой молекул RH.

б) Влияние стирловых красителей на величину дипольного потенциала сфинголипид-содержащих фосфолипидных бислоев

На рис. 3.12 приведены зависимости увеличения дипольного потенциала мембран, сформированных с участием стерина и сфинголипидов, от концентрации стирилпиридиновых красителей серии RH в омывающих растворах. Результаты линейной аппроксимации представленных на рис. 3.12 зависимостей суммированы в таблице 3.6. Можно заключить, что RH 237 более эффективен в отношении сфинголипид-содержащих мембран по сравнению с RH 421. Аналогичная зависимость наблюдается и в случае бикомпонентных стерин-содержащих бислоев (таблица 3.5).

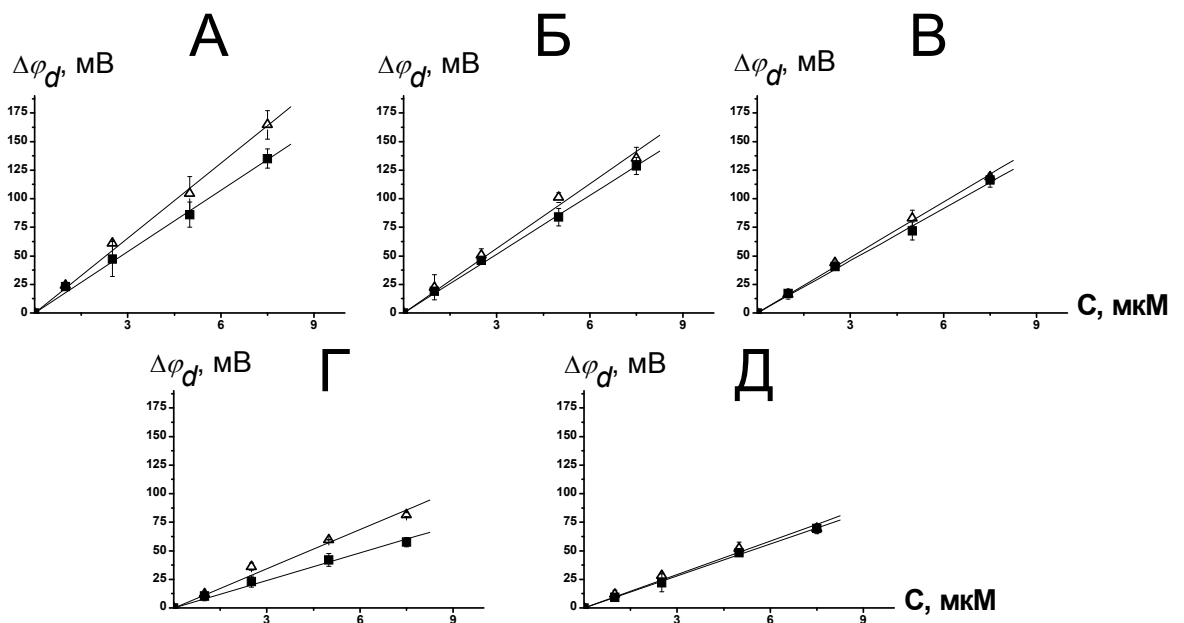


Рис. 3.12. Зависимость увеличения дипольного потенциала сфинголипид-содержащих мембран ($\Delta\varphi_d$) от концентрации (C) RH 237 (■) и RH 421 (Δ) в омывающих бислои растворах. Мембраны сформированы из 40 мол % ПОФХ, 40 мол % сфинголипида и 20 мол % стерина: ПОФХ:СМ:Хол (А), ПОФХ:СМ:Эрг (Б), ПОФХ:СМ:7-ДХол (В), ПОФХ:СФС:Хол (Г), ПОФХ:СЭС:Хол (Д) и омываются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Таблица 3.6. Коэффициент наклона (β , мВ/мкМ) линейной зависимости увеличения дипольного потенциала сфинголипид-содержащих мембран от концентрации стирилпиридиновых красителей серии RH.

состав мембраны (40:40:20 моль %)	стирилпиридиновый краситель	
	RH 421	RH 237
ПОФХ:СМ:Хол	17.9 ± 0.4	22.7 ± 2.1
ПОФХ:СМ:Эрг	17.2 ± 0.2	19.3 ± 1.1
ПОФХ:СМ:7-ДХол	15.3 ± 1.4	16.2 ± 1.0
ПОФХ:СФС:Хол	8.2 ± 0.5	10.9 ± 0.9
ПОФХ:СЭС:Хол	9.1 ± 0.2	9.8 ± 0.4

Как видно из таблицы 3.6, способность стирилпиридиновых красителей увеличивать дипольный потенциал бислоя зависит как от мембранообразующего стерина, так и от входящего в состав бислоя сфинголипида. Учитывая различный эффект тестируемых стерина и сфинголипидов на плотность упаковки липидов и формирование упорядоченных доменов в мембране (3.1.2) [20, 61, 103, 271, 377, 418], можно связывать диполь-модифицирующую способность RH красителей с их ориентацией в бислое.

Представленные в подпараграфе результаты позволяют заключить, что:

- 1) Стирилпиридиновые красители серии RH увеличивают дипольный потенциал липидных бислоев, сформированных с участием фосфолипидов, стерина и сфинголипидов.
- 2) Существует связь диполь-модифицирующей способности RH-красителей с плотностью упаковки мембранных липидов и доменной структурой мембраны.

3.1.1.3. Диполь-модифицирующая способность гормонов щитовидной железы

В подпараграфе 3.1.1.1 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 дипольный потенциал мембраны, но погружающиеся в бислой на большую глубину. Предъявляемым требованиям соответствуют тиреоидные гормоны (1.2.3) [205,335,432]. В работе определены количественные характеристики

влияния тироксина и триодтиронина на дипольный потенциал различных фосфолипидных бислоев.

На рис. 3.13 показаны зависимости уменьшения дипольного потенциала ДФФХ, ДФФС и ДФФЭ бислоев от концентрации иодосодержащих гормонов щитовидной железы в омывающих растворах. Видно, что эффект не зависит ни от гормона, ни от мембранообразующего липида.

Аналогично флавоноидам, адсорбция тиреоидных гормонов на фосфолипидных мембранах удовлетворительно описывается изотермой адсорбции Ленгмюра. Об этом свидетельствует линеаризация представленных на рис. 3.14 зависимостей $\Delta\varphi_d(\infty)/\Delta\varphi_d(C)$ от $1/C$. В таблице 3.7 представлены полученные при обработке результатов значения характеристических параметров изотермы адсорбции Ленгмюра.

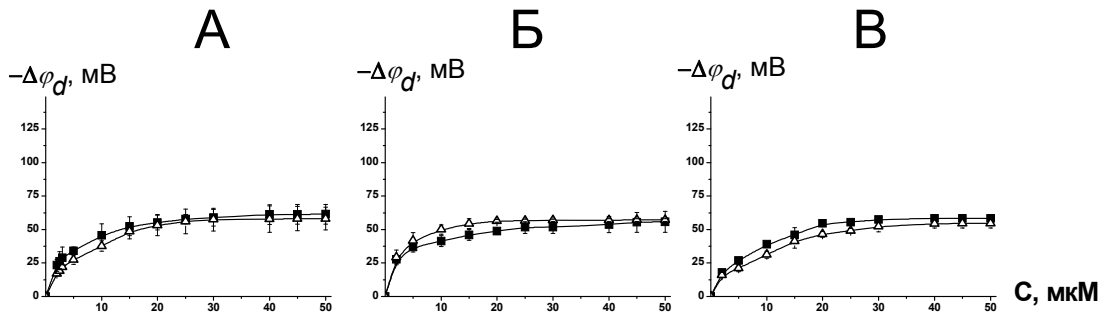


Рис. 3.13. Зависимость уменьшения дипольного потенциала фосфолипидных мембран ($-\Delta\varphi_d$) от концентрации (C) тироксина (■) и триодтиронина (Δ) в омывающих бислои растворах. Мембраны сформированы из ДФФХ (А), ДФФС (Б) и ДФФЭ (В) и омываются 0.1 М KCl растворами при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

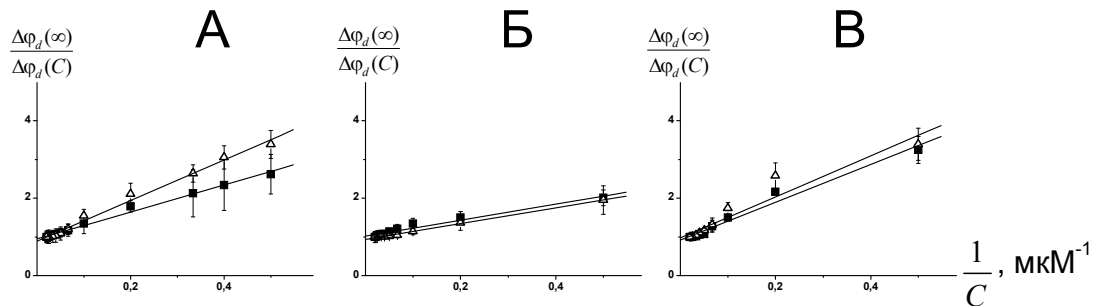


Рис. 3.14. Зависимость $\frac{\Delta\varphi_d(\infty)}{\Delta\varphi_d(C)}$ от $\frac{1}{C}$. Все условия и обозначения соответствуют указанным в подписи к рис. 3.13.

Таблица 3.7 показывает сходство диполь-модифицирующих свойств тироксина и трийодтиронина. Эффект не зависит от заряда мембранообразующих фосфолипидов. Отсутствие зависимости диполь-модифицирующей способности тиреоидных гормонов от заряда бислая указывает на то, что уменьшение дипольного потенциала мембран обусловлено сорбцией их незаряженной формы. Полученные результаты согласуются с результатами Цыбульской и др. [432]. С помощью гидрофобного аниона карбонилцианид-*n*-фтормето-кисфенилгидрозола и нонактина авторы установили одинаковое уменьшение дипольного потенциала мембран при введении в мембраноомывающие растворы тироксина и трийодтиронина. Эти результаты указывают на то, что дополнительный по сравнению с трийодтиронином атом йода в молекуле тироксина (1.3.1, рис. 2.1) мало влияет на плоскость адсорбции в мембране модификатора и его дипольный момент.

Таблица 3.7. Характеристические параметры изотермы адсорбции Ленгмюра для иодосодержащих гормонов в фосфолипидных бислоях.

иодосодержащий гормон	параметр	состав мембраны		
		ДФФХ	ДФФС	ДФФЭ
тироксин	$-\Delta\phi_d(\infty)$, мВ	61 ± 7	55 ± 7	58 ± 5
	K , мкМ	3.5 ± 0.1	2.1 ± 0.1	4.9 ± 0.3
трийодтиронин	$-\Delta\phi_d(\infty)$, мВ	58 ± 9	57 ± 5	54 ± 5
	K , мкМ	5.3 ± 0.2	2.0 ± 0.1	5.3 ± 0.5

Суммируя представленные результаты, можно резюмировать:

- 1) Тиреоидные гормоны, тироксин и трийодтиронин, обладают сходными диполь-модифицирующими свойствами.
- 2) Эффект уменьшения дипольного потенциал мембраны обусловлен сорбцией незаряженной формы гормонов.

3.1.2. Фазовое разделение в липидном бислое

Параграф написан по работам [16a, 25a, 27a *Списка основных публикаций автора*]. В параграфе систематизированы полученные автором сведения о влиянии дипольных модификаторов мембран на фазовое разделение в липидном бислое. На основании сравнения способности родственных соединений влиять на латеральную гетерогенность мембраны выявлены факторы, ответственные за эффекты дипольных модификаторов.

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 и обнаруженная несколькими группами исследователей способность флоретина, помимо снижения дипольного потенциала мембраны, также влиять на плавление ацильных цепей мембранных липидов [47,107,419]. В этой связи было высказано предположение о том, что подобным свойством обладают и другие флавоноиды, уменьшающие дипольный потенциал мембраны 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 одноламеллярных липосом, изготовленных из бинарных смесей липидов с низкой ($T_{m_ДОФХ} = -18.3 \pm 3.6$ °C) и высокой температурой плавления ($T_{m_СМ} = 37 \div 45$ °C; $T_{m_ДМФХ} = 23.6 \pm 1.5$ °C; $T_{m_ДПФХ} = 41.3 \pm 1.8$ °C), нами изучены перестройки доменной структуры мембран под действием флавоноидов.

На рис. 3.15 представлены примеры фотографий гигантских одноламеллярных липосом из ДОФХ:СМ (80:20 моль %) (А), ДОФХ:ДМФХ (50:50 моль %) (Б) и ДОФХ:ДПФХ (50:50 моль %) (В), в отсутствие (контроль) и в присутствии 400 мкМ биоханина А, флоретина или мирицетина. На рисунке видно, что независимо от липидного состава в отсутствие дипольных модификаторов липосомы содержат неокрашенные домены неправильной формы, которые могут быть отнесены к твердокристаллическому или гель-состоянию (s_0) [49, 50, 454]. Таким образом, контроль характеризуется сосуществованием жидкой неупорядоченной и твердой упорядоченной

липидных фаз (l_d+s_o). При введении флавоноидов наблюдается изменение сценария фазового разделения в липосомах.

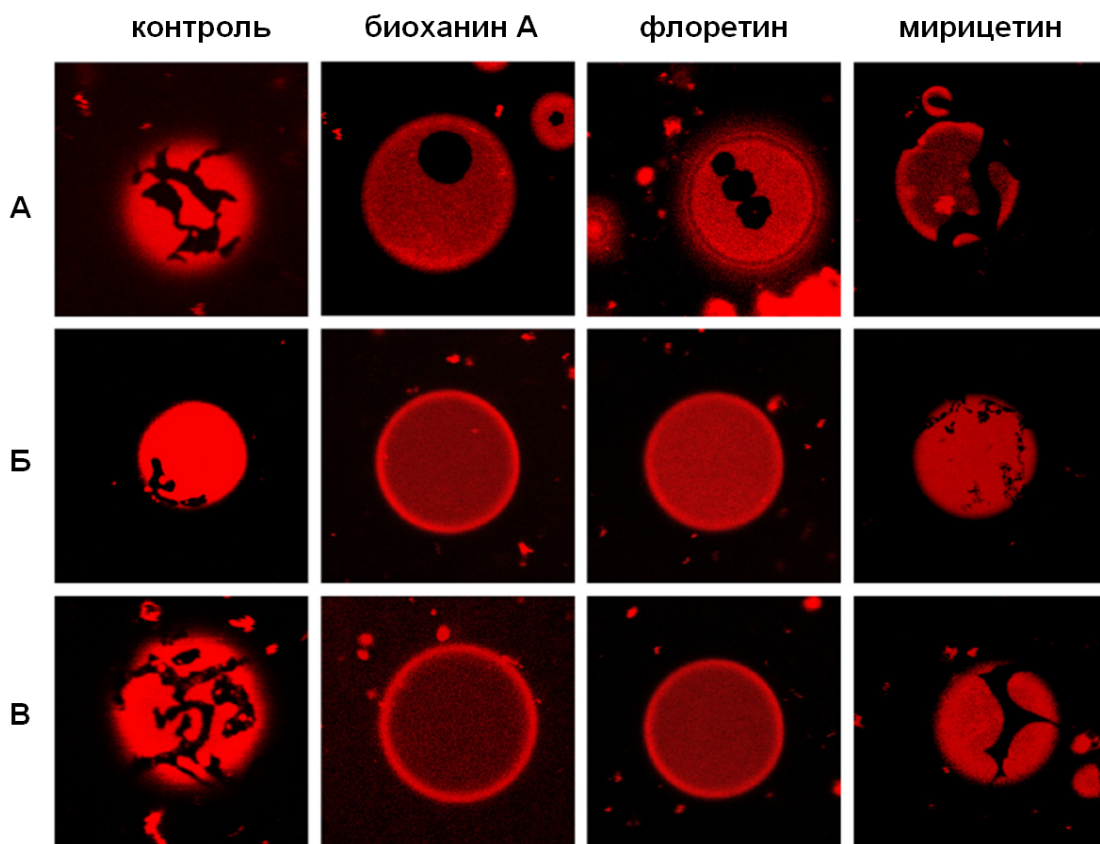


Рис. 3.15. Примеры микрофотографий гигантских одноламеллярных липосом, сформированных из смеси ДОФХ:СМ (80:20 моль %) (А), ДОФХ:ДМФХ (50:50 моль %) (Б) и ДОФХ:ДПФХ (50:50 моль %) (В), до (контроль) и после введения биохаина А, флоретина или мирицетина в омывающий раствор до концентрации 400 мкМ. Размер каждого изображения составляет 26x26 мкм.

В случае липосом из ДОФХ:СМ (80:20 моль %) (рис. 3.15 А), модифицированных 400 мкМ биохаина А или флоретина, вместо неокрашенных доменов нерегулярной формы везикулы содержат домены более правильной, близкой к круглой, формы. Такая форма доменов свидетельствует об изменении агрегатного состояния образующих их липидов. С определенной долей уверенности они могут быть отнесены к жидкому упорядоченному состоянию – липидным рафтам (l_o) [93, 117, 157, 260, 368, 453]. При этом липосомы из ДОФХ:ДМФХ (50:50 моль %) или ДОФХ:ДПФХ (50:50 моль %) в присутствии указанных флавоноидов гомогенно окрашены, что говорит об отсутствии видимого фазового разделения в бислое. Следует обратить внимание, что в независимости от липидной композиции везикул мирицетин подобными эффектами не обладает.

Статистическое описание распределения липосом во всех тестируемых системах дано в виде диаграмм (рис. 3.16). В отсутствие дипольных модификаторов около 90 %

липосом из ДОФХ:СМ (80:20 моль %) содержат твердокристаллические домены (s_o); 10 % оказываются гомогенно окрашенными (l_d); при этом везикул, включающих липидные рафты (l_o) не наблюдается. Доля гомогенно окрашенных липосом в контроле умеренно увеличена до 20-30 % в случаях везикул из смесей ДОФХ с насыщенными фосфохолинами (ДМФХ или ДПФХ). В присутствии биоханина А и флоретина процент липосом, включающих s_o -домены снижается приблизительно в 2 раза для смеси ДОФХ:СМ (80:20 моль %) и в ~4-7 раз для смесей ДОФХ:ДМФХ (50:50 моль %) и ДОФХ:ДПФХ (50:50 моль %) (рис. 3.16). При этом 40 и 10 % везикул из ДОФХ:СМ (80:20 моль %) и ДОФХ:ДПФХ (50:50 моль %), соответственно, содержат неокрашенные круглые домены, которые могут быть отнесены к l_o -подобному состоянию. Практически аналогичная ситуация наблюдается при введении флоретина. Мирицетин на фазовое поведение липидов в бислое практически не влияет. При этом флавонол существенно тушит флуоресценцию ЛР-ДПФЭ.

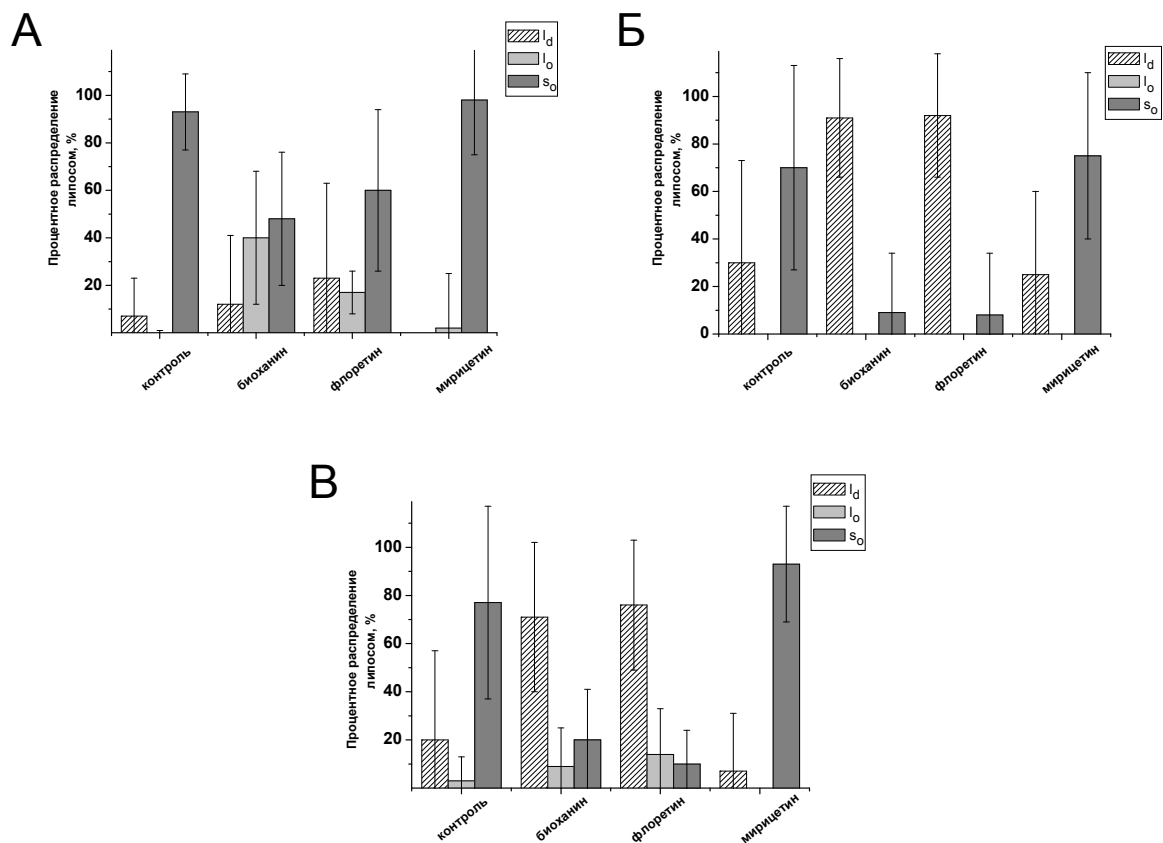


Рис. 3.16. Процентное соотношение везикул с разным типом фазового разделения, сформированных из смеси ДОФХ:СМ (80:20 моль %) (А), ДОФХ:ДМФХ (50:50 моль %) (Б) и ДОФХ:ДПФХ (50:50 моль %) (В), в отсутствие (контроль) и в присутствии 400 мкМ биоханина А, флоретина или мирицетина в омывающем растворе (слева направо).

Весоловска и др. [455] также наблюдали, что мирицетин и кверцетин интенсивно тушат флуоресценцию фосфолипидов с мечеными гидрофильными головками. Это свидетельствует о колокализации гасителя с хромофором флуоресцентной метки. Число гидроксильных групп в молекуле флавоноида определяет его относительную гидрофобность, а, следовательно, плоскость адсорбции модификатора в мембране. Поскольку мирицетин содержит 6 гидроксильных групп, в то время как биооханин А и флоретин имеют 2 и 4 ОН-группы, соответственно, можно ожидать более глубокое погружение в бислой последних по сравнению с первым. В подтверждение можно привести некоторые литературные данные. Так, Оллила с соавторами [324] продемонстрировали, что время задержки на колонке с ДПФХ для мирицетина в пять раз больше, чем для апигенина, флавоноида с 3 ОН-группами. Ядерно-магнитные исследования показали, что коэффициенты диффузии флавоноидов с малым числом гидроксильных групп близки к коэффициенту диффузии мембранообразующих липидов, в то время как модификаторы, имеющие большое число ОН-групп характеризуются коэффициентами диффузии, сходными с мембраносвязанными молекулами воды [373]. Более того, коэффициенты распределения флавоноидов между октанолом и водой обратно пропорциональны числу гидроксильных групп в составе молекул [362].

Таким образом, разжижающий эффект биооханина А и флоретина должен быть обусловлен их относительной гидрофобностью и способностью интеркалировать в бислой. По всей вероятности, адсорбция этих флавоноидов способствует увеличению свободного пространства в гидрофобной области мембраны, в результате чего плотность упаковки липидных молекул падает, а подвижность насыщенных цепей фосфолипидов возрастает (рис. 3.17). Это приводит к разжижению мембраны и разрушению твердокристаллических доменов. В подтверждение, генистеин, близкий аналог биооханина А, встраиваясь на границе между углеводородным кором и полярной частью бислоя, вызывает существенное увеличение текучести мембран [349], а акацетин, изомер биооханина А, уменьшает температуру фазового перехода ДМФХ и ДПФХ липосом [454].

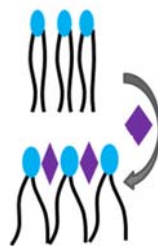


Рис. 3.17. Схематическое представление механизма разжижения бислоя под действием флоретина и биооханина А.

Следует также отметить, что введение тестируемых флавоноидов в липосомную суспензию помимо эффектов на фазовое разделение липидных бислоев вызывает образование небислоиных игольчатых или палочкообразных структур, которые могут быть отнесены к небислоиной фазе (рис. 3.18).

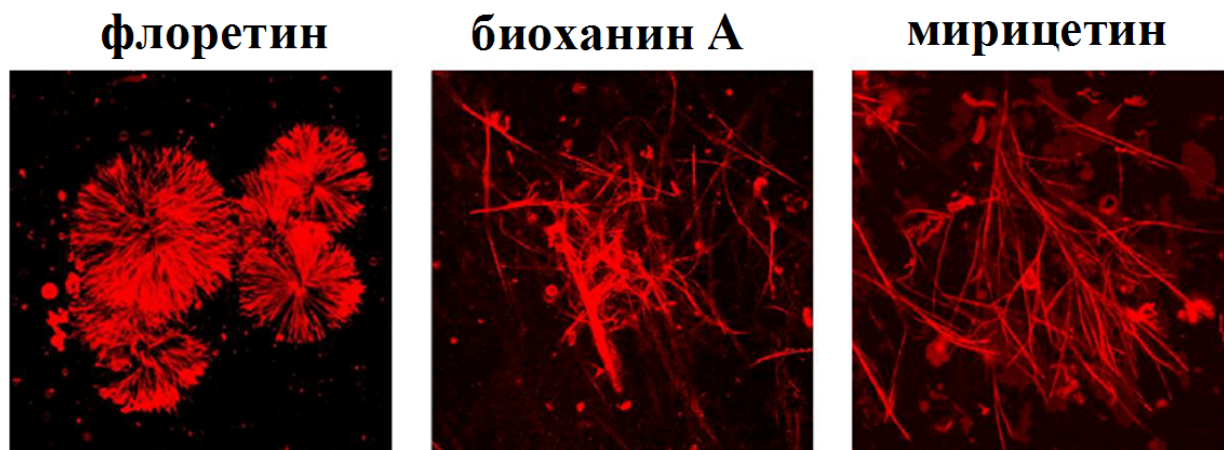


Рис. 3.18. Микрофотографии небислоиных образований в суспензии ДОФХ:ДПФХ (50:50 моль %) липосом в присутствии 400 мкМ флоретина, биоханина А и мирицетина. Размер изображений составляет 160x160 мкм.

Таким образом, представленные результаты позволяют говорить об индукции флавоноидами полиморфного фазового перехода липидов из бислоиной в гексагональную фазу. В подтверждение в присутствии флавоноидов на термограммах появляется дополнительный пик с максимумом в области более высоких температур, который может быть отнесен к плавлению небислоиной фазы [16a]. Подобный переход характерен для веществ, увеличивающих спонтанную кривизну липидных монослоев [15]. Он инициируется дисбалансом между объёмами, занимаемыми гидрофобными и гидрофильными областями мембраны [14] (рис. 3.19). Поскольку полиморфный фазовый переход наблюдается в присутствии как флоретина и биоханина, погружающихся в полярную область мембраны, так и мирицетина, адсорбирующего на ее поверхности, то можно заключить, что способ увеличения объема гидрофильной части мембраны для инициации перехода флавоноидами значения не имеет.

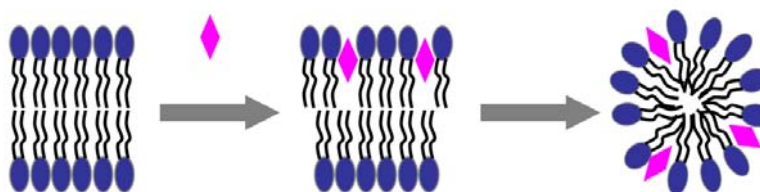


Рис. 3.19. Схематическое представление полиморфного фазового перехода в присутствии флавоноидов.

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.

На рис. 3.20 представлены примеры микрофотографий гигантских одноламеллярных липосом из ПОФХ:СМ:Хол, ПОФХ:СМ:Эрг, ПОФХ:СМ:7-ДХол, ПОФХ:СФС:Хол и ПОФХ:СЭС:Хол (40:40:20 моль %) в отсутствие каких-либо мембраноактивных соединений. Примерно 50 % ПОФХ:СМ:Хол-липосом содержат твердокристаллические домены нерегулярной формы (s_o) (рис. 3.20, первый столбец). Жидкие упорядоченные домены круглой формы (l_o) включают приблизительно 30% ПОФХ:СМ:Хол-везикул. Жидкая природа доменов круглой формы подтверждается возможностью наблюдения слияния двух или более неокрашенных круглых доменов. Оставшаяся часть – это гомогенные липосомы (l_d), не демонстрирующие микроскопического фазового разделения.

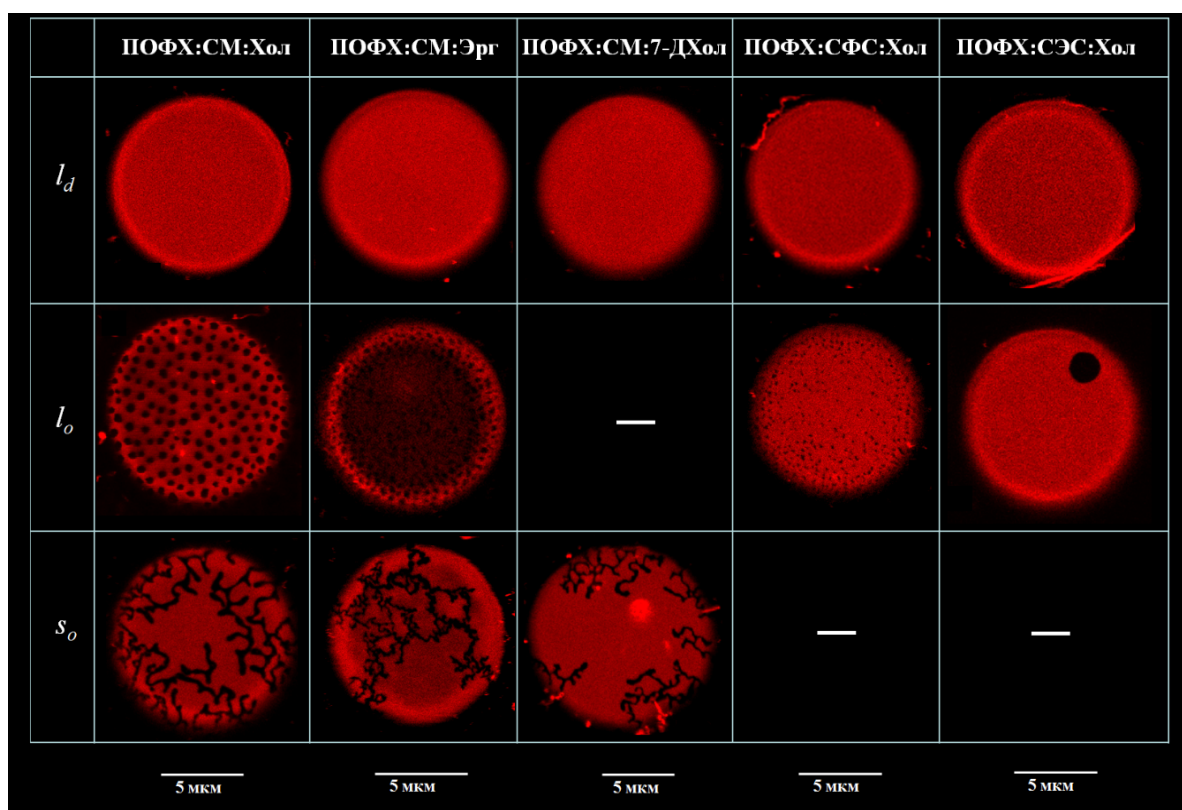


Рис. 3.20. Примеры микрофотографий гигантских одноламеллярных липосом, сформированных из смеси ПОФХ:СМ:Хол, ПОФХ:СМ:Эрг, ПОФХ:СМ:7-ДХол, ПОФХ:СФС:Хол и ПОФХ:СЭС:Хол (40:40:20 моль %) (слева направо).

Аналогичные результаты были получены для ПОФХ:СМ:Эрг-смеси (второй столбец, рис. 3.20), за исключением перераспределения вероятности наблюдения между везикулами, включающими l_o -домены (порядка 10 %), и гомогенными липосомами в пользу последних (около 40 %). ПОФХ:СМ:7-ДХол-смесь жидкой упорядоченной фазы не образует, гомогенные везикулы и липосомы, содержащие s_o -домены встречаются с равной частотой (третий столбец, рис. 3.20). Последнее наблюдение хорошо согласуется с литературными данными, свидетельствующими о том, что 7-ДХол не образует жидкой упорядоченной фазы [20].

Сценарий фазового разделения в липидном бислое сильно зависит от типа входящего в состав мембраны сфинголипида. Так, основная часть ПОФХ:СФС:Хол-везикул гомогенна окрашена и лишь незначительная часть демонстрирует сосуществование двух жидких фаз ($l_d + l_o$) (менее 10 %). Замена СФС на СЭС приводит к увеличению вероятности наблюдения липосом с l_o -доменами и изменению морфологии последних. СМ имеет два структурных отличия от СЭС: гидроксильная группа в C_1 -положении СМ этерифицирована фосфохолиновым остатком и, в отличие от дигидроцерамидов (СФС и СЭС), СМ имеет C_4 -двойную связь. Согласно литературным данным обе химические модификации могут иметь серьезные последствия для фазового разделения в сфинголипид-содержащих мембранах [74, 271, 418].

Фазовая сегрегация сфинголипид- и стерин-содержащих мембран существенно изменяется под действием дипольных модификаторов (рис. 3.21). Эффекты дипольных модификаторов определяются липидным составом мембран. В случае ПОФХ:СМ:Хол-липосом все использованные модификаторы вызывают разрушение гель-доменов (и соответствующее уменьшение числа липосом с твердокристаллическими доменами) (рис. 3.21 А). При введении флоретина, кверцетина или мирицетина увеличивается процентное содержание гомогенных липосом, а в присутствии флорицина, RH 421 и RH 237 – везикул с l_o -доменами. Флоретин, благодаря относительно высокой гидрофобности, достаточно глубоко интеркалирует в бислой, увеличивает площадь, приходящуюся на одну молекулу, что приводит к увеличению подвижности углеводородных цепей мембранообразующих липидов и разрушению твердокристаллических доменов [419]. Действие флорицина менее выражено из-за его относительно высокой гидрофильности. Влияние кверцетина и мирицетина на фазовое поведение тройных липидных смесей (рис. 3.21 А) при его отсутствии в бинарных (3.1.2.1) может быть обусловлено уменьшением сайтов связывания на поверхности стерин- и сфинголипид-обогащенных упорядоченных доменов по сравнению с твердокристаллическими областями, включающими только сфинголипиды или тугоплавкие фосфолипиды. Наличие молекул стерина в составе упорядоченных

доменов препятствует иммобилизации липидов флавонолами, наблюдающейся в бинарных смесях (3.1.2.1). Согласно [38] отталкивание между отрицательно заряженными сульфогруппами RH красителей, а также диполь-дипольное взаимодействие между их молекулами должны способствовать снижению плотности упаковки липидов в бислое.

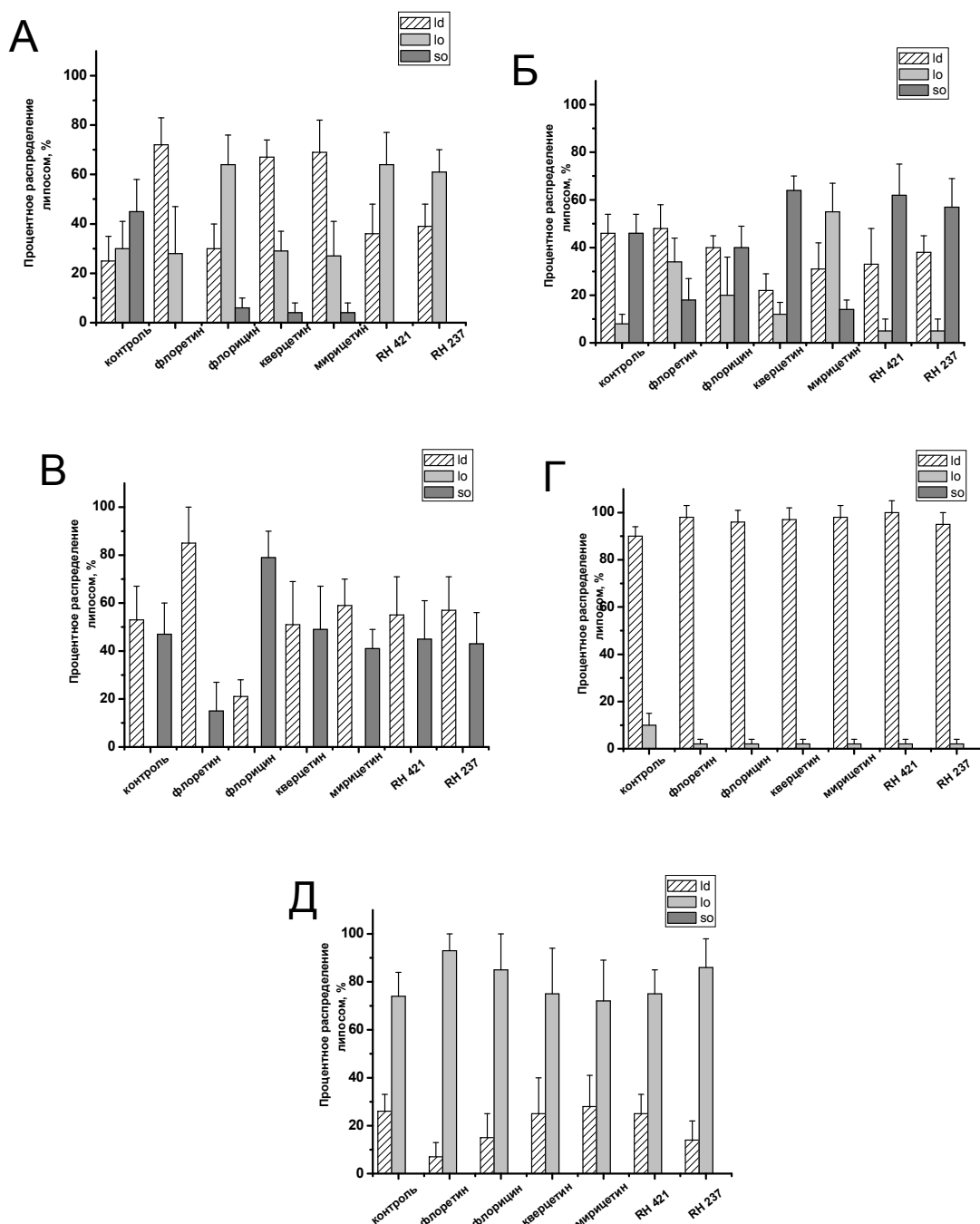


Рис. 3.21. Процентное соотношение везикул с разным типом фазового разделения, сформированных из смеси ПОФХ:СМ:Хол (А), ПОФХ:СМ:Эрг (Б), ПОФХ:СМ:7-ДХол (В), ПОФХ:СФС:Хол (Г) и ПОФХ:СЭС:Хол (Д) (40:40:20 моль %) в отсутствие (контроль) и в присутствии 400 мкМ флоретина, флорицина, кверцетина, мирицетина и 10 мкМ RH 421 и RH 237 (слева направо) в суспензии.

Замена в мембранообразующей смеси Хол на Эрг (рис. 3.21 Б) или 7-ДХол (рис. 3.21 В) приводит к потере способности тестируемых дипольных модификаторов разрушать s_o -домены. Исключение составляет только флоретин, который обладает слабым "разжижающим" действием в отношении ПОФХ:СМ:Эрг и ПОФХ:СМ:7-ДХол-бислоев. Наблюдаемое расхождение в эффектах дипольных модификаторов может быть связано с различием во взаимодействии диполь-модифицирующих агентов с компонентами твердокристаллических доменов, включающих разные стерин и сфинголипиды. Известно, что конденсирующая способность падает в ряду: Эрг > Хол > 7-ДХол [61, 103, 377]. Это может влиять на глубину погружения и ориентацию модификаторов в бислое, которые определяют их влияние как на величину дипольного потенциала мембран, так и на фазовую сегрегацию в бислое. Тестируемые дипольные модификаторы не оказывают действия на ПОФХ:СФС:Хол- (рис. 3.21 Г) и ПОФХ:СЭС:Хол-бислои (рис. 3.21 Д). Это, вероятно, связано с отсутствием твердокристаллической фазы в мембранах, состоящих из частично смешивающихся липидных компонентов.

3.1.2.3. Влияние дипольных модификаторов мембран на температуру плавления насыщенных липидов

Для подтверждения изменения сценария фазовой сегрегации в бислое при введении флавоноидов была применена дифференциальная сканирующая микрокалориметрия (2.5). На рис. 3.22 можно увидеть термограммы липосом из ДПФХ в отсутствие (контроль) и в присутствии различных флавоноидов в концентрации 70 мкМ в суспензии: флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина, даидзеина. Видно, что катехин и даидзеин практически не влияют ни на температуру главного фазового перехода ДПФХ, ни на ширину пика, по которой можно судить о кооперативности фазового перехода. Кверцетин слабо уменьшает температуру плавления ДПФХ (пик сдвигается в область меньших температур) и кооперативность перехода (пик становится более широким). В присутствии флоретина и биоханина А значительно падает температура, соответствующая максимуму на термограмме, а также снижается кооперативность перехода. Полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными (1.2.1.3). Так, в ряде работ установлено уменьшение температуры плавления ДМФХ и ДПФХ в присутствии флоретина [47, 107, 419, 434]. Исключение составляет неактивный таксифолин. По-видимому, наблюдаемое в [419] некоторое снижение T_m и увеличение $T_{1/2}$ в присутствии таксифолина обусловлены нестационарностью процесса прохождения флавоноида через систему бислоев в мультисамельных везикулах.

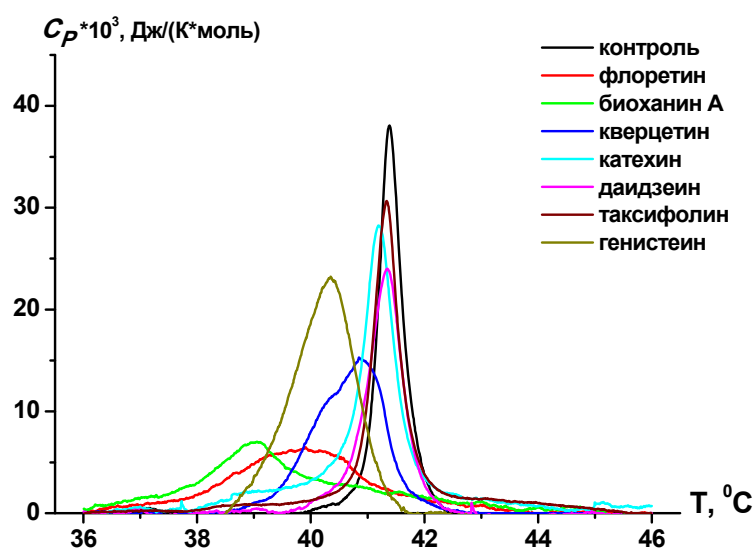


Рис. 3.22. Термограммы плавления ДПФХ от температуры в отсутствие (черная кривая) и в присутствии флоретина (красная кривая), биоханина А (зелёная кривая), кверцетина (синяя кривая), катехина (кривая цвета циан), даидзеина (фиолетовая кривая), таксифолина (бордовая кривая) и генистеина (кривая темно желтого цвета) в концентрации 70 мкМ. Отношение липид:флавоноид равно 9:1.

Таблица 3.8 демонстрирует величины температур, соответствующих максимуму на термограмме (T_m), и значения ширины пика на полувысоте, характеризующих кооперативность фазового перехода ($T_{1/2}$), (размер ячейки) ДПФХ бислоев в отсутствие и присутствии флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина.

Таблица 3.8. Температура главного фазового перехода (T_m) и полуширина пика ($T_{1/2}$) ДПФХ бислоев в отсутствие и при наличии 70 мкМ флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина.

флавоноид	T_m , °C	$T_{1/2}$, °C
контроль (ДПФХ)	41.4	0.5
флоретин	39.9	2.5
биоханин А	39.6	1.8
генистеин	40.3	1.7
кверцетин	40.8	1.4
катехин	41.2	0.6
таксифолин	41.3	0.6
даидзеин	41.4	0.7

Можно заключить, что эффекты флавоноидов обусловлены гидрофобностью их молекул. Встраиваясь в мембрану, флавоноиды увеличивают площадь, приходящуюся на липидную молекулу (рис. 3.18), подвижность углеводородных хвостов увеличивается, а температура и кооперативность главного фазового перехода падают. Чем больше гидрофобность, тем глубже молекула погружается в бислой и тем выраженнее ее влияние на фазовый переход мембранообразующих липидов. Следует отметить, что эффект определяется не только числом гидроксильных групп, но и их расположением в молекуле флавоноида, а также ее конформацией, что, скорее всего, сказывается на способности агента встраиваться в мембрану. В частности, даидзеин, имеющий две ОН-группы на противоположных концах молекулы, не может глубоко погружаться в мембрану, в отличие от биоханина А, у которого две гидроксильные группы расположены поблизости (Таблица 1.1 из 1.3.1). По всей вероятности, благодаря своей жесткой и плоской конформации молекулы кверцетина сильнее взаимодействуют с бислоем, образуя большое число водородных связей с гидрофильными головами мембранообразующих липидов, по сравнению с молекулами катехина, имеющими конформацию "кресла" (Таблица 1.1 из 1.3.1). Этот результат подтверждается отсутствием тушения флуоресценции ЛР-ДПФЭ в присутствии катехина, в отличие от кверцетина и его гидроксильного аналога мирицетина.

На рис. 3.23 представлены термограммы липосом из ДПФХ в отсутствие (контроль) и в присутствии RH 421 в различной концентрации в суспензии. Соответствующие величины T_m и $T_{1/2}$ представлены в Таблице 3.9. Можно отметить, что влияние стирилпиридиновых красителей в используемых концентрациях на фазовое поведение ДПФХ мало: с ростом концентрации RH 421 наблюдается незначительное уменьшение величины T_m и маловыраженный рост $T_{1/2}$. Некоторое падение температуры и кооперативности перехода может быть связано с пронизыванием молекулой RH 421 как полярной, так и неполярной области бислоя, а также с электростатическим отталкиванием обращенных в водную фазу отрицательно заряженных сульфо-групп красителя. Это должно приводить к увеличению площади, приходящейся на одну липидную молекулу в бислое, а, следовательно, к относительному росту подвижности ацильных хвостов липидов.

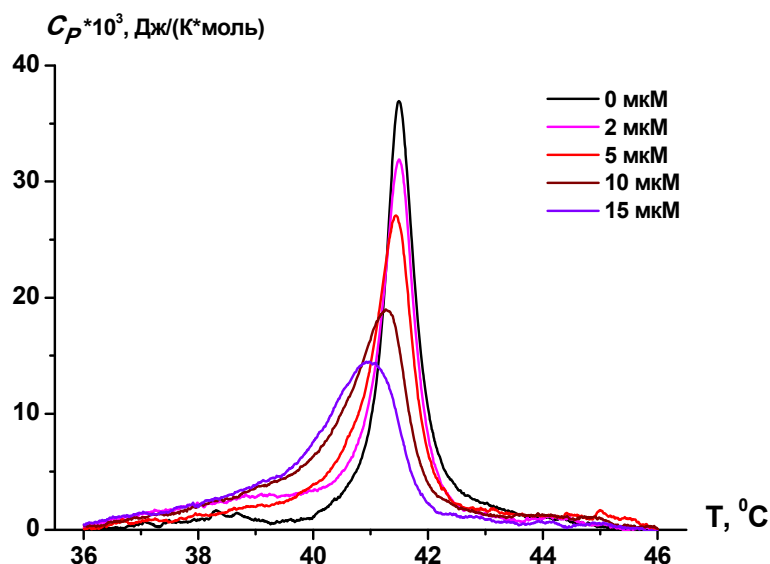


Рис. 3.23. Термограммы плавления ДПФХ от температуры в отсутствие (черная кривая) и в присутствии 2 (розовая кривая), 5 (красная кривая), 10 (бордовая кривая) и 15 мкМ RH 421 (фиолетовая кривая). Соответствующие отношения липид:стирилпиридиновый краситель равны 312:1, 125:1 62:1 и 42:1.

Таблица 3.9. Температура главного фазового перехода (T_m) и полуширина пика ($T_{1/2}$) ДПФХ-бислоев в отсутствие и в присутствии 2, 5, 10 и 15 мкМ RH 421.

концентрация RH 421	T_m , °C	$T_{1/2}$, °C
контроль (ДПФХ)	41.5	0.6
2 мкМ	41.5	0.7
5 мкМ	41.4	0.8
10 мкМ	41.3	1.1
15 мкМ	41.1	1.5

Рис. 3.24 и Таблица 3.10 позволяют сравнить эффекты трииодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) в отношении фазового перехода ДПФХ. Видно, что T_4 практически не влияет на температуру плавления насыщенного фосфохолина, наблюдается незначительное уменьшение кооперативности перехода. В отличие от T_4 , T_3 вызывает значимое снижение T_m и увеличение $T_{1/2}$. Полученные данные хорошо согласуются с результатами Иссе с соавторами [205], свидетельствующими о большей эффективности взаимодействия T_3 с липидным бислоем по сравнению с T_4 . Более выраженное влияние T_3 может быть обусловлено большей глубиной погружения этого гормона в мембрану. В подтверждение, расчет методами молекулярной динамики, проведенный [335], показывает, что T_3 глубже проникает в гидрофобную область мембраны по сравнению с

T_4 . Альварес с коллегами предположили, что различие во взаимодействии T_4 и T_3 с мембраной обусловлено специфическими конформационными изменениями молекул гормонов при их встраивании в бислои [28]. Интеркаляция T_3 в гидрофобную область мембраны должна сопровождаться увеличением объема этой области и ростом подвижности ацильных цепей.

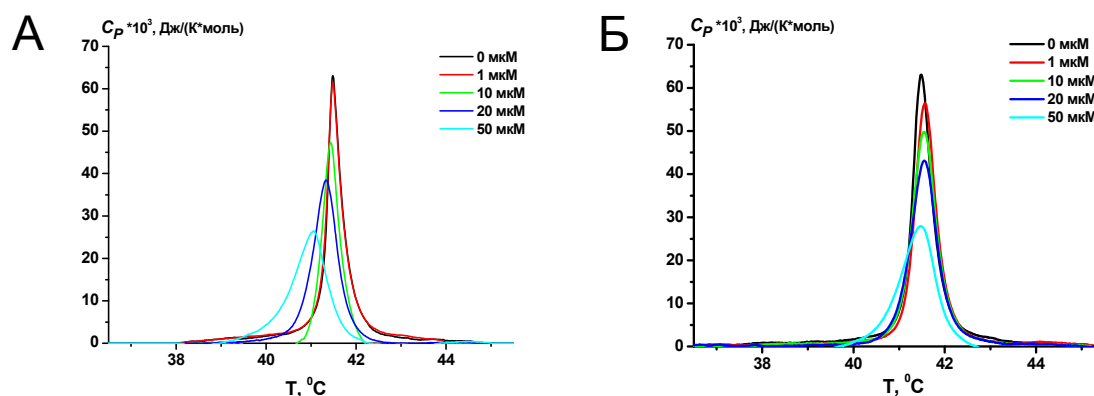


Рис. 3.24. Термограммы плавления ДПФХ от температуры от температуры в отсутствие (черная кривая) и в присутствии 1 (красная кривая), 10 (зеленая кривая), 20 (синяя кривая) и 50 мкМ (кривая цвета циан) трийодтиронина (T_3) (А) и тироксина (T_4) (Б). Соответствующие отношения липид:гормон равны 1250:1, 125:1, 63:1 и 25:1.

Таблица 3.10. Температура главного фазового перехода (T_m) и полуширина пика ($T_{1/2}$) ДПФХ-бислоев в отсутствие и в присутствии 1, 10, 20 и 50 мкМ трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4).

концентрация гормона	$T_m, ^\circ\text{C}$		$T_{1/2}, ^\circ\text{C}$	
	T_3	T_4	T_3	T_4
контроль (ДПФХ)	41.5	41.5	0.4	0.5
1 мкМ	41.5	41.5	0.5	0.6
10 мкМ	41.4	41.5	0.6	0.7
20 мкМ	41.3	41.5	0.7	0.7
50 мкМ	41.0	41.4	1.0	1.0

Резюмируя представленные в параграфах 3.1.1 и 3.1.2 результаты, можно заключить:

1) Наибольшее влияние на фазовое разделение в мембране оказывают агенты, способные глубоко интеркалировать в область гидрофильных голов мембранных липидов, флоретин и биоханин А. Увеличение площади, приходящейся на одну молекулу в бислое,

сопровождается увеличением подвижности ацильных хвостов липидов и разрушением упорядоченных доменов.

2) В результате увеличения объема гидрофильной части мембраны флоретин, биоханин А и кверцетин индуцируют полиморфный фазовый переход липидов из ламеллярной в гексагональную фазу.

3) Полученные данные согласуются с предположением о более глубоком погружении триодтиронина в гидрофобную область мембраны по сравнению с тироксином.

3.1.3. Проницаемость липидных бислоев для кальцеина

Параграф написан по работе [27а *Списка основных публикаций автора*]. В параграфе систематизированы полученные автором сведения о 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 (2.6). На рис. 3.25 представлена зависимость величины утечки флуорофора из больших одноламеллярных липосом, сформированных из ДОФХ и Хол (67:33 моль %), от концентрации различных флавоноидов.

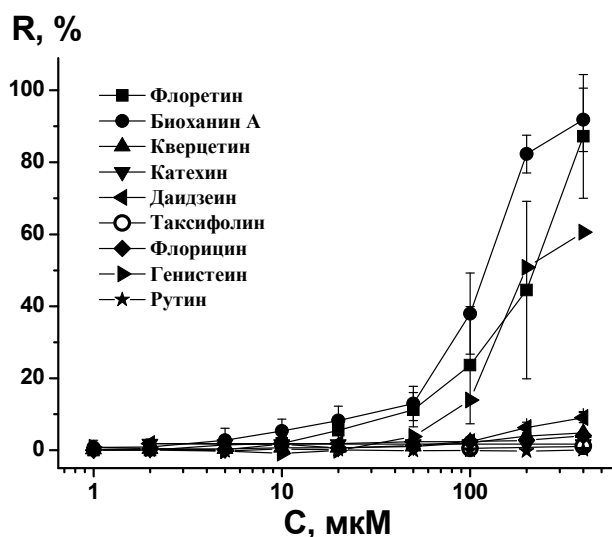


Рис. 3.25. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (R) кальцеина, вытекшего из ДОФХ:Хол (67:33 моль %)-липосом, от концентрации флоретина (■), биоханина А (●), генистеина (►), кверцетина (▲), катехина (▼), таксифолина (○), флорицина (◆), даидзеина (◄) и рутина (*).

На рис. 3.25 видно, что флоридин, кверцетин, катехин, даидзеин, рутин и таксифолин 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 флуоресцентного маркера из везикул. Концентрация, соответствующая 50% утечке для флоретина и биоханина А составляет 200 и 100 мкМ, соответственно. Максимальная утечка, обусловленная 400 мкМ генистеина, равна 60%. Очевидно, что наблюдаемые эффекты не могут быть обусловлены изменением дипольного потенциала липосом при введении флавоноидов, поскольку падение дипольного потенциала мембран при добавке флоретина, флоридина, биоханина А, генистеина, кверцетина, мирицетина и рутина (в отличие от катехина, таксифолина и даидзеина) должно было бы привести к уменьшению проницаемости мембран для отрицательно заряженного кальцеина. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами исследования влияния тестируемых флавоноидов на температуру плавления ДПФХ. На этом основании следует полагать, что эффекты флавоноидов определяются глубиной их погружения в мембраны липосом. Как уже неоднократно отмечалось, более гидрофобные агенты, флоретин, биоханин А и генистеин, способны интеркалировать в бислой. Относительно гидрофильные кверцетин, таксифолин и катехин связываются вблизи поверхности мембраны. Несмотря на относительно высокую гидрофобность даидзеина, его погружению в бислой препятствует наличие двух гидроксильных групп на противоположных концах молекулы. Погружению флоридина мешает гидрофильный остаток сахара.

Количественная оценка изменения проницаемости липосом под действием красителей стирилпиридинового ряда затруднена в виду тушения ими флуоресценции кальцеина.

Тиреоидные гормоны инициируют утечку кальцеина из ДОФХ-липосом, причем трийодтиронин обладает большей эффективностью по сравнению с тироксином (рис. 3.26). Полученные результаты согласуются с данными дифференциальной сканирующей калориметрии и, также как в случае с флавоноидами, позволяют утверждать, что наблюдаемые различия обусловлены глубиной погружения модификатора в бислой.

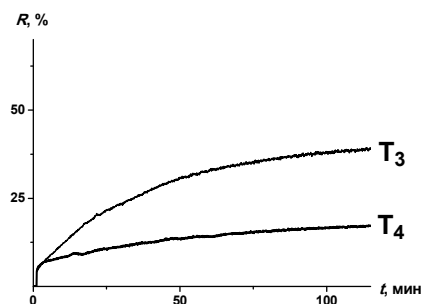


Рис. 3.26. Зависимость утечки кальцеина из ДОФХ-липосом под действием 50 мкМ триодтиронина (T₃) и тироксина (T₄) от времени.

Резюмируя представленные в подглаве 3.1 результаты, можно заключить, что:

1) Взаимозависимость изменений дипольного потенциала мембраны, ее проницаемости для кальцеина и фазового разделения в бислое наблюдается при введении модификаторов, способных интеркалировать в мембрану. Можно полагать, что причиной разупорядочивающего действия модификаторов такого рода является взаимное отталкивание перпендикулярных к поверхности мембраны компонент дипольных моментов их молекул. Низкомолекулярные амфифилы, связывающиеся вблизи границы раздела фаз, изменяют дипольный потенциал бислоя посредством изменения адсорбции воды, и практически не влияют на механические свойства мембраны.

2) Разработаны принципы классификации флавоноидов по функциональным характеристикам взаимодействия с липидным бислоем. Можно выделить три класса соединений: а) уменьшающие дипольный потенциал мембраны и вызывающие разупорядочение липидов в бислое; б) снижающие потенциальный барьер для катионов в полярной области мембраны; в) не оказывающие непосредственного влияния на распределение электрического поля на границах мембраны и ее фазовое состояние.

3) Полученные в работе свидетельства увеличения объема гидрофильной и гидрофобной областей мембраны в присутствии флавоноидов и тиреоидных гормонов, соответственно, указывают на возможность применения этих дипольных модификаторов для модуляции распределения латеральной компоненты давления вдоль оси, перпендикулярной к плоскости бислоя.

Приведенные количественные характеристики влияния протестированных низкомолекулярных соединений на физико-химические свойства липидных бислоев являются основой для их использования в качестве инструментов для изучения роли липидного микроокружения в формировании и функционировании ионных каналов. Ниже представлены результаты исследования с помощью дипольных модификаторов мембран ионных каналов, образуемых различными экзогенными соединениями (3.2).

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, а также рассмотрены пути и перспективы использования дипольных модификаторов мембран в качестве инструментов для исследования процессов формирования и функционирования ионных каналов. 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 (1.1.1). 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 подобная зависимость 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 заряженные в физиологических условиях липопептиды, синрингомицин 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 водой внутри поры или полярными группами, образующими стенки канала. Предполагая, что увеличение молекулярной массы порообразующего соединения должно сопровождаться ослаблением влияния дипольного потенциала на энергетический барьер для проникающих через каналы ионов, проводился сравнительный анализ роли дипольного потенциала в мембранной активности коротких антимикробных пептидов и больших белковых токсинов, в частности, альфа-гемолизина золотистого стафилококка. Другим ключевым фактором регуляции каналобразующей 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 (1.1.2). 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 или углеводородного остова мембраны, будет аналогична участию липидов, склонных к образованию неламеллярных фаз.

Подробная характеристика объектов исследования приведена в 1.3. Полученные результаты имеют потенциальную практическую значимость, поскольку все протестированные соединения обладают выраженной фармакологической и/или токсической активностью.

3.2.1. Ионные каналы, формируемые сирингомицином E

Параграф написан по работам [1a-5a, 8a, 26a, 28a *Списка основных публикаций автора*] и посвящен изучению ионных каналов, образуемых сирингомицином E (СМЕ), липодепсинанопептидом, продуцируемым фитопатогенными бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (1.3.1.1). Интерес к этому объекту обусловлен положительным зарядом и заметным фунгицидным действием липопептида [114,417]. Считается, что причиной гибели грибковых клеток является образование в их мембранах ионных каналов [138].

3.2.1.1. Сирингомициновые каналы в фосфолипидных бислоях

Как уже отмечалось в разделе 1.3.1.1, сирингомициновые каналы характеризуются многоуровневой проводимостью и потенциал-чувствительностью открывания (закрывания) [17, 223, 278]. Так, 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 (рис. 3.27). Ранее было установлено, что последние являются результатом кооперативной работы сразу нескольких элементарных каналов [17, 223], но вопрос о механизме синхронизации воротных процессов до недавнего времени оставался открытым. Показано, что число кооперативно открывающихся (закрывающихся) элементарных каналов в кластере (m) является

функцией трансмембранного напряжения [10, 11, 326] (рис. 3.28). Зависимость этого процессов от трансмембранного напряжения позволяет предполагать участие заряженных и(или) дипольных групп в работе воротного механизма, обеспечивающего синхронную работу каналов.

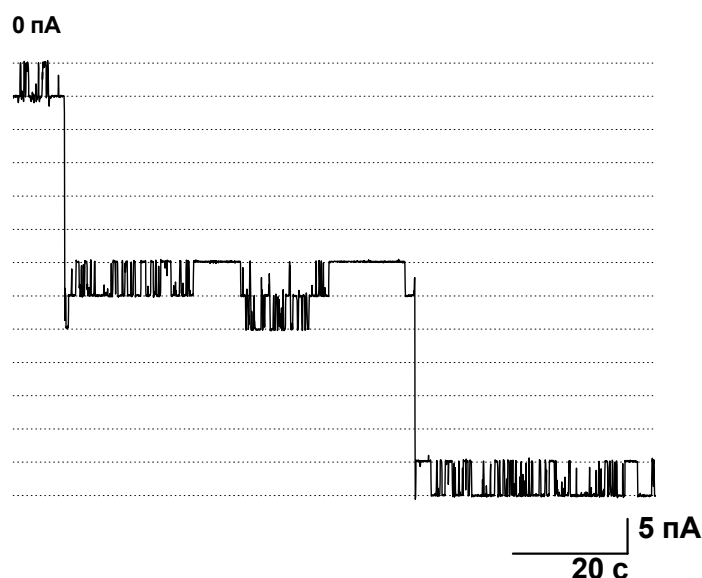


Рис. 3.27. Одиночные СМЕ-каналы: элементарные каналы и кластеры. Мембраны изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и омываются 0.1 М раствором NaCl при pH 6.0. Трансмембранная разность потенциалов составляет -100 мВ. По [326].

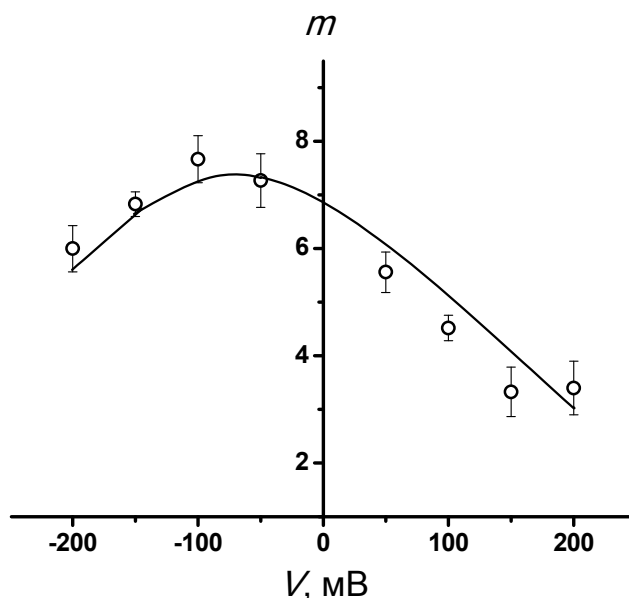


Рис. 3.28. Зависимость среднего нормированного числа синхронно функционирующих элементарных СМЕ-каналов в кластерах (m) от трансмембранного напряжения (V). Мембраны изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и омываются 0.1 М раствором NaCl при pH 6. По [326].

На этом основании было предположено, что синхронизация функционирования СМЕ-каналов в кластерах обусловлена электростатическими взаимодействиями. Для проверки высказанного предположения мы изучили отклик сирингомициновых каналов на варьирование дипольного потенциала мембран: были измерены проводимость и среднее нормированное число кооперативно работающих элементарных каналов в кластерах в присутствии дипольных модификаторов. Рис. 3.29 иллюстрирует влияние последовательного увеличения дипольного потенциала мембраны (в присутствии в мембраноомывающих растворах 20 мкМ флоретина, уменьшающего φ_d (см. 3.1.1.1), в отсутствие дипольных модификаторов и после введения 5 мкМ RH 421, увеличивающего φ_d (см. 3.1.1.2)) на проводимость элементарных СМЕ-каналов и кооперативность их функционирования в кластерах. Видно, что рост дипольного потенциала вызывает увеличение амплитуды элементарного канала и падение числа кооперативно работающих элементарных каналов в составе кластеров.

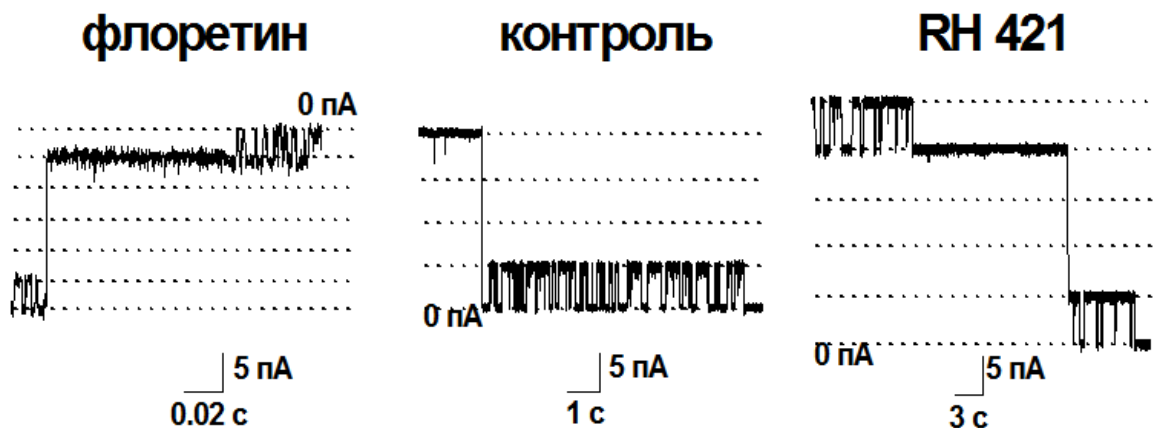


Рис. 3.29. Одиночные СМЕ-каналы в отсутствие (контроль) и в присутствии дипольных модификаторов: 20 мкМ флоретина (левая панель) или 5 мкМ RH 421 (правая панель). Мембраны изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и омываются 1 М растворами NaCl при pH 6.0. Трансmemбранное напряжение составляет 160 мВ.

Зависимости проводимости элементарных СМЕ-каналов в мембранах, модифицированных флоретином и 6-кетохолестанолом, от трансmemбранного напряжения представлены на рис. 3.30. Можно утверждать, что рост φ_d приблизительно на 100 мВ при введении 6-кетохолестанола в мембрану [405] или аналогичное снижение дипольного потенциала, вызванное добавкой в околomембранный раствор 20 мкМ флоретина, вызывает соответствующее увеличение или уменьшение проводимости СМЕ-каналов приблизительно на 20 %. На рис. 3.30 также видно, что форма кривой g от V практически не зависит от дипольного потенциала мембраны. Этот факт указывает на незначительное

изменение профиля распределения заряда вдоль оси поры при введении дипольных модификаторов.

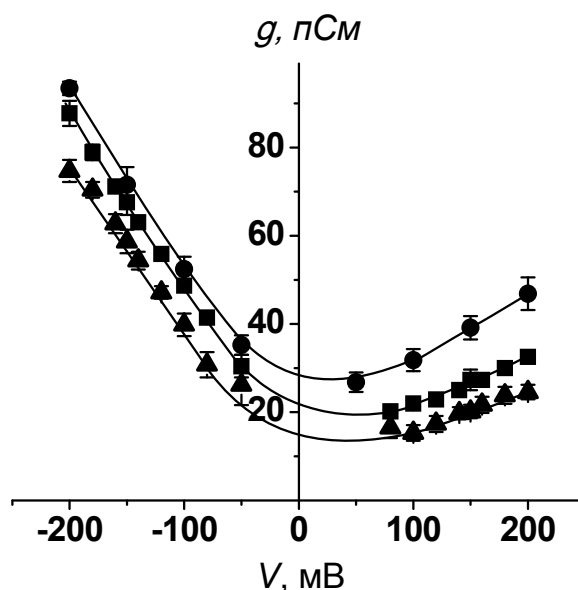


Рис. 3.30. Зависимости проводимости элементарных СМЕ-каналов (g) от трансмембранного напряжения (V) в мембранах, изготовленных из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ в отсутствие дипольных модификаторов (■) и в присутствии 20 мкМ флоретина (▲) или в бислоях, сформированных из эквимольной смеси ДОФС и 6-кетохолестанола (●). Мембраны омываются 1 М раствором NaCl при pH 6.

Учитывая преимущественно анионную селективность СМЕ-каналов (число переноса анионов $t^- = 0.9 \pm 0.02$), увеличение их проводимости при увеличении дипольного потенциала бислоя должно быть обусловлено увеличением энергетического барьера для транспорта анионов (1.1.1). Для того чтобы наглядно продемонстрировать эту связь и исключить возможность каких-либо специфических взаимодействий дипольных модификаторов с СМЕ-каналами, мы измерили проводимость СМЕ-каналов в 0.4 М растворах NaAsp или NaGlc. Замена проникающих анионов Cl^- на большие по размеру и характеризующиеся меньшей подвижностью анионы Asp^- или Glc^- сопровождается утратой анионной избирательности СМЕ-каналов. Расчет числа переноса анионов дает $t^- = 0.41 \pm 0.08$, т.е. в системах, содержащих NaAsp или NaGlc, СМЕ-каналы практически неселективны. Потеря выраженной анионной селективности пор должна привести к отсутствию эффектов дипольных модификаторов в отношении их проводимости. Из рис. 3.31 видно, что в отличие от системы, содержащей хлорид натрия (рис. 3.29), проводимость элементарных СМЕ-каналов в растворах NaAsp или NaGlc не зависит от добавки дипольных модификаторов. Эти результаты указывают на неспецифическое влияние дипольных модификаторов на проводимость СМЕ-каналов в растворах NaCl,

опосредованное изменениями дипольного потенциала мембраны и анионной избирательностью пор.



Рис. 3.31. Флуктуации проводимости, соответствующие открыванию и закрыванию элементарных СМЕ-каналов, в отсутствие (контроль) и в присутствии дипольных модификаторов, 20 мкМ флоретина (левая панель) или 5 мкМ RH 421 (правая панель), в 0.4 М растворах NaAsp (верхняя панель) или NaGlc (нижняя панель). Бислои сформированы из ДФФХ. Трансmemбранное напряжение составляет -50 мВ. Штриховые линии соответствуют нулевому уровню (0 пСм).

Зависимость натурального логарифма проводимости элементарных СМЕ-каналов, интерполированной к нулевому трансmemбранному напряжению, ($\ln(g_{V=0})$) в мембранах, омываемых 1 М растворами NaCl, от безразмерного дипольного потенциала ($e\varphi_d / kT$) показана на рис. 3.32. На основании выражения (2.8) следовало бы ожидать равенства тангенса угла наклона прямой, аппроксимирующей экспериментальную зависимость $\ln(g_{V=0})[e\varphi_d / kT]$, единице. Однако соответствующая величина равна 0.05. Этот факт позволяет предположить, что скачок дипольного потенциала в канале составляет около 5 % от дипольного потенциала бислоя. Причиной экранирования является вода, заполняющая пору и обладающая высокой диэлектрической проницаемостью. Эффективность компенсации зависит от геометрических характеристик канала: чем он шире и чем дальше от центра мембраны находится место связывания проникающего иона, тем сильнее экранирование φ_d . Проникающий через СМЕ-пору анион связывается с экспонированными в воду положительно заряженными аминокислотными остатками липопептида, которые локализованы вблизи *цис*-устья с радиусом около 0.3 нм [325]. Согласно расчетам Джордана [211] в этом случае экранирование должно составлять приблизительно 85 %, что хорошо согласуется с приведенным выше значением.

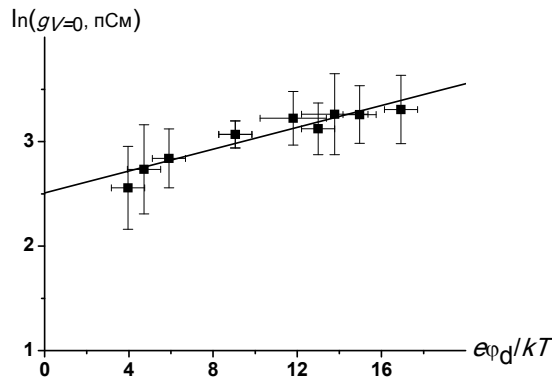


Рис. 3.32. Зависимость проводимости элементарных СМЕ-каналов, интерполированной к нулевому трансмембранному напряжению ($\ln(g_{V=0})$) от дипольного потенциала мембран (φ_D). Мембраны омываются 1 М раствором NaCl при pH 6. Величины дипольных потенциалов в отсутствие и в присутствии различных модификаторов определены на основании данных, представленных в параграфах 1.1.1. и 3.1.1.

Зависимости среднего нормированного числа кооперативно открывающихся каналов в кластерах от трансмембранного напряжения в отсутствие и в присутствии различных дипольных модификаторов показаны на рис. 3.33. Видно, что увеличение дипольного потенциала мембраны от 120 (что соответствует добавке в околосмембранные растворы 20 мкМ флоретина) до 300 мВ (что соответствует введению 5 мкМ RH 421) сопровождается уменьшением m , наблюдаемым во всем измеренном диапазоне трансмембранных напряжений (-200 ÷ 200 мВ). При этом максимальное число синхронно функционирующих каналов в кластере (m_{max}) падает от 9 до 6 единиц в 1 М растворах NaCl. Полученные результаты позволяют предположить участие диполь-дипольных взаимодействий в синхронизации воротных процессов. Сходным образом рост дипольного потенциала при введении в 6-кетохолестанола в мембрану вызывает уменьшение m_{max} от 8 до 6 единиц в 0.1 М растворах NaCl (рис. 3.33 Б). При этом величина V , при которой фиксируется максимальное число синхронно функционирующих элементарных каналов в кластерах, не изменяется. В концентрированных 1 М растворах NaCl кривые $m(V)$ независимо от величины дипольного потенциала мембраны имеют максимум при нулевом трансмембранном напряжении (рис. 3.33 А). В разбавленных растворах 0.1 М NaCl максимумы функций $m(V)$ сдвигаются примерно на 100 мВ в область отрицательных потенциалов (рис. 3.33 Б). Учитывая, что в 1 М растворах NaCl можно ожидать существенного экранирования заряда каналоформера, то асимметрия кривых $m(V)$ относительно оси ординат, наблюдаемая в 0.1 М NaCl, может быть связана с наличием заряда у молекул каналоформера и возникновением дополнительных заряд-дипольных взаимодействий.

Параллельно с увеличением g и падением m увеличение φ_d приводит к росту времени жизни элементарных СМЕ-каналов (рис. 3.34).

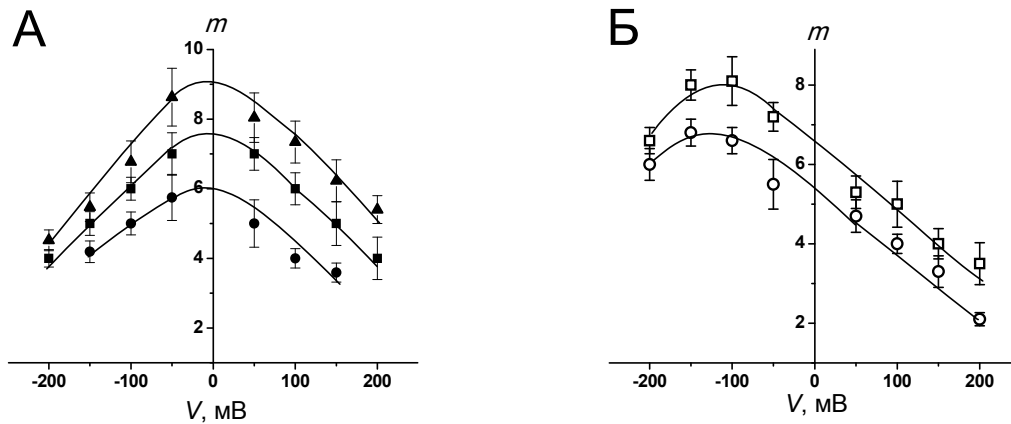


Рис. 3.33. Зависимости среднего нормированного числа кооперативно открывающихся элементарных СМЕ-каналов в кластерах (m) от трансмембранного напряжения в отсутствие и в присутствии различных дипольных модификаторов. (А) – Мембраны изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и оmyваются 1 М растворами NaCl при pH 6.0. (▲) – после введения 20 мкМ флоретина; (■) – контроль (в отсутствие дипольных модификаторов); (●) – добавка 5 мкМ RH 421; (Б) – Мембраны образованы из ДОФС:ДОФЭ (33:67 моль %) (□) и ДОФС:6-кетохолестанола (33:67 моль %) (○) и оmyваются 0.1 М растворами NaCl при pH 6.0.

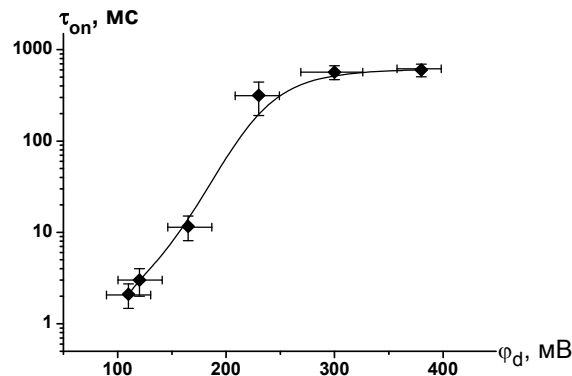


Рис. 3.34. Зависимость среднего времени жизни элементарных СМЕ-каналов (τ_{on}) от дипольного потенциала фосфолипидных бислоев (φ_d). Мембраны оmyваются 0.1 М раствором NaCl при pH 6.0. Величины дипольных потенциалов в отсутствие и в присутствии различных модификаторов определены на основании данных, представленных в параграфах 1.1.1. и 3.1.1. Трансмембранное напряжение составляет -200 мВ.

Видно, что рост дипольного потенциала мембран приблизительно на 200 мВ сопровождается увеличением времени жизни элементарных каналов на 2 порядка. Следует отметить, что изменение τ_{on} при введении модификаторов, в частности, флоретина и RH 421, не связано с их влиянием на механические свойства мембран (3.1.2 и

3.1.3). В подтверждение этого можно привести данные о совпадении времени жизни СМЕ-каналов в бислоях из липидов различной формы, ДОФХ и ДОФЭ (1.1.2). Необходимо подчеркнуть, что время жизни СМЕ-каналов определяется именно дипольным потенциалом, а не способом его модификации. Так, сходное падение дипольного потенциала мембраны (приблизительно на 100 мВ) при переходе от фосфолипидных мембран к ГМО-бислоям или при введении 20 мкМ флоретина в растворы, омывающие фосфолипидные мембраны, сопровождается идентичным падением времени жизни СМЕ каналов до 7 ± 2 мс и 5 ± 1 мс, соответственно. Таким образом, влияние φ_d на время пребывания СМЕ-каналов в открытом состоянии следует связывать с протеканием воротных процессов в области скачка потенциала.

Снижение дипольного потенциала мембраны вызывает уменьшение времени жизни как элементарных каналов, так и кластеров. Так, добавка флоретина в околосмембранные растворы до концентрации 100 мкМ приводит к падению времени жизни кластеров на три порядка. Это дает основание считать, что открывание кластеров обусловлено диполь-дипольными взаимодействиями воротных механизмов элементарных каналов.

Оказалось, что эффекты дипольного потенциала не ограничиваются модификацией характеристик одиночных СМЕ-каналов, изменяется также число открытых пор в мембране. Сравнение пороговых концентраций СМЕ, необходимых для наблюдения одиночных каналов до $C(\varphi_{d1})$ и после введения дипольных модификаторов $C(\varphi_{d2})$ показывает, что падение дипольного потенциала мембран вызывает рост каналообразующей активности СМЕ (Таблица 3.11). Так, отношение пороговых концентраций липопептида в присутствии и в отсутствие флоретина оказывается меньше единицы. В присутствии диполь-модифицирующих агентов, введение которых сопровождается ростом φ_d , 6-кетохолестанола и RH 421, соответствующее отношение составляет около 2. Стоит также отметить, что в случае мембран, омываемых 0.1 М и 1 М растворами электролита отношения $C(\varphi_{d1})/C(\varphi_{d2})$ одинаковы, несмотря на различие величин $C(\varphi_{d1})$. Этот факт еще раз подчеркивает связь наблюдаемых эффектов с неэкранируемым скачком потенциала на границе мембраны, величина которого не зависит от ионной силы околосмембранных растворов [106].

Таблица 3.11. Отношение пороговых концентраций СМЕ, соответствующих образованию одиночных каналов в мембране при $|V|^* = 100$ мВ в присутствии $C(\varphi_{d2})$ и в отсутствие дипольных модификаторов $C(\varphi_{d1})$.

состав мембранообразующего раствора, дипольный модификатор	ДОФС:ДОФЭ 20 мкМ флоретина	ДОФС:ДОФЭ 5 мкМ RH 421	ДОФС:6- кетохолестанол
$\frac{C(\varphi_{d2})}{C(\varphi_{d1})} \#$	0.2 ± 0.1	2.2 ± 0.8	2.0 ± 0.6

Мембраны оmyваются 0.1 или 1.0 М раствором NaCl (pH 6).

* см. Таблицу 3.12;

Таблица 3.12. Зависимость знака трансмембранного напряжения ($\pm V$), вызывающего открывание СМЕ каналов в ДОФС:ДОФЭ (50:50 моль %) бислоях, от присутствия дипольных модификаторов и концентрации электролита в оmyвающих мембраны растворах.

	10÷40 мкМ флоретина	без дипольных модификаторов	5÷15 мкМ RH 421 или 33÷67 моль % 6-кетохолестанола
0.1 М NaCl (pH 6)	+V	+V	-V
1 М NaCl (pH 6)	+V	-V	-V

Установленная зависимость каналообразующей активности СМЕ от дипольного потенциала мембраны указывает на связь коэффициента распределения положительно заряженного липопептида между мембраной и водным раствором со скачком потенциала на границе раздела фаз. В случае, если центр положительного заряда молекул СМЕ частично погружен в зону скачка потенциала, уменьшение φ_d вызовет увеличение коэффициента распределения липопептида в пользу бислоя и соответствующее увеличение числа каналов.

Для проверки выдвинутой гипотезы был измерен стационарный СМЕ-индуцированный трансмембранный ток до и после введения дипольных модификаторов при неизменной концентрации липопептида и постоянном трансмембранном напряжении. На рис. 3.35 представлена кинетика изменения трансмембранного тока после добавки флоретина (рис. 3.35 А) или RH 421 (рис. 3.35 Б) в околосмембранный раствор до концентрации 10 мкМ.

Из рис. 3.35 видно, что введение флоретина индуцирует более чем 20000-кратный рост стационарного тока, протекающего через модифицированную СМЕ ДОФС:ДОФЭ-мембрану, а добавка RH 421 приводит приблизительно к 30-кратному падению абсолютной величины стационарного СМЕ-индуцированного трансмембранного тока.

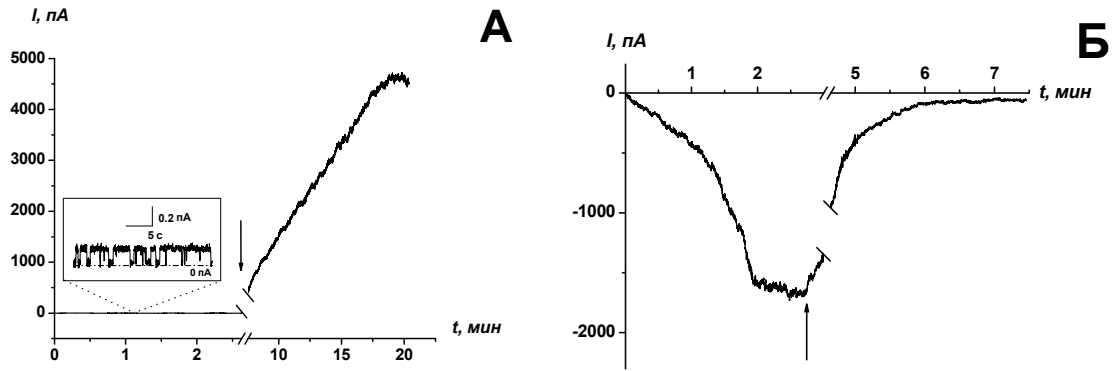


Рис. 3.35. Изменение кинетики СМЕ-индуцированного макроскопического тока после адсорбции дипольных модификаторов на мембране. Липидные бислои изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ. (А) – Стрелкой указан момент двустороннего введения 10 мкМ флоретина в омывающие мембрану 0.1 М растворы NaCl при pH 6.0, $V = 75$ мВ. (Б) – Стрелкой указан момент двусторонней добавки 10 мкМ RH 421 в омывающие бислой 1.0 М растворы NaCl при pH 6.0, $V = -50$ мВ.

С ростом дипольного потенциала ток, протекающий через одиночный элементарный СМЕ-канал, увеличивается (рис. 3.32), что не позволяет связать падение стационарного макроскопического липопептид-индуцированного тока с изменениями проводимости каналов. Следовательно, дипольный потенциал влияет на число открытых СМЕ-каналов в мембране. Можно предположить несколько причин изменения числа каналов, включая: коэффициент распределения липопептида между мембраной и водным раствором, кооперативность функционирования элементарных каналов в кластерах и эффективный воротный заряд, характеризующий потенциал-чувствительность открывания СМЕ-каналов. На основании общих соображений о работе СМЕ-каналов, нами был разработан подход для анализа вклада различных факторов в изменение каналообразующей активности липопептида при варьировании дипольного потенциала. Так, трансмембранный ток можно представить как сумму токов, протекающих через каналы с разной проводимостью:

$$I(V) = I_1(V) \sum_{i=1}^{M(V)} iN_i(V), \quad (3.1)$$

где $I_1(V)$ – ток, протекающий через элементарный канал, i – тип кластера, определяемый числом кооперативно открывающихся элементарных каналов в его составе, $N_i(V)$ – число кластеров типа i , $M(V)$ – максимальное число кооперативно открывающихся элементарных каналов в одном кластере. Тогда число открытых элементарных СМЕ-каналов, функционирующих по отдельности или в составе кластеров можно записать как:

$$N_{op}(V) = \sum_{i=1}^{M(V)} iN_i(V), \quad (3.2)$$

Учитывая, что среднее нормированное число синхронно функционирующих элементарных каналов в кластерах равно $m(V) = \sum_{i=2}^{M(V)} iN_i / \sum_{i=2}^{M(V)} N_i$, а относительно число кластеров не является функцией трансмембранного напряжения [326] и представляет собой $S = \sum_{i=2}^{M(V)} N_i / \sum_{i=1}^{M(V)} N_i$, выражение (3.2) может быть переписано в виде:

$$N_{op}(V) = N_1(V) \left[1 + \frac{m(V)S}{1-S} \right], \quad (3.3)$$

Малевым с соавторами [6] было показано, что элементарные каналы и кластеры имеют общего предшественника. В стационарных условиях ($dN_i(V, \infty)/dt = 0$) между предшественниками и элементарными каналами существует равновесие:

$$N_1(V, \infty) = K_1(V) N_p(\infty), \quad (3.4)$$

где $K_1(V)$ – константа равновесия, в общем случае являющаяся функцией трансмембранного напряжения. Объединив (3.3) и (3.4), можно записать выражение для стационарного числа открытых СМЕ-каналов:

$$N_{op}(V, \infty) = K_1(V) N_p(\infty) \left[1 + \frac{m(V)S}{1-S} \right], \quad (3.5)$$

Работа образования СМЕ-канала может быть представлена в виде [372]:

$$\Delta U = \Delta U_{str} - eqV, \quad (3.6)$$

где $\Delta U_{str}(\varphi_d)$ – химическая составляющая работы образования СМЕ-поры, которая отражает конформационные изменения, происходящие в процессе формирования водной поры; $q(\varphi_d)$ – эффективный воротный заряд СМЕ-канала, характеризующий смещение заряженных и полярных групп, образующих сенсор напряжения (воротный механизм), при потенциал-зависимом открывании поры [188, 191].

В стационарных условиях при равенстве электрохимических потенциалов предшественников и элементарных каналов:

$$\ln K_1(V) = -\frac{\Delta U}{kT}, \quad (3.7)$$

С учетом (3.5) и (3.6) последнее выражение может быть переписано в виде:

$$\ln N_{op}(V, \infty) = \ln N_p(\infty) + \ln \left[1 + \frac{m(V)S}{1-S} \right] - \frac{\Delta U_{str}}{kT} + \frac{eqV}{kT}, \quad (3.8)$$

$N_p(\infty)$ определяется концентрацией липопептида в водном растворе (C) и коэффициентом распределения мономеров СМЕ между мембраной и водной фазой. Учитывая, что ток пропорционален шестой степени C [6], уравнение (3.8) можно представить как:

$$\ln N_{op}(V, \infty) = \ln \rho' + 6 \ln C + \ln \left[1 + \frac{m(V)S}{1-S} \right] - \frac{\Delta U_{str}}{kT} + \frac{eqV}{kT}, \quad (3.9)$$

где $\rho'(\varphi_d)$ – параметр, характеризующий коэффициент распределения липопептида между липидной и водной фазами и агрегацию молекул СМЕ на поверхности мембраны.

Линейность зависимости $\ln N_{op}(V, \infty)$ от eV/kT [278] разрешает пренебречь зависимостью m от V и переписать выражение (3.9) для случая варьирования дипольного потенциала в виде:

$$\ln N_{op}(V, \infty, \varphi_d) = \ln \rho'(\varphi_d) + 6 \ln C + \ln \left[1 + \frac{m(\varphi_d)S(\varphi_d)}{1-S(\varphi_d)} \right] - \frac{\Delta U_{str}(\varphi_d)}{kT} + \frac{q(\varphi_d)eV}{kT}. \quad (3.10)$$

Выделив

потенциал-независимую

$$(A(\varphi_d) = \ln \rho'(\varphi_d) + 6 \ln C + \ln \left[1 + \frac{m(\varphi_d)S(\varphi_d)}{1-S(\varphi_d)} \right] - \frac{\Delta U_{str}(\varphi_d)}{kT}) \quad \text{и} \quad \text{потенциал-зависимую} \\ \left(\frac{q(\varphi_d)eV}{kT} \right) \text{ компоненты, из уравнения (3.10) можно получить выражение (2.5),}$$

приведенное в разделе 2.1.3.

На основании формулы (2.5) можно записать выражение для отношения стационарного числа открытых элементарных СМЕ каналов при φ_{d1} и φ_{d2} в виде:

$$\frac{N_{op}(V, \infty, \varphi_{d2})}{N_{op}(V, \infty, \varphi_{d1})} = \exp[A(\varphi_{d2}) - A(\varphi_{d1})] \exp \left\{ \frac{[|q(\varphi_{d2})| - |q(\varphi_{d1})|]e|V|}{kT} \right\} \quad (3.11)$$

Так как знак трансмембранного напряжения, открывающего СМЕ-каналы (Таблица 3.12) определяет знак эффективного воротного заряда, а уравнение (2.5) содержит произведение этих величин, то в выражении (3.11) использованы их абсолютные значения. Такая форма записи позволяет сравнить $N_{op}(V, \infty, \varphi_d)$ в любых экспериментальных системах.

На рис. 3.36 показаны зависимости $\ln N_{op}$ от безразмерного трансмембранного напряжения eV/kT для бислоев с различным дипольным потенциалом, омываемых 0.1 М (рис. 3.36 А) и 1 М (рис. 3.36 Б) растворами NaCl. Видно, что введению дипольных модификаторов соответствуют изменения как наклона прямых $\ln N_{op}(eV/kT)$, обусловленного модуляцией воротного заряда (q), так и отсекаемого отрезка по оси ординат, который определяется коэффициентом распределения липопептида между мембраной и водной фазой (ρ'), кооперативностью функционирования СМЕ-каналов (величинами m и S) и энергетической стоимостью конформационных перестроек при формировании водной поры канала (ΔU_{str}) (см. уравнение (2.6)).

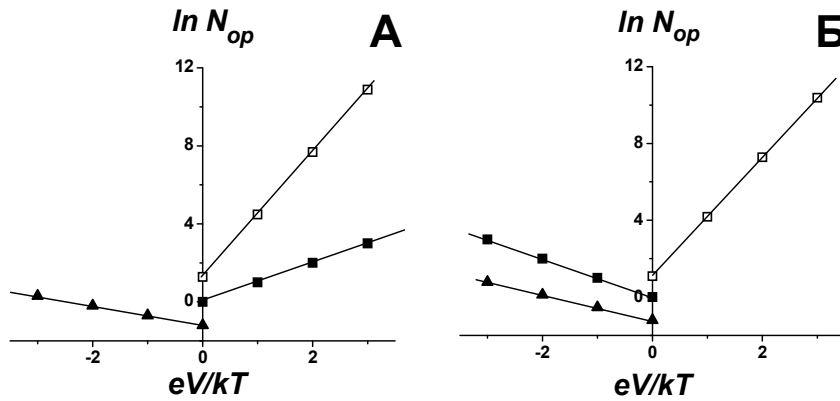


Рис. 3.36. Зависимость стационарного числа открытых СМЕ-каналов (N_{op}) от безразмерной трансмембранной разности потенциалов (eV/kT) в ДОФС:ДОФЭ-мембранах с различным дипольным потенциалом. (А) – 0.1 М NaCl при pH 6.0; (Б) – 1.0 М NaCl при pH 6.0. (□) – 20 мкМ флоретина в омывающих мембраны растворах; (■) – в отсутствие дипольных модификаторов (контроль); (▲) – 5 мкМ RH 421 в омывающих мембраны растворах.

Как уже было отмечено выше, число синхронно открывающихся СМЕ-каналов в кластерах падает с ростом φ_d (рис. 3.33). При этом относительное число кластеров в общем пуле каналов, обуславливающих проводимость, не является функцией дипольного потенциала [3а]. Расчет показывает, что вклад t в $\exp[A(\varphi_{d1}) - A(\varphi_{d2})]$ не превышает 15 %, поэтому наблюдаемые изменения $A(\varphi_d)$ обусловлены ρ' и ΔU_{str} . Независимость формы вольт-амперных характеристик одиночных СМЕ-каналов от дипольного потенциала (рис. 3.30) указывает на неизменность ΔU_{str} , позволяя говорить об изменении коэффициента распределения липопептида между мембраной и водным раствором.

Анализируя уравнение (3.11), можно заключить, что рост трансмембранного напряжения приведет к увеличению вклада потенциал-зависимой компоненты $\exp\{[|q(\varphi_{d1})| - |q(\varphi_{d2})|]eV/kT\}$. Оценка, проведенная с использованием результатов, представленных на рис. 3.36, показывает, что при $V > 100$ мВ вклад воротного заряда станет определяющим. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что движение воротных частиц СМЕ-канала происходит в области скачка дипольного потенциала.

Модель строения СМЕ-канала как асимметричной липопептид-липидной поры (1.22) подразумевает, что изменение распределения латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности мембраны также должно иметь регуляторное значение для каналообразующей активности СМЕ. Для проверки этого предположения мы измерили пороговую концентрацию, необходимую для наблюдения одиночных СМЕ-каналов, в ДОФХ и ДОФЭ-мембранах. Оказалось, что в случае бислоев, сформированных их ДОФЭ,

имеющего форму инвертированного конуса, соответствующая концентрация в 20 раз выше по сравнению с бислоями из цилиндрического ДОФХ. Полученный результат не противоречит представлениям об СМЕ-каналах как об асимметричных липопептид-липидных порах. В литературе бытует мнение, что липиды, склонные к образованию инвертированных гексагональных фаз, дестабилизируют пептид-липидные поры (1.1.2). В случае СМЕ, равновероятным объяснением может быть стабилизация подобными липидами закрытого состояния канала, соответствующего одиночным липопептидным молекулам конической формы (рис. 3.37). В результате, равновесие между исходным и конечным состоянием смещается в сторону первого. В таком случае, дипольные модификаторы, встраивающиеся в гидрофильную область бислоя, должны иметь обратный эффект и способствовать образованию СМЕ-каналов. Адсорбция флоретина сопровождается ростом числа открытых СМЕ-каналов. Этот эффект может быть обусловлен падением как дипольного потенциала, так и энергии образования липидных пор, характеризующихся положительной кривизной. Несмотря на коническую форму RH 421 (1.1.2.1), введение стирилпиридинового красителя приводит к падению СМЕ-индуцированного стационарного тока вследствие увеличения дипольного потенциала. Это свидетельствует о ключевой роли электростатических факторов в регуляции каналобразующей активности СМЕ с помощью стирилпиридиновых красителей.

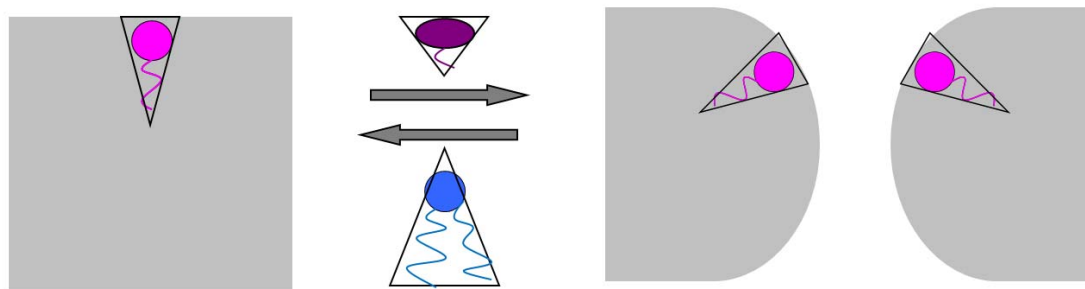


Рис. 3.37. Схематическое представление влияния дипольных модификаторов и неламеллярных липидов на равновесие между закрытым (слева) и открытым (справа) состоянием СМЕ-канала. Молекулы СМЕ показаны розовым цветом; липиды, имеющие форму инвертированных конусов и стабилизирующие начальное состояние, показаны синим цветом; молекулы дипольных модификаторов, увеличивающие объем гидрофильной области бислоя и смещающие равновесие в сторону открытого состояния, показаны фиолетовым цветом.

Результаты изучения модуляции активности липопептида тиреоидными гормонами указывают на то, что в некоторых случаях могут преобладать механические факторы. Из рис. 3.38 видно, что введение триодтиронина 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 T_3 (3.1.1.3). Причиной может быть изменение распределения латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности бислоя в результате встраивания трийодтиронина в гидрофобную область мембраны (3.1.2.3), приводящее к стабилизации закрытого состояния СМЕ-канала подобно случаю введения в состав бислоя ДОФЭ. Вероятно, в случае тироксина, глубина погружения которого в гидрофобную область мембраны меньше, чем у трийодтиронина (3.1.2.3), а диполь-модифицирующие свойства сходны с таковыми для T_3 , разнонаправленные эффекты компенсируют друг друга, и, в результате, T_4 на стационарный СМЕ-индуцированный ток не влияет.

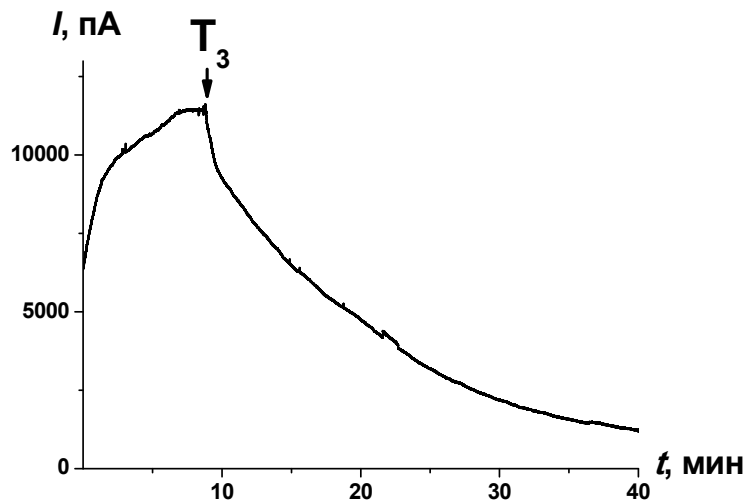


Рис. 3.38. Влияние трийодтиронина на кинетику СМЕ-индуцированного тока. Мембрана сформирована из ДФФХ и омывается 0.1 М раствором KCl при pH 7.4, $V = 10$ мВ. Стрелкой указан момент двустороннего введения трийодтиронина (T_3) в околосмембранный раствор до концентрации 50 мкМ.

3.2.1.2. *Сирингомициновые каналы в сфинголипид-содержащих мембранах*

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 стеринны. Учитывая, что мембраны указанного состава подвержены латеральной сегрегации компонентов, интерес представляло исследование влияния дипольных модификаторов на характеристики инкорпорированных в них СМЕ-каналов.

Для имитации мембран грибковых клеток в состав модельных мембран из эквимольной смеси ДОФС, ДОФЭ и эргостерина включали 20 моль % СФС или СЭС. Выбор сфинголипидов обусловлен тем, что токсичность СМЕ для клеток дрожжей зависит от наличия в составе их мембран С₄-гидроксильрованных сфинголипидов [200]. Это обусловило наш интерес к мембранам, содержащим СФС и СЭС, молекулы которых отличаются друг от друга наличием одной гидроксильной группы. Для моделирования липидного состава плазматических мембран клеток млекопитающих использовали эквимольную смесь ДОФС, ДОФЭ и холестерина, содержащую 20 моль % сфингомиелина из мозга свиней (СМ). Поскольку указанные системы отличаются как по стеринному, так и по сфинголипидному составу, для полноты картины были также протестированы смеси, включающие Эрг:СМ и Хол:СФС/СЭС.

а) одиночные СМЕ-каналы

На рис. 3.39 представлены записи функционирования одиночных элементарных СМЕ-каналов в стерин- и сфинголипид-содержащих бислоях различного состава. Видно, что проводимость каналов не зависит от типа мембранообразующего стерина и сфинголипидов.

Установлено, что вольтамперные характеристики элементарных СМЕ-каналов в липидных бислоях, сформированных с участием указанных стериннов и сфинголипидов, совпадают в пределах погрешности измерений (рис. 3.40).

В Таблице 3.13 и Таблице 3.14 резюмированы результаты измерения характеристик одиночных элементарных СМЕ-каналов в стерин- и сфинголипид-содержащих мембранах. Можно заметить незначительные отличия времени жизни СМЕ-каналов, которые, по всей вероятности, отражают различную способность стериннов и сфинголипидов влиять на плотность упаковки липидов в мембране.

Рис. 3.41 демонстрирует флуктуации тока, соответствующие открыванию и закрыванию СМЕ-каналов в ДОФС:ДОФЭ:Хол:СМ-мембранах до (рис. 3.41 Б) и после введения дипольных модификаторов, флоретина (рис. 3.41 А) и RH 421 (рис. 3.41 В). Видно, что в присутствии диполь-модифицирующих агентов наблюдаются две популяции СМЕ-каналов.

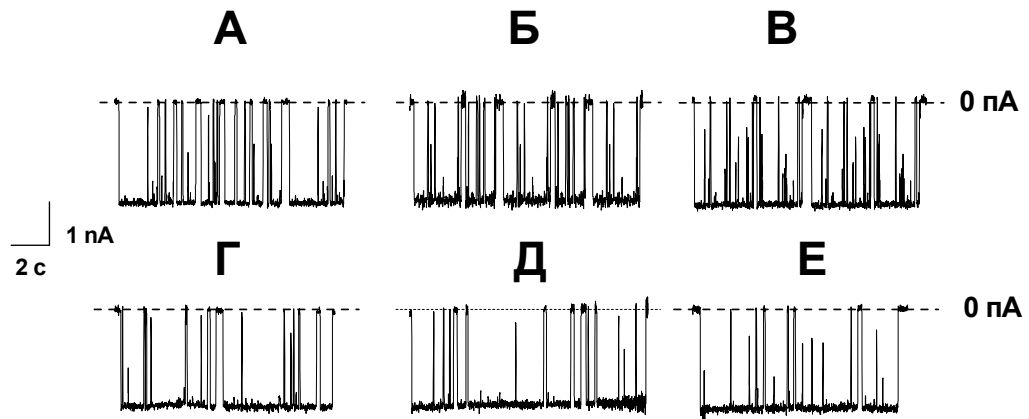


Рис. 3.39. Одиночные элементарные СМЕ-каналы в стерин- и сфинголипид-содержащих бислоях различного состава: ДОФС:ДОФЭ:Хол:СМ (А), ДОФС:ДОФЭ:Хол:СФС (Б), ДОФС:ДОФЭ:Хол:СЭС (В), ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СМ (Г), ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СФС (Д), ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СЭС (Е) в соотношении 26.7:26.7:26.7:20.0 моль %. Мембраны омываются 0.1 М КСl при рН 7.4. Трансmemбранное напряжение составляет -200 мВ. Штриховые линии соответствуют закрытому состоянию каналов (0 пА).

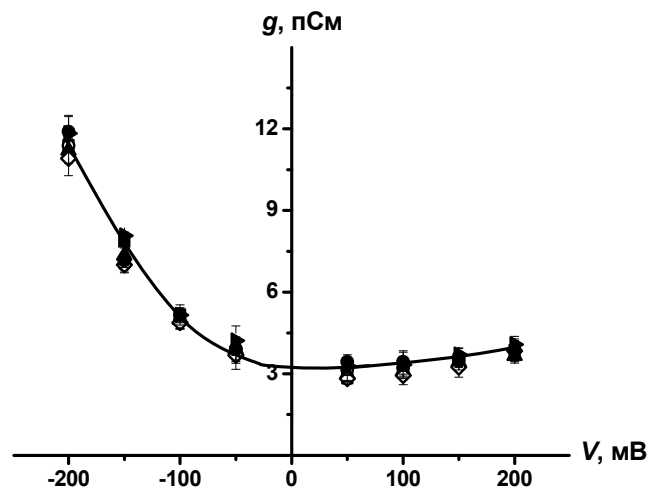


Рис. 3.40. Зависимость проводимости элементарных СМЕ-каналов в стерин- и сфинголипид-содержащих бислоях различного состава, ДОФС:ДОФЭ:Хол:СМ (■), ДОФС:ДОФЭ:Хол:СФС (▲), ДОФС:ДОФЭ:Хол:СЭС (▴), ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СМ (○), ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СФС (◇), ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СЭС (●) (26.7:26.7:26.7:20.0 моль %), от трансmemбранного напряжения. Мембраны омываются 0.1 М КСl при рН 7.4.

Таблица 3.13. Проводимость одиночных элементарных СМЕ-каналов (G , пСм) в стерин- и сфинголипид-содержащих бислоях различного состава в отсутствие и в присутствии дипольных модификаторов (20 мкМ флоретина и 5 мкМ RH 421). Соотношение ДОФС:ДОФЭ:стерин:сфинголипид составляет (26.7:26.7:26.7:20.0 моль %). Мембраны омываются 0.1 М KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение равно –200 мВ.

состав мембраны	g , пСм		
	контроль	флоретин	RH 421
ДОФС:ДОФЭ:Хол:СМ	11.39 ± 0.25	10.04 ± 0.44 11.31 ± 0.27	11.25 ± 0.27 12.98 ± 0.22
ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СМ	11.38 ± 0.54	10.07 ± 0.46 11.46 ± 0.35	11.28 ± 0.32 13.18 ± 0.21
ДОФС:ДОФЭ:Хол:СФС	11.21 ± 0.48	9.99 ± 0.58	12.89 ± 0.47
ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СФС	11.91 ± 0.64	10.33 ± 0.44	12.34 ± 0.48
ДОФС:ДОФЭ:Хол:СЭС	11.83 ± 0.62	10.09 ± 0.52	13.47 ± 0.41
ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СЭС	11.89 ± 0.60	9.96 ± 0.53	12.94 ± 0.49

Таблица 3.14. Среднее время жизни элементарных СМЕ-каналов ($\tau_{он}$, мс) в стерин- и сфинголипид-содержащих бислоях различного состава в отсутствие и в присутствии дипольных модификаторов (20 мкМ флоретина и 5 мкМ RH 421). Соотношение ДОФС:ДОФЭ:стерин:сфинголипид составляет (26.7:26.7:26.7:20.0 моль %). Мембраны омываются 0.1 М KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение равно –200 мВ.

состав мембраны	$\tau_{он}$, мс		
	контроль	флоретин	RH 421
ДОФС:ДОФЭ:Хол:СМ	254 ± 51	–	–
ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СМ	530 ± 106	–	–
ДОФС:ДОФЭ:Хол:СФС	358 ± 74	73 ± 13	286 ± 20
ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СФС	396 ± 83	83 ± 15	376 ± 32
ДОФС:ДОФЭ:Хол:СЭС	326 ± 65	75 ± 13	275 ± 25
ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СЭС	398 ± 72	98 ± 17	302 ± 32

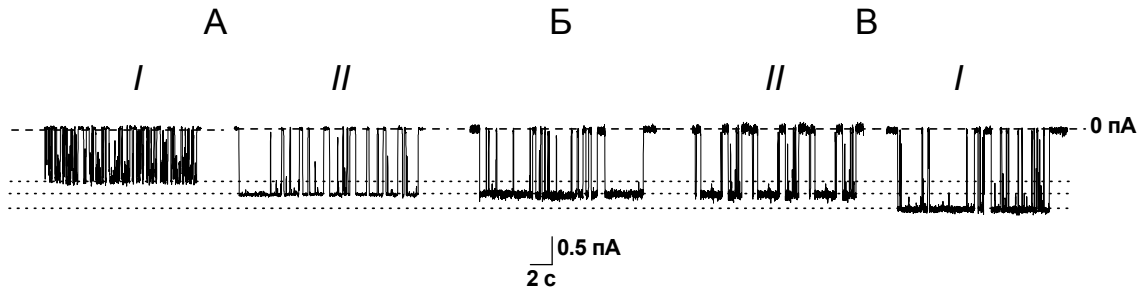


Рис. 3.41. Одиночные элементарные СМЕ-каналы в ДОФС:ДОФЭ:Хол:СМ-мембранах в отсутствие дипольных модификаторов (Б) и в присутствии 20 мкМ флоретина (А) и 5 мкМ RH 421 (В). При введении модификаторов наблюдается две популяции СМЕ-каналов: I типа (проводимость совпадает с контрольной) и II типа (проводимость изменяется при введении модификаторов). Липидные бислои омываются 0.1 М KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет -150 мВ. Штриховые линии соответствуют закрытому состоянию каналов (0 пА).

Проводимость каналов I типа совпадает с проводимостью каналов в отсутствие модификаторов. Каналы II типа ведут себя аналогично СМЕ-каналам в фосфолипидных бислоях (3.2.1.2, рис. 3.29): их проводимость уменьшается при введении флоретина и увеличивается после добавки RH 421, т.е. является функцией дипольного потенциала мембраны. Аналогичные результаты были получены для ДОФС:ДОФЭ:Эрг:СМ-бислоев. В СФС- и СЭС-содержащих мембранах зарегистрированы только каналы II типа. При введении флоретина время жизни СМЕ-каналов в СФС- и СЭС-содержащих мембранах уменьшается приблизительно в 4 раза, в то время как после добавки RH 421 оно практически не меняется. Эти данные хорошо согласуются с результатами изучения зависимости времени жизни СМЕ-каналов от дипольного потенциала в фосфолипидных бислоях (рис. 3.29).

Возможное объяснение существования в липидных бислоях, включающих СМ, популяции каналов, не чувствительных к введению диполь-модифицирующих соединений, связано с отличием их латеральной организации от СФС- и СЭС-содержащих мембран (3.1.2). Бислои, включающие СМ, характеризуются наиболее выраженной фазовой сегрегацией и в отличие от СФС- и СЭС-содержащих мембран имеют s_o -домены (рис. 3.20). Вероятно, флоретин и RH 421 не способны изменять дипольный потенциал СМ-содержащих упорядоченных доменов, в которых находятся СМЕ-каналы. Дипольный потенциал окружающей неупорядоченной фазы изменяется под действием диполь-модифицирующих агентов, как и характеристики расположенных в этих областях СМЕ-каналов.

б) стационарный СМЕ-индуцированный ток

Установлено, что пороговая концентрация липопептида, необходимая для наблюдения одиночных каналов в СЭС-содержащих мембранах в два раза выше, чем в случае СФС-включающих бислоев. Учитывая разное фазовое поведение мембран, включающих СФС и СЭС (3.1.2.2), можно предположить связь каналообразующей активности СМЕ в сфинголипид-содержащих бислоях с их латеральной организацией. Для подтверждения выдвинутого предположения нами было изучено влияние флоретина на стационарное число открытых СМЕ-каналов в различных сфинголипид-содержащих бислоях. Установлено, что добавка 10 мкМ флоретина сопровождается 170 ± 30 и 5200 ± 700 кратным ростом N_{op} в случае мембран, включающих СФС и СЭС, соответственно. Рис. 3.42 иллюстрирует количественные различия влияния флоретина на стационарное число открытых СМЕ-каналов в липидных бислоях, сформированных с участием СФС или СЭС. Для установления механизмов изменения каналообразующей активности липопептида в этих системах проведены измерения воротных зарядов СМЕ-каналов. До введения флоретина значения воротных зарядов СМЕ-каналов в мембранах указанного состава практически совпадают ($q = 1.0 \pm 0.1$).

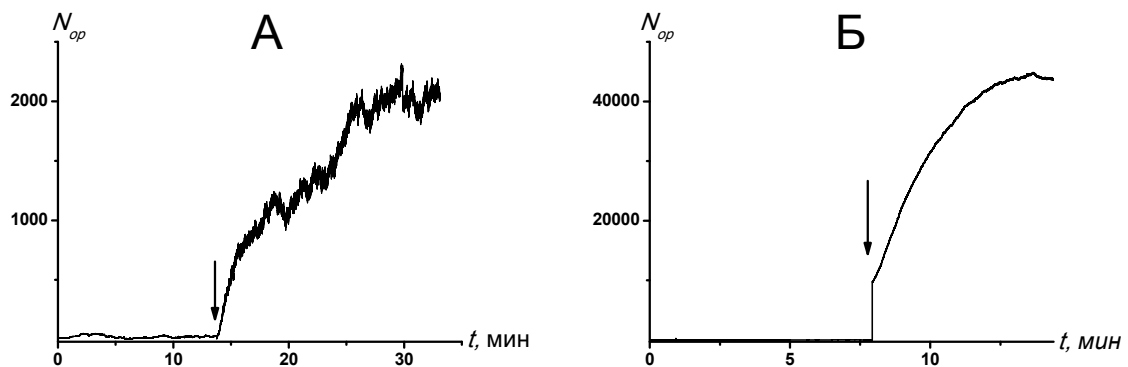


Рис. 3.42. Влияние флоретина на стационарное число открытых СМЕ-каналов (N_{op}) в мембранах, изготовленных из смеси ДОФС:ДОФЭ:Эрг (1:1:1 = М:М:М) с 20 моль % СФС (А) или СЭС (Б). Моменты введения 10 мкМ флоретина в 0.1 М растворы NaCl при pH 6.0 указаны стрелками. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

После добавки флавоноида величины воротных зарядов составляют 2.3 ± 0.1 и 3.7 ± 0.5 для СФС- и СЭС-включающих бислоев, соответственно. Можно думать, что наблюдаемые эффекты связаны с различной способностью флоретина изменять дипольный потенциал упорядоченных доменов, включающих эти сфинголипиды.

Резюмируя основные результаты, представленные в этом параграфе, следует отметить:

1) Увеличение дипольного потенциала мембраны сопровождается ростом проводимости и времени жизни элементарных СМЕ-каналов, а также падением кооперативности открывания и числа функционирующих в мембране липопептидных пор. Увеличение проводимости является результатом уменьшения потенциального барьера для проникающих через СМЕ-канал анионов. За счет ориентации молекул воды в СМЕ-поре компенсируется около 95 % дипольного потенциала мембраны. Изменения кооперативности открывания и времени жизни СМЕ-каналов обусловлены взаимодействием дипольного потенциала мембраны с заряженными и полярными группами, входящими в состав воротного механизма канала.

2) Создана теоретическая модель работы СМЕ-каналов. На ее основе проанализирован вклад различных факторов в активность СМЕ-пор при варьировании дипольного потенциала. Установлено, что основными причинами изменения числа открытых СМЕ-пор являются модификация эффективного воротного заряда каналов и коэффициента распределения СМЕ между мембраной и водной фазой.

3) Каналообразующая активность СМЕ зависит от латеральной организации бислоя, обуславливающей гетерогенность его свойств, в том числе, дипольного потенциала.

4) Увеличение давления в гидрофобной области мембраны при переходе от ДОФХ-мембран к ДОФЭ-бислоям или введении триодтиронины ингибирует образование липопептидных пор. Это согласуется с моделью строения СМЕ-канала как асимметричной липопептид-липидной поры.

3.2.2. Ионные каналы, образуемые сурфактином

Параграф написан по работе [6a *Списка основных публикаций автора*].

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 ключевую роль заряд-дипольных взаимодействий в каналообразующей активности липопептидов. Идеальным кандидатом для проверки выдвинутой гипотезы является сурфактин (СФ) (1.3.1.2). Дело в том, что этот гептапептид, продуцируемый *Bacillus subtilis*, в физиологических условиях имеет отрицательный заряд. Известно, что в плоских липидных бислоях СФ образует потенциал-независимые катион-селективные каналы разноуровневой проводимости [382]. 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 [81,230,393,443,444].

а) одиночные сурфактиновые каналы

Введение сурфактина (СФ) с обеих сторон липидного бислоя вызывает появление дискретных флуктуаций проводимости. Число подуровней и величины проводимостей СФ каналов сильно варьируют от эксперимента к эксперименту [382, 6a]. Для примера на рис. 3.43 представлены записи флуктуаций одиночных СФ-каналов, и соответствующие им гистограммы токов, полученные в двух независимых экспериментах (рис. 3.43 А и 3.43 Б) при одинаковой концентрации липопептида (0.4 мкМ) в омывающих ДФФХ мембраны 1 М растворах KCl (рН 6.5).

Видно, что в первом эксперименте гистограмма флуктуаций тока характеризуется наличием трех подуровней проводимости СФ-каналов. В эквивалентных условиях в другом эксперименте (рис. 3.43 Б) зарегистрировано пять подсостояний проводимости СФ-каналов. Поскольку число, величины и вероятности подуровней проводимости СФ-каналов отличаются от эксперимента к эксперименту, для сравнения характеристик одиночных каналов при варьировании условий эксперимента использовали средний нормированный ток (i_{SC}), который рассчитывали, как указано в параграфе 2.1.1.

Отсутствие влияния формы мембранообразующих липидов (ДФФХ или ДОФЭ, 1.1.2) на i_{SC} и пороговую концентрацию сурфактина свидетельствует в пользу того, что геометрические характеристики симметричных СФ-каналов (образованных при

двустороннем введении липопептида) в закрытом и открытом состояниях мало отличаются.

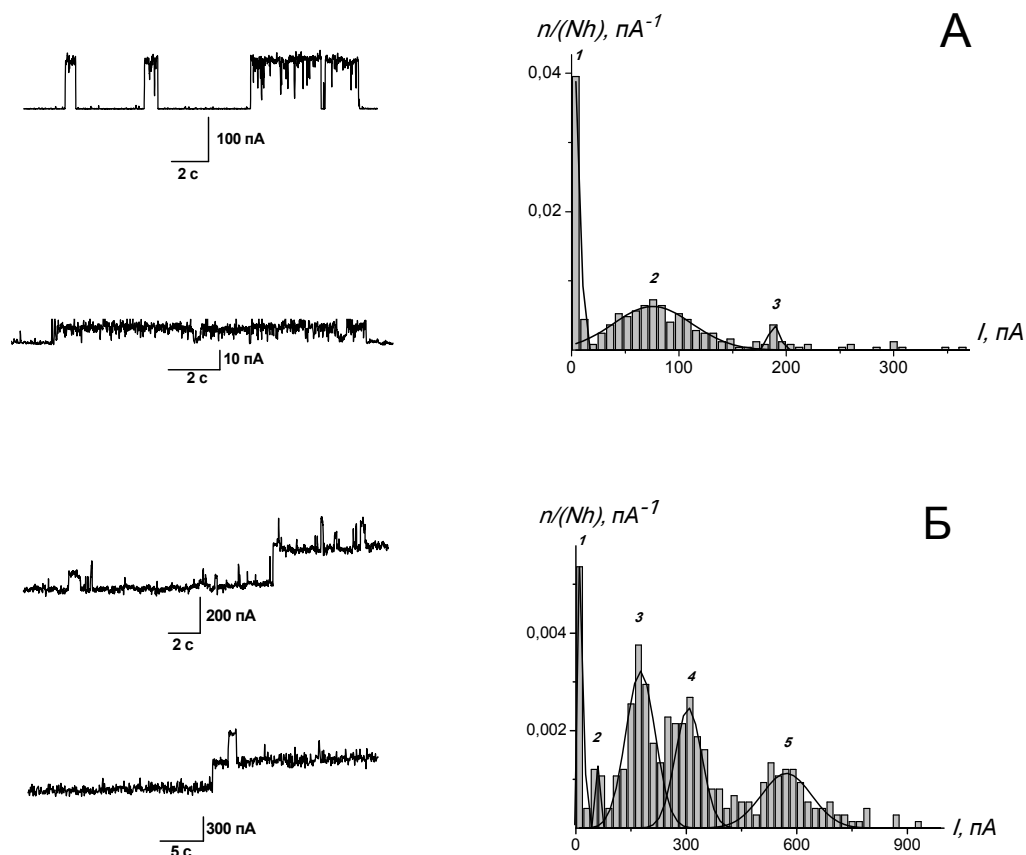


Рис. 3.43. Левая панель – записи флуктуаций одиночных СФ-каналов при концентрации липопептида 0.4 мкМ. Правая панель – гистограммы распределения флуктуаций тока, соответствующих открыванию (закрыванию) одиночных СФ каналов. Рисунки А и Б представляют два независимых эксперимента. Мембраны сформированы из ДФФХ и омываются 1.0 М раствором KCl при pH 6.5. Трансмембранное напряжение составляет 25 мВ.

На рис. 3.44 приведены записи флуктуаций одиночных СФ-каналов, и соответствующие им гистограммы токов в отсутствие и в присутствии в околосмембранном растворе дипольных модификаторов. Можно заметить, что добавка 20 мкМ флоретина в мембраноомывающие растворы вызывает падение как числа, так и величин проводимости подсостояний СФ-каналов, при этом средний нормированный ток уменьшается от 250 до 70 пА. Стирилпиридиновый краситель RH 421 в концентрации 10 мкМ вызывает обратный эффект, приводя к росту i_{SC} от 3 до 16 пА за счет увеличения амплитуд подуровней проводимости и перераспределения вероятностей их появления в пользу больших.

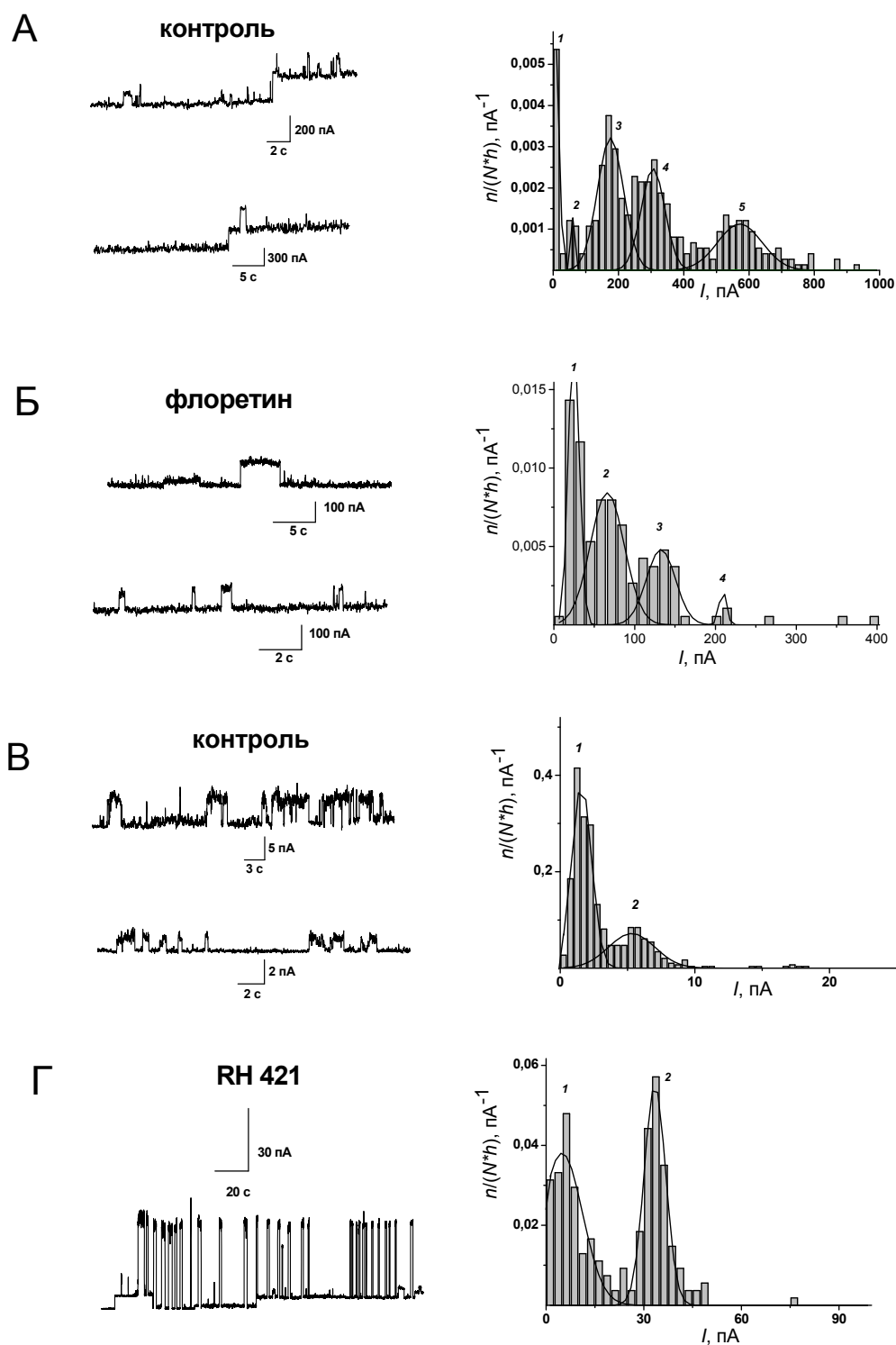


Рис. 3.44. Записи флуктуаций индуцированного СФ трансмембранного тока (Левая панель) и соответствующие им гистограммы распределения (Правая панель) до (**А**, **В**) и после введения дипольных модификаторов, 20 мкМ флоретина (**Б**) и 10 мкМ RH 421 (**Г**). Липидные бислои сформированы из ДФФХ и омываются 1 М KCl при pH 6.5. Трансмембранное напряжение составляет 25 мВ. Концентрация СФ в околосмембранных растворах составляет 0.4 мкМ (**А** и **Б**) или 0.2 мкМ (**В** и **Г**).

Таблица 3.15 суммирует результаты измерения среднего нормированного тока до и после введения дипольных модификаторов в 10 независимых эксперимента. Из Таблицы 3.15 видно, что относительное изменение среднего нормированного тока (i_{SC_DM}/i_{SC_0}) не так сильно варьирует от эксперимента к эксперименту в отличие от абсолютных значений i_{SC} . Это дает возможность количественно охарактеризовать влияние дипольного потенциала мембраны на проводимость одиночных СФ-каналов. Из представленных данных следует, что уменьшение дипольного потенциала ДФФХ-мембраны на 130 мВ в результате присутствия в омывающем растворе 20 мкМ флоретина (3.1.1.1) приводит приблизительно к 3-кратному падению среднего нормированного тока, характеризующего проводимость одиночных СФ-каналов (Таблица 3.15). Увеличение дипольного потенциала ДФФХ-бислоя на более чем на 200 мВ при введении RH 421 в околосмембранные растворы до концентрации 10 мкМ (3.1.1.4) вызывает 5-кратный рост i_{SC} .

Таблица 3.15. Средний нормированный ток, протекающий через одиночные СФ-каналы до (i_{SC_0}) и после введения дипольных модификаторов (i_{SC_DM}).

№ эксперимента	i_{SC_0} , пА	i_{SC_DM} , пА	i_{SC_DM}/i_{SC_0}
<i>20 мкМ флоретина</i>			
1	88.2	19.4	0.22
2	57.1	16.4	0.29
3	161.8	36.4	0.23
4	55.0	25.3	0.46
5	240.1	70.1	0.29
6	128.5	37.7	0.29
<i>10 мкМ RH 421</i>			
7	4.6	30.0	6.5
8	22.7	72.1	3.2
9	2.6	10.3	4.0
10	2.7	16.3	6.1

Изменение среднего нормированного тока при введении дипольных модификаторов может быть обусловлено влиянием дипольного потенциала мембраны на олигомеризацию сурфактиновых молекул. Подобное предположение подразумевает, что подуровни проводимости СФ-каналов образованы олигомерами, включающими различное число молекул липопептида. Увеличение числа мономеров в составе проводящего олигомера приведет к росту диаметра поры и потере ее селективности. Для подтверждения этого предположения была измерена селективность СФ-каналов различной проводимости. Согласно [382] СФ-каналы демонстрируют выраженную катионную селективность, которая должна быть связана с наличием двух отрицательно заряженных аминокислотных остатков в молекуле липопептида (рис. 1.24). Однако

детальных исследований селективности СФ-каналов авторами цитируемой работы не было проведено. Результаты наших измерений показали, что катион-анионная селективность СФ-каналов зависит от их проводимости. На рис. 3.45 представлены вольт-амперные характеристики двух различных подуровней проводимости СФ-каналов при 10 кратном градиенте концентрации электролита на мембране. Можно заметить, что потенциалы реверсии, отвечающие нулевому трансмембранному току, для СФ-пор с проводимостью 40 пСм и 450 пСм равны 45 мВ и 0 мВ, соответственно. Числа переноса катионов калия, рассчитанные согласно уравнению Гендерсона (см. параграф 2.1.4), составляют $t_+ = 0.85$ и $t_+ = 0.50$ для потенциалов реверсии 45 и 0 мВ, соответственно. На этом основании можно сделать заключение, что увеличение проводимости СФ-поры от 40 до 450 пСм сопровождается потерей ее селективности. Эти данные указывают на различие эффективных диаметров каналов разной проводимости.

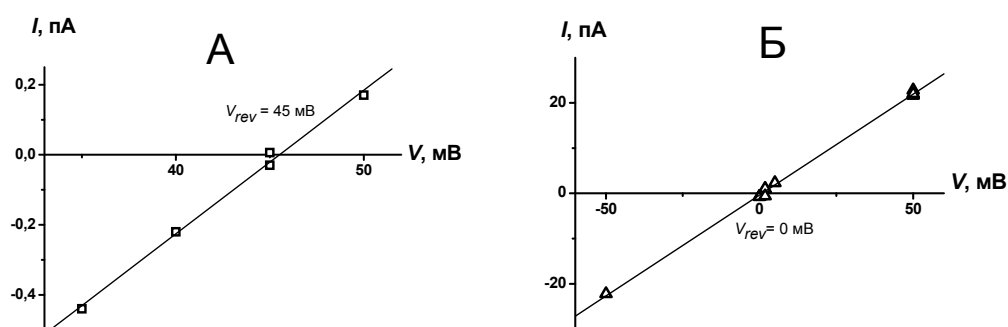


Рис. 3.45. Вольт-амперные кривые для двух различных подуровней проводимости (А и Б) одиночных СФ-каналов. Коэффициенты наклона прямых, аппроксимирующих представленные зависимости, составляют 40 (А) и 450 (Б) пСм. Потенциалы реверсии, отвечающие нулевому трансмембранному току, равны 45 (А) и 0 мВ (Б). На мембранах создан градиент концентрации электролита: 1.0 и 0.1 М КСl при рН 6.5 в цис- и транс-отсеках экспериментальной камеры, соответственно. Мембраны изготовлены из ДФФХ. Концентрация СФ в омывающих бислои растворах с обеих сторон составляет 0.2 (А) и 0.4 мкМ (Б).

Увеличение размера канала должно быть обусловлено ростом числа мономеров СФ в составе проводящего олигомера. В свою очередь, увеличение коэффициента распределения липопептида между мембраной и омывающим ее раствором приведет к росту числа мономеров СФ в мембране, которые могут формировать проводящие олигомеры. Поэтому можно думать, что эффекты дипольных модификаторов опосредованы изменением коэффициента распределения липопептида между мембраной и омывающим ее раствором при модуляции ими дипольного потенциала бислоя.

б) стационарный сурфактин-индуцированный ток

В случае реализации предложенного сценария варьирование дипольного потенциала липидного бислоя, вызванное адсорбцией дипольных модификаторов, должно привести к изменению не только проводимости, но и числа СФ-каналов. На рис. 3.46 А видно, что добавка флоретина в околосмембранные растворы до 20 мкМ вызывает 40-кратное уменьшение стационарного СФ-индуцированного макроскопического трансмембранного тока. При этом введение 10 мкМ RH 421 приводит к 1500-кратному росту тока (рис. 3.46 Б).

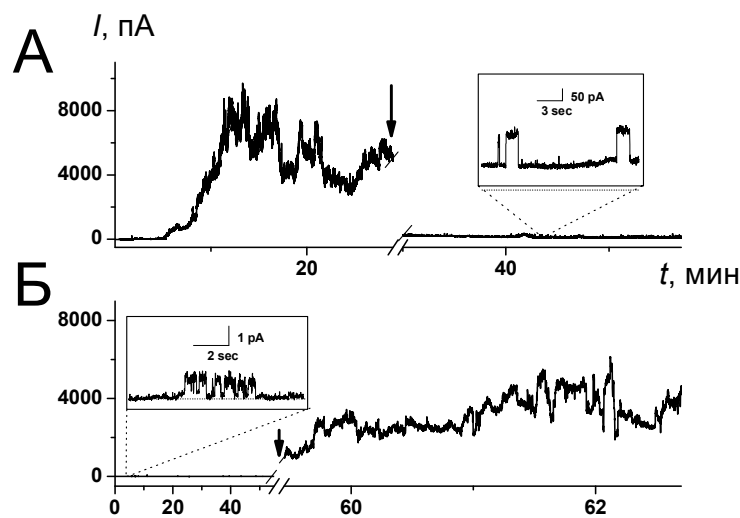


Рис. 3.46. Изменение стационарного СФ-индуцированного трансмембранного тока под действием дипольных модификаторов. Мембраны изготовлены из ДФФХ и омываются 1 М раствором KCl при pH 6.5. Моменты введения флоретина до концентрации 20 мкМ (А) или RH 421 до концентрации 10 мкМ (Б) в омывающий раствор указаны стрелками. Трансмембранная разность потенциалов составляет 50 мВ (А) или 25 мВ (Б).

Сходный результат был получен в большом числе независимых экспериментов. Отсутствие корреляции между исходной величиной стационарного тока и отношением трансмембранных токов после и до введения дипольных модификаторов позволило определить диапазоны изменения тока, которые включают 5÷50 кратное уменьшение и 7÷7000-кратное увеличение тока, при добавке в мембраноомывающие растворы флоретина до 20 мкМ и RH 421 до 10 мкМ, соответственно. Сравнение приведенных отношений с величинами i_{SC_DM}/i_{SC_0} обнаруживает, что наблюдаемые изменения стационарного СФ-индуцированного трансмембранного тока при адсорбции дипольных модификаторов являются результатом изменения как проводимости, так и числа открытых СФ-каналов. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу

влияния незранируемого скачка потенциала на границе мембраны на коэффициент распределения липопептида между липидным бислоем и водной фазой. По всей вероятности, увеличение дипольного потенциала мембраны сопровождается уменьшением энергии погружения в мембрану отрицательно заряженных мономеров сурфактина. С учетом того, что рост дипольного потенциала мембраны вызывает снижение порообразующей способности положительно заряженного СМЕ (3.2.1), в том числе, за счет изменения коэффициента распределения, можно предположить ключевую роль заряд-дипольных взаимодействий в каналообразующей активности липопептидов (рис. 3.47).

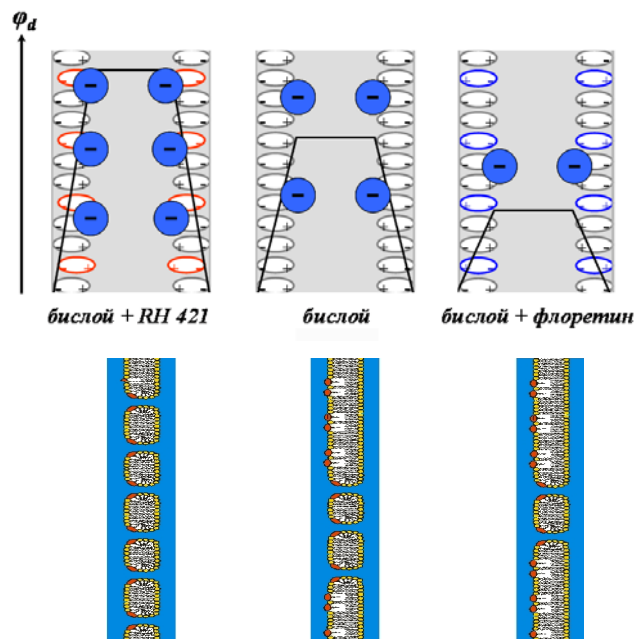


Рис. 3.47. Схематическое представление роли заряд-дипольных взаимодействий в каналообразующей активности СФ (молекулы каналоформера показаны синим цветом).

Суммируя полученные результаты можно заключить:

1) Многоуровневая проводимость сурфактиновых каналов обусловлена олигомеризацией молекул липопептида. Каналы большей проводимости характеризуются меньшей катионной селективностью.

2) Изменение распределения латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности бислоя не оказывает влияния на каналообразующую активность СФ, что указывает на сходство геометрических характеристик закрытого и открытых состояний симметричных СФ-каналов.

3) Увеличение дипольного потенциала мембраны приводит к росту проводимости и числа одиночных сурфактиновых каналов. Ключевая роль в этих процессах принадлежит заряд-дипольным взаимодействиям между молекулами липопептида и бислоем.

3.2.3. Порообразующая способность цекропинов

Параграф написан по работе [18а *Списка основных публикаций автора*].

Для изучения регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, образуемых пептидами, нами были выбраны антимикробные пептиды насекомых, цекропины. Как уже отмечалось в (1.3.2.1), молекулы цекропинов А (ЦА) и Б (ЦБ) представляют собой последовательность 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) [140,141]. Подобная организация необходима для проявления цекропинами широкого спектра противомикробной активности, включающего практически все клинически важные грамотрицательные и некоторые грамположительные бактерии [140]. 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». Согласно другой модели, цекропины образуют в мембранах патогенных клеток поры.

Введение цекропина А (ЦА) или цекропина Б (ЦБ) в омывающий раствор с *цис*-стороны липидного бислоя, сформированного из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ, до концентрации $2 \div 5$ мкМ и последующее приложение трансмембранного напряжения способствует формированию ионных каналов многоуровневой проводимости. Дальнейшее увеличение концентрации пептида (более 10 мкМ) приводит к дестабилизации бислоя и его разрушению. Полученные данные находятся в согласии с одной из обсуждаемых в литературе моделей мембранной активности цекропинов (см. параграф 1.4.2.1), которая подразумевает образование ион-проницаемых пор на первом этапе дезинтеграции бислоя, происходящей в результате формирования на поверхности мембраны сплошного пептидного «ковра» [371, 379].

а) одиночные цекропиновые каналы

На рис. 3.48 представлены записи флуктуаций тока, протекающего через ЦА-каналы, при трансмембранном потенциале 25 мВ. Видно, что ЦА образует хорошо воспроизводимые стабильные подсостояния проводимости от 1 до 18 пА (1–5).

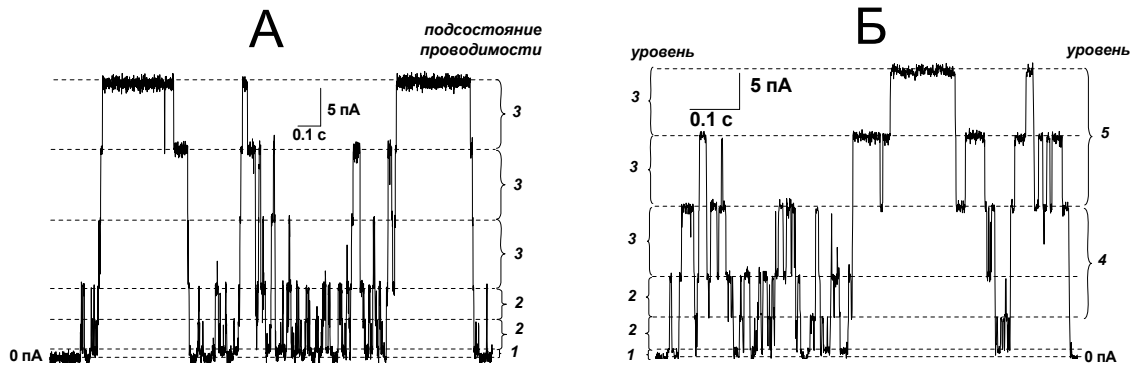


Рис. 3.48. Одиночные ЦА-каналы в липидных бислоях из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ. Цифрами от 1 до 5 отмечены подсостояния проводимости ЦА-каналов. Мембрана омывается 0.1 М раствором KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 25 мВ. Рисунки А и Б демонстрируют различные подсостояния проводимости ЦА-каналов.

На рис. 3.49 показана гистограмма распределения флуктуаций трансмембранного тока, протекающего через ЦА-каналы, при трансмембранном напряжении 25 мВ, являющаяся результатом обработки треков, аналогичных представленному на рис. 3.48. На гистограмме видно пять пиков, соответствующих различным подсостояниям проводимости ЦА-каналов.

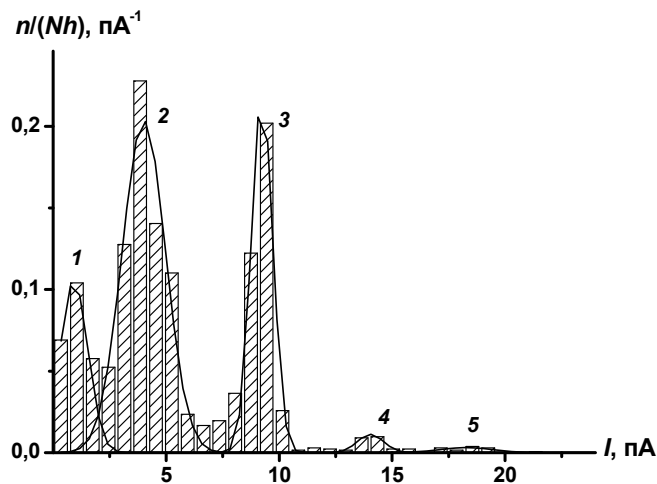


Рис. 3.49. Гистограмма распределения флуктуаций трансмембранного тока, протекающего через одиночные ЦА-каналы в мембранах из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ. Бислои омываются 0.1 М раствором KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 25 мВ.

Для исследования механизмов многоуровневой проводимости ЦА-каналов были проведены измерения проводимости одиночных ЦА-каналов в присутствии дипольных модификаторов. На рис. 3.50 представлены гистограммы распределения флуктуаций трансмембранного ЦА-индуцированного тока при $V = 25$ мВ после добавки флоретина или мирицетина до 20 мкМ, а также RH 421 и RH237 до 5 мкМ. Из сопоставления рис. 3.49 и 3.50 видно, что введение в околосмембранные растворы флоретина (А), RH 421 (В) или RH 237 (Г) приводит к перераспределению вероятности флуктуаций между подуровнями проводимости в пользу меньших (1–3), при этом вероятность флуктуации больших подуровней проводимости (4 и 5) значительно уменьшается. Вместе с тем, мирицетин практически не влияет на вероятность появления тех или иных подуровней проводимости ЦА-каналов (рис. 3.50 Б).

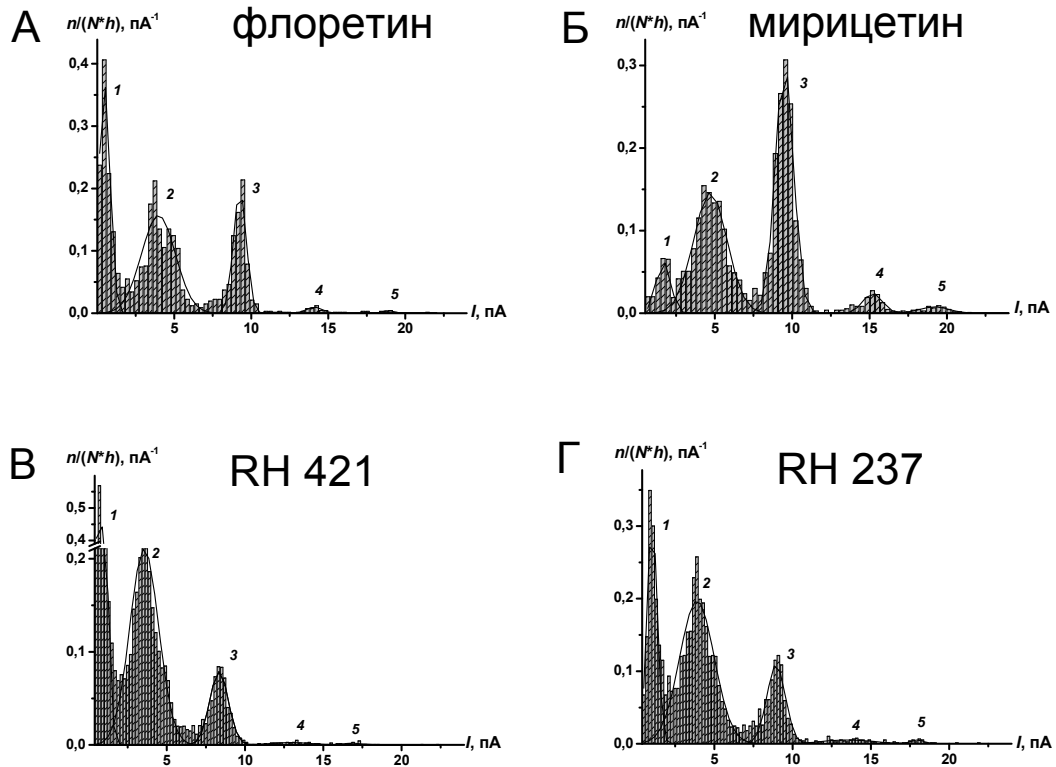


Рис. 3.50. Гистограммы распределения флуктуаций токов, протекающих через одиночные ЦА-каналы в мембранах из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ в присутствии 20 мкМ флоретина (А), 20 мкМ мирицетина (Б), 5 мкМ RH 421 (В) и 5 мкМ RH 237 (Г). Мембраны омываются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 25 мВ.

Для того, чтобы охарактеризовать все подуровни одиночных ЦА-каналов в отсутствие и в присутствии дипольных модификаторов использовали средний нормированный ток (i_{SC}) и среднюю нормированную проводимость (g_{SC}) (2.2.5.

"Материалы и методы"). На рис. 3.51 представлены зависимости средней нормированной проводимости ЦА-каналов в ДОФС:ДОФЭ-мембранах от трансмембранного напряжения в отсутствие (контроль) и в присутствии в омывающих растворах дипольных модификаторов, флоретина, мирицетина, RH 421 и RH 237. Видно, что добавка в растворы, омывающие ДОФС:ДОФЭ-мембрану, флоретина до 20 мкМ, RH 237 или RH 421 до 5 мкМ вызывает падение средней нормированной проводимости ЦА-каналов. При этом введение в мембраноомывающие растворы мирицетина до 20 мкМ практически не влияет на g_{SC} .

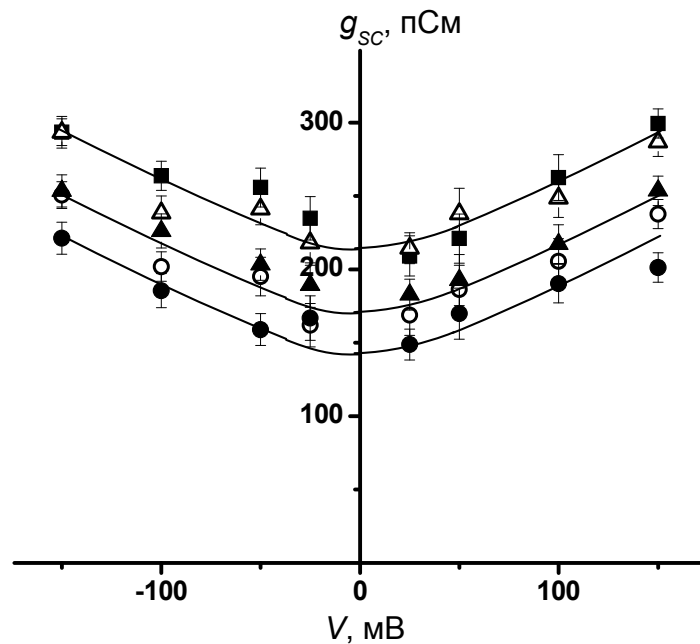


Рис. 3.51. Зависимость средней нормированной проводимости ЦА-каналов (g_{sc}) от трансмембранного напряжения (V) до и после введения дипольных модификаторов: (■) – в отсутствие флавоноидов (контроль); (○) – 20 мкМ флоретина, (Δ) – 20 мкМ мирицетина, (●) – 5 мкМ RH 421 и (▲) – 5 мкМ RH 237. Липидные бислои изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и омываются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4.

Введение флоретина и мирицетина в омывающие ДОФС:ДОФЭ мембраны растворы до 20 мкМ приводит к уменьшению дипольного потенциала мембраны на 90 ± 10 и 20 ± 5 мВ, соответственно. Добавка 5 мкМ RH 421 или RH 237 вызывает увеличение дипольного потенциала на 60 ± 10 и 100 ± 5 мВ, соответственно (3.1.1). Сравнение абсолютных величин изменения дипольного потенциала отрицательно заряженных мембран и относительных изменений g_{sc} после введения указанных модификаторов показывает, что проводимость одиночных ЦА-каналов не является функцией φ_d .

Дипольные модификаторы могут влиять на многоуровневую проводимость ЦА-каналов за счет увеличения латерального давления в гидрофильной области мембраны. Как обсуждалось выше (3.1.2), в отличие от флоретина и стирилпиридиновых красителей, мирицетин не способен значительно погружаться в бислои, а, следовательно, подобного эффекта оказывать не должен. По всей вероятности, стерическое несоответствие встроенных в бислой конических модификаторов геометрическим характеристикам открытых состояний цекропиновых каналов, характеризующихся высокой проводимостью, приводит к увеличению энергии их образования. В пользу выдвинутого предположения говорят и результаты измерения g_{SC} в липидных бислоях с холестерином. На рис. 3.52 представлена зависимость g_{SC} от V для ЦА-каналов в мембранах, изготовленных из эквимольной смеси ДОФС, ДОФЭ и Хол, в отсутствие и в присутствии флоретина и RH 421. Видно, что влияние флоретина и RH 421 на среднюю нормированную проводимость ЦА-каналов в холестерин-содержащих мембранах пренебрежимо мало. Это может быть результатом компенсации холестерином индуцированных дипольными модификаторами изменений в распределении латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности бислоя.

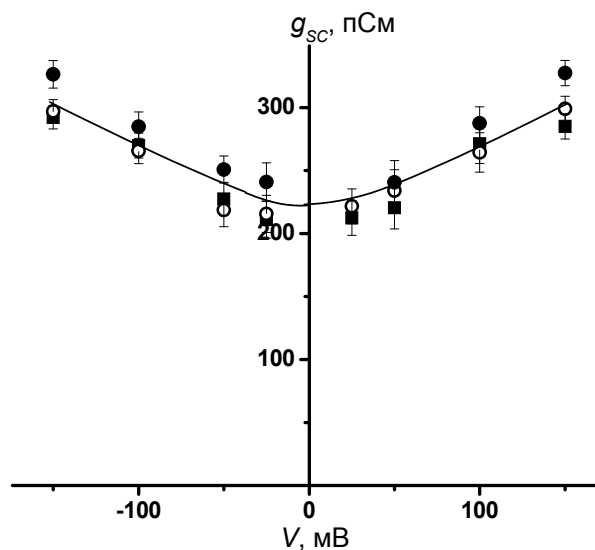


Рис. 3.52. Зависимость средней нормированной проводимости ЦА-каналов (g_{SC}) от трансмембранного напряжения (V) до и после введения дипольных модификаторов: (■) — в отсутствие флавоноидов (контроль); (○) — 20 мкМ флоретина и (●) — 5 мкМ RH 421. Липидные бислои изготовлены из эквимольной смеси ДОФС, ДОФЭ и Хол и оmyваются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4.

Нами также были проведены измерения проводимости одиночных ЦА-каналов мембранах, сформированных из эквимольной смеси ДФФС и ДФФЭ. Эти фосфолипиды

имеют разветвленные жирнокислотные хвосты и форму инвертированных конусов [366], что способствует изменению профиля латерального давления в бислое по сравнению с мембраной, сформированной из ДОФС и ДОФЭ. Замена ДОФС и ДОФЭ на ДФФС и ДФФЭ приводит к увеличению вероятности появления малых подуровней проводимости ЦА-каналов (1–3), в то время как подуровни большей проводимости (4 и 5) практически не наблюдаются. Это вызывает уменьшение средней нормированной проводимости ЦА-каналов в ДФФС:ДФФЭ бислоях (рис. 3.53) по сравнению с ДОФС:ДОФЭ мембранами (рис. 3.51). Таким образом, полученные результаты указывают на то, что липиды, существенно увеличивающие латеральное давление в гидрофобной области мембраны, также как и дипольные модификаторы, увеличивающие давление в области полярных головок липидов, дестабилизируют высокопроводящие состояния ЦА-каналов. Подобные эффекты могут наблюдаться в том случае, если олигомеры цекропина образуют цилиндрические поры (рис. 3.54). Учитывая, что конечный результат (открытие каналов) зависит от разности энергий начального и конечного состояний, нужно полагать, что закрытое состояние цекропиновых каналов отвечает сорбированному на мембране пептиду, что согласуется с предположением о независимости его энергии от распределения латерального давления в бислое. Такое рассмотрение приводит к выводу, что ключевые факторы, оказывающие влияние на каналобразующую активность цекропина, модулируют погружение пептида в бислой.

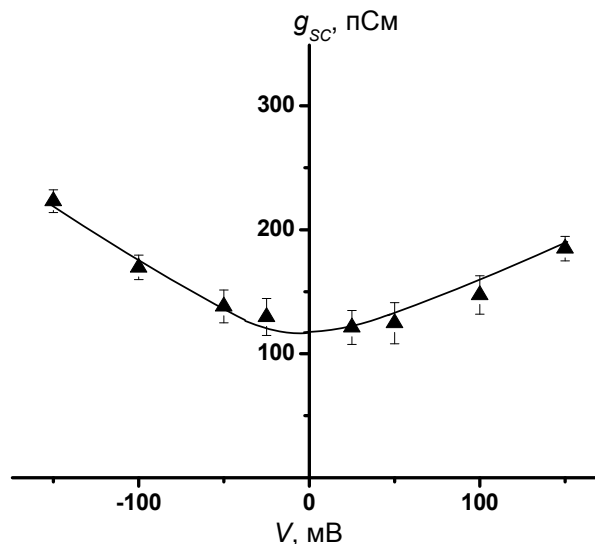


Рис. 3.53. Зависимость средней нормированной проводимости цекропиновых каналов (g_{sc}) в бислоях, изготовленных из эквимольной смеси ДФФС и ДФФЭ, от трансмембранного напряжения (V). Мембраны омываются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4.

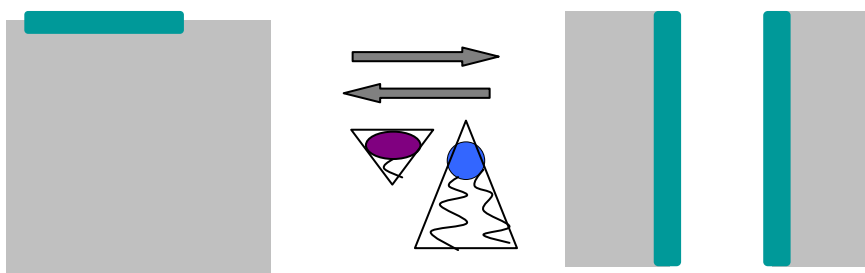


Рис. 3.54. Схематическое представление влияния дипольных модификаторов и неламеллярных липидов на равновесие между закрытым (слева) и открытым (справа) состоянием ЦА-канала. Молекулы пептида показаны зеленым цветом; липиды, имеющие форму инвертированных конусов и дестабилизирующие конечное состояние, показаны синим цветом; молекулы дипольных модификаторов, увеличивающие объем гидрофильной области бислоя и также смещающие равновесие в сторону закрытого состояния, показаны фиолетовым цветом.

Кристенсен с соавторами [98] показали, что цекропиновые каналы обладают слабой анионной селективностью, что, скорее всего, является результатом наличия шести положительно заряженных аминокислотных остатков в N-концевой спирали молекулы, которая по мнению авторов цитируемой работы отвечает за формирование канала. Увеличение диаметра цекропиновых пор при встраивании дополнительных мономеров в проводящие олигомеры должно вызывать потерю селективности. Чтобы подтвердить это предположение, мы исследовали катион-анионную избирательность ЦА-каналов различной проводимости. На рис. 3.55 представлен пример определения потенциалов реверсии (V^{rev}), соответствующих нулевому трансмембранному току, протекающему через ДОФС:ДОФЭ-мембрану при десятикратном градиенте концентраций электролита. Обнаружено три популяции ЦА-каналов: поры со слабой катионной селективностью, поры со слабой анионной селективностью и неселективные поры. Соответствующие числа переноса катионов (t^+) равны 0.66 ± 0.09 , 0.52 ± 0.04 и 0.39 ± 0.07 . Как правило, неселективные поры имеют бóльшую проводимость по сравнению с селективными каналами.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными Дарелла с соавторами [128], которые с помощью методов молекулярной динамики показали, что цекропины формируют ионные каналы двух типов. Поры I и II типа образуются при погружении в мембрану C- или N-концевой спирали, соответственно (рис. 3.56).

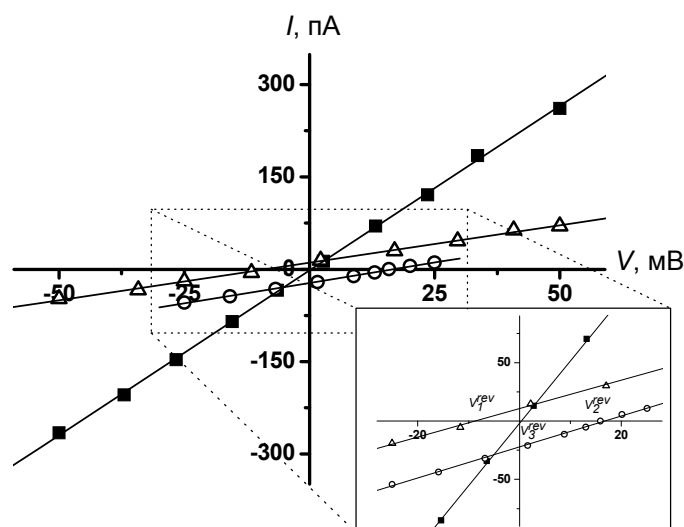


Рис. 3.55. Вольт-амперные характеристики ЦА-каналов в ДОФС:ДОФЭ мембране при десятикратном градиенте концентраций электролита. Отсекаемые отрезки по оси абсцисс равны -11 мВ, 0 мВ и 18 мВ и представляют потенциалы реверсии (V^{rev}) для анионных (Δ), неселективных ($\blacksquare$) и катионных ($\circ$) ЦА-каналов, соответственно.

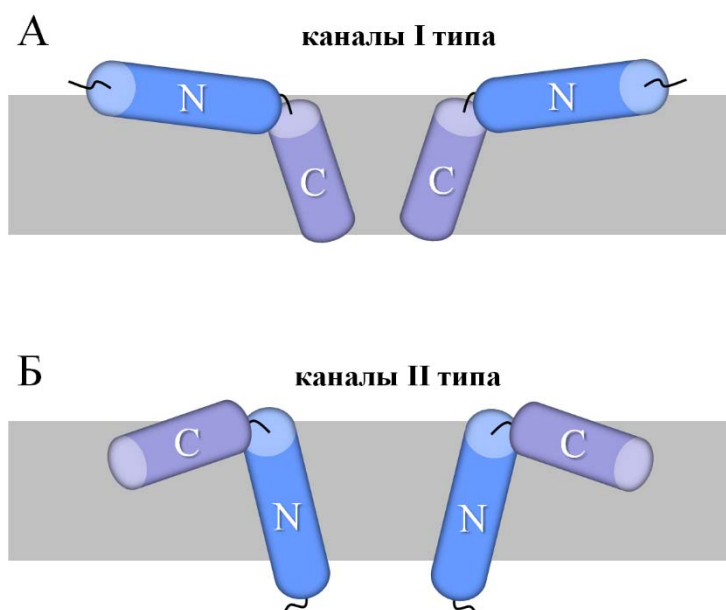


Рис. 3.56. Модели цекропиновых каналов. С- или N-концевые спирали молекул цекропина показаны в виде цилиндров. Для простоты представлено только по одному мономеру для каждого антипараллельного димера цекропина. (А) – I тип цекропиновых каналов, (Б) – II тип цекропиновых каналов. По [128] с изменениями.

Согласно [128] узкая часть каналов I типа формируется двумя кольцами, образованными соединенными водородными связями остатками Gln₃₁ и Gln₃₄. Аналогичная кольцевая структура, образованная остатками Gln₇, регулирует размер и проводимость аламетицинового канала, который, как известно, имеет слабую катионную селективность

[146]. На основании приведенной аналогии Дарелл с коллегами предположили катионную селективность цекропиновых каналов *I* типа. При этом работа Кристенсена и др. [98] явилась базой для предположения об анионной избирательности каналов *II* типа [128]. Надо думать, что обнаруженные нами неселективные цекропиновые поры являются результатом увеличения размера селективных каналов при встраивании дополнительных мономеров пептида. Подобное явление было выявлено при исследовании сурфактиновых каналов (3.2.2).

б) стационарное число открытых цекропиновых каналов

Введение в мембраноомывающие растворы дипольных модификаторов влияет не только на характеристики одиночных цекропиновых каналов, но и на число открытых пептидных пор. Добавка в растворы, омывающие ДОФС:ДОФЭ мембраны, флоретина до 20 мкМ приводит к значительному уменьшению стационарного ЦА-индуцированного трансмембранного тока (I_{∞}) (рис. 3.57 А), в то время как 20 мкМ концентрация мирицетина практически не влияет на I_{∞} (Таблица 3.16). Введение RH 421 (рис. 3.57 Б) или RH 237 (рис. 3.57 В) в омывающие бислои растворы до 5 мкМ вызывает существенный рост стационарного ЦА-индуцированного тока. Аналогичные результаты были получены и для цекропина В (Таблица 3.16). Таблица 3.17 суммирует результаты исследования влияния флоретина и RH 421 на стационарный ЦА-индуцированный ток, протекающий через холестерин-содержащие бислои. Сравнение Таблиц 3.16 и 3.17 показывает, что эффекты дипольных модификаторов не зависят от наличия холестерина в мембране. К аналогичному заключению пришли и Сильвестро с соавторами [388], которые показали, что присутствие (отсутствие) холестерина в мембране не влияет на процесс порообразования цекропином.

Поскольку в присутствии флоретина относительное уменьшение I_{∞} (Таблица 3.16) превышает падение g_{SC} (рис. 3.51) можно думать, что адсорбция флавоноида на мембране сопровождается одновременным уменьшением как числа (N_{∞}), так и проводимости ЦА каналов. Разнонаправленность действия RH 421 на I_{∞} (увеличение, Таблица 3.16) и g_{SC} (уменьшение, рис. 3.51) предполагает, что первый эффект обусловлен увеличением числа открытых ЦА-каналов после введения стирилпиридинового красителя.

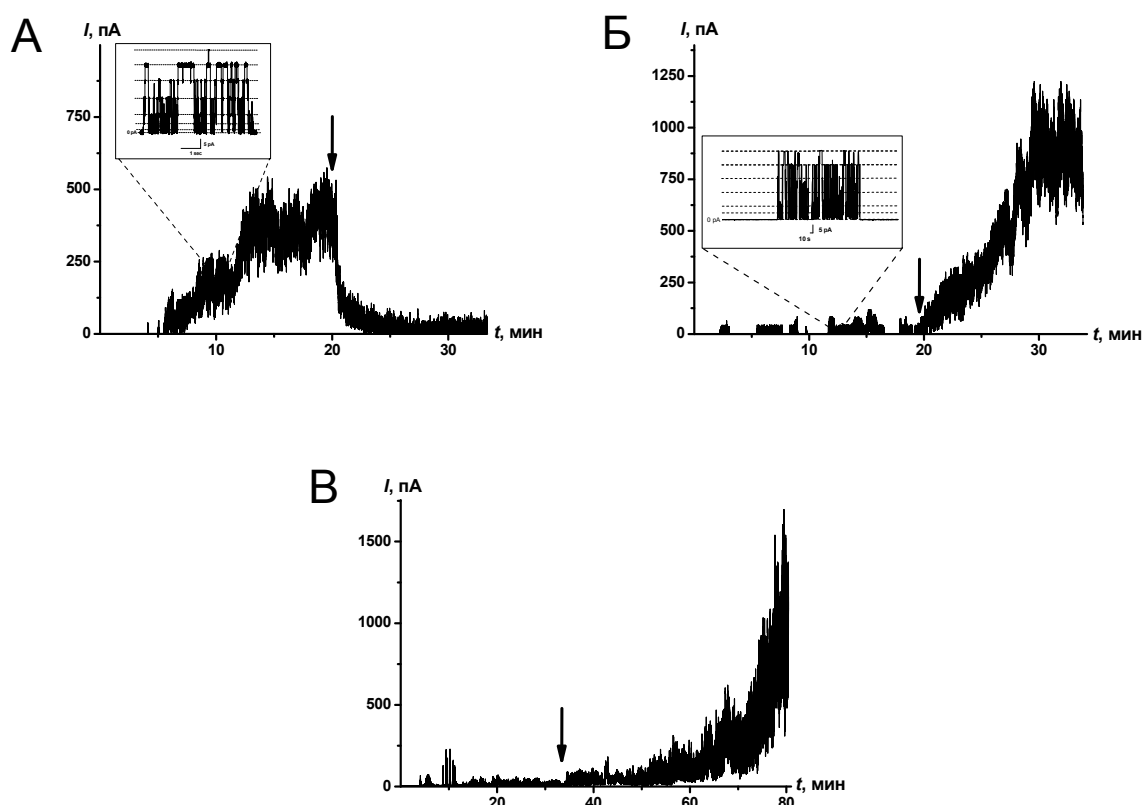


Рис. 3.57. Влияние 20 мкМ флоретина (А), 5 мкМ RH 421 (Б) и 5 мкМ RH 237 (В) на стационарный ЦА-индуцированный трансмембранный ток. Мембраны изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и оmyваются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4. Моменты введения дипольных модификаторов в околосмембранный раствор указаны стрелками. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Таблица 3.16. Среднее отношение стационарного трансмембранного тока, индуцированного цекропином А или цекропином Б, после и до введения различных дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Липидные бислои изготовлены из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ и оmyваются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

антимикробный пептид	дипольный модификатор			
	20 мкМ флоретина	20 мкМ мирицетина	5 мкМ RH 237	5 мкМ RH 421
цекропин А	0.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1	9.3 ± 3.9	7.2 ± 4.9
цекропин Б	0.5 ± 0.3	0.9 ± 0.1	2.9 ± 0.8	3.7 ± 1.6

Сравнение относительных изменений N_{∞} и абсолютных изменений φ_d ДОФС:ДОФЭ мембран при абсорбции указанных дипольных модификаторов (см. 3.1) указывает на корреляцию между стационарным числом открытых цекропиновых каналов и величиной дипольного потенциала бислоев.

Таблица 3.17. Среднее отношение стационарного цекропин-индуцированного макроскопического тока после и до введения различных дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Липидные бислои изготовлены из эквимольной смеси ДОФС, ДОФЭ и Хол и омываются 0.1 М растворами KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

антимикробный пептид	дипольный модификатор	
	20 мкМ флоретина	5 мкМ RH 421
цекропин А	0.4 ± 0.2	4.3 ± 2.4
цекропин В	0.3 ± 0.1	7.3 ± 6.9

Уменьшение дипольного потенциала бислоя вызывает падение стационарного числа цекропиновых каналов, т.е. сопровождается увеличением энергетического барьера для встраивания молекул пептида. Последнее не позволяет связать наблюдаемые изменения с положительным интегральным зарядом молекул цекропина. Следовательно, в мембрану погружается не вся молекула пептида, а только ее часть, характеризующаяся наличием дипольного момента, причем так, чтобы внутри бислоя оказался отрицательный полюс диполя (рис. 3.58). Можно думать, что в мембрану встраивается более гидрофобный С-конец пептида. Согласно Дареллу и др. [128] при погружении С-концевой спирали формируются цекропиновые каналы I типа. Превалирование в мембране каналов этого типа может быть обусловлено большей стабильностью С-концевой части молекулы цекропина по сравнению с N-концевой спиралью при взаимодействии с отрицательно заряженным бислоем [91].

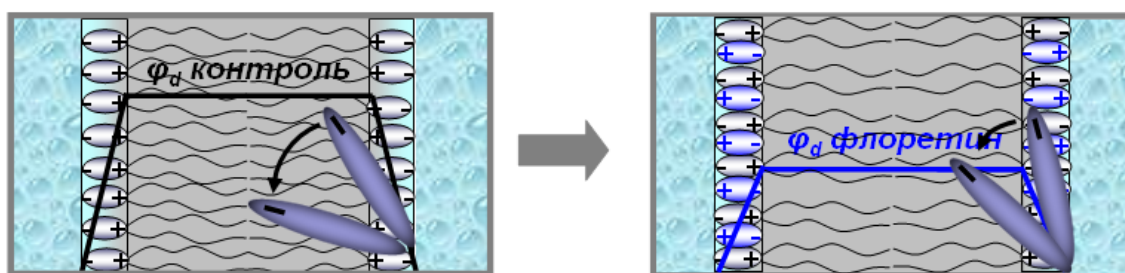


Рис. 3.58. Схема, иллюстрирующая механизм уменьшения каналообразующей активности цекропина при уменьшении дипольного потенциала мембраны, вызванном адсорбцией флоретина.

Схема, представленная на рис. 3.59 резюмирует полученные при исследовании каналообразующей активности цекропинов результаты.

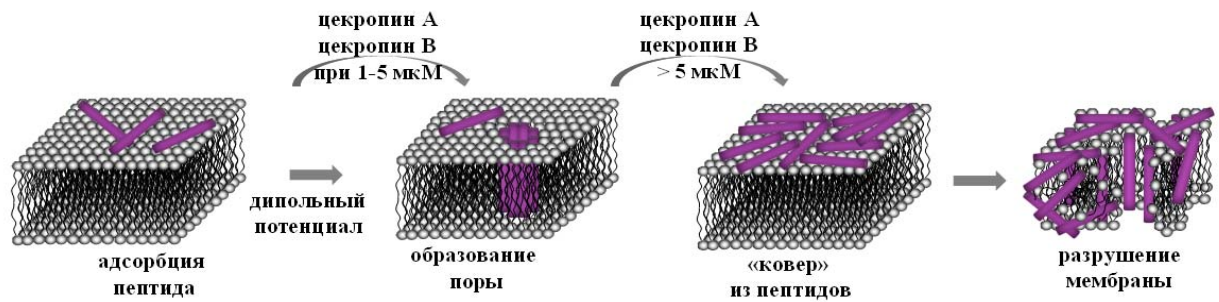


Рис. 3.59. Мембранная активность цекропина А и В в бислойных липидных мембранах.

В заключение этого параграфа следует подчеркнуть:

1) Мембранная активность цекропинов А и В включает образование ион-проводящих пор. Пептиды в концентрациях более 10 мкМ разрушают бислой.

2) Механические свойства мембраны определяют проводимость одиночных цекропиновых каналов, формируемых путем олигомеризации пептида. Увеличение латерального давления, как в гидрофильной, так и в гидрофобной области мембраны, при введении липидов, образующих неламеллярные фазы, и дипольных модификаторов мембран приводит к дестабилизации подсостояний с высокой проводимостью. Полученные результаты согласуются с предположением о том, что при погружении пептидов в бислой образуются цилиндрические каналы.

3) Увеличение дипольного потенциала бислоя сопровождается ростом числа открытых цекропиновых каналов. Экспериментальные результаты позволяют сделать выбор в пользу формирования пор цекропином путем интеркаляции в мембрану С-концевого домена пептида. При этом отрицательный полюс диполя С-концевого домена оказывается погруженным на большую глубину по сравнению с положительным.

3.2.4. Ионные каналы, индуцированные олигомерами амилоидных пептидов

Параграф написан по работам [7а, 23а *Списка основных публикаций автора по теме диссертации*]. Распространенной гипотезой, связывающей нейротоксичность β -амилоидов и их мембранное действие, является предположение о формировании олигомерами β -амилоидов ионных каналов [41,43,118,348] (1.3.2.2). 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. 3.60 показаны одиночные каналы, индуцированные А β П (25-35) в ДОФС:ДОФЭ-мембранах. Видно, что А β П (25-35)-каналы характеризуются многоуровневой проводимостью. Как уже отмечалось в параграфе 1.3.2.3, подсостояния проводимости образованы за счет изменения степени олигомеризации мономеров амилоидного пептида в канале [41, 43, 127, 189, 242, 301]. Следует отметить, что число подуровней проводимости достаточно велико и неконтролируемо в условиях эксперимента. По этой причине анализ влияния дипольных модификаторов мембран на свойства подуровней проводимости А β П (25-35)-каналов представляется весьма затруднительным. Это определило выбор в качестве количественной характеристики для дальнейших исследований величины А β П (25-35)-индуцированного стационарного интегрального трансмембранного тока.

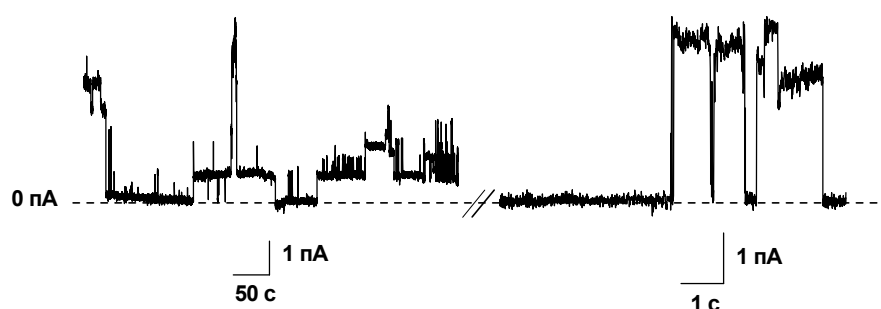


Рис. 3.60. Одиночные ионные каналы, образуемые фрагментом 25-35 β -амилоидного пептида в липидных бислоях из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ. Мембраны омываются раствором 0.1 М КСl при рН 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Нами показано, что добавка флоретина в мембраноомывающие растворы до 20 мкМ вызывает значительный рост стационарного трансмембранного тока, индуцированного А β П (25-35) в ДОФС:ДОФЭ-бислоях (рис. 3.61 А). При этом другие

протестированные дипольные модификаторы, флоретин, генистеин, кверцетин, ТГАФ, RH 237 и RH 421, на I_{∞} практически не влияют. В качестве примера приведен рис. 3.61 Б, иллюстрирующий отсутствие эффекта RH 421. Маркер амилоидных фибрилл тиофлавин Т также не модифицирует мультисекундную активность АβП (25-35) в ДОФС:ДОФЭ-мембранах. Таблица 3.18 суммирует результаты определения среднего отношения стационарного АβП (25-35)-индуцированного трансмембранного тока после и до добавки различных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0) при трансмембранном напряжении 50 мВ.

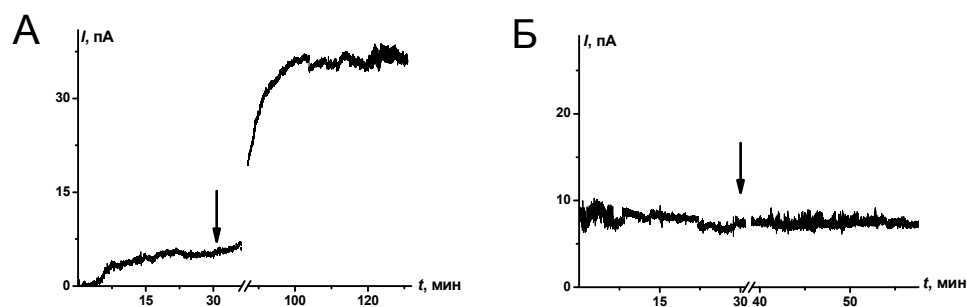


Рис. 3.61. Влияние дипольных модификаторов, флоретина (А) и RH 421 (Б) на стационарный ток, индуцированный фрагментом 25-35 β-амилоидного пептида, в липидных бислоях из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ. Мембраны омываются раствором 0.1 М KCl при pH 7.4. Моменты введения флоретина до 20 мкМ (А) и RH 421 до 5 мкМ (Б) в мембраноомывающие растворы указаны стрелками. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Таблица 3.18. Отношение стационарного трансмембранного тока, индуцированного фрагментом 25-35 β-амилоидного пептида в отрицательно заряженных мембранах после и до добавки различных дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Липидные бислои изготовлены из эквимольной смеси ДОФС:ДОФЭ и омываются 0.1 М KCl при pH 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

дипольный модификатор		I_{∞}/I_{∞}^0
20 мкМ	флоретин	9.7 ± 2.8
	флорицин	1.1 ± 0.1
	генистеин	1.1 ± 0.1
	кверцетин	1.0 ± 0.2
	ТГАФ	1.1 ± 0.1
10 мкМ	тиофлавин Т	1.2 ± 0.1
5 мкМ	RH 421	1.0 ± 0.1
	RH 237	1.2 ± 0.1

Проведено сопоставление эффектов тестируемых модификаторов в отношении каналообразующей активности АβП (25-35) и дипольного потенциала ДОФС:ДОФЭ-бислоев. Абсолютная величина падения дипольного потенциала в присутствии различных флавоноидов уменьшается в ряду флоретин, флорицин, кверцетин, генистеин и ТГАФ

(Таблица 3.1). Добавка в мембраноомывающие растворы стирловых красителей сопровождается ростом дипольного потенциала, причем диполь-модифицирующая способность RH 237 в отношении ДОФС:ДОФЭ-мембран превышает эффективность RH 421 (Таблица 3.5). Маркер амилоидных фибрилл тиофлавин Т практически не влияет на φ_d ДОФС:ДОФЭ-мембран ($\Delta\varphi_d = 0 \pm 5$ мВ). Поскольку в литературе можно обнаружить сведения об изменении дипольного потенциала мембран при адсорбции некоторых амилоидных пептидов [401], нами было проанализировано влияние фрагмента 25-35 β -амилоидного пептида на φ_d . Обнаружено, что пептид не изменяет дипольный потенциал ДОФС:ДОФЭ-бислоев (при концентрации пептида 65 мкМ $\Delta\varphi_d = 0.6 \pm 0.3$ мВ). Сравнение значений I_∞/I_∞^0 и $\Delta\varphi_d$ позволяет говорить об отсутствии корреляции между этими величинами. Следовательно, дипольный потенциал мембраны не является ключевым фактором, определяющим каналобразующую активность амилоидного пептида.

Как отмечалось ранее (1.1.2), дипольные модификаторы мембран способны влиять на каналобразующую активность антимикробных агентов посредством изменения распределения латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности мембраны. Хванг с соавторами [198] связали увеличение времени жизни и стационарного числа открытых грамицидиновых каналов в присутствии генистеина со стабилизацией флавоноидом липидных устьев грамицидиновой поры. Апетрей с соавторами [38] предположили, что изменение каналобразующей активности аламетицина при адсорбции RH 421 на мембране является результатом модификации стирловым красителем эластических свойств мембраны благодаря электростатическому расталкиванию сульфонатных групп. Об увеличении флоретином и близким аналогом кверцетина, мирицетином, объема и давления в гидрофильной области мембраны свидетельствует полиморфный фазовый переход липидов из бислойной в гексагональную фазу в их присутствии (3.1.2.1). Основываясь на том, что изменяющие трансмембранное распределение латерального давления генистеин, кверцетин и RH 421 не оказывают действия на с АβП (25-35)-индуцированный ток, можно сделать заключение, что эффект флоретина не связан с модификацией флавоноидом эластических свойств мембраны изменением.

Поскольку молекула АβП (25-35) имеет положительный заряд, можно думать, что наблюдаемый рост каналобразующей активности пептида при введении флоретина является результатом электростатического взаимодействия АβП (25-35) с отрицательно заряженной формой дипольного модификатора. Для проверки выдвинутого предположения мы провели скрининг амилоидных и амилоидоподобных пептидов и белков, имеющих различный суммарный заряд молекул. В качестве амилоидоподобных

белков нами были использованы BASP1 и GAP-43, а также их фрагменты. GAP-43 и BASP1 являются близкими по своим свойствам нейрональными белками, локализованными на внутренней поверхности плазматической мембраны аксонных окончаний. Установлено, что эти белки образуют олигомерные комплексы, которые по своей структуре и свойствам очень напоминают олигомеры амилоидных белков, в том числе они способны формировать катион-селективные каналы многоуровневой проводимости [7a]. Полученные результаты представлены в Таблице 3.19.

Таблица 3.19. Отношение стационарного трансмембранного тока, индуцированного амилоидогенными пептидами и белками в бислоях, после и до введения в околосмембранные растворы флоретина до 20 мкМ (I_{∞}/I_{∞}^0). Мембраны сформированы из смеси ДОФС:ДОФЭ (50:50 моль %) и ДОФХ:ФИФ₂:Хол (62:33:5 моль %) и омываются 0.1 М KCl при pH 7.4.

пептид/белок	а.к. последовательность	суммарный заряд молекулы	I_{∞}/I_{∞}^0
АβП (25-35) [#]	GSNKGAIIGLM	+1	9.7 ± 2.8
АβП (25-35) [Gly ³⁵] [#]	GSNKGAIIGLG	+1	6.1 ± 2.4
АβП (25-35) [Ala ²⁸] [#]	GSNAGAIIGLM	0	1.3 ± 0.2
АβП (1-42) [#]	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGS NKGAIIGLMVGGVVIA	0	1.6 ± 0.8
пресенилин-1 [#]	QMSEDNHLSTVRSQNDNR	0	1.0 ± 0.1
прион (106-126) [#]	KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG	+3	4.9 ± 3.2
myr-BASP1 (1-13) ^{\$}	myr-GGKLSKKKKGYNV	+5	4.2 ± 3.2
myr-BASP1 (1-19) ^{\$}	myr-GGKLSKKKKGYNVNDEKAK	+5	14.0 ± 7.8
GAP-43 (1-40) ^{\$}	MLCCMRRTKQVEKNDDDQKIEQDGIK PEDKAHKAATKIQA	+1	6.3 ± 3.9
GAP-43-3 ^{\$}	SFRGHITRKCLK...EEREADQEHA	-21	1.3 ± 0.1
BASP1 ^{\$}	myr-GGKLSKKKKG...SDQTVAVKE	-22	1.1 ± 0.1

Из таблицы 3.19 видно, что, аналогично АβП (25-35), флоретин вызывает рост каналобразующей активности положительно заряженных пептидов: АβП (25-35) [Gly³⁵], фрагмента прионного белка ПР (106-126), а также фрагментов нейрональных белков BASP1 и GAP-43, myr-BASP1 (1-13), myr-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 ПС-1, GAP-43 (41-242) и BASP1. Эти результаты указывают на электростатическую природу взаимодействия флоретина с АβП (25-35). В качестве еще одного свидетельства электростатического взаимодействия между АβП (25-35) и флоретином можно привести результаты исследования влияния флоретина на I_{∞} , индуцированный амилоидным пептидом при pH 4.0, т.е. в условиях отсутствия заряженной формы модификатора (< 1%).

В это случае введение флоретина практически не оказывает влияния на каналообразующую активность АβП (25-35) при pH 4.0 (среднее значение I_{∞}/I_{∞}^0 равно 1.8 ± 0.8). Вероятно, электростатическое взаимодействие пептида с модификатором приводит к изменению агрегационного статуса АβП (25-35), а, следовательно, и его каналообразующей активности.

Результаты электронной микроскопии согласуются с предположением о влиянии флоретина на характер агрегации амилоидогенных пептидов. Как видно на рис. 3.62 в отсутствие модификатора АβП (25-35) образует сеть из длинных фибрилл. Введение флоретина блокирует формирование длинных фибрилл, вместо которых наблюдаются более короткие фибриллярные агрегаты.

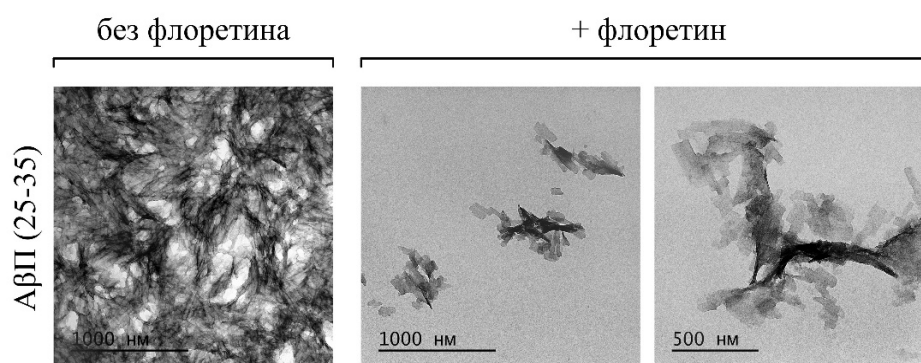


Рис. 3.62. Электронные микрофотографии АβП (25-35)-агрегатов в отсутствие флоретина (левая панель) и в присутствии эквимольного количества флоретина (средняя и правая панели). Инкубация в 10 mM Na-фосфатном буфере при pH 7.3 в течение 2 часов при +37°C. По [23a].

Независимым подтверждением гипотезы о модификации агрегационного статуса амилоидогенных пептидов флоретином могут служить результаты оценки проницаемости одноламеллярных везикул для кальцеина. На рис. 3.63 изображены временные зависимости относительной флуоресценции кальцеина, вытекшего из ПОФХ или ПОФХ:Хол (80:20 моль %) липосом под действием фрагмента 25-35 β-амилоидного пептида, в отсутствие и в присутствии 50 мкМ флоретина в омывающих везикулы растворах. Представленные кривые хорошо аппроксимируются суммой двух экспонент с параметрами t_1 и t_2 , характеризующими "быструю" и "медленную" компоненты утечки, соответственно. Первая скорее обусловлена сорбцией пептида из водного раствора на мембрану, а вторая – его олигомеризацией на поверхности бислоя. Из таблицы 3.20 видно, что флоретин снижает как t_1 , так и t_2 . Последнее свидетельствует, что компенсация положительного заряда пептида флоретином способствует его олигомеризации на бислое.

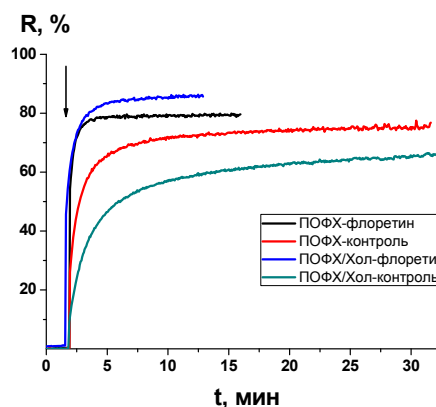


Рис. 3.63. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (R) кальцеина, вытекшего из ПОФХ- или ПОФХ:Хол (80:20 моль %)-липосом, от времени после введения АβП (25-35) (25 мкг/мл) или одновременной добавки АβП (25-35) (25 мкг/мл) и флоретина (50 мкМ). Момент введения указан стрелкой.

Таблица 3.20. Параметры временной зависимости утечки кальцеина из липосом в отсутствие и в присутствии 50 мкМ флоретина в омывающем растворе. Зависимости аппроксимированы суммой двух экспоненциальных функций с характерными временами t_1 и t_2 .

	ПОФХ		ПОФХ:Хол (80:20 моль %)	
	t_1 , мин	t_2 , мин	t_1 , мин	t_2 , мин
контроль	0.31 ± 0.01	3.03 ± 0.09	1.18 ± 0.02	7.97 ± 0.20
флоретин	0.06 ± 0.01	0.75 ± 0.04	0.05 ± 0.01	1.00 ± 0.02

Электростатическое взаимодействие между флоретином и амилодогенным пептидом не может быть единственной причиной роста каналообразующей активности. Исследованные флавоноиды имеют близкие значения pK_a от 7.3 до 7.7 [208, 261; 354, 367] и, следовательно, сходные доли заряженных молекул при pH 7.4. При этом, кроме флоретина, другие флавоноиды не оказывают эффекта в отношении порообразующей способности АβП (25-35). Одной из причин наблюдаемых различий может быть уникальная среди всех протестированных флавоноидов способность флоретина принимать конформацию "скрепки". Наблюдаемая разница параметров амилоид-индуцированной утечки кальцеина из липосом, сформированных без и с участием Хол (Таблица 3.20), также указывает на возможную роль фазовой сегрегации мембраны в каналообразующей активности АβП (25-35).

Недавние биохимические исследования показали, что так как γ -секретаза, осуществляющая процессинг белка-предшественника β -амилоида, локализуется в липидных рафтах, их состав, вероятно, влияет на конформацию и положение АβП в мембране, т.е. на факторы, которые ответственны за его олигомеризацию [283, 442]. Считается, что липидные рафты могут выступать точками концентрации и нуклеации амилоидогенных пептидов [370]. Учитывая, что флоретин способен изменять фазовое

разделение в липидном бислое (3.1.2), можно думать, что его эффект определяется модификацией амилоид-обогащенных доменов. Для проверки этого предположения, с использованием флуоресцентной конфокальной микроскопии гетерогенных липосом было определено число везикул, содержащих твердые упорядоченные домены, до и после добавки пептида. Установлено, что инкубация ПОФХ:СМ (80:20 моль %) липосом с АβП (25-35) (7 мкг/мл) приводит к росту числа везикул с s_o -доменами на 15 % (в отсутствие пептида соответствующая величина равна 80 %). Введение 400 мкМ флоретина к липосомам, обработанным амилоидогенным пептидом, вызывает уменьшение числа гетерогенных везикул на 45 %. Можно думать, что, разрушая упорядоченные области и электростатически взаимодействуя с АβП (25-35), флоретин терминирует агрегацию пептида. При этом образуются олигомеры среднего размера, которые формируют ионные каналы. Предполагаемый механизм действия флоретина на порообразующую способность АβП (25-35) проиллюстрирован на рис. 3.64.

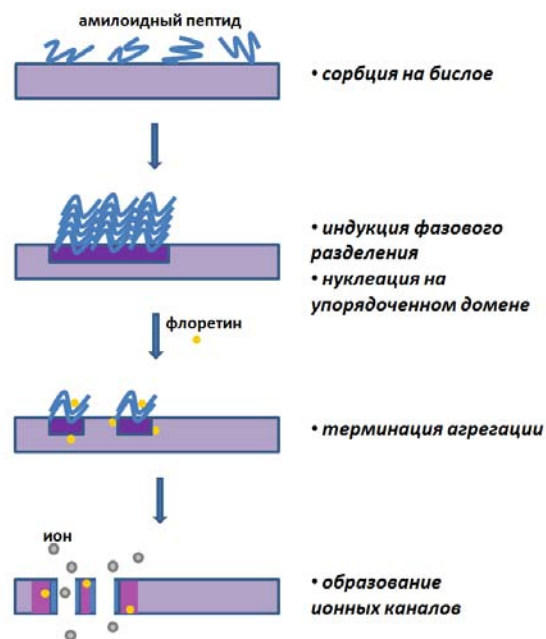


Рис. 3.64. Схематическое представление действия флоретина на мембранную активность амилоидных пептидов.

Таким образом, полученные результаты указывают на ключевую роль электростатических взаимодействий и латеральной гетерогенности липидного бислоя в мембранной активности амилоидных и амилоидоподобных пептидов. Вызываемый флоретином рост порообразующей активности некоторых амилоидогенных белков с одной стороны, и выраженное нейропротекторное действие флавоноида с другой, ставят вопрос о связи нейротоксичности амилоидов с образованием ими ионных каналов в клеточных мембранах.

3.2.5. Одиночная альфа-гемолизиновая пора

Параграф написан по работе [9а *Списка основных публикаций автора*].

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 (1.3.2.3) [166,399].

В 1.4.2.2. было отмечено, что основной интерес исследователей при изучении каналообразующей активности α -гемолизина (α -ГЛ) сосредоточен на механизмах потенциал-чувствительности закрывания образуемых им одиночных пор. Дело в том, что при трансмембранной разности потенциалов более $|100|$ мВ одиночный α -ГЛ канал закрывается (рис. 3.65). При этом проводимость поры падает не до нуля: канал переходит в состояние с малой проводимостью. На рис. 3.66 представлены примеры гистограмм распределения флуктуаций проводимости одиночной α -гемолизиновой поры при $V = 50$ и -150 мВ. Видно, что при $V = 50$ мВ α -ГЛ канал может находиться только в открытом состоянии со средней проводимостью 800 пСм (А), а при $V = -150$ мВ α -ГЛ канал флуктуирует между открытым и закрытым состояниями со средними проводимостями около 1000 и 100 пСм, соответственно (Б).

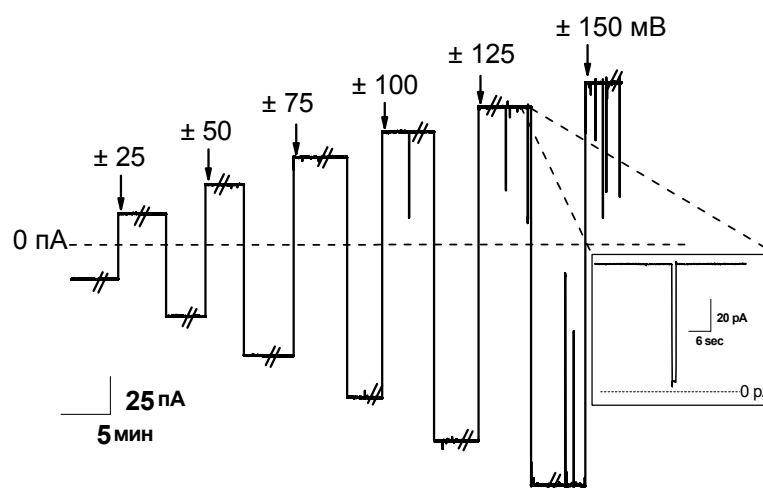


Рис. 3.65. Запись флуктуаций одиночной α -ГЛ поры при различном трансмембранном напряжении. Липидный бислой изготовлен из ДФФХ и омывается 1.0 М раствором KCl при pH 7.5. Стрелками указаны моменты изменения трансмембранной разности потенциалов, величина напряжения указана над стрелками.

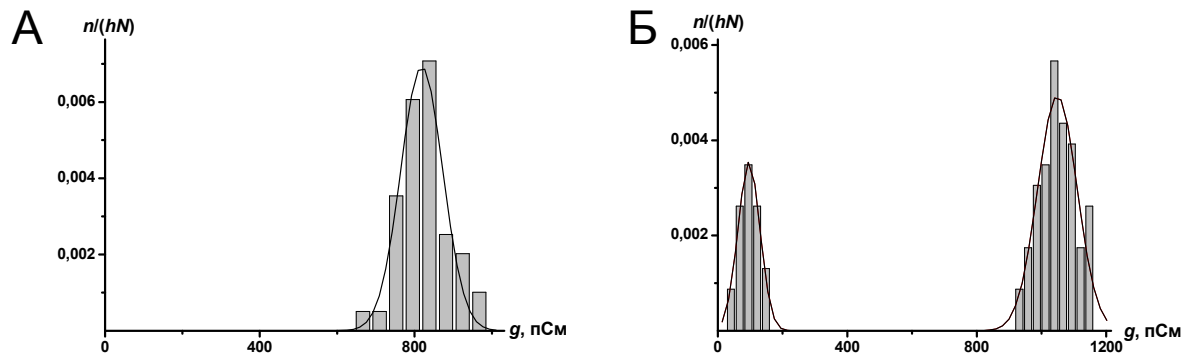


Рис. 3.66. Гистограммы флуктуаций проводимости одиночного α -ГЛ канала. Мембраны сформированы из ДФФХ и омываются 1.0 М раствором KCl при pH 7.5. Трансмембранная разность потенциалов составляет 50 (А) или -150 мВ (Б).

На рис. 3.67 приведены зависимости проводимостей открытого и закрытого состояний α -ГЛ канала от трансмембранного напряжения. Видно, что рост трансмембранного напряжения (от -150 мВ до 150 мВ) сопровождается некоторым падением проводимости открытого состояния канала. Это может быть результатом асимметричного распределения заряда вдоль оси поры, обусловленного асимметрией ее строения (1.3.2.2.). Проводимость закрытого состояния не зависит от трансмембранного напряжения, в диапазоне от -100 до 100 мВ закрывания α -ГЛ поры не наблюдается.

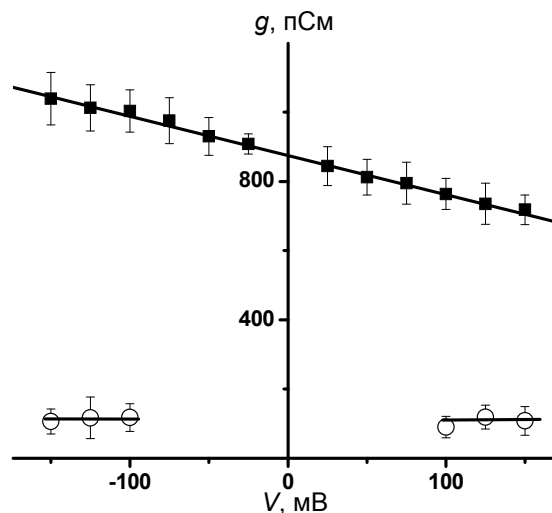


Рис. 3.67. Зависимость проводимости (g) открытого (■) и закрытого (○) состояний одиночной α -ГЛ поры от трансмембранного напряжения (V). Мембраны сформированы из ДФФХ и омываются 1.0 М раствором KCl при pH 7.5.

Нами были проведены измерения катион-анионной селективности открытого и закрытого состояний одиночной α -ГЛ поры. На рис. 3.68 представлен пример определения потенциалов реверсии (V^{rev}) для открытого и закрытого состояний α -ГЛ канала. Видно, что открытое состояние характеризуется высокой анионной избирательностью, в то время как закрытое – катионной. Соответствующие числа переноса анионов составляют для открытого состояния $t^- = 0.70 \pm 0.05$, а для закрытого состояния t^- варьирует в пределах от 0.17 до 0.31. Широкие диапазоны величин проводимости (рис. 3.68) и числа переноса анионов для закрытого состояния, вероятно, обусловлены существованием нескольких закрытых состояний с близкими энергиями. Полученное число переноса анионов для открытого состояния совпадает в пределах погрешности с величинами, определенными в работах Корчева и Менестрина с соавторами [240, 241, 297]. Селективность закрытого состояния в цитируемых работах не определялась.

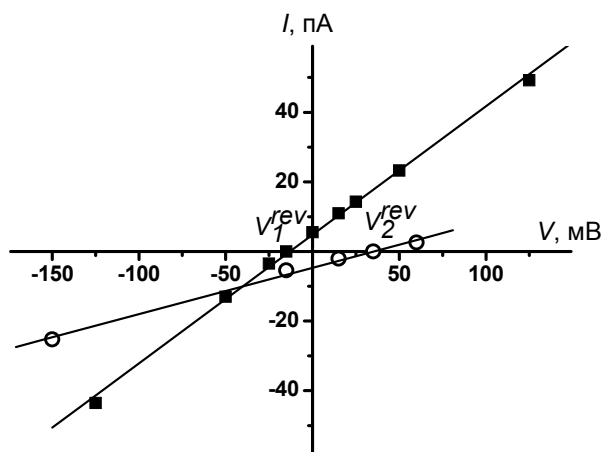


Рис. 3.68. Вольт-амперные характеристики открытого (■) и закрытого (○) состояний одиночной α -ГЛ поры, встроенной в ДФФХ-мембрану при десятикратном градиенте концентрации электролита. Отсекаемые по оси абсцисс отрезки равны потенциалам реверсии (V_1^{rev} и V_2^{rev}) и составляют -12 и 35 мВ для открытого и закрытого состояния, соответственно.

Наблюдаемая инверсия селективности при закрывании поры подразумевает потенциал-индуцированные движения ее воротного механизма, сопровождающиеся заменой положительно заряженных аминокислотных остатков на отрицательные в селективном фильтре канала. Потенциал-зависимость закрывания может обеспечиваться взаимодействием с трансмембранным полем заряженных или полярных аминокислотных остатков, образующих сенсор напряжения канала. Для проверки первого предположения была исследована потенциал-зависимость закрывания одиночной α -ГЛ поры в ДФФХ-мембранах, омываемых разбавленными растворами KCl (0.1 М), т.е. в отсутствие

экранирования зарядов аминокислотных остатков, обращенных в просвет канала и доступных для противоионов электролита. Различий в поведении α -ГЛ канала обнаружено не было. Таким образом, полученные результаты говорят об отсутствии вклада заряженных компонент в потенциал-зависимость закрывания α -ГЛ поры. Это дает основание думать, что ключевую роль играет дипольная составляющая. Чтобы проверить высказанное предположение была исследована каналобразующая активность α -ГЛ канала в присутствии дипольных модификаторов. Результаты измерений показывают, что введение RH 421 (3.1.1.2) или 6-кетохолестанола (1.1.1), увеличивающих дипольный потенциал мембраны, не вызывает каких-либо изменений каналобразующей активности α -ГЛ. Приведенные данные не позволяют говорить о влиянии дипольного потенциала бислоя на потенциал-зависимость закрывания одиночной α -ГЛ поры.

В тоже время, оказалось, что другой дипольный модификатор, флоретин, увеличивает потенциал-чувствительность закрывания α -ГЛ канала. На рис. 3.69 видно, что при всех измеренных трансмембранных напряжениях пора флуктуирует между открытым и закрытым состояниями. Рис. 3.70 демонстрирует примеры гистограмм распределения флуктуаций проводимости α -ГЛ поры при $V = 50$ (рис. 3.70 А) и -150 мВ (рис. 3.70 Б). Сравнение рис. 3.66 А и 3.70 А обнаруживает, что после добавки 20 мкМ флоретина в омывающие мембрану растворы канал может находиться в закрытом состоянии при $V = 50$ мВ, хотя в отсутствие дипольного модификатора закрывания поры при указанном потенциале не наблюдается.

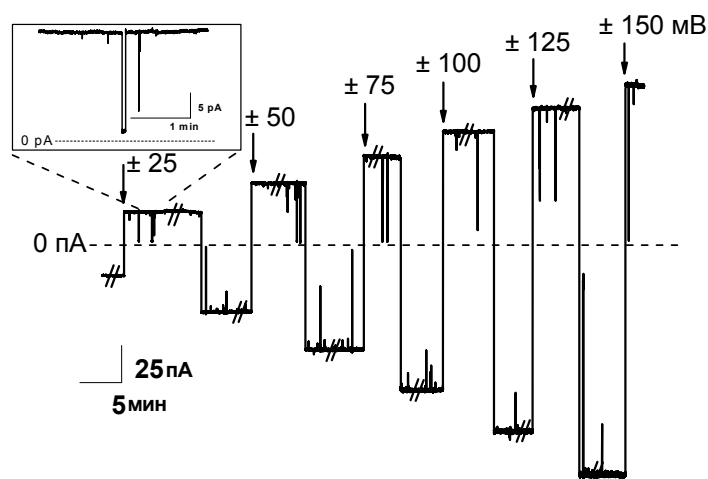


Рис. 3.69. Запись флуктуаций одиночной α -ГЛ поры при различном трансмембранном напряжении в присутствии 20 мкМ флоретина. Липидный бислой изготовлен из ДФФХ и омывается 1 М раствором KCl при pH 7.5. Стрелками указаны моменты изменения трансмембранной разности потенциалов, величина напряжения указана над стрелками.

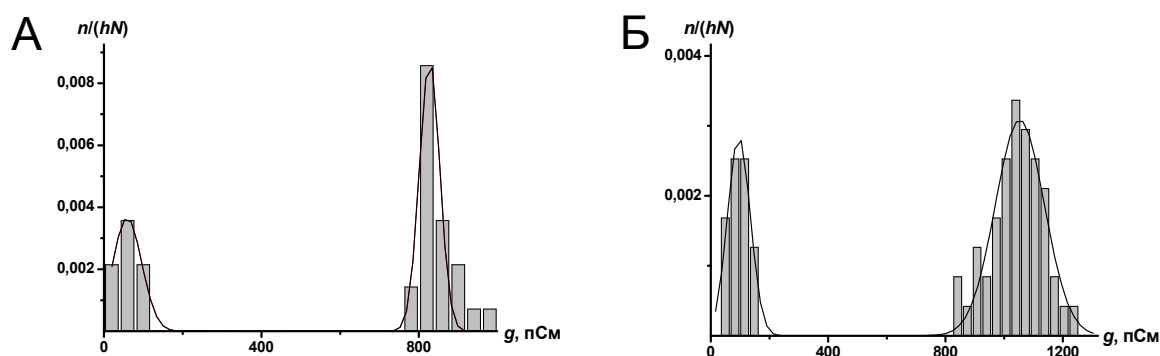


Рис. 3.70. Гистограммы флуктуаций проводимости одиночного α -ГЛ канала в присутствии 20 мкМ флоретина. Мембраны сформированы из ДФФХ и омываются 1 М раствором KCl при pH 7.5. Трансмембранная разность потенциалов составляет 50 (А) или -150 мВ (Б).

На рис. 3.71 представлены зависимости проводимостей открытого и закрытого состояний α -ГЛ канала от трансмембранного напряжения при адсорбции флоретина на мембране.

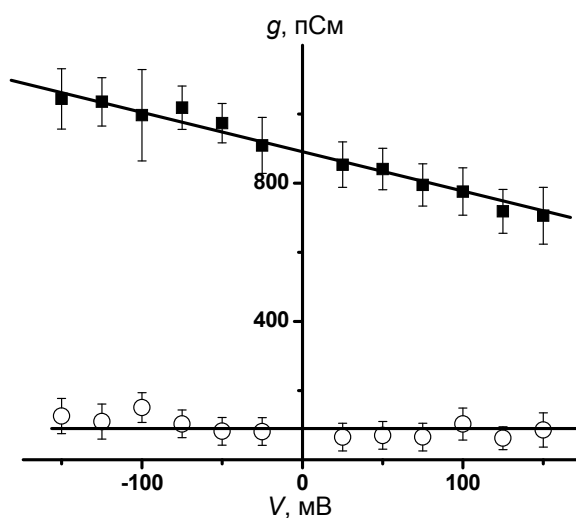


Рис. 3.71. Зависимость проводимости (g) открытого (■) и закрытого (○) состояний одиночной α -ГЛ поры от трансмембранной разности потенциалов (V) при введении в омывающие растворы флоретина до 20 мкМ. Мембраны сформированы из ДФФХ и омываются 1 М раствором KCl при pH 7.5.

Сравнение рис. 3.67 и 3.71 показывает, что флоретин не оказывает влияния на проводимость как открытого, так и закрытого состояния α -ГЛ канала: до и после добавки модификатора проводимости открытого и закрытого состояний, интерполированные к нулевому трансмембранному напряжению, составляют около 900 и 100 пСм, соответственно. В тоже время после введения флоретина закрытое состояние канала

может быть зарегистрировано во всем диапазоне измеренных трансмембранных напряжений в отличие от случая отсутствия дипольного модификатора. Учитывая существенное снижение дипольного потенциала бисюля флоретином (приблизительно на 130 мВ (3.1.1.1)), в его присутствии можно было ожидать уменьшения проводимости открытого анион-селективного состояния и увеличения проводимости закрытого катион-селективного состояния α -ГЛ канала. Следует считать, что отсутствие влияния дипольного потенциала мембраны на проводимость канала связано с практически полным его экранированием водным раствором в поре и полярными аминокислотными остатками, формирующими стенки канала [211, 280].

Результаты, полученные в присутствии других дипольных модификаторов, позволяют прийти к заключению, что эффект флоретина не определяется изменением дипольного потенциала ДФФХ-мембран при его адсорбции. Неизменность проводимости и селективности подсостояний (числа переноса в присутствии флоретина равны $t^- = 0.68$ для открытого состояния и $t^- = 0.24$ для закрытого состояния), а также времени жизни закрытого состояния (1.5 ± 0.5 мс в присутствии и 1.2 ± 0.3 мс в отсутствие дипольного модификатора) при введении флоретина позволяет исключить возможность блокирования поры модификатором. Можно полагать, что флавоноид способен взаимодействовать с сенсором напряжения поры. Для установления стехиометрии связывания было измерено время жизни α -ГЛ канала в открытом состоянии при варьировании концентрации флоретина. На рис. 3.72 представлена зависимость обратного времени жизни α -ГЛ поры в открытом состоянии от концентрации халкона в двулогарифмическом масштабе. Коэффициент наклона линейного участка роста указанной зависимости равен числу молекул флоретина, взаимодействующих с одиночной α -ГЛ порой (m). Значение m составляет 3 ± 1 (рис. 3.72). Следовательно, на 7 протомеров, формирующих α -ГЛ канал (1.4.2.2.), приходится 3 молекулы модификатора. Одна молекула флоретина может образовывать водородные связи с двумя соседними протомерами. Для того, чтобы определить, какие гидроксильные группы флавоноида участвуют в образовании связей были проведены измерения потенциал-чувствительности закрывания одиночной α -ГЛ поры после введения других флавоноидов: генистеина, кверцетина, мирицетина, таксифолина, катехина, даидзеина, генистина, флорицина, биоханина А и ТГАФ. Результаты измерений представлены в Таблице 3.21.

Видно, что добавка даидзеина, генистина, флорицина, биоханина А и ТГАФ в мембраноомывающие растворы не влияет на потенциал-чувствительность закрывания одиночной α -ГЛ поры. В тоже время, генистеин, кверцетин, мирицетин, таксифолин и катехин увеличивают потенциал-чувствительность закрывания канала аналогично

флоретину. Исследование стехиометрии взаимодействия этих флавоноидов с α -ГЛ порой показывает, что число молекул, связывающихся с одиночным каналом варьирует от 3 до 5 (рис. 3.73). Полученные результаты хорошо согласуются с величиной m для флоретина (рис. 3.72).

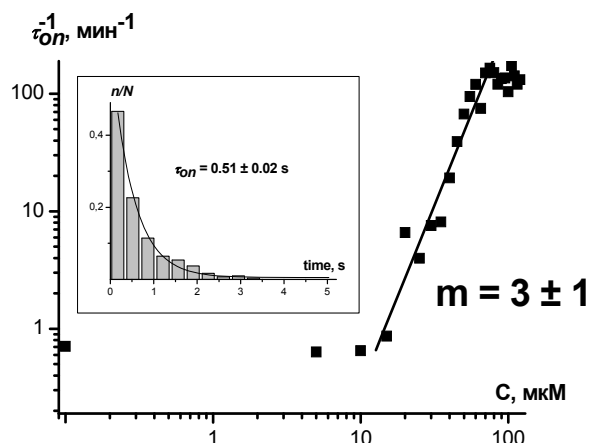


Рис. 3.72. Зависимость обратного времени жизни α -ГЛ поры в открытом состоянии (τ_{on}^{-1}) от концентрации флоретина (C). Липидные бислои изготовлены из ДФФХ и омываются 1 М раствором KCl при pH 7.5. Трансмембранное напряжение составляет -100 мВ. Коэффициент наклона линейного участка роста характеризует число молекул флоретина, взаимодействующих с одиночной α -ГЛ порой (m). Вставка: гистограмма распределения времени пребывания α -ГЛ канала в открытом состоянии в присутствии 60 мкМ флоретина в омывающих растворах.

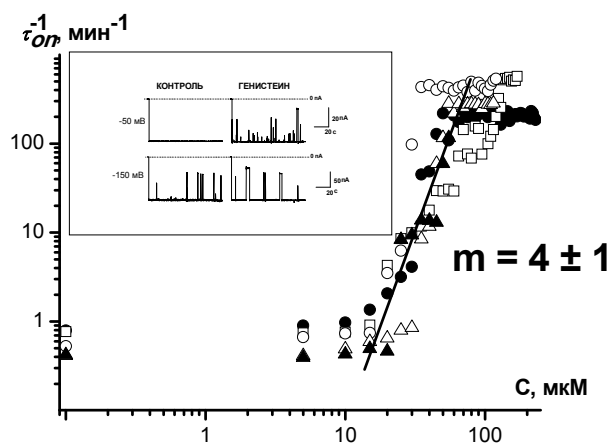


Рис. 3.73. Зависимость обратного времени жизни α -ГЛ поры в открытом состоянии (τ_{on}^{-1}) от концентрации (C) генистеина ($\bullet$), таксифолина ($\blacktriangle$), мирицетина ($\square$), кверцетина ($\circ$) и катехина (Δ). Липидные бислои изготовлены из ДФФХ и омываются 1 М раствором KCl при pH 7.5. Трансмембранное напряжение составляет -100 мВ. Коэффициент наклона линейного участка роста характеризует число молекул флавоноида, взаимодействующих с одиночной α -ГЛ порой (m). Вставка: запись флуктуаций одиночной α -ГЛ поры при различном трансмембранном напряжении до и после введения 20 мкМ генистеина.

Таблица 3.21. Потенциал-чувствительность одиночной α -ГЛ поры в присутствии различных флавоноидов.

флавоноид	концентрация, мкМ ^Ω	$ V $, мВ [#]
—	—	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	

Ω – для флавоноидов, увеличивающих потенциал-чувствительность закрывания α -ГЛ канала (флоретин, генистеин, кверцетин, мирицетин, таксифолин и катехин) указана пороговая концентрация; для неактивных (даидзеин, генистин, флорицин, биоханин А и ТГАФ) – максимальная из тестируемых.

– минимальная абсолютная величина трансмембранного напряжения, при котором наблюдается закрывание α -ГЛ поры.

Анализ структур флавоноидов (Таблица 1.1, 1.2.1.1) и их эффектов на каналобразующую активность α -ГЛ (Таблица 3.21) позволил выявить ОН-группы, образующие водородные связи с сенсором напряжения канала: гидроксилы в 5-ом положении А-цикла и в 4'-ом положении В-цикла. Учитывая, что все флавоноиды, увеличивающие потенциал-чувствительность закрывания α -ГЛ-поры, также гидроксильрованы в 7-ом положении А-цикла, участие этой гидроксильной группы в связывании с каналом исключить нельзя. Отсутствие эффекта у больших по размеру гликозидов (генистин и флорицин) и короткого полифенола (ТГАФ) указывает на ключевую роль расстояния между взаимодействующими с протомерами гидроксильными. Проведенный анализ известных структур белков, комплексированных с различными 5-ОН и 4'-ОН-гидроксильрованными флавоноидами, позволил нам определить расстояние между этими гидроксильными группами как 0.83 ± 0.05 нм [23, 162, 192, 281, 303, 320, 340, 386, 430, 448, 456, 457]. С учетом длин двух водородных связей, расстояние между аминокислотными остатками, связывающими одну молекулу флавоноида, составляет около 1.1 нм. Согласно литературным данным закрывание α -ГЛ канала включает

конформационные перестройки в глицин-обогащенном участке со стороны *транс*-устья канала и(или) в области сужения поры между "шляпкой" и "ножкой" (1.3.2.2) [305, 399]. Проанализировав структуру α -гемолизинового канала [399], мы определили расстояние между идентичными полярными аминокислотными остатками (Asn, Gln, Ser, Tyr и Thr) соседних протомеров в указанных участках (106–116, 142–152, 122–133) и выявили потенциальные места связывания. Оказалось, что расстояние между аминокислотными остатками в глицин-богатом регионе, например, между Thr₁₂₉ соседних протомеров составляет около $1.1 \div 1.2$ нм, что делает этот участок наиболее подходящим кандидатом на роль сенсора напряжения α -ГЛ канала, с которым могут связываться 5- и 4'-гидроксилированные флавоноиды (рис. 3.74). Можно думать, что собственный дипольный момент молекул флавоноида суммируется с дипольным моментом сенсора напряжения, в результате чего последний реагирует на меньшее по абсолютной величине трансмембранное напряжение по сравнению с контролем и канал закрывается. При этом конформационные перестройки могут включать «скручивание» β -слоев, образующих "ножку" поры, что затрагивает область сужения между «ножкой» и «шляпкой». В результате, в селективном фильтре α -ГЛ канала происходит экспонирование противоположно заряженных аминокислотных остатков, приводящее к инверсии катион-анионной селективности.

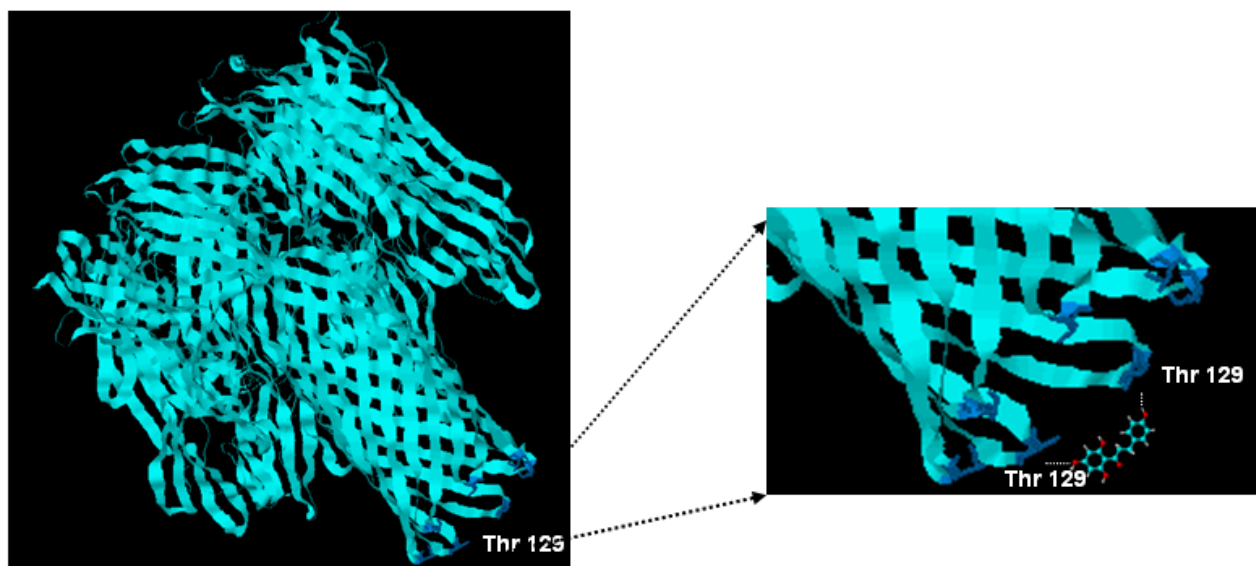


Рис. 3.74. Гипотетическая модель взаимодействия флоретина с Thr₁₂₉ (аминокислотные остатки выделены синим цветом). Голубые ленты представляют полипептидные цепи протомеров α -ГЛ.

Представленные в параграфе данные позволяют заключить:

- 1) Установлено, что при потенциал-зависимом закрывании альфа-гемолизинного канала происходит инверсия катион-анионной избирательности.
- 2) Дипольный потенциал мембраны не оказывает влияния на проводимость альфа-гемолизинной поры, что является результатом его компенсации водным раствором в поре и полярными аминокислотными остатками, образующими "стенки" канала.
- 3) 5-, 7- и 4'-гидроксилированные флавоноиды увеличивают потенциал-чувствительность альфа-гемолизинной поры при связывании с ней в стехиометрическом соотношении 3:1.
- 4) Полученные результаты указывают на локализацию сенсора напряжения альфа-гемолизинного канала в глицин-богатом регионе с цитоплазматической стороны бета-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(1.3.3). Интерес к полиеновым антибиотикам, в первую очередь, 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. [104,383]. Современные фармацевтические подходы направлены на снижение токсичности полиеновых макролидов за счет включения в состав лекарственного препарата липидных компонент [426]. Точная архитектура формируемых полиеновыми антимицотиками пор, также 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. В зависимости от того, введен ли антибиотик с обеих или только с одной стороны мембраны, полиены способны формировать два различных типа каналов: симметричные и асимметричные, соответственно.

3.2.6.1. Симметричные полиеновые каналы

Подпараграф написан по работам [11а, 12а, 13а, 17а, 20а, 21а, 22а, 27а *Списка основных публикаций автора по теме диссертации*].

В этой части работы приводятся результаты сравнительного исследования влияния различных дипольных модификаторов на симметричные полиеновые каналы.

а) одиночные полиеновые каналы

В бислойных липидных мембранах ионные каналы, образованные амфотерицином Б (АМБ) при симметричной добавке, демонстрируют многоуровневую проводимость с одним наиболее вероятным подсостоянием. На рис. 3.75 показаны одиночные АМБ каналы в модельных мембранах, сформированных из ДФФХ и Хол (33 моль %), в отсутствие и в присутствии дипольных модификаторов в околосмембранных растворах при $V = 200$ мВ. Видно, что введение флавоноидов, флоретина и кверцетина, вызывает уменьшение, а стирилпиридиновых красителей, RH 160, RH 237 и RH 421, – увеличение амплитуды одиночных АМБ-каналов.

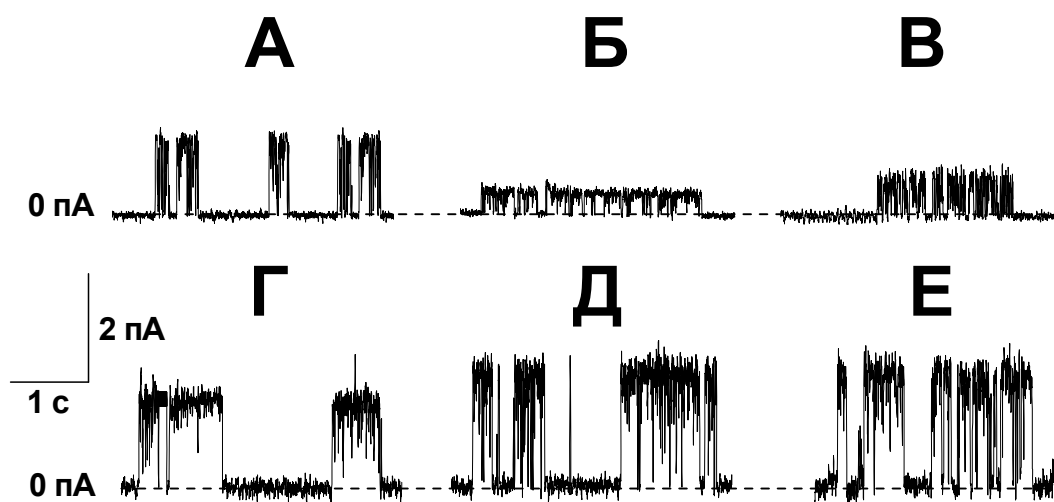


Рис. 3.75. Одиночные АМБ-каналы в отсутствие дипольных модификаторов (А), в присутствии 20 мкМ флоретина (Б), 20 мкМ кверцетина (В), 5 мкМ RH 160 (Г), 5 мкМ RH 237 (Д) или 5 мкМ RH 421 (Е). Липидные бислои изготовлены из ДФФХ:Хол (67:33 моль %) и омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Штриховые линии соответствуют закрытому состоянию АМБ-каналов. Трансмембранное напряжение составляет 200 мВ.

На рис. 3.76 представлены зависимости проводимости одиночных АМБ-каналов в Хол- и Эрг-содержащих мембранах от трансмембранного напряжения до и после добавки дипольных модификаторов. Проводимости АМБ-каналов, интерполированные к нулевому трансмембранному напряжению, равны 6.8 ± 0.5 пСм для ДФФХ:Хол-мембран и 7.1 ± 0.5 пСм для ДФФХ:Эрг-бислоев. На этом основании можно сделать вывод об отсутствии зависимости проводимости АМБ-каналов от вида мембранообразующего стерина. Введение флоретина в омывающие бислои растворы до 20 мкМ вызывает уменьшение $g_{V=0}$ приблизительно в 3 и 2 раза в случае ДФФХ:Хол-мембран и ДФФХ:Эрг-бислоев, соответственно. Добавка кверцетина приводит к падению $g_{V=0}$ в 2 раза в случае ДФФХ:Хол-мембран и практически не оказывает влияния на проводимость АМБ-каналов в ДФФХ:Эрг-бислоях. Введение в омывающие растворы стироловых красителей до 5 мкМ вызывает увеличение $g_{V=0}$ в мембранах, включающих как Хол, так и Эрг. При этом в ряду RH 160, RH 237 и RH 421 проводимость возрастает.

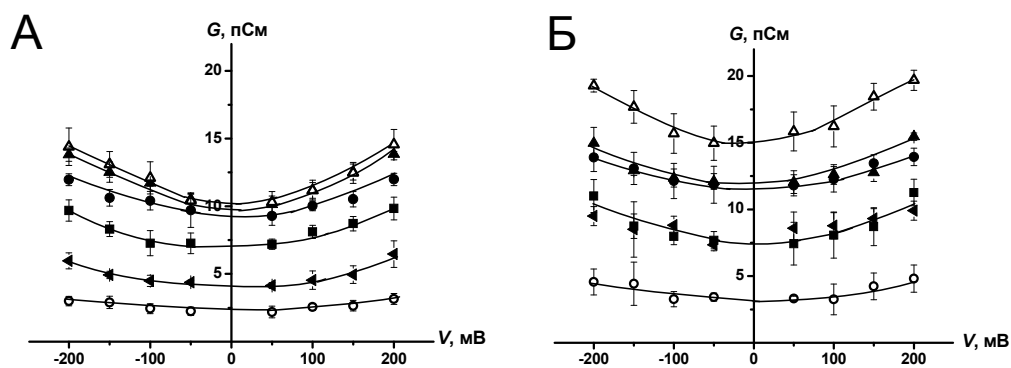


Рис. 3.76. Зависимость проводимости АМБ-каналов от трансмембранного напряжения до (■) и после введения дипольных модификаторов: 20 мкМ флоретина (○), 20 мкМ кверцетина (◄), 5 мкМ RH 160 (●), 5 мкМ RH 237 (▲) или 5 мкМ RH 421 (Δ). Липидные бислои изготовлены из ДФФХ:Хол (67:33 моль %) (А) и ДФФХ:Эрг (67:33 моль %) (Б) и оmyваются 2.0 М растворами KCl при pH 7.0.

Следует отметить, что другие флавоноиды, в частности, флорицин, генистеин, генистин, биоханин А и ТГАФ, практически не изменяют проводимости АМБ-каналов. Результаты исследования влияния различных дипольных модификаторов на проводимость одиночных АМБ-каналов резюмированы в Таблице 3.22.

Таблица 3.22. Отношение проводимостей одиночных АМБ-каналов до и после добавки различных дипольных модификаторов при $V = 50$ мВ. Липидные бислои изготовлены из ДФФХ:Хол (67:33 моль %) и ДФФХ:Эрг (67:33 моль %) и оmyваются 2.0 М растворами KCl при pH 7.0.

дипольный модификатор		мембранообразующий раствор	
		ДФФХ:Хол	ДФФХ:Эрг
флавоноид	флоретин	3.30 ± 0.21	2.20 ± 0.41
	флорицин	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10
	кверцетин	1.72 ± 0.21	0.95 ± 0.15
	генистеин	0.98 ± 0.09	—
	генистин	0.96 ± 0.08	—
	биоханин А	0.89 ± 0.11	—
	ТГАФ	0.91 ± 0.15	—
стириловый краситель	RH 421	0.69 ± 0.07	0.49 ± 0.06
	RH 237	0.71 ± 0.08	0.61 ± 0.05
	RH 160	0.80 ± 0.09	0.63 ± 0.06

Сравнение величин, приведенных в таблице 3.22 и таблицах 3.2, 3.3 и 3.7 (3.1.1), показывает, что, несмотря на некоторую наблюдаемую корреляцию, изменение дипольного потенциала стерин-содержащих мембран не может быть единственным фактором, определяющим изменения проводимости АМБ-каналов при введении дипольных модификаторов. Можно думать, что некоторые дипольные модификаторы непосредственно взаимодействуют с каналобразующими молекулами (АМБ и стеринами).

Известно, что полиен-стериновые комплексы, формирующие поры в мембране, стабилизированы ван-дер-ваальсовыми силами [321]. Сила ван-дер-ваальсового взаимодействия зависит от параллельности и компланарности молекул. Это может определять зависимость энергии комплекса «полиен-стерин» от структурной геометрии липидного микроокружения. Как уже отмечалось в 1.3.3, полиеновая и стериновая молекулы ориентируются друг относительно друга за счет формирования водородных связей между гидроксильной группой стерина и аминсахаром полиена. В случае Эрг двойные связи в стероидном ядре и боковой цепи могут взаимодействовать с полиеновым фрагментом АМБ (посредством π - π -электронных взаимодействий) и таким образом служить дополнительными ориентационными факторами [53]. Хол содержит только одну двойную связь в стероидном ядре и поэтому образует менее стабильный комплекс с АМБ (рис. 1.34). Эти факторы позволяют ожидать различное взаимодействие дипольных модификаторов с АМБ-Эрг и АМБ-Хол комплексами.

На рис. 3.77 представлена зависимость времени жизни одиночных АМБ-каналов от концентрации стерина в мембранообразующем растворе. Видно, что время жизни АМБ-каналов увеличивается с увеличением концентрации стерина в мембране. Согласно Старку-Петерковичу и др. [405] зависимость дипольного потенциала мембраны от концентрации Хол немонотонна: ϕ_d увеличивается в диапазоне концентраций стерина от 0 до 35 моль %, максимум изменения ϕ_d наблюдается при концентрации 35-45 моль %, а дальнейшее увеличение концентрации стерина приводит к падению дипольного потенциала. Этот факт не позволяет связать наблюдаемое увеличение времени жизни АМБ-каналов с изменениями дипольного потенциала мембраны при увеличении концентрации Хол.

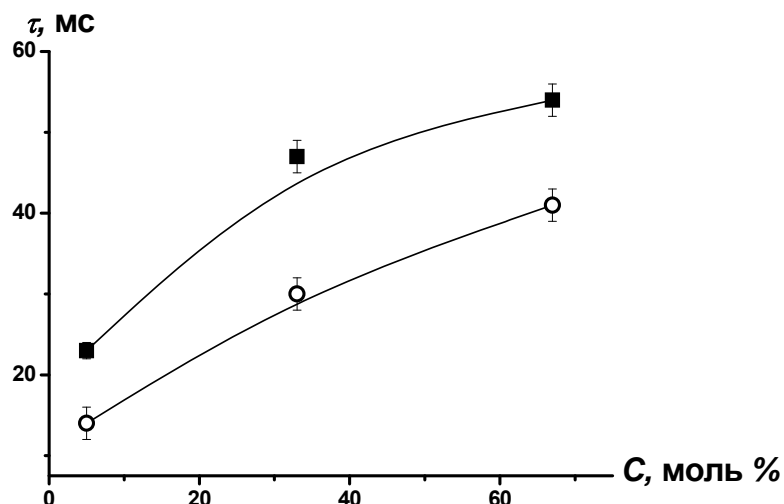


Рис. 3.77. Зависимость среднего времени жизни АМБ-каналов (τ) от концентрации Хол (■) и Эрг (○) в ДФФХ:стерин (67:33 моль %) мембранах. Бислои омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0.

Учитывая, что увеличение концентрации стерина в мембране сопровождается конденсацией бислоя [358, 385], альтернативным объяснением может быть изменение текучести стерин-содержащих мембран, что в свою очередь влияет на ассоциацию (диссоциацию) двух полупор, образующих симметричный АМБ-канал. Кроме того, на рис. 3.77 видно, что время жизни АМБ-каналов в Хол-содержащих мембранах больше, чем в Эрг-содержащих бислоях. Эти данные согласуются с тем, что АМБ вызывает конденсацию Хол-содержащих мембран, в то время как полиеновый антибиотик практически не влияет на упорядоченность Эрг-содержащих бислоев [109, 155, 329].

В таблице 3.23 представлены результаты измерения проводимости и времени жизни одиночных АМБ-каналов в других стерин-содержащих ДФФХ-мембранах. Известно, что 6-кетохолестанол (6-КХ) увеличивает, а 7-кетохолестанол (7-КХ) уменьшает дипольный потенциал мембраны [405]. Из Таблицы 3.23 видно, что проводимость одиночных АМБ-каналов не зависит от концентрации 6-КХ в мембране, ее величина значимо уменьшается только при введении 67 моль % 7-КХ. Поскольку, согласно данным Старка-Петерковича и соавторов [405], 6-КХ более эффективно увеличивает дипольный потенциал бислоев, чем 7-КХ его уменьшает, то влияние кетопроизводных холестерина на проводимость одиночных АМБ-каналов не может являться результатом изменения дипольного потенциала мембраны при их введении, а, скорее, обусловлено их взаимодействием с АМБ.

Таблица 3.23. Зависимость проводимости при нулевом трансмембранном потенциале, $g_{V=0}$, и среднего времени жизни АМБ-каналов, τ , от концентрации различных стерина в ДФФХ-мембранах. Бислои оmyваются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0.

концентрация стерина, моль %	параметр	стерин		
		6-КХ	7-КХ	Андр
33	$g_{V=0}$, пСм	7.0 ± 0.5	8.0 ± 1.0	11.5 ± 1.0
	τ , мс	23 ± 3	15 ± 2	15 ± 3
67	$g_{V=0}$, пСм	7.0 ± 1.0	4.0 ± 0.8	18.0 ± 1.0
	τ , мс	38 ± 5	37 ± 5	37 ± 3

Молекула 5 α -андростан-3 β -ола (Андр) характеризуется полностью насыщенным стероидным ядром и отсутствием боковой углеводородной цепи (рис. 2.1). Отсутствие гидрофобной цепи может сказываться на локализации стерина в мембране: Андр может располагаться ближе к границе раздела фаз мембрана-раствор, чем другие стерина, и существенно влиять на дипольный скачок потенциала в этой области. Поскольку, как и в случае стироловых красителей (рис. 3.76), проводимость одиночных АМБ-каналов увеличивается с ростом концентрации Андр, можно предположить, что Андр увеличивает дипольный потенциал фосфолипидных бислоев. В пользу этого предположения свидетельствует увеличение стационарной K^+ -нонактин-индуцированной проводимости мембраны, содержащей 67 моль % 5 α -андростан-3 β -ола, при ее обработке 8.7 мМ метил- β -циклодекстрина. Поскольку метил- β -циклодекстрин экстрагирует стерин из мембраны [405], увеличение проводимости мембраны для катионов означает снижение дипольного потенциала мембраны при уменьшении концентрации стерина.

Анализируя Таблицу 3.23 также можно заметить, что время жизни АМБ-каналов увеличивается с ростом концентрации 6-КХ, 7-КХ или Андр в бислое, как и в случае Хол или Эрг (рис. 3.77). Причем, среднее время жизни АМБ-каналов в мембранах, включающих 6-КХ, 7-КХ или Андр, несколько меньше, чем в Хол-содержащих мембранах. Эти данные согласуются с результатами Смондырева и Берковица [395], которые показали, что из-за сдвига кето-производных холестерина в полярную область, упорядоченность бислоев, их включающих, меньше, чем содержащих Хол. Благодаря отсутствию гидрофобной боковой цепи, аналогичный сдвиг можно предположить и в случае Андр.

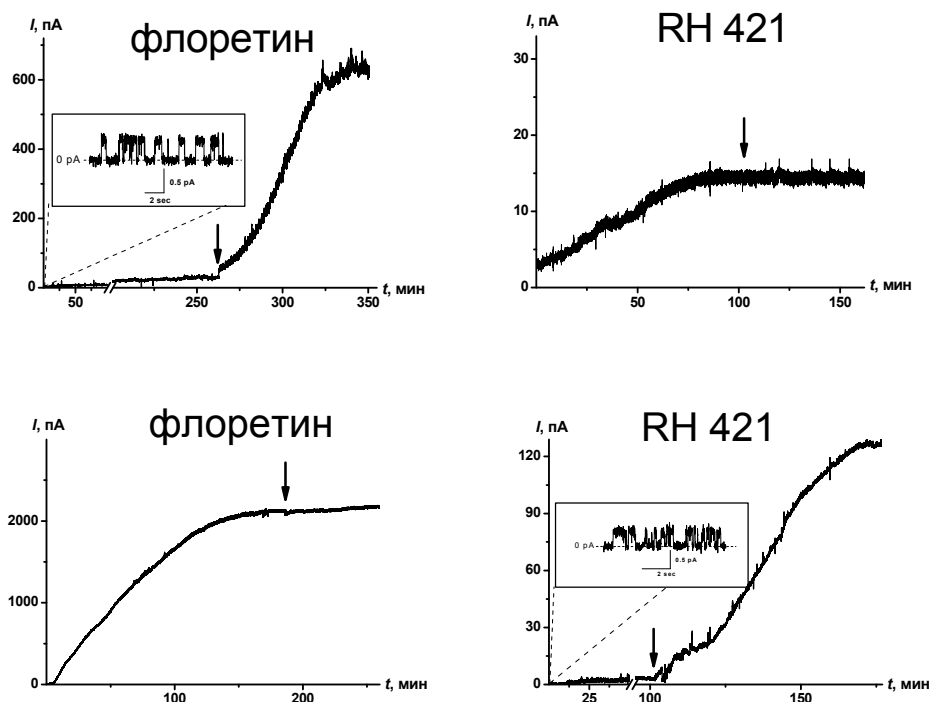


Рис. 3.78. Изменение стационарного АМБ-индуцированного трансмембранного тока под действием дипольных модификаторов. Липидные бислои из ДФФХ:Хол (67:33 моль %) (верхняя панель) и ДФФХ:Эрг (67:33 моль %) (нижняя панель) и омываются 2.0 М растворами KCl при pH 7.0. Моменты добавки в околосмембранные растворы флоретина до концентрации 20 мкМ (левая панель) или RH 421 до концентрации 5 мкМ (правая панель) указаны стрелками. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Скорее всего, благодаря участию своих полярных или заряженных 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 стеринной молекулами. Очевидно, что в этом случае основное значение имеют конформация и ориентация молекул модификаторов в бислое. Так, флоретин, погружаясь в полярную область мембраны и принимая конформацию «шпильки» [419], может исполнять роль медиатора между полиеновой и стеринной молекулами, участвовать в сети водородных связей и стабилизировать менее выгодный с энергетической точки зрения АМБ-Хол комплекс. Последнее выражается в увеличении каналообразующей активности полиенового антибиотика в Хол-содержащих мембранах после введения флоретина. Можно предположить колокализацию RH 421 с комплексом АМБ-Эрг, обусловленную промежуточной плоскостью адсорбции этого красителя среди тестируемых. Близкая к нормали ориентация RH 421 [332] предполагает участие его полиенового фрагмента в π - π -электронных взаимодействиях в АМБ-Эрг комплексе.

Таблица 3.24. Среднее отношение стационарного АМБ-индуцированного макроскопического тока в Хол- и Эрг-включающих ДФФХ-мембранах после и до введения дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Липидные бислои изготовлены из ДФФХ:Хол (67:33 моль %) или ДФФХ:Эрг (67:33 моль %) и омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ. Концентрация флавоноидов и стирилпиридиновых красителей в околосмембранных растворах составляет 20 и 5 мкМ, соответственно.

дипольный модификатор		мембранообразующий раствор	
		ДФФХ:Хол	ДФФХ:Эрг
флавоноид	флоретин	11.0 ± 2.9	0.8 ± 0.1
	флорицин	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2
	кверцетин	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.1
	мирицетин	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1
	генистеин	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1
	генистин	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2
	биоханин А	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1
	ТГАФ	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
стириловый краситель	RH 421	1.1 ± 0.1	15.2 ± 6.1
	RH 237	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.1
	RH 160	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.2

- *варьирование вида стерина*

Главное отличие молекулы Эрг от Хол заключается в двух дополнительных двойных связях в 7-м и 22-м положениях (рис. 2.1). Для установления влияния структурных особенностей молекулы стерина на взаимодействие дипольных модификаторов с полиен-стериновыми комплексами, нами исследована порообразующая способность АМБ в липидных бислоях, содержащих 7-дегидрохолестерин (ДХол) и стигмастерин (Стигм), которые отличаются от Хол только одной двойной связью в 7-м или 22-м положении, соответственно (рис. 2.1). Результаты измерений представлены в Таблице 3.25.

Таблица 3.25. Среднее отношение стационарного АМБ-индуцированного макроскопического тока в ДФФХ-мембранах, включающих 33 мол % ДХол или Стигм, после и до введения в околосмембранные растворы флоретина до 20 мкМ или RH 421 до 5 мкМ (I_{∞}/I_{∞}^0). Липидные бислои омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

состав мембраны	флоретин	RH 421
ДФФХ:Стигм	5.3 ± 3.1	1.1 ± 0.1
ДФФХ:ДХол	1.7 ± 0.3	1.2 ± 0.1

Показано, что добавка флоретина вызывает бóльший рост стационарного АМБ индуцированного трансмембранного тока, протекающего через ДФФХ:Стигм-бислои, чем в случае ДФФХ:ДХол-мембран. При этом RH 421 практически не влияет на I_{∞}/I_{∞}^0 через ДФФХ:ДХол или ДФФХ:Стигм-бислои. Качественное совпадение эффектов дипольных модификаторов на активность полиенового антибиотика в этих мембранах и в бислоях, включающих Хол, и их принципиальное отличие от ДФФХ:Эрг-мембран (Таблица 3.24), доказывает сходство геометрии АМБ-Хол, АМБ-Стиг и АМБ-ДХол комплексов. Полученные результаты указывают на то, что обе двойные связи в 7-м и 22-м положениях влияют на силу взаимодействия между стериновой и полиеновой молекулами, и отсутствие хотя бы одной из них существенно дестабилизирует АМБ-стериновые комплексы.

- *варьирование вида макролидного полиенового антибиотика*

Необходимость определения ответственных за эффекты структурных особенностей всех участников взаимодействия потребовало изучения влияния дипольных модификаторов на каналобразующую активность других полиеновых антибиотиков, нистатина (НС) и филипина (ФЛ). Как отмечено в 1.3.3, НС отличается от АМБ отсутствием одной двойной связи в середине полиенового фрагмента. Последнее должно отразиться на π - π -электронных взаимодействиях в полиен-стериновом комплексе. В отличие от АМБ и НС, молекула ФЛ не включает аминокислотного остатка. Отсутствие основного гидрофильного фрагмента у полиеновой молекулы должно сказаться как на локализации антибиотика в мембране, так и на его способности формировать водородные связи со стериновой молекулой. Результаты исследования влияния дипольных модификаторов на каналобразующую активность НС и ФЛ в стерин-содержащих бислоях резюмированы в Таблице 3.26.

Таблица 3.26. Среднее отношение стационарного макроскопического тока, индуцированного НС или ФЛ в ДФФХ-мембранах, включающих 33 мол % Хол или Эрг, после и до введения дипольных модификаторов (I_{∞}/I_{∞}^0). Липидные бислои изготовлены из ДФФХ:Хол (67:33 моль %) или ДФФХ:Эрг (67:33 моль %) и омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансmemбранное напряжение составляет 50 мВ. Концентрация флавоноидов и стирилтиридинового красителя к околomембранным растворам составляет 20 и 5 мкМ, соответственно.

полиен	состав мембраны	флоретин	кверцетин	RH 421
НС	ДФФХ:Хол	5.1 ± 1.4	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	ДФФХ:Эрг	3.8 ± 0.7	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
ФЛ	ДФФХ:Хол	2.2 ± 0.7	11.0 ± 4.1	1.0 ± 0.1
	ДФФХ:Эрг	2.8 ± 0.8	10.4 ± 3.1	1.1 ± 0.1

Видно, что флоретин вызывает увеличение НС-индуцированного тока независимо от вида мембранообразующего стерина, в то время как кверцетин и RH 421 на каналобразующую активность НС не влияют. В отношении модифицированных ФЛ мембран эффективны оба флавоноида, причем кверцетин вызывает более существенный рост тока по сравнению с флоретином. Как и в случае НС, влияния RH 421 на каналобразующую активность ФЛ не наблюдается. Способность флоретина стабилизировать НС- и ФЛ-стериновые комплексы и ее отсутствие у RH 421 указывает на сходство этих комплексов с АМБ-Хол. Однако, на каналобразующую активность НС, ФЛ (Таблица 3.26) и АМБ (Таблица 3.24) по-разному влияет кверцетин. Это может указывать на различную локализацию полиен-стериновых комплексов в мембране.

- *варьирование вида фосфолипида*

Как было отмечено в 1.4.2.2, в литературе доминирует стерин-зависимая модель мембранной активности макролидных полиеновых антибиотиков. Несмотря на ряд косвенных свидетельств в пользу возможности взаимодействия полиеновых антибиотиков с фосфолипидами [51, 151, 300, 409], влияние последних на порообразующую способность полиенов изучено слабо.

На рис. 3.79 и в Таблице 3.27 представлены результаты исследования действия дипольных модификаторов на каналобразующую активность АМБ в мембранах, включающих различные фосфолипиды.

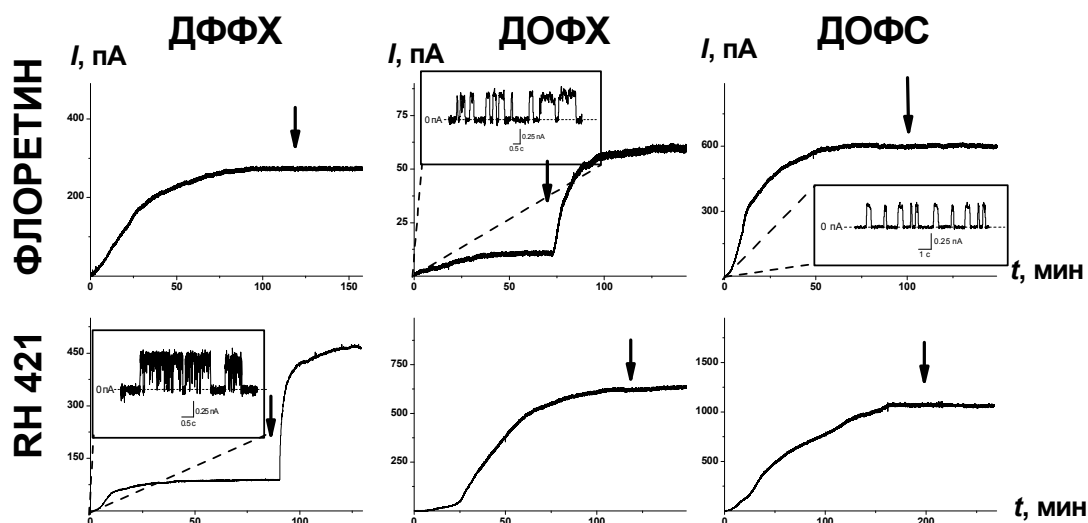


Рис. 3.79. Изменение стационарного АМБ-индуцированного трансмембранного тока под действием дипольных модификаторов. Мембраны изготовлены из смеси фосфолипидов (указаны над соответствующими треками) и Эрг (67:33 моль %) и омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Моменты введения флоретина до концентрации 20 мкМ (верхняя панель) или RH 421 до концентрации 5 мкМ в омывающие растворы (нижняя панель) отмечены стрелками. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Таблица 3.27. Среднее отношение стационарного трансмембранного тока, индуцированного АМБ в различных фосфолипидных бислоях, включающих 33 моль % Эрг, после и до введения 20 мкМ флоретина или 5 мкМ RH 421 (I_{∞}/I_{∞}^0). Мембраны омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

дипольный модификатор	мембранообразующий фосфолипид					
	ДФФХ	ДФФС	ПОФХ	ДОФХ	ДОФЭ	ДОФС
флоретин	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	12.2 ± 9.6	3.9 ± 2.5	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
RH 421	15.2 ± 6.1	42 ± 23	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1

Видно, что флоретин вызывает рост стационарного АМБ-индуцированного тока через бислои, содержащие ПОФХ или ДОФХ, а RH 421 – ДФФХ или ДФФС. На АМБ модифицированные мембраны, включающие другие фосфолипиды, флоретин и RH 421 не действуют. С учетом того, что молекулы ДФФХ, ДФФС, ДОФЭ и ДОФС характеризуются конической, а ДОФХ и ПОФХ – цилиндрической формой [62, 366], можно предположить, что последние по форме лучше соответствуют относительно жесткой «палочкообразной» молекуле АМБ. Можно думать, что сильное взаимодействие АМБ-ДОФХ(ПОФХ) ослабляет взаимодействие АМБ-Эрг. По всей вероятности, молекулы флоретина способны стабилизировать подобные комплексы. Стерическое несоответствие между молекулой АМБ и фосфолипидами, склонными к образованию неламеллярных структур (ДФФХ,

ДФФС, ДОФЭ и ДОФС), ослабляет их взаимодействие с АМБ и, существенной дестабилизации АМБ-Эрг комплекса не происходит. По всей вероятности, фосфолипиды с разветвленными ацильными хвостами (ДФФХ и ДФФС) практически не взаимодействуют с АМБ и не влияют на стабильность АМБ-Эрг комплекса, с которым связывается RH 421.

- *варьирование вида сфинголипида*

В литературе можно обнаружить лишь ограниченные и косвенные свидетельства взаимодействия между полиенами и сфинголипидами. В частности, Загер продемонстрировал, что полиеновые антибиотики влияют на содержание в плазматической мембране фосфолипидов и церамидов [469]. Нажиэк с соавторами показали, что дрожжевые клетки мутантного штамма, дефицитные по сфинголипидам, более восприимчивы к АМБ, чем клетки дикого типа [318]. Приведенные данные указывают на актуальность изучения влияния сфинголипидов на порообразующую способность АМБ.

Нами установлено, что флоретин приблизительно в два раза увеличивает стационарный АМБ-индуцированный трансмембранный ток, протекающий через ДФФХ:Эрг:СФС-бислои (Таблица 3.28). RH 421 обладает сходной способностью, но в отношении ДФФС:Эрг:СФС-мембран.

Таблица 3.28. Среднее отношение стационарного трансмембранного тока, индуцированного АМБ в различных фосфолипидных бислоях, включающих 27 моль % Эрг и 20 моль % СФС, после и до введения 20 мкМ флоретина или 5 мкМ RH 421 (I_{∞}/I_{∞}^0). Мембраны омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

состав мембраны	дипольный модификатор	
	флоретин	RH 421
ДФФХ:Эрг:СФС	2.3 ± 1.4	1.0 ± 0.1
ДФФС:Эрг:СФС	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.4
ПОФХ:Эрг:СФС	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.3
ДОФХ:Эрг:СФС	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
ДОФЭ:Эрг:СФС	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
ДОФС:Эрг:СФС	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1

При замене фосфолипидной (Таблица 3.28) или сфинголипидной (Таблица 3.29) составляющих в указанных смесях увеличения I_{∞}/I_{∞}^0 в присутствии дипольных модификаторов не наблюдается. Полученные результаты говорят о влиянии

сфинголипидов на межмолекулярные взаимодействия "полиен-стерин" и "полиен-фосфолипид". Различия между эффектами сфинголипидов могут быть обусловлены их структурной геометрией. Отсутствие фосфохолина в составе полярных голов дигидроцерамидов (СФС и СЭС) определяет их форму в виде инвертированных конусов в отличие от цилиндрического СМ. Наличие дополнительной гидроксильной группы в молекуле СФС может обеспечивать больший вклад в сеть водородных связей между молекулами полиена и стерина по сравнению с СЭС.

Таблица 3.29. Среднее отношение стационарного трансмембранного тока, индуцированного АМБ в различных сфинголипид-содержащих бислоях, включающих 53 моль % ДФФС и 27 моль % Эрг, после и до введения 20 мкМ флоретина или 5 мкМ RH 421 (I_{∞}/I_{∞}^0). Мембраны омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

состав мембраны	дипольный модификатор	
	флоретин	RH 421
ДФФС:Эрг:СЭС	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2
ДФФС:Эрг:СМ	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1

Следует отметить, что наблюдаемые различия в эффектах дипольных модификаторов в отношении стерин- и сфинголипид-содержащих бислоев, модифицированных полиенами, не исключают возможности влияния всех участников взаимодействия на латеральную гетерогенность мембраны.

В заключение следует подчеркнуть, 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

Подпараграф написан по работам [20а, 22а, 27а *Списка основных публикаций автора по теме диссертации*].

Как уже отмечалось (1.3.3), в зависимости от способа введения полиеновые макролиды способны формировать два совершенно различных типа каналов [235]. Например, стационарный трансмембранный ток, вызванный односторонней добавкой нистатина, достигается в течение нескольких минут, а при добавлении НС с обеих сторон бислоя достижение стационара по току требует нескольких часов (рис. 3.78). От способа введения антибиотика зависит и его пороговая концентрация, требуемая для достижения макроскопической мембранной проводимости. Более того, способ введения полиенового макролида определяет селективность каналов [68, 235, 285]. Перечисленные факты делают актуальной постановку вопроса о различии и общности механизмов регуляции симметричных и асимметричных полиеновых каналов.

Рис. 3.80 демонстрирует изменения стационарного трансмембранного тока, индуцированного введением НС с *цис*-стороны ДОФХ:Хол:СМ-бислоев, после двустороннего введения различных дипольных модификаторов. Как видно, флоретин, биоханин А, флорицин, мирицетин и RH 421 вызывают увеличение стационарного нистатинового тока, в то время как даидзеин, катехин, ТГАФ и RH 237 не влияют на I_{∞} . Таблица 3.30 суммирует полученные результаты и представляет отношение трансмембранных токов после и до добавки различных модификаторов. Увеличение НС-индуцированного тока также наблюдается в присутствии кверцетина, таксифолина и генистеина.

Следует отметить, что в заданных условиях (состав мембраны, концентрация электролита в омывающем растворе, pH и т.п.) одиночные флуктуации асимметричных НС-каналов не разрешимы. Известно, что протонирование COO^- -группы молекулы НС способствует стабилизации асимметричных НС-пор [44]. Поэтому для установления канальной природы трансмембранного тока были проведены измерения каналообразующей активности НС в холестерин-содержащих бислоях при низких pH околосмембранных растворов.

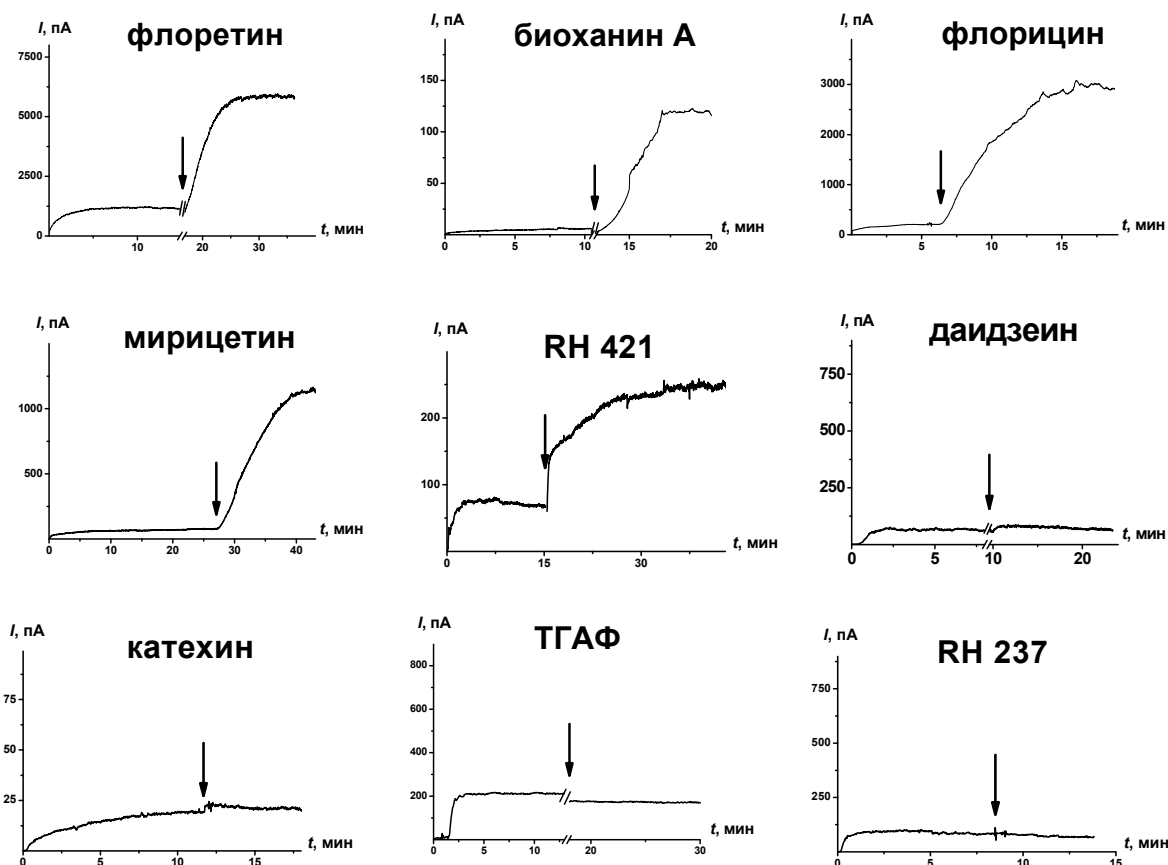


Рис. 3.80. Влияние двустороннего введения различных дипольных модификаторов на стационарный макроскопический трансмембранный ток, индуцированный цис-добавкой нистатина. Стрелки указывают моменты введения 20 мкМ флоретина, флорицина, биоханина А, мирицетина, даидзеина, катехина, ТГАФ или 5 мкМ RH 421 и RH 237. Мембраны сформированы из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 моль %) и омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

На рис. 3.81А видно, что при pH 2.5 флуктуации одиночных НС-каналов в ДОФХ:Хол:СМ-бислоях хорошо различимы. В подтверждение того, что в физиологических условиях НС также образует каналы, был исследован спектр шума НС-индуцированного тока при pH 7.0. Спектр, представленный на рис. 3.81Б, имеет предел на низких частотах и характеризуется падением спектральной плотности с увеличением частоты. Подобная (лоренцевская) форма спектра характерна для токов, являющихся результатом функционирования ионных каналов в мембране. При этом, спектры шумов, обусловленных функционированием в мембране переносчиков ионов или транспортом гидрофобных ионов, характеризуются независимостью спектральной плотности от частоты или ее увеличением на высоких частотах [237].

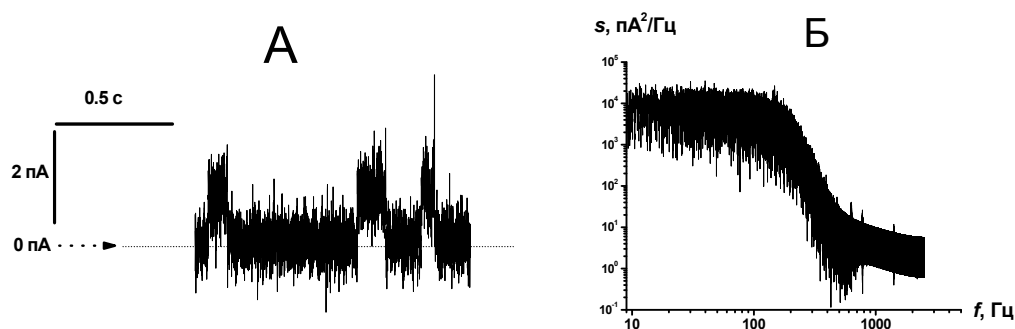


Рис. 3.81. (А) – Флуктуации тока, соответствующие открыванию/закрыванию одиночных НС каналов. Мембрана сформирована из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 моль %) и омывается 3.0 М раствором KCl при pH 2.5. Трансмембранное напряжение составляет 100 мВ. (Б) – Спектральная плотность шума, генерируемого НС-каналами. Мембрана сформирована из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 моль %) и омывается 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ. Концентрация НС в околосмембранном растворе с цис-стороны бислоя составляет 20 мкМ. Частота дискретизации усилителя 5 кГц.

Таблица 3.30. 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 моль %) и омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ. Концентрация флавоноидов и стирилпиридиновых красителей в околосмембранных растворах составляет 20 и 5 мкМ, соответственно.

дипольный модификатор	I_{∞}/I_{∞}^0
флоретин	$3 \div 46$
флорицин	$4 \div 210$
биоханин А	5 ± 120
мирицетин	$4 \div 270$
кверцетин	$19 \div 41$
таксифолин	$6 \div 250$
генистеин	$2 \div 6$
даидзеин	1
катехин	1
ТТАФ	1
RH 237	1
RH 421	$4 \div 93$

- влияние дипольного потенциала бислоя

На рис. 3.82 А показана зависимость стационарного макроскопического НС-индуцированного тока от трансмембранного напряжения. Видно, что проводимость мембраны зависит от знака разности потенциалов: положительное напряжение инициирует значительно больший по величине трансмембранный ток, чем отрицательное. Клейнберг и Финкельштейн [235] также наблюдали подобную зависимость открывания каналов, формируемых при одностороннем введении НС, от знака приложенной разности потенциалов. Это может быть обусловлено взаимодействием полиенового диполя с трансмембранным электрическим полем (рис. 3.82 Б). По данным Жуба с Багинским, положительный полюс диполя АМБ глубже погружен в липидный бислой по сравнению с отрицательным полюсом [109]. Можно предположить, что приложение положительного трансмембранного напряжения (плюс со стороны введения антибиотика) будет способствовать погружению полиеновых диполей в бислой и последующему образованию каналов. Сходным образом на формировании полиеновых каналов должно отразиться уменьшение дипольного потенциала мембраны (т.е. положительного потенциала внутри углеводородного кора). Тем не менее, предположение о том, что дипольный потенциал играет ключевую роль в регуляции проводимости, индуцированной односторонней добавкой нистатина, не подтверждается с учетом роста тока в присутствии RH красителей, которые увеличивают дипольный потенциал мембраны (3.1.1.2).

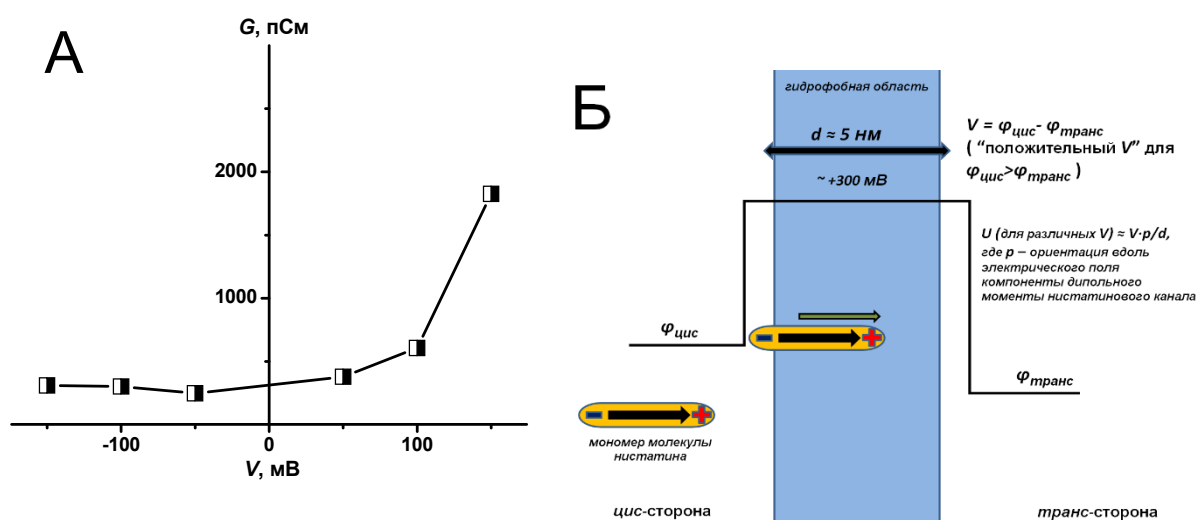


Рис. 3.82. (А) – Зависимость НС-индуцированного стационарного тока от трансмембранного напряжения. Мембрана сформирована из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 моль %) и омывается 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. (Б) – Схематическое представление взаимодействия диполя НС с трансмембранным электрическим полем. Рисунок предоставлен Е.Г. Чулковым.

- *эффекты фазового разделения в мембране*

Наличие латеральной гетерогенности у мембран, сформированных с участием холестерина и сфингомиелина [439], осложняет интерпретацию полученных результатов. Учитывая неравномерное распределение полиеновых антибиотиков в гетерогенных мембранах [86], эффект дипольных модификаторов на НС-индуцированный ток может быть опосредован влиянием последних на фазовое разделение в бислое. С целью проверки этого предположения было изучено действие флоретина, биоханина А и мирицетина на латеральную организацию гигантских одноламеллярных везикул, предварительно обработанных НС. Рис. 3.83 представляет собой микрофотографии обработанных НС липосом, образованных из ДОФХ:Хол:СМ, в отсутствие и в присутствии тестируемых модификаторов. Видно, что в присутствии нистатина липосомы содержат неокрашенные домены неправильной формы, которые следует отнести к твердокристаллической липидной фазе (см. 2.4) (рис. 3.83 А). Введение флоретина и биоханина А приводит к исчезновению неокрашенных доменов (рис. 3.83 Б, В). При этом мирицетин практически не оказывает влияния на фазовое разделение в бислое (рис. 3.83 Г). Сходные результаты получены при изучении влияния дипольных модификаторов на латеральную гетерогенность липидных бислоев, модифицированных АМБ.

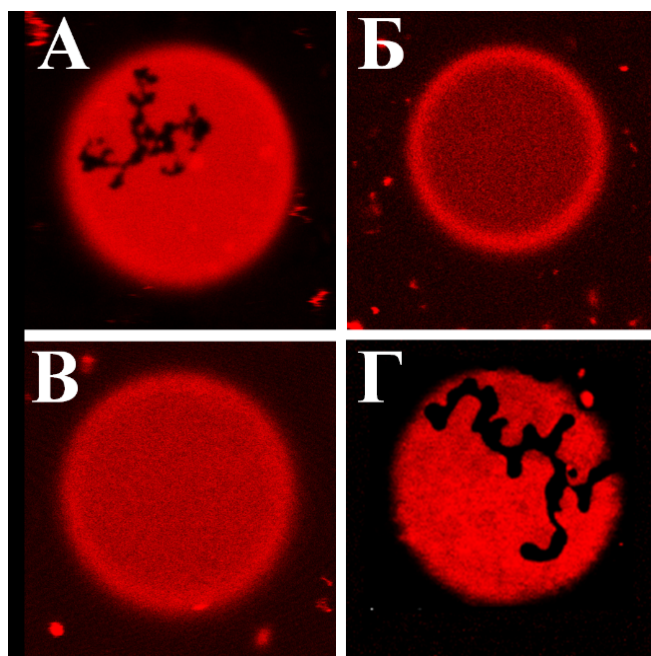


Рис. 3.83. Микрофотографии гигантских однослойных липосом, сформированных из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 моль %) и обработанных 200 мкМ НС. (А) – в отсутствие дипольных модификаторов (контроль); в присутствии в липосомной суспензии 400 мкМ флоретина (Б); биоханина А (В) или мирицетина (Г). Размер каждой микрофотографии равен 26×26 мкм.

Статистическое описание полученных результатов дано на рис. 3.84, который представляет собой диаграмму распределения липосом с видимым фазовым разделением в отсутствие и в присутствии дипольных модификаторов. Рис. 3.84 (*контроль*) показывает, что приблизительно 80 % липосом, обработанных 200 мкМ НС, содержат твердокристаллические домены (s_o). Добавка 400 мкМ флоретина или биоханина А вызывает уменьшение числа гетерогенных липосом на 50 и 30 %, соответственно (рис. 3.84 *флоретин*, *биоханин А*). В присутствии 400 мкМ мирицетина число липосом, характеризующихся фазовой сегрегацией, мало отличается от контрольного значения (рис. 3.84 *мирицетин*). Сравнение данных, представленных на рис. 3.84 и в Таблице 3.30 показывает, что корреляции между влиянием указанных модификаторов на латеральную гетерогенность обработанных НС однослойных везикул и каналобразующую активность полиенового антибиотика в плоских липидных бислоях не наблюдается.

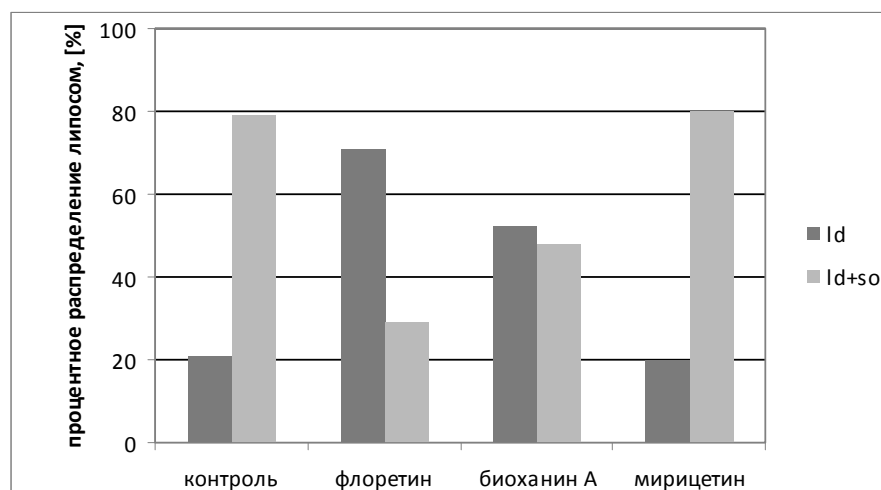


Рис. 3.84. Диаграмма распределения липосом с видимым фазовым разделением в отсутствие (*контроль*) и в присутствии различных дипольных модификаторов, флоретина, биоханина А или мирицетина в концентрации 400 мкМ в суспензии. Липосомы сформированы из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 моль %) и обработаны 200 мкМ НС.

- *влияние кривизны транс-монослоя*

Поскольку толщина бислоя (~ 4 нм) превышает длину полиеновой молекулы (~ 2 нм), в случае одностороннего введения антибиотика можно ожидать, что часть трансмембранной поры образована мембранными липидами. Подобная модель строения канала предполагает, что решающую роль в формировании поры должна играть кривизна липидного монослоя, противоположного модифицированному полиеном [62, 130, 276, 291, 396]. Чтобы проверить это предположение, цилиндрический ДОФХ в составе мембран был заменен на ДОФЭ, имеющий форму инвертированного конуса [238].

Формирование липидного устья полиеновой поры предполагает его положительную кривизну. На этом основании можно ожидать уменьшения каналообразующей активности НС в мембранах, включающих ДОФЭ. Действительно, пороговая концентрация антибиотика, требуемая для инициации макроскопического трансмембранного тока в ДОФЭ-содержащих бислоях в 10 раз выше, чем в случае мембран, включающих ДОФХ. Эти результаты в свою очередь дают основание предполагать, что введение мембранотропных амфифильных соединений, увеличивающих кривизу *транс*-монослоя, будет способствовать увеличению каналообразующей активности НС. Результаты, приведенные на рис. 3.85, хорошо согласуются с предложенным сценарием. Видно, что добавка модификаторов с *цис*-стороны не приводит к росту мембранной проводимости, тогда как *транс*-введение флорицина, биоханина А, мирицетина или RH 421 инициирует увеличение НС-индуцированного стационарного тока. В подтверждение вышесказанного, установлено, что мицеллообразующий мембраноактивный агент, TX-100, вызывает рост каналообразующей активности НС.

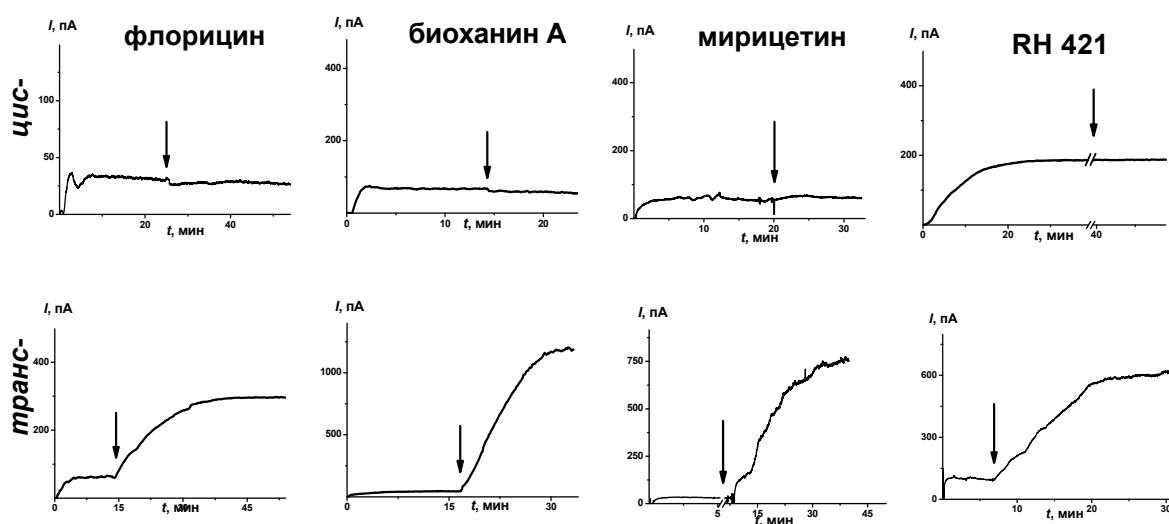


Рис. 3.85. Влияние одностороннего введения различных дипольных модификаторов на стационарный трансмембранный ток, индуцированный *цис*-добавкой нистатина. Верхняя и нижняя панели отвечают введению модификаторов в омывающий раствор с *цис*- или *транс*-стороны бислоя, соответственно. Стрелки указывают моменты введения в околомембранные растворы флорицина, биоханина А, мирицетина до 20 мкМ, или RH 421 до 5 мкМ. Мембраны сформированы из ДОФХ:Хол:СМ (57:33:10 моль %) и омываются 2.0 М раствором KCl при pH 7.0. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

Предлагаемая модель действия модификаторов, увеличивающих полиен-индуцированный ток, схематически изображена на рис. 3.86.

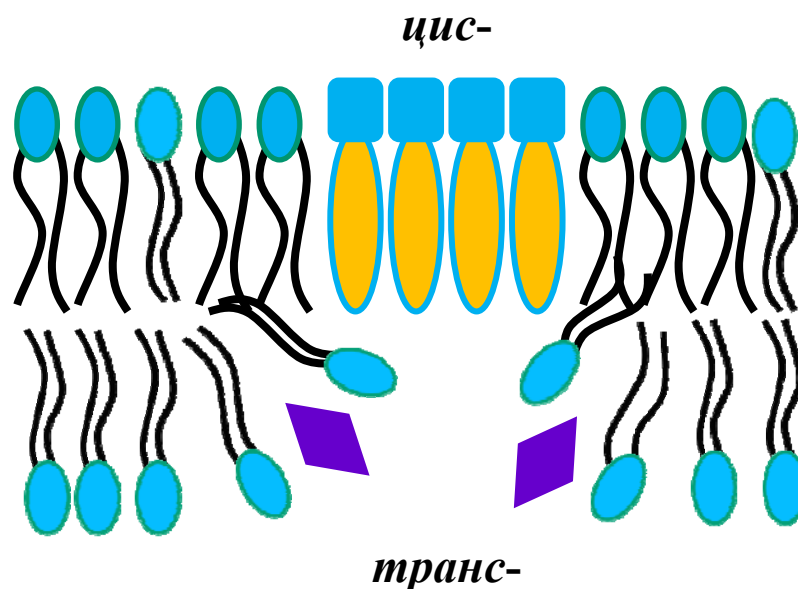


Рис. 3.86. Схематическое представление механизма действия дипольных модификаторов на формирование липидного устья НС-поры. Модификаторы способствуют образованию липидного устья полиеновой поры.

Можно полагать, что флавоноиды, усиливающие стационарный НС-индуцированный ток, способны увеличивать объем гидрофильной области мембраны и уменьшать работу образования липидного устья полиеновых пор. Как показано в 3.1.2.1, флоретин, биоханин А и мирицетин (ближайший аналог кверцетина) способны индуцировать переход липидов из бислоевой в гексагональную фазу, характеризующуюся высокой положительной кривизной (3.1.2). Генистеин приводит к увеличению проницаемости липосомных мембран для флуоресцентной метки (3.1.3), что свидетельствует о его значительном погружении в область полярных голов мембранных липидов. Отсутствие кето-группы в молекуле катехина по сравнению с таксифолином, вероятно, приводит к изменению взаимного расположения колец «А» и «С», и влияет на взаимодействие флавоноида с бислоем. Отсутствие чувствительности НС-индуцированного трансмембранного тока к ТГАФ может быть обусловлено его относительно небольшим размером. Отличие эффектов RH 421 и RH 237 можно объяснить разной глубиной погружения красителей в мембрану [332].

В настоящее время внимание фармацевтического производства сосредоточено на липосомных лекарственных формах полиеновых макролидов. Считается, что они обладают меньшей токсичностью. Это послужило причиной тестирования совместного действия полиеновых макролидов и дипольных модификаторов на проницаемость липосом. В этой части работы использовали большие одноламеллярные везикулы, нагруженные кальцеином (2.6).

На рис. 3.87 А представлена зависимость утечки флуоресцентного маркера от концентрации НС в отсутствие и в присутствии флоретина, биоханина А, кверцетина, катехина и даидзеина. Видно, что проницаемость ДОФХ:Хол-мембран в присутствии флоретина выше, чем в случае липосом, обработанных только полиеновым антибиотиком. Можно заметить, что пороговая концентрация НС после добавки флоретина уменьшается от 5 до 1 мкМ. Введение остальных флавоноидов не оказывает подобного эффекта. Аналогичные результаты были получены и для другого полиенового макролида, АМБ (рис. 3.87 Б). Следует отметить, что в отсутствие диполь-модифицирующих агентов пороговая концентрация АМБ на порядок ниже, чем НС. Полученные сведения хорошо согласуются с результатами сравнения терапевтической и токсической активности этих антибиотиков [222].

Молекулы флоретина легко проникают через бислои [441]. Благодаря небольшому объему внутри липосом, концентрации флавононоида внутри и снаружи везикул быстро выравниваются. Таким образом, флоретин достигает внутреннего (*транс*-) монослоя мембраны липосом, увеличивает объем его гидрофильной области и способствует формированию полиеновых пор (рис. 3.88). В отличие от флоретина, в физиологических условиях кверцетин не проникает через бислои [313], а, следовательно, не может оказывать влияния на образование липидного устья полиеновых пор. По всей вероятности, плоские и жесткие молекулы биоханина А также не способны преодолеть мембрану и оказаться во внутрилипосомном растворе. Уменьшение утечки кальцеина в присутствии биоханина А может быть результатом диссипации градиента флуорофора в результате разжижения липидного бислоя. Как и ожидалось, катехин и даидзеин эффекта на утечку кальцеина из везикул под действием полиеновых антибиотиков не оказывают.

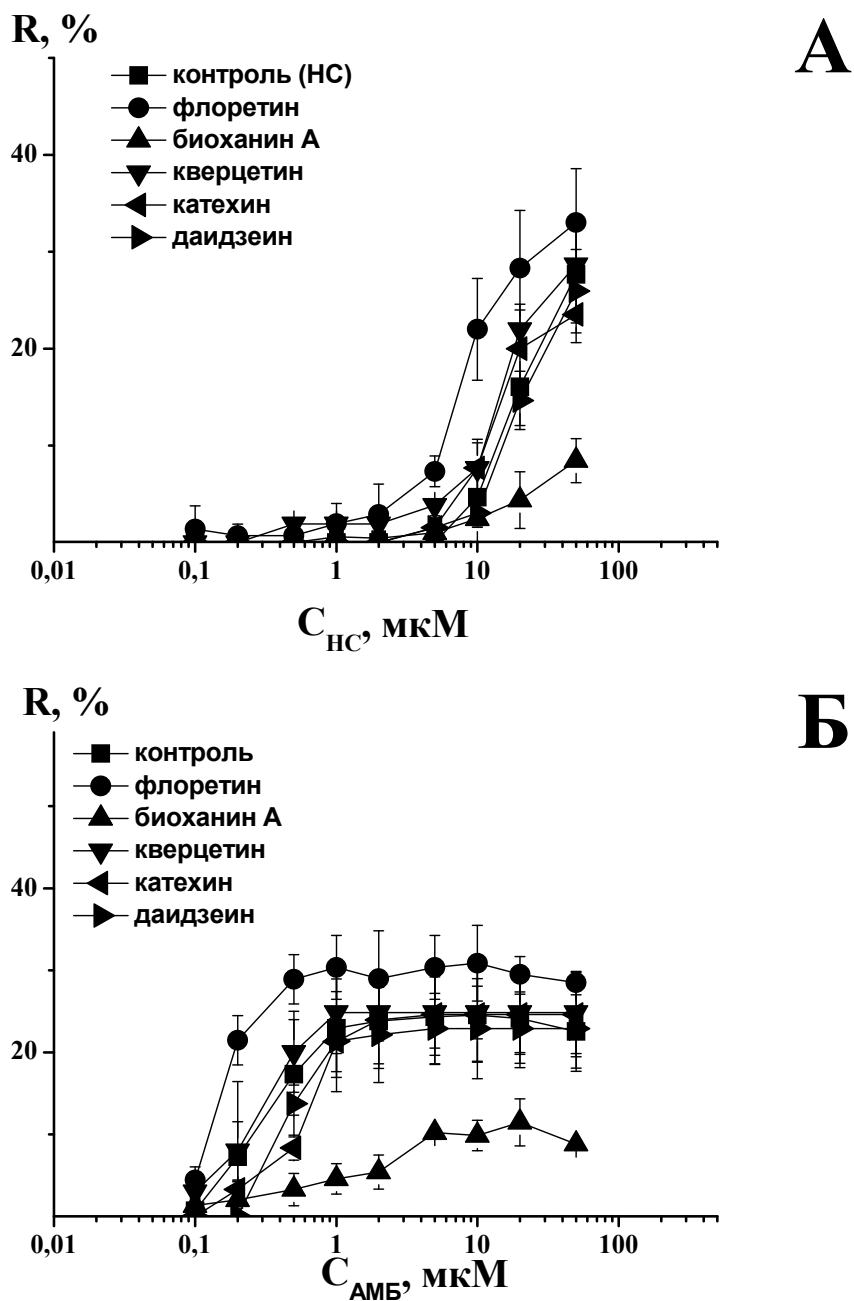


Рис. 3.87. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (R , %) кальцеина, вытекшего из ДОФХ:Хол (67:33 моль %)-липосом, от концентрации нистатина (А) и амфотерицина Б (Б) в отсутствие (■) и в присутствии 50 мкМ флоретина (●), биоханина А (▲), кверцетина (▼), катехина (◄) и даидзеина (►).

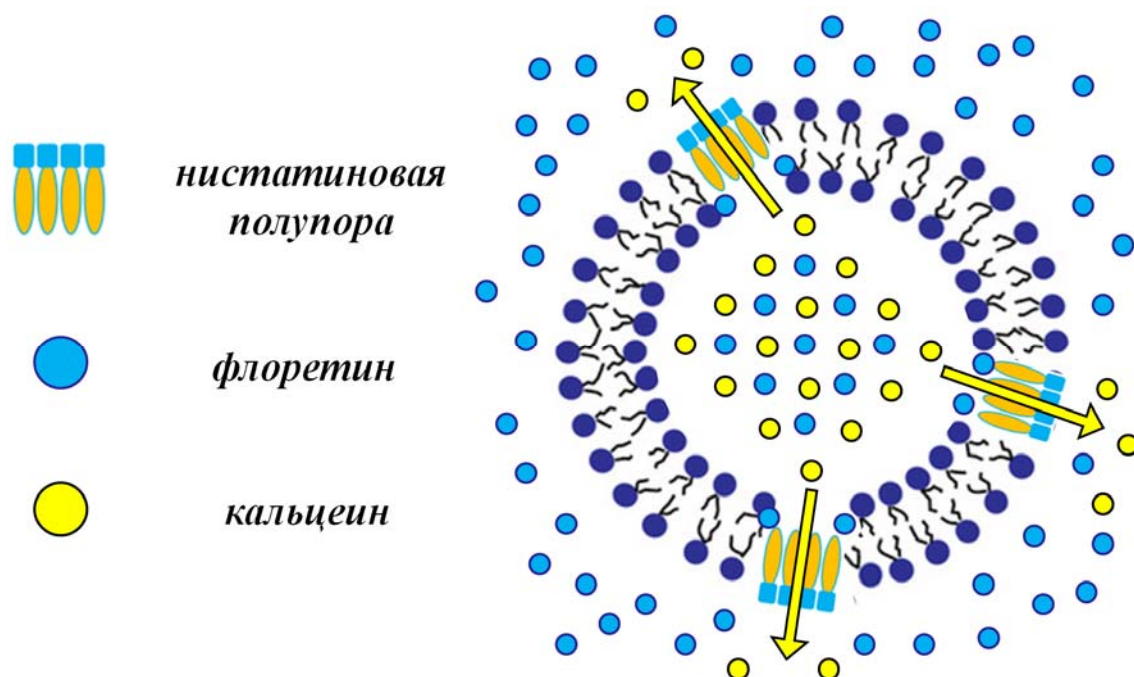


Рис. 3.88. Схематическое представление механизма увеличения нистатин-индуцированной утечки кальцеина из липосом под действием флоретина.

Суммируя представленные результаты, можно считать:

1. Увеличение объема гидрофильной части *транс*-монослоя при адсорбции дипольных модификаторов мембран приводит к росту каналаобразующей активности полиеновых макролидов при их *цис*-введении.
2. Флоретин можно рассматривать в качестве потенциального синергиста терапевтического действия нистатина.

3.3. Общие закономерности липидопосредованной регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов, образуемых антимикробными агентами и токсинами

Материалы представлены в обзорных работах автора [29а, 30а *Списка основных публикаций автора по теме диссертации*].

Полученные в работе результаты позволили существенно дополнить картину, построенную на основании анализа литературных данных (рис. 1.36) и сформулировать общие представления о роли малоизученных свойств липидного матрикса в формировании и функционировании ионных каналов, образованных антимикробными агентами и токсинами, а также возможностях их регуляции дипольными модификаторами мембран (рис. 3.89).

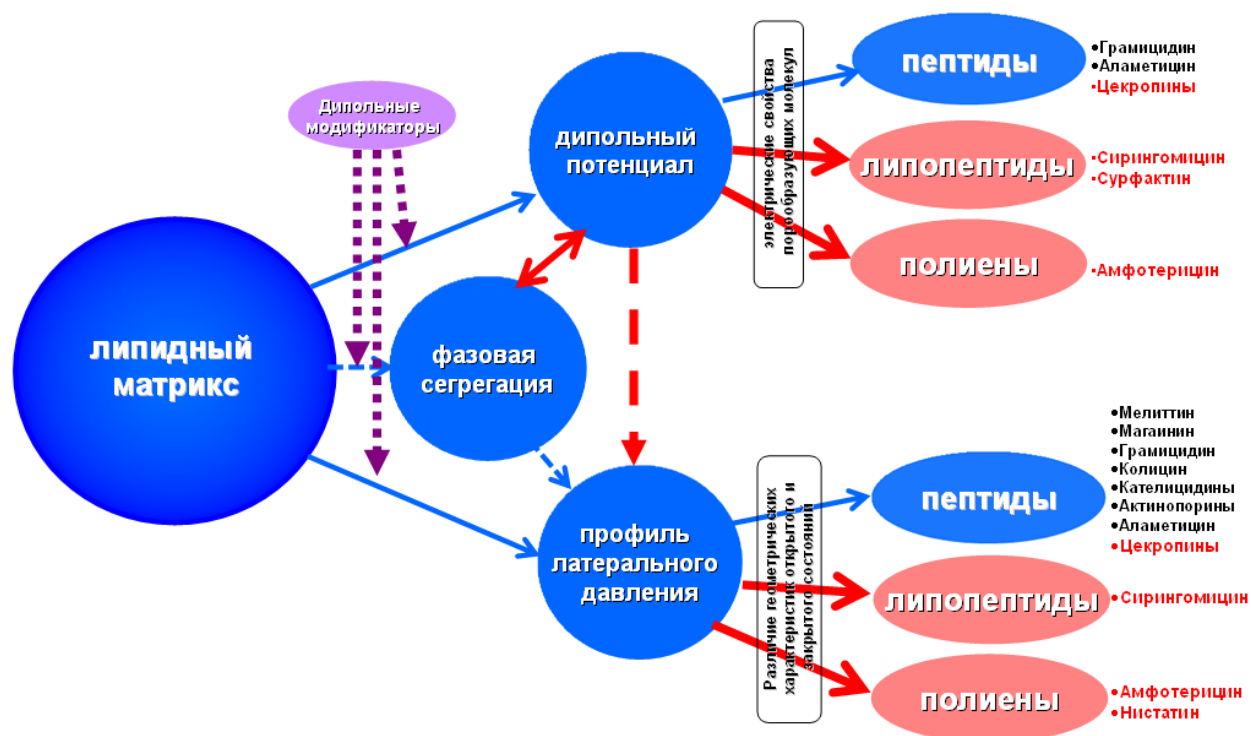


Рис. 3.89. Схема, иллюстрирующая роль липидного матрикса мембран в каналообразующей активности антимикробных агентов и токсинов. Красным цветом выделены полученные в работе сведения.

Регуляторная роль дипольных модификаторов мембран в функционировании ионных каналов, формируемых экзогенными для клетки соединениями, многообразна и включает:

(1) Модификацию дипольного потенциала мембраны

В работе получены достоверные экспериментальные результаты, указывающие на то, что дипольный потенциал влияет на активность заряженных или полярных агентов не только пептидной (формируемых грамицидином, аламетицином (1.1.1) и цекропинами), но и липопептидной (образованных сириномицином и сурфактином) (3.2), а также полиеновой природы (3.2.6.1). Установлено, что **амплитуда элементарного кванта проводимости** является функцией дипольного потенциала бислоя с поправкой на катион-анионную избирательность канала и экранирование скачка потенциала водным раствором внутри поры. Это справедливо как для катион-селективных грамицидиновых (1.1.1.1) и аламетициновых каналов (1.1.1.2), так и для анион-избирательных пор, образованных сириномицином Е (3.2.1) и амфотерицином Б (3.2.6.1). Обнаружено, что, в случаях, когда открывание/закрывание канала ассоциировано с перемещением воротных частиц в области скачка потенциала, дипольный потенциал мембраны определяет **время жизни каналов**. Яркими примерами такой зависимости являются грамицидиновые (1.1.1.1) и сириномициновые каналы (3.2.1). Параметром, наиболее чувствительным к изменению дипольного потенциала мембраны, является **стационарное число открытых в мембране каналов**. Механизмы регуляции включают модификацию заряд-дипольных и диполь-дипольных взаимодействий между молекулами каналоформеров и мембранных липидов. Рост дипольного потенциала мембраны сопровождается увеличением свободной энергии встраивания в мембрану положительно заряженных молекул сириномицина Е (3.2.1.1) или погружения в бислой N-концевой части аламетицина (1.1.1.2) и мелиттина (1.1.1.3), а также уменьшением энергии интеркаляции в бислой отрицательно заряженных молекул сурфактина (3.2.2) и С-концевых доменов молекул цекропина (3.2.3). В ходе работы обнаружено значительное влияние дипольного потенциала мембраны на **многоуровневую проводимость ионных каналов**. Так, увеличение дипольного потенциала мембраны сопровождается десинхронизацией открывания сириномициновых каналов в кластерах. Полученные данные указывают на регуляцию воротных процессов посредством изменения диполь-дипольных и заряд-дипольных взаимодействий в мембране (3.2.1.1). В случае, когда многоуровневая проводимость обусловлена олигомеризацией молекул каналоформера, ключевая роль принадлежит его коэффициенту распределения между мембраной и водной фазой. Так, увеличение дипольного потенциала мембраны приводит

к росту коэффициента распределения отрицательно заряженного сурфактина в пользу нейтральных мембран, уменьшению энергии встраивания мономеров в бислой, и, как следствие, к увеличению вероятности появления более высоких подуровней проводимости (3.2.2). Зависимость **потенциал-чувствительности открывания/закрывания каналов** от дипольного потенциала мембраны исследована на примере синрингомициновых каналов и пор, формируемых альфа-токсином золотистого стафилококка. Обнаруженный значительный рост эффективного воротного заряда синрингомициновых каналов при увеличении дипольного потенциала мембраны указывает на активную роль липидных молекул в формировании каналов и воротных процессах (3.2.1). При этом, дипольный потенциал не влияет на потенциал-чувствительность закрывания большой белковой поры, образованной альфа-гемолизином, в результате экранирования дипольного потенциала полярными группами, образующими «стенки» канала (3.2.5).

(2) изменение распределения латеральной компоненты давления вдоль нормали к поверхности мембраны

В литературе содержится большое число примеров влияния этого параметра мембраны на **активность** (число) пептид-липидных тороидальных пор, образованных мелиттином (1.1.2.1), магаинином (1.1.2.2), колицином E1 (1.1.2.3), кателицидинами (1.1.2.5) и актинопоринами (1.1.2.6). Полученные нами результаты указывают на приемлемость подобного рассмотрения и для липопептид-липидных (3.2.1.1) и полиен-липидных пор (3.2.6.2). В частности, обусловленное адсорбцией дипольных модификаторов повышение давления или объема в гидрофильной области одного из монослоев приводит к росту каналообразующей активности встроенных в противоположный монослой полиеновых макролидов за счет уменьшения энергии образования липидного устья пор. Анализ вклада различных мембранных компонентов в порообразующую активность полиеновых макролидов при их двустороннем относительно мембраны введении позволил заключить, что стабильность полиен-стериновых комплексов определяется влиянием микроокружения на энергию комплексообразования. Механические свойства бислоя определяют также **многоуровневую проводимость каналов**, образованных олигомерами пептидов, в частности, аламетицина (1.1.2.7) и цекропинов (3.2.3). Функцией реологических свойств бислоя является **время жизни каналов**. Так, конденсация мембраны приводит к увеличению времени жизни симметричных амфотерициновых каналов (3.2.6.1).

(3) влияние на характер фазового разделения в бислое

Фазовое разделение в мембране обуславливает гетерогенность ее свойств, в том числе, дипольного потенциала. Латеральная гетерогенность дипольного потенциала бислоя определяет **число открытых** синергомициновых **каналов** (3.2.1.2), а **проводимость и время жизни подсосостояний** аламетициновых каналов в различных по липидному составу бислоях зависит от профиля латерального давления (1.1.3.1). Полученные в работе результаты позволяют также связывать с латеральной организацией мембран каналообразующую активность амилоидных пептидов. Нами выявлена связь между изменением характера агрегации бета-амилоидов и модификацией фазовой сегрегации мембраны (3.2.4).

(4) непосредственное взаимодействие с ионными каналами, образуемыми токсинами

Пути регуляции дипольными модификаторами мембран ионных каналов не всегда опосредованы липидным матриксом. В работе показаны возможности непосредственного взаимодействия дипольных модификаторов мембран с ионными каналами, формируемыми α -гемолизином и β -амилоидными пептидами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами 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 полярных головок мембранных липидов. Есть основания полагать, что в последнем случае возможно изменение числа связанных с бислоем молекул воды, ориентации их дипольных моментов на границе раздела фаз или участие модификаторов в сети водородных связей. 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. 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 бислое; 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 синингомициновых 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 липопептидные и 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;
- 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 потребляемые в пищу полифенолы растительного происхождения способны подавлять формирование пор альфа-гемолизином золотистого стафилококка. Учитывая, что этот патоген возглавляет список возбудителей внутрибольничных инфекций, обнаруженные эффекты 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 структуры 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: а) уменьшающие дипольный потенциал мембраны и вызывающие разупорядочение липидов в бислое; б) снижающие потенциальный барьер для катионов в полярной области мембраны; в) не оказывающие непосредственного влияния на распределение электрического поля на границах мембраны и ее фазовое состояние.

2. Дипольные модификаторы мембран 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.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин
- ДФФС – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин
- ДФФЭ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин
- ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин
- ДМФХ – 1,2-димиристоил-*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
- ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин
- ДСФЭ – 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин
- ПИП₂ – *L*- α -фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат из мозга свиней
- ЛР-ДПФЭ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамин)
- Хол – холестерин
- Эрг – эргостерин
- ДХол – 7-дегидрохолестерин
- Стигм – стигмастерин
- Андр – 5 α -адростан-3 β -ол
- СФС – N-стеароил-фитосфингозин из *Saccharomyces cerevisiae*
- СМ – сфингомиелин из мозга свиней
- СЭС – N-стеароил-D-эритро-сфинганин
- 6-КХ – 6-кетохолестанол
- 7-КХ – 7-кетохолестанол
- ГМО – 1-олеоил-*rac*-глицерол
- СМЕ – сириномицин Е
- СФ – сурфактин
- ЦА – цекропин А
- ЦВ – цекропин В
- α -ГЛ – α -гемолизин *Staphylococcus aureus*
- АМВ – амфотерицин В
- НС – нистатин
- ФЛ – филиппин
- АВР – фрагмент β -амилоидного пептида
- ПС-1 – пресенилин-1-N

ПР (106-126) – фрагмент 106-126 прионного белка человека

ТГАФ – 2',4',6'- моногидрат тригидроксиацетофенона

ДГАФ – 2'-гидрокси-4',6'-диметокси-ацетофенон

ДМСО – диметилсульфоксид

φ_d – дипольный потенциал мембраны

K – константа десорбции

P – параметр упаковки липидных молекул

T_m – температура плавления липида

$T_{1/2}$ – ширина эндотермического пика на полувывсоте

H_m – энтальпия

l_d – жидкая неупорядоченная фаза

l_o – жидкая упорядоченная фаза

s_o – твердая упорядоченная фаза

C – концентрация мембранотропного агента

V – поданное на мембрану напряжение

i – ток, протекающий через одиночный канал

g – проводимость одиночных каналов

g_{sc} – средняя нормированная проводимость одиночных каналов

m – среднее нормированное число синхронно функционирующих каналов

S – Относительное число кластеров

i_{sc} – средний нормированный трансмембранный ток, протекающий через одиночные каналы

I_{∞} – стационарный ток, протекающий через бислойную липидную мембрану

G – проводимость мембраны

N_{op} – равновесное число открытых каналов

q – эффективный воротный заряд канала

ρ – коэффициент распределения порообразующего соединения между мембраной и водным раствором

$\Delta U_{str}(\varphi_d)$ – химическая составляющая работы по образованию поры

t^- – число переноса для анионов

t^+ – число переноса для катионов

R – относительная величина утечки флуорофора из липосом

$s(f)$ – спектральная плотность шума

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

- 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 липодепсипептидом 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. – 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. – 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 Натюра. – 2014. – Том 6 (4-23). – 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 Натюра. – 2015. – Том 7 (4-27). – 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. 279 (1). – 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. – 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 Advances in planar lipid bilayers and liposomes*, edited by A. Leitmannova Liu. V. 8. Amsterdam: Elsevier. – 2008. – 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: Jeon K.W. (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.

Публикации в сборниках тезисов научных конференций:

- 31a. Ostroumova O.S.**, Bessonov A.N., Takemoto J.Y., Schagina L.V. Membrane dipole potential modulates syringomycin E channel formation // Abstracts of 52th Annual Meeting of Biophysical Society, Long Beach, California, February 2-6. *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94. – P. 614a.
- 32a. Остроумова О.С.**, Щагина Л.В. Влияние дипольного потенциала липидных бислоев на каналобразующую активность противогрибкового липодепептида сирингомицина Е // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11-15 мая, Новосибирск. – 2008. – Стр. 362.
- 33a. Ефимова С.С.**, **Остроумова О.С.** Влияние размера иона на проводимость фитотоксинового канала // XXXVII неделя науки СПбГПУ. Материалы Всероссийской межвузовской научной конференции студентов и аспирантов. 24-29 ноября, Санкт-Петербург. – 2008. – Часть V. – Стр. 3.
- 34a. Остроумова О.С.**, Щагина Л.В. Роль дипольных модификаторов мембран и липидных рафтов в регуляции каналобразующей активности сирингомицина Е // Материалы научной конференции «Ионные каналы: структура и функции». 17-18 марта, Санкт-Петербург. *Биол. мемб.* – 2009. – Vol. 26(4). – P. 324-325.
- 35a. Остроумова О.С.**, Гурьев Ф.А., Малев В.В. Температурные зависимости параметров, характеризующих функционирование СМЕ-каналов в липидных бислоях // Материалы научной конференции «Ионные каналы: структура и функции». 17-18 марта, Санкт-Петербург. *Биол. мемб.* – 2009. – Vol. 26(4). – P. 324.
- 36a. Efimova S.S.**, **Ostroumova O.S.** Effect of phloretin on the properties of single channels formed by alpha-hemolysin // Abstracts of 7th European Biophysics Congress. July 11th-15th, Genoa, Italy. *Eur. Biophys. J.* – 2009. – Vol. 38. – P. S141.
- 37a. Остроумова О.С.** Направленная регуляция мембранной активности биологически важных экзогенных соединений // 14 Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов. Санкт-Петербург, 11 декабря. Аннотации работ победителей конкурса

- грантов Санкт-Петербурга 2009 года для студентов, аспирантов, молодых ученых и молодых кандидатов наук. – 2009. – Стр.81.
- 38a. Ostroumova O.S., Ilin M.G., Malev V.V., Schagina L.V.** Effect of dipole modifying agents on surfactin-induced conductance of planar lipid bilayers // Abstracts of 54th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California, February 20-24. Biophys. J. – 2010. – Vol. 98 (3). – P. 107a.
 - 39a. Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S.** Phloretin affects the voltage gating of alpha-hemolysin channel // Abstracts of 54th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California, February 20-24. Biophys. J. – 2010. – Vol. 98 (3). – P. 108a.
 - 40a. Остроумова О.С., Захаров В.В., Щагина Л.В., Мосевичкий М.И.** Олигомеры BASP1 формируют ионные каналы в липидных бислоях // II Конференция молодых ученых Института цитологии РАН. Санкт-Петербург, 15-16 февраля. Цитология. – 2010. – Vol. 52 (6). – P. 501.
 - 41a. Ефимова С.С., Остроумова О.С.** Природа низкопроводящих подсостояний α -гемолизинового канала // II Конференция молодых ученых Института цитологии РАН. Санкт-Петербург, 15-16 февраля. Цитология. – 2010. – Vol. 52 (6). – P. 495-496.
 - 42a. Ильин М.Г., Остроумова О.С.** Сравнение механизмов функционирования липопептидов, сурфактина и сириномицина Е, в липидных бислоях в присутствии дипольных модификаторов // II Конференция молодых ученых Института цитологии РАН. Санкт-Петербург, 15-16 февраля. Цитология. – 2010. – Vol. 52 (6). – P. 497-498.
 - 43a. Ефимова С.С., Остроумова О.С., Щагина Л.В.** Влияние флавоноидов на воротный механизм альфа-гемолизинового канала // Молодые ученые - промышленности северо-западного региона: материалы конференций политехнического симпозиума. Санкт-Петербург, 20 мая. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та. – 2010. – Стр. 226-229.
 - 44a. Zakharov V.V., Ostroumova O.S., Schagina L.V., Mosevitsky M.I.** Formation of amyloid-like oligomers of brain abundant protein BASP1 promoted by anionic phospholipid membranes // 7th Forum of European neuroscience. Amsterdam, 3-7 July, FENS Abstr. – 2010. – Vol. 5. – P. 117.
 - 45a. Ostroumova O.S., Malev V.V., Schagina L.V.** Interaction of antimicrobial lipopeptides with bilayer lipid membranes of different dipole potential // I International Conference on Antimicrobial Research, 3-5 November, Valladolid (Spain). Proceedings of the ICAR2010 "Science and Technology against Microbial Pathogens. Research, Development and Evaluation". – 2010. – P. 330.
 - 46a. Schagina L.V., Ostroumova O.S., Malev V.V.** Dipole membrane potential as a regulator of ion channel activity // 9th International Frumkin symposium (24-29 october 2010 Moscow). Electrochemical technologies and materials for XXI century. Abstracts. – 2010. – P. 275.
 - 47a. Ostroumova O.S., Schagina L.V.** Amphotericin B channel-forming activity depends on membrane dipole potential // Abstracts of 55th Annual Meeting of Biophysical Society, Baltimore, Maryland, March 5-9. Biophys. J. – 2011. – P. 98a.
 - 48a. Остроумова О.С., Остроумова Ю.С., Ханин Д.С.** Программное обеспечение научных исследований как эффективное средство обучения студентов основам и методам современных нанобиотехнологий // Труды международной конференции

- «Информационные технологии в науке, образовании, телекоммуникации и бизнесе». Гурзуф, Украина. 20-30 мая. – 2011. – Р. 181-182.
- 49а. Остроумова О.С.,** Ефимова С.С., Щагина Л.В. Программное обеспечение научных исследований как эффективное средство обучения студентов основам и методам современных нанобиотехнологий // Труды международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Гурзуф, Украина. 31 мая -10 июня. – 2011. – Р. 241-243.
- 50а. Ефимова С.С., Остроумова О.С.,** Щагина Л.В. Активность синрингомициновых каналов в присутствии органических анионов и дипольных модификаторов в мембраноомывающих растворах // Материалы III Конференции "Современные проблемы молекулярной биофизики" Санкт-Петербург, 14-15 июня. – 2011. – Стр. 43.
- 51а. Efimova S.S., Ostroumova O.S.,** Malev V.V., Schagina L.V. Dipole modifiers affect properties of syringomycin channels in the presence of large organic anions // Abstracts of 7th European Biophysics Congress. August 23th-27th, Budapest, Hungary. Eur. Biophys. J. – 2011. – Vol. 40. – P. 167.
- 52а. Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S.** Role of sterols in the channel-forming activity of amphotericin B in planar lipid bilayers // 17th International Biophysics Congress Oct. 30th - Nov. 3rd. Beijing, China. – 2011. – P. 353.
- 53а. Ostroumova O.S.,** Efimova S.S., Schagina L.V. Dipole modifiers affect amphotericin B channel-forming activity // 17th International Biophysics Congress Oct. 30th - Nov. 3rd. Beijing, China. – 2011. – P. 354.
- 54а. Ефимова С.С., Остроумова О.С.** Дипольный потенциал стерин-содержащих модельных мембран в присутствии флавоноидов // Измерительные и информационные технологии в охране здоровья. Метромед-2011: сборник научных трудов международной научной конференции. 8-10 ноября, Санкт-Петербург. – 2011. – Стр. 136-137.
- 55а. Ефимова С.С., Остроумова О.С.** Роль органических анионов в регуляции активности синрингомициновых каналов в присутствии дипольных модификаторов // «Биология: от молекулы до биосферы». Материалы VI Международной конференции молодых ученых 22-25 ноября, Харьков, Украина. – 2011. – Стр. 14-15.
- 56а. Efimova S.S., Ostroumova O.S.** Effects of flavonoids on dipole potential of sterol-containing membranes // Abstracts of 56th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Diego, California, February 25-29. Biophys. J. – 2012. – P. 3621-B 482.
- 57а. Ефимова С.С., Остроумова О.С.** Активность антимикотика амфотерицина В в липидных бислоях, содержащих дипольные модификаторы // III Конференция молодых ученых Института Цитологии РАН. 15-16 мая, Санкт-Петербург, Цитология. – 2012. – Том. 54 (4). – Стр. 340.
- 58а. Чулков Е.Г., Ефимова С.С., Остроумова О.С.** Эффект дипольных модификаторов на стационарный трансмембранный ток, индуцированный полиеновым антимикотиком нистатином в эргостерин-содержащих бислоях // III Конференция молодых ученых Института Цитологии РАН. 15-16 мая, Санкт-Петербург, Цитология. – 2012. – Том. 54 (4). – Стр. 363.

- 59a. **Остроумова О.С.**, Ефимова С.С., Малев В.В., Щагина Л.В. Роль дипольных модификаторов в регуляции мембранной активности экзогенных соединений // III Конференция молодых ученых Института Цитологии РАН. 15-16 мая, Санкт-Петербург, Цитология. – 2012. – Том. 54 (4). – Стр. 350-351.
- 60a. Ефимова С.С., **Остроумова О.С.**, Щагина Л.В. Роль дипольных модификаторов в регуляции каналообразующей активности полиенового антибиотика филипина в липидных бислоях // IV Съезд Биофизиков России. Симпозиум I «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток». Материалы докладов. 20-26 августа 2012г., Нижний Новгород, Россия. – 2012. – Стр. 101.
- 61a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Schagina L.V. Interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes // Young scientists Program 2012 of IUBMB & FEBS. September 1-4, Cádiz, Spain. – 2012. – P. 134.
- 62a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Schagina L.V. Interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes // Abstracts of 37th FEBS Congress. September 4-9, Seville, Spain. – 2012. – P. 254.
- 63a. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Channel-forming activity of cecropin A depends from membrane dipole modifiers in planar lipid bilayers // Abstracts of 37th FEBS Congress. September 4-9, Seville, Spain. – 2012. – P. 253.
- 64a. Efimova S.S., **Ostroumova O.S.**, Schagina L.V. Phloretin affects the channel-forming activity of amyloid β -peptide fragment 25-35 in planar lipid bilayers // Abstracts of Annual Meeting of the German Biophysical Society. September 23-26, Gottingen, Germany. – 2012. – P. 201.
- 65a. **Остроумова О.С.**, Ефимова С.С., Малев В.В., Щагина Л.В. Механизмы влияния флавоноидов на каналообразующую активность токсинов и антимикробных агентов // III Съезд Общества клеточной биологии. 16–18 октября, Санкт-Петербург, Цитология. – 2012. – Том. 54 (9). – Стр. 696.
- 66a. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Effects of flavonols on the magnitude of dipole potential of phospholipid bilayers // Abstracts of 57th Annual Meeting of the Biophysical Society. February 2-6, Philadelphia, Pennsylvania, USA. – 2013. – P. 3621-B 482.
- 67a. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Role of dipole potential in the channel-forming activity of cecropin A in planar lipid bilayers // Abstracts of 38th FEBS Congress. July 6th-11th, Saint-Petersburg, Russia. FEBS J. – 2013. – Vol. 280. – P. 188.
- 68a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Schagina L.V. Plant flavonoids affect membrane activity of antimicrobial agents // Abstracts of 38th FEBS Congress. July 6th-11th, Saint-Petersburg, Russia. FEBS J. – 2013. – Vol. 280. – P. 191-192.
- 69a. Chulkov E.G., **Ostroumova O.S.** The influence of the plant flavonoids on the domain shape in unilamellar vesicles // Abstracts of 38th FEBS Congress. July 6th-11th, Saint-Petersburg, Russia. FEBS J. – 2013. – Vol. 280. – P. 205.
- 70a. **Ostroumova O.S.**, Efimova S.S., Schagina L.V. Modifiers of the membrane dipole potential are promising synergists of antimicrobial agents // Abstracts of 9th European biophysics congress. Lisbon, Portugal, July 13th-17th. Eur. Biophys. J. – 2013. – Vol. 42. – P. S83.

- 71a. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Effects of modifiers of the membrane dipole potential on sphingolipid containing bilayers // Abstracts of 9th European biophysics congress. Lisbon, Portugal, July 13th-17th. Eur. Biophys. J. – 2013. – Vol. 42. – P. S121.
- 72a. Захарова А.А., **Остроумова О.С.** Влияние дипольных модификаторов на каналообразующую активность синингомицина Е // XLII научно-практическая конференция с международным участием «НЕДЕЛЯ НАУКИ СПбГПУ» 2-7 декабря, Санкт-Петербург. – 2014. – Стр. 133-136.
- 73a. Ефимова С.С., Щагина Л.В., **Остроумова О.С.** Роль мембранных липидов в формировании и функционировании полиеновых пор в липидных бислоях // IV Конференция молодых ученых Института цитологии РАН. 18-20 марта, Санкт-Петербург, Цитология. – 2014. – Том. 56 (5). – Стр. 366.
- 74a. Чулков Е.Г., Щагина Л.В., **Остроумова О.С.** Исследование влияния флавоноидов на фазовое разделение в гигантских моноламеллярных липосомах // IV Конференция молодых ученых Института цитологии РАН. 18-20 марта, Санкт-Петербург, Цитология. – 2014. – Том. 56 (5). – Стр. 387-388.
- 75a. Чулков Е.Г., Степаненко О.В., Щагина Л.В., **Остроумова О.С.** Полиморфизм липидов, индуцированный флоретином, биоханином А и мирицетином // IV Конференция молодых ученых Института цитологии РАН. 18-20 марта, Санкт-Петербург, Цитология. – 2014. – Том. 56 (5). – Стр. 388.
- 76a. Efimova S.S., **Ostroumova O.S.** Channel-forming activity of amyliod peptides is affected by phloretin // Abstracts of 39th FEBS Congress. Paris, France, August 30 – September 4. FEBS J. – 2014. – Vol. 281. – P. 619-620.
- 77a. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Effect of the membrane dipole modifiers on the channel-forming activity of polyene macrolide antibiotics // Pore-Forming Toxins: a meeting in memory of Gianfranco Menestrina, PFT2014. Italy, Trento, August 28–30. – 2014. – P. 40.
- 78a. Efimova S.S., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.** Membrane dipole modifiers affect the channel forming activity of cecropins // III International Conference on Antimicrobial Research. Madrid, Spain, 1-3 October. – 2014. – P. 347.
- 79a. Efimova S.S., **Ostroumova O.S.** Effect of polyphenols on the channel-forming activity of toxin and antimicrobial agents // 9th Malta Polyphenols World Congress. June 3-5, St Julian's, Malta. – 2015. – P. 121.
- 80a. Efimova S.S., Zakharov V.V., **Ostroumova O.S.** Dipole modifiers affect channel-forming activity of amyliod and amyloid-like peptides // Abstracts of 40th FEBS Congress. Berlin, Germany, July 4-9. FEBS J. – 2015. – Vol. 282. – P. 199.
- 81a. Efimova S.S., **Ostroumova O.S.** Effects of flavonoids on the lateral heterogeneity of the sphingolipid-containing membranes. Abstracts of 10th European biophysics congress. Dresden, Germany, July 18-22. Eur. Biophys. J. – 2015. – Vol. 44. – P. S111.
- 82a. Ефимова С.С., **Остроумова О.С.** Дипольные модификаторы бислоевых липидных мембран // II Всероссийская конференция: "Внутриклеточная сигнализация,

транспорт, цитоскелет". 20-22 октября, Санкт-Петербург, Цитология. – 2015. – Том. 57 (9). – Стр. 628.

83а. Ефимова С.С., **Остроумова О.С.** Механизмы действия флавоноидов на каналобразующую активность экзогенных соединений // II Всероссийская конференция: "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет". 20-22 октября, Санкт-Петербург, Цитология. – 2015. – Том. 57 (9). – Стр. 628-629.

84а. Медведев Р.Я., Ефимова С.С., **Остроумова О.С.** Влияние местных анестетиков на проницаемость липидных бислоев для кальцеина // II Всероссийская конференция: "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет". 20-22 октября, Санкт-Петербург, Цитология. – 2015. – Том. 57 (9). – Стр. 641-642.

85а. Чулков Е.Г., **Остроумова О.С.** Влияние флавоноидов на утечку кальцеина из липосом // II Всероссийская конференция: "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет". 20-22 октября, Санкт-Петербург, Цитология. – 2015. – Том. 57 (9). – Стр. 664-665.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровский Э., Фальковский Л., Зелиньски Е., Колодзейчик П., Голик Я., Цибульская Б., Зимински Т., Еречек Э., Павляк Я., Якобс Э., Шенин Ю.Д., Терешин И.М. Структура, модификация и биологические свойства антибиотиков из группы полиеновых макролидов // Химико-фармацевтический журнал. – 1977. – Том 11. – С. 57–61.
2. Ещенко Н. Д. Биохимия психических и нервных болезней. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского университета, 2004. – 200 с.
3. Касумов Х.М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. – М.: Наука, 2009. – 512 с.
4. Каулин Ю.А., Щагина Л.В. Влияние электролитного состава водных растворов на потенциал-чувствительность ионных каналов, образованных сирингомицином E в липидных бислоях // Цитология. – 1999. – Том 41 (7). – С. 610–614.
5. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Монография. – Мн.: БГУ, 2004. – 174 с.
6. Малев В.В., Каулин Ю.А., Безруков С.М., Гурьев Ф.А., Такемото Д., Щагина Л.В. Кинетика открывания – закрывания каналов, образованных сирингомицином E в липидных бислоях // Биологические мембраны. – 2000. – Том 17 (6). – С. 653–665.
7. Малев В.В., Каулин Ю.А., Гурьев Ф.А., Безруков С.М., Такемото Д., Щагина Л.В. Эффекты пространственного распределения заряда в проводимости одиночных каналов, образованных сирингомицином E в липидных бислоях // Биологические мембраны. – 2001. – Том 18. – С. 145–153.
8. Марукович Н.И., Нестеренко А.М., Ермаков Ю.А. Структурные факторы во взаимодействии лизина и полилизина с липидными мембранами // Биологические мембраны. – 2014. – Том 31 (6). – С. 401–409.
9. Митрошина Е.В. Оптический имиджинг в приложении к исследованию нейробиологических систем мозга. Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 40 с.
10. Остроумова О.С., Гурьев Ф.А., Такемото Д., Щагина Л.В., Малев В.В. Кинетические характеристики одиночных ионных каналов и стационарная проводимость модифицированных фитотоксинами липидных бислоев // Цитология. – 2005. – Том 47. – С. 338–343.
11. Остроумова О.С., Малев В.В., Щагина Л.В. Кооперативность функционирования ионных каналов, образованных фитотоксинами, сирингомицином E и сирингостатином A // Биологические мембраны. – 2006. – Том 23. – С. 412–419.
12. Симонова М.В., Черный В.В., Донат Е., Соколов В.С., Маркин В.С. Граничные потенциалы на бислойной мембране в присутствии ремантадина. Анализ трех методов измерения // Биологические мембраны. – 1986. – Том 3. – С. 846–857.
13. Соколов В.С., Черный В.В., Маркин В.С. Измерение скачков потенциала при адсорбции флоретина и флорицина на поверхности липидных мембран методом компенсации внутримембранного поля // Биофизика. – 1984. – Том 29. – С. 424–429.

14. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. – М.: Издательство ЛКИ, 2011. – 280 с.
15. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрашилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина // Пушино: Synchrobook, 2013. – 310 с.
16. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидрокверцетина) с мультиламеллярными липосомами из димиристоилфосфатидилхолина // Биофизика. – 2008. – Том 53. – С. 78–83.
17. Щагина Л.В., Каулин Ю.А., Фейгин А.М., Такемото Д., Бранд Д., Малев В.В. Зависимость свойств ионных каналов, образованных антибиотиком синрингомицином Е в липидных бислоях, от концентрации электролита в водной фазе // Биологические мембраны. – 1998. – Том 15. – С. 433–446.
18. Abramov A.Y., Ionov M., Pavlov E., Duchon M.R. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of b-amyloid: implications for Alzheimer's disease // Aging Cell. – 2011. – Vol. 10. – P. 595–603.
19. Agner G., Kaulin Y.A., Gurnev P.A., Szabo Z., Schagina L.V., Takemoto J.Y., Blasko K. Membrane-permeabilizing activities of cyclic lipodepsipeptides, syringopeptin 22A and syringomycin E from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in human red blood cells and in bilayer lipid membranes // Bioelectrochem. – 2000. – Vol. 52. – P. 161–167.
20. Aittoniemi J., Róg T., Niemelä P., Pasenkiewicz-Gierula M., Karttunen M., Vattulainen I. Tilt: major factor in sterols' ordering capability in membranes // J. Phys. Chem. B. – 2006. – Vol. 110. – P. 25562–25564.
21. Aksimentiev A., Schulten K. Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map // Biophys. J. – 2005. – Vol. 88. – P. 3745–3761.
22. Alfieri K.N., Vienneau A.R., Londergan C.H. Using infrared spectroscopy of cyanylated cysteine to map the membrane binding structure and orientation of the hybrid antimicrobial peptide CM15 // Biochem. – 2011. – Vol. 50. – P. 11097–11108.
23. Alguel Y., Meng C., Teran W., Krell T., Ramos J.L., Gallegos M.T., Zhang X. Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials // J. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 369. – P. 829–840. (PDB ID: 2UXI, PDB ID: 2UXH).
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. Allende D., Vidal A., Simon S.A., McIntosh T.J. Bilayer interfacial properties modulate the binding of amphipathic peptides // Chem. Phys. Lipids. – 2003. – Vol. 122. – P. 65–76.
26. Almeida P.F., Vaz W.L., Thompson T.E. Percolation and diffusion in three-component lipid bilayers: effect of cholesterol on an equimolar mixture of two phosphatidylcholines // Biophys. J. – 1993. – Vol. 64. – P. 399–412.
27. Alvarez C., Mancheño J.M., Martínez D., Tejuca M., Pazos F., Lanio M.E. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla*

- helianthus: their interaction with membranes // *Toxicon*. – 2009. – Vol. 54. – P. 1135–1147.
28. Alvarez R.M., Farias R.N., Hildebrandt P. Comparative vibrational analysis of thyronine hormones using infrared and Raman spectroscopy and density functional theory calculations // *J. Raman Spectrosc.* – 2004. – Vol. 35. – P. 947–955.
 29. Andersen O.S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1976. – Vol. 67. – P. 749–771.
 30. Andersen O.S., Koeppe R.E. Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2007. – Vol. 36. – P. 107–130.
 31. Andersen O.S., Koeppe R.E. Molecular determinants of channel function // *Physiol. Rev.* – 1992. – Vol. 72. – P. S89–158.
 32. Anderson R.G., Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains // *Science*. – 2002. – Vol. 296. – P. 1821–1825.
 33. Anderson T.M., Clay M.C., Cioffi A.G., Diaz K.A., Hisao G.S., Tuttle M.D., Nieuwkoop A.J., Comellas G., Maryum N., Wang S., Uno B.E., Wildeman E.L., Gonen T., Rienstra C.M., Burke M.D. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge // *Nat. Chem. Biol.* – 2014. – Vol. 10. – P. 400–406.
 34. Andrä J., Berninghausen O., Leippe M. Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans* // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2001. – Vol. 189. – P. 169–173.
 35. Andreoli T. The structure and function of amphotericin B cholesterol pores in lipid bilayer membranes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1974. – Vol. 235. – P. 448–468.
 36. Antonenko Y.N., Bulychev A.A. Effect of phloretin on the carrier-mediated electrically silent ion fluxes through the bilayer lipid membrane: measurements of pH shifts near the membrane by pH microelectrode // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1991. – Vol. 1070. – P. 474–480.
 37. Aparicio S. A systematic computational study on flavonoids // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. – Vol. 11. – P. 2017–2038.
 38. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. The RH 421 styryl dye induced, pore model-dependent modulation of antimicrobial peptides activity in reconstituted planar membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – Vol. 1790. – P. 809–816.
 39. Aresta-Branco F., Cordeiro A.M., Marinho H.S., Cyrne L., Antunes F., de Almeida R.F. Gel domains in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: highly ordered, ergosterol-free, and sphingolipid-enriched lipid rafts // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 5043–5054.
 40. Arima K., Kakinuma A., Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1968. – Vol. 31. – P. 488–494.
 41. Arispe N., Pollard H.B., Rojas E. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A β P-(1-40)] in bilayer membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993a. – Vol. 90. – P. 10573–10577.

42. Arispe N., Pollard H.B., Rojas E. Zn^{2+} interaction with Alzheimer amyloid beta protein calcium channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93. – P. 1710–1715.
43. Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 567–571.
44. Asandei A., Luchian T. Ion selectivity, transport properties and dynamics of amphotericin B channels studied over a wide range of acidity changes // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2008. – Vol. 67. – P. 99–106.
45. Asawakarn T., Cladera J., O'Shea P. Effects of the membrane dipole potential on the interaction of saquinavir with phospholipid membranes and plasma membrane receptors of Caco-2 cells // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 38457–38463.
46. Ashrafuzzaman M., Tuszynski J. Ion pore formation in lipid bilayers and related energetic considerations // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 19. – P. 1619–1634.
47. Auner B.G., O'Neill M.A., Valenta C., Hadgraft J. Interaction of phloretin and 6-ketocholestanol with DPPC-liposomes as phospholipid model membranes // *Int. J. Pharm.* – 2005. – Vol. 294. – P. 149–155.
48. Avdulov N.A., Chochina S.V., Igbavboa U., O'Hare E.O., Schroeder F., Cleary J.P., Wood W.G. Amyloid beta-peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes // *J. Neurochem.* – 1997. – Vol. 68. – P. 2086–2091.
49. Bagatolli L.A., Gratton E. Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures // *Biophys. J.* – 2000. – Vol. 78. – P. 290–305.
50. Bagatolli L.A., Kumar P.B.S. Phase behavior of multicomponent membranes: experimental and computational techniques // *Soft Matter.* – 2009. – Vol. 5. – P. 3234–3248.
51. Balakrishnan A.R., Easwaran K.R.K. Lipid-amphotericin B complex structure in solution: a possible first step in the aggregation process in cell membranes // *Biochem.* – 1993. – Vol. 32. – P. 4139–4144.
52. Bandari S., Chakraborty H., Covey D.F., Chattopadhyay A. Membrane dipole potential is sensitive to cholesterol stereospecificity: implications for receptor function // *Chem. Phys. Lipids.* – 2014. – Vol. 184. – P. 25–29.
53. Baran M., Borowski E., Mazerski J. Molecular modeling of amphotericin B ergosterol primary complex in water II // *Biophys. Chem.* – 2009. – Vol. 141. – P. 162–168.
54. Barlic A., Gutiérrez-Aguirre I., Caaveiro J.M., Cruz A., Ruiz-Argüello M.B., Pérez-Gil J., González-Mañas J.M. Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 34209–34216.
55. Basañez G., Shinnar A.E., Zimmerberg J. Interaction of hagfish cathelicidin antimicrobial peptides with model lipid membranes // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol. 532. – P. 115–120.

56. Basu I., Chattopadhyay A., Mukhopadhyay C. Ion channel stability of gramicidin A in lipid bilayers: effect of hydrophobic mismatch // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1838. – P. 328–338.
57. Batenburg A.M., van Esch J.H., de Kruijff B. Melittin-induced changes of the macroscopic structure of phosphatidylethanolamines // *Biochem.* – 1988. – Vol. 27. – P. 2324–2331.
58. Bechinger B., Seelig J. Interaction of electric dipoles with phospholipid head groups. A ²H and ³¹P NMR study of phloretin and phloretin analogues in phosphatidylcholine membranes // *Biochem.* – 1991. – Vol. 30. – P. 3923–3929.
59. Beguinot F., Beguinot L., Tramontano D., Duilio C., Formisano S., Bifulco M., Ambesi-Impiombato F.S., Aloj S.M. Thyrotropin regulation of membrane lipid fluidity in the FRTL-5 thyroid cell line. Its relationship to cell growth and functional activity // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262. – P. 1575–1582.
60. Belmonte G., Pederzoli C., Macek P., Menestrina G. Pore formation by the sea anemone cytolytic toxin in red blood cells and model lipid membranes // *J. Membr. Biol.* – 1993. – Vol. 131. – P. 11–22.
61. Berring E.E., Borrenpohl K., Fliesler S.J., Serfis A.B. A comparison of the behavior of cholesterol and selected derivatives in mixed sterol-phospholipid Langmuir monolayers: a fluorescence microscopy study // *Chem. Phys. Lipids.* – 2005. – Vol. 136. – P. 1–12.
62. Bezrukov S.M. Functional consequences of lipid packing stress // *Current Opinion in Colloid. Interface Sci.* – 2000. – Vol. 5. – P. 237–243.
63. Bezrukov S.M., Rand R.P., Vodyanoy I., Parsegian V.A. Lipid packing stress and polypeptide aggregation: alamethicin channel probed by proton titration of lipid charge // *Faraday Discuss.* – 1998. – Vol. 111. – P. 173–183.
64. Bhattacharyya A.K., Connor W.E. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters // *J. Clin. Invest.* – 1974. – Vol. 53. – P. 1033–1043.
65. Bidwai A.P., Takemoto J.Y. Bacterial phytotoxin, syringomycin, induces a protein kinase-mediated phosphorylation of red beet plasma membrane polypeptides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 6755–6759.
66. Blasko K., Schagina L.V., Agner G., Kaulin Y.A., Takemoto Y. Membrane sterol composition modulates the pore forming activity of syringomycin E in human red blood cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1373. – P. 163–169.
67. Bogdanov M., Dowhan W. Lipid-assisted protein folding // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 36827–36830.
68. Bolard J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – Vol. 864. – P. 257–304.
69. Boman H.G., Wade D., Boman I.A., Wählén B., Merrifield R.B. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids // *FEBS Lett.* – 1989. – Vol. 259. – P. 103–106.
70. Borisova M.P., Brutyan R.A., Ermishkin L.N. Mechanism of anion-cation selectivity of amphotericin B channels // *J. Membr. Biol.* – 1986. – Vol. 90. – P. 13–20.

71. Bramkamp M., Lopez D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2015. – Vol. 79. – P. 81–100.
72. Braun V., Pils H., Gross P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes and evolution // *Arch. Microbiol.* – 1994. – Vol. 161. – P. 199–206.
73. Brockman H. Dipole potential of lipid membranes // *Chem. Phys. Lipids.* – 1994. – Vol. 73. – P. 57–79.
74. Brockman H.L., Momsen M.M., Brown R.E., He L., Chun J., Byun H.S., Bittman R. The 4,5-double bond of ceramide regulates its dipole potential, elastic properties, and packing behavior // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 87. – P. 1722–1731.
75. Brown D. Structure and function of membrane rafts // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2002. – Vol. 291. – P. 433–437.
76. Brown M.F. Curvature forces in membrane lipid-protein interactions // *Biochem.* – 2012. – Vol. 51. – P. 9782–9795.
77. Brutyan R.A., McPhie P. On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1996. – Vol. 107. – P. 69–78.
78. Bulit F., Grad I., Manoil D., Simon S., Wataha J.C., Filieri A., Feki A., Schrenzel J., Lange N., Bouillaguet S. Antimicrobial activity and cytotoxicity of 3 photosensitizers activated with blue light // *J. Endod.* – 2014. – Vol. 40. – P. 427–431.
79. Bull C.T., Wadsworth M.L., Sorensen K.M., Takemoto J.Y., Austin R.K., Smilanick J.L. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons // *Biol. Control.* – 1998. – Vol. 12. – P. 89–95.
80. 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. Noncontact dipole effects on channel permeation. I. Experiments with (5F-indole)Trp13 gramicidin A channels // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 75. – P. 2830–2844.
81. 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. Surfactin blocks NO production in lipopolysaccharide-activated macrophages by inhibiting NF-kappaB activation // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 18. – P. 1984–1989.
82. Cahan R., Swissa N., Gellerman G., Nitzan Y. Photosensitizer-antibiotic conjugates: a novel class of antibacterial molecules // *Photochem. Photobiol.* – 2010. – Vol. 86. – P. 418–425.
83. Cantor R.S. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 76. – P. 2625–2639.
84. Carpaneto A., Dalla Serra M., Menestrina G., Fogliano V., Gambale F. The phytotoxic lipodepsipeptide syringopeptin 25A from *Pseudomonas syringae pv syringae* forms ion channels in sugar beet vacuoles // *J. Membr. Biol.* – 2002. – Vol. 188. – P. 237–248.
85. Carrillo C., Teruel J.A., Aranda F.A., Ortiz A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2003. – Vol. 1611. – P. 91–97.

86. Castanho M.A.R.B., Prieto M., Jameson D.M. The pentaene macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: a fluorescence pressure dependence study // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1419. – P. 1–14.
87. Castro B.M., de Almeida R.F., Fedorov A., Prieto M. The photophysics of a Rhodamine head labeled phospholipid in the identification and characterization of membrane lipid phases // *Chem. Phys. Lipids.* – 2012. – Vol. 165. – P. 311–319.
88. Cerón J.M., Contreras-Moreno J., Puertollano E., de Cienfuegos G.Á., Puertollano M.A., de Pablo M.A. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells // *Peptides.* – 2010. – Vol. 31. – P. 1494–1503.
89. Cevc G. Isothermal lipid phase transitions // *Chem. Phys. Lipids.* – 1991. – Vol. 57. – P. 293–307.
90. Chen H.M., Clayton A.H., Wang W., Sawyer W.H. Kinetics of membrane lysis by custom lytic peptides and peptide orientations in membrane // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268. – P. 1659–1669.
91. Chen H.M., Lee C.H. Structure stability of lytic peptides during their interactions with lipid bilayers // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2001. – Vol. 19. – P. 193–199.
92. Chen H.M., Wang W., Smith D., Chan S.C. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1336. – P. 171–179.
93. Chiantia S., Kahay N., Ries J., Schwille P. Effects of ceramid on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90. – P. 4500–4508.
94. Chicharro C., Granata C., Lozano R., Andreu D., Rivas L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – P. 2441–2449.
95. Chiriac R., Luchian T. Single-molecule investigation of the influence played by lipid rafts on ion transport and dynamic features of the pore-forming alamethicin oligomer // *J. Membr. Biol.* – 2008. – Vol. 224. – P. 45–54.
96. Chochina S.V., Avdulov N.A., Igbavboa U., Cleary J.P., O'Hare E.O., Wood W.G. Amyloid beta-peptide1-40 increases neuronal membrane fluidity: role of cholesterol and brain region // *J. Lipid Res.* – 2001. – Vol. 42. – P. 1292–1297.
97. Choucair A., Chakrapani M., Chakravarthy B., Katsaras J., Johnston L.J. Preferential accumulation of A β (1-42) on gel phase domains of lipid bilayers: an AFM and fluorescence study // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1768. – P. 146–154.
98. Christensen B., Fink J., Merrifield R.B., Mauzerall D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 5072–5076.
99. Cladera J., O'Shea P., Hadgraft J., Valenta C. Influence of molecular dipoles on human skin permeability: Use of 6-ketocholestanol to enhance the transdermal delivery of bacitracin // *J. Pharm. Sci.* – 2003. – Vol. 92. – P. 1018–1027.

100. Clarke R.J. Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1327. – P. 269–278.
101. Clarke R.J. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2001. – Vol. 89. – P. 263–281.
102. Clarke R.J., Kane D.J. Optical detection of membrane dipole potential: avoidance of fluidity and dye-induced effects // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1323. – P. 223–239.
103. Cournia Z., Ullmann G.M., Smith J.C. Differential effects of cholesterol, ergosterol and lanosterol on a dipalmitoyl phosphatidylcholine membrane: a molecular dynamics simulation study // *J. Phys. Chem.* – 2007. – Vol. 111. – P. 1786–1801.
104. Craven P.C., Gremillion D.H. Risk factors of ventricular fibrillation during rapid amphotericin B infusion // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1985. – Vol. 27. – P. 868–871.
105. Cseh R., Benz R. Interaction of phloretin with lipid monolayers: relationship between structural changes and dipole potential change // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 77. – P. 1477–1488.
106. Cseh R., Benz R. The adsorption of phloretin to lipid monolayers and bilayers cannot be explained by Langmuir adsorption isotherms alone // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 74. – P. 1399–1408.
107. Cseh R., Hetzer M., Wolf K., Kraus J., Bringmann G., Benz R. Interaction of phloretin with membranes: on the mode of action of phloretin at the water-lipid interface // *Eur. Biophys. J.* – 2000. – Vol. 29. – P. 172–183.
108. Cseri J., Nánási P.P., Varga E. Effects of phlorizin and phloretin on passive and dynamic electrical properties in muscle membrane // *Acta Physiol. Hung.* – 1987. – Vol. 69. – P. 21–32.
109. Czub J., Baginski M. Modulation of amphotericin B membrane interaction by cholesterol and ergosterol-a molecular dynamics study // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – Vol. 110. – P. 16743–16753.
110. Dart C. Lipid microdomains and the regulation of ion channel function // *J. Physiol.* – 2010. – Vol. 588. – P. 3169–3178.
111. de Kruijff B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., Demel R.A., van Deenen L.L. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1974. – Vol. 339. – P. 30–43.
112. de Levie R., Rangarajan S.K., Seelig P.F., Andersen O.S. On the adsorption of phloretin onto a black lipid membrane // *Biophys. J.* – 1979. – Vol. 25. – P. 295–300.
113. de los Rios V., Mancheño J.M., Lanio M.E., Oñaderra M., Gavilanes J.G. Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 252. – P. 284–289.

114. De Lucca A.J., Walsh T.J. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43. – P. 1–11.
115. De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W., Von Figura K., Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein // *Nature.* – 1998. – Vol. 391. – P. 387–390.
116. Decraene V., Pratten J., Wilson M. An assessment of the activity of a novel light-activated antimicrobial coating in a clinical environment // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* – 2008. – Vol. 29. – P. 1181–1184.
117. Deitrich C., Bagatolli L.A., Volovyk Z.N., Thompson N.L., Levi M., Jacobson K., Gratton E. Lipid rafts reconstituted in model membranes // *Biophys. J.* – 2001. – Vol. 80. – P. 1417–1428.
118. Demuro A., Smith M., Parker I. Single-channel Ca(2+) imaging implicates A β 1-42 amyloid pores in Alzheimer's disease pathology // *J. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 195. – P. 515–524.
119. Di Scala C., Chahinian H., Yahi N., Garmy N., Fantini J. Interaction of Alzheimer's β -amyloid peptides with cholesterol: mechanistic insights into amyloid pore formation // *Biochem.* – 2014. – Vol. 53. – P. 4489–4502.
120. Di Scala C., Troadec J.D., Lelièvre C., Garmy N., Fantini J., Chahinian H. Mechanism of cholesterol-assisted oligomeric channel formation by a short Alzheimer β -amyloid peptide // *J. Neurochem.* – 2014. – Vol. 128. – P. 186–195.
121. Diaz J.C., Linnehan J., Pollard H., Arispe N. Histidines 13 and 14 in the A β sequence are targets for inhibition of Alzheimer's disease A β ion channel and cytotoxicity // *Biol. Res.* – 2006. – Vol. 39. – P. 447–460.
122. Dies H., Toppozini L., Rheinstädter M.C. The interaction between amyloid- β peptides and anionic lipid membranes containing cholesterol and melatonin // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – P. e99124.
123. Diociaiuti M., Polzi L.Z., Valvo L., Malchiodi-Albedi F., Bombelli C., Gaudiano M.C. Calcitonin forms oligomeric pore-like structures in lipid membranes // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 91. – P. 2275–2281.
124. Disalvo E.A., Lairion F., Martini F., Almaleck H. Water in biological membranes at interfaces: does it play a functional role? // *J. Argent. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 92. – P. 1–22.
125. Drolle E., Hane F., Lee B., Leonenko Z. Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease // *Drug Metab. Rev.* – 2014. – Vol. 46. – P. 207–223.
126. Duclohier H., Wróblewski H. Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues // *J. Membr. Biol.* – 2001. – Vol. 184. – P. 1–12.
127. Durell S.R., Guy H.R., Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. Theoretical models of the ion channel structure of amyloid beta-protein // *Biophys. J.* – 1994. – Vol. 67. – P. 2137–2145.

128. Durell S.R., Raghunathan G., Guy H.R. Modeling the ion channel structure of cecropin // *Biophys. J.* – 1992. – Vol. 63. – P. 1623–1631.
129. Elliott J.R., Needham D., Dilger J.P., Haydon D.A. The effects of bilayer thickness and tension on gramicidin single-channel lifetime // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 735. – P. 95–103.
130. Epand R.F., Martinou J.-C., Fornallaz-Milhauser M., Hughes D.V., Epand R.M. The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 32632–32639.
131. Ermakov Y.A., Kamaraju K., Sengupta K., Sukharev S. Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids // *Biophys. J.* – 2010. – Vol. 98. – P. 1018–1027.
132. Ermakov Yu.A., Sokolov V.S. Boundary potentials of bilayer lipid membranes: method and interpretations // *Planar Lipid Bilayers and Applications*. Eds Tien H.T., Ottova A.N.Y.:Elsevier. – 2003. – P. 109–141.
133. Ermishkin L.N., Kasumov K.M., Potzeluyev V.M. Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine // *Nature.* – 1976. – Vol. 262. – P. 698–699.
134. Fantini J., Di Scala C., Yahi N., Troadec J.D., Sadelli K., Chahinian H., Garmy N. Bexarotene blocks calcium-permeable ion channels formed by neurotoxic Alzheimer's β -amyloid peptides // *ACS Chem. Neurosci.* – 2014. – Vol. 5. – P. 216–224.
135. Farnoud A.M., Toledo A.M., Konopka J.B., Del Poeta M., London E. Raft-like membrane domains in pathogenic microorganisms // *Curr. Top. Membr.* – 2015. – Vol. 75. – P. 233–268.
136. Fawzy A.A., Vishwanath B.S., Franson R.C. Inhibition of human non-pancreatic phospholipases A2 by retinoids and flavonoids. Mechanism of action // *Agents Actions.* – 1988. – Vol. 25. – P. 394–400.
137. Feigin A.M., Schagina L.V., Takemoto J.Y., Teeter J.H., Brand J.G. The effect of sterol on the sensitivity of membranes to the channel-forming antifungal antibiotic, syringomycin E // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1324. – P. 102–110.
138. Feigin A.M., Takemoto J.Y., Wangspa R., Teeter J.H., Brand J.G. Properties of voltage-gated ion channels formed by syringomycin E in planar lipid bilayers // *J. Membr. Biol.* – 1996. – Vol. 149. – P. 41–47.
139. Ferre R., Melo M.N., Correia A.D., Feliu L., Bardají E., Planas M., Castanho M. Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100 // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 96. – P. 1815–1827.
140. Fink J., Boman A., Boman H.G., Merrifield R.B. Design, synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1989. – Vol. 33. – P. 412–421.
141. Fink J., Merrifield R.B., Boman A., Boman H.G. The chemical synthesis of cecropin D and an analog with enhanced antibacterial activity // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 6260–6267.

142. Finkelstein A., Andersen O.S. The gramicidin A channel: a review of its permeability characteristics with special reference to the single-file aspect of transport // J. Membr. Biol. – 1981. – Vol. 59. – P. 155–171.
143. Flewelling R.F., Hubbell W.L. Hydrophobic ion interactions with membranes. Thermodynamic analysis of tetraphenylphosphonium binding to vesicles // Biophys. J. – 1986. – Vol. 49. – P. 531–540.
144. Flewelling R.F., Hubbell W.L. The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes // Biophys. J. – 1986. – Vol. 49. – P. 541–552.
145. Fluhler E., Burnham V.G., Loew L.M. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes // Biochem. – 1985. – Vol. 24. – P. 5749–5755.
146. Fox R.O., Richards F.M. A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution // Nature(Lond). – 1982. – Vol. 300. – P. 325–330.
147. Franklin J.C., Cafiso D.S. Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles // Biophys. J. – 1993. – Vol. 65. – P. 289–299.
148. Freer J.H., Arbuthnott J.P. Toxins of *Staphylococcus aureus* // Pharmacol. Ther. – 1983. – Vol. 19. – P. 55–106.
149. Freer J.H., Arbuthnott J.P., Billcliffe B. Effects of staphylococcal-toxin on the structure of erythrocyte membranes: a biochemical and freeze-etching study // J. Gen. Microbiol. – 1973. – Vol. 75. – P. 321–332.
150. Frolov V.A., Chizmadzhev Y.A., Cohen F.S., Zimmerberg J. "Entropic traps" in the kinetics of phase separation in multicomponent membranes stabilize nanodomains // Biophys. J. – 2006. – Vol. 91. – P. 189–205.
151. Fujii G., Chang J.E., Coley T., Steere B. The formation of amphotericin B ion channels in lipid bilayers // Biochem. – 1997. – Vol. 36. – P. 4959–4968.
152. Fukuchi N., Isogai A., Nakayama J., Takayama S., Yamashita S., Suyama K., Takemoto J.Y., Suzuki A. Structure and stereochemistry of three phytotoxins, syringomycin, syringotoxin and syringostatin, produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. – 1992. – Vol. 1. – P. 1149–1157.
153. Fuller N., Benatti C.R., Rand R.P. Curvature and bending constants for phosphatidylserine-containing membranes // Biophys. J. – 2003. – Vol. 85. – P. 1667–1674.
154. Fulop T., Le Page A., Garneau H., Azimi N., Baehl S., Dupuis G., Pawelec G., Larbi A. Aging, immunosenescence and membrane rafts: the lipid connection // Longev. Healthspan. – 2012. – Vol. 1. – P. 6.
155. Gabrielska J., Gagoś M., Gubernator J., Gruszecki W.I. Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: a ¹H NMR study // FEBS Lett. – 2006. – Vol. 580. – P. 2677–2685.

156. Gao W., Chen L., Wu R., Yu Z., Quinn P.J. Phase diagram of androsterol-dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures dispersed in excess water // *J. Phys. Chem. B.* – 2008. – Vol. 112. – P. 8375–8382.
157. García-Sáez A.J., Chiantia S., Schwille P. Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 33537–33544.
158. Garofalo T., Manganelli V., Grasso M., Mattei V., Ferri A., Misasi R., Sorice M. Role of mitochondrial raft-like microdomains in the regulation of cell apoptosis // *Apoptosis.* – 2015. – Vol. 20. – P. 621–634.
159. Gawrisch K., Ruston D., Zimmerberg J., Parsegian V.A., Rand R.P., Fuller N., Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces // *Biophys. J.* – 1992. – Vol. 61. – P. 1213–1223.
160. Geissman T.A., Heaton C.D. Anthochlor pigments. IV. The pigments of *Coreopsis grandiflora* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1943. – Vol. 65. – P. 677–683.
161. Gibson N.J., Brown M.F. Lipid headgroup and acyl chain composition modulate the MI-MII equilibrium of rhodopsin in recombinant membranes // *Biochem.* – 1993. – Vol. 32. – P. 2438–2454.
162. Gledhill J.R., Montgomery M.G., Leslie A.G., Walker J.E. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – Vol. 104. – P. 13632–13637. (PDB ID: 2JJ2).
163. Goñi F.M., Alonso A., Bagatolli L.A., Brown R.E., Marsh D., Prieto M., Thewalt J.L. Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1781. – P. 665–684.
164. Goniotaki M., Hatziantoniou S., Dimas K., Wagner M., Demetzos C. Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 56. – P. 1217–1224.
165. González-Damián J., Ortega-Blake I. Effect of membrane structure on the action of polyenes II: nystatin activity along the phase diagram of ergosterol- and cholesterol-containing POPC membranes // *J. Membr. Biol.* – 2010. – Vol. 237. – P. 41–49.
166. Gouaux E. alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins // *J. Struct. Biol.* – 1998. – Vol. 121. – P. 110–122.
167. Gould K.S., Lister C. Flavonoid functions in plants, in Ande-sen, O. M., Markham, K. R. *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications* // Boca Raton. – 2006. – Vol. 8. – P. 397–441.
168. Gray K.C., Palacios D.S., Dailey I., Endo M.M., Uno B.E., Wilcock B.C., Burke M.D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109. – P. 2234–2239.
169. Gregory P. Classification of dyes by chemical structure. *In: The Chemistry and Application of Dyes.* Waring D.H., Hallas G. Eds. Plenum. Press., New York. – 1990. – P. 17–47.
170. Grgurina I., Barca A., Cervigni S., Gallo M., Scaloni A., Pucci P. Relevance of chlorine-substituent for the antifungal activity of syringomycin and syringotoxin,

- metabolites of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* // Experientia. – 1994. – Vol. 50. – P. 130–133.
171. Grilley M.M., Stock S.D., Dickson R.C., Lester R.L., Takemoto J.Y. Syringomycin action gene SYR2 is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 11062–11068.
 172. Grinvald A., Hildesheim R., Farber I.C., Anglister L. Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential // Biophys. J. – 1982. – Vol. 39. – P. 301–308.
 173. Gross D.C., DeVay J.E., Stadtman F.H. Chemical properties of syringomycin and syringotoxin: Toxigenic peptides produced by *Pseudomonas syringae* // J. Appl. Bacteriol. – 1977. – Vol. 43. – P. 453–463.
 174. Gross E., Bedlack R.S., Loew L.M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential // Biophys. J. – 1994. – Vol. 67. – P. 208–216.
 175. Gruner S.M. Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1985. – Vol. 82. – P. 3665–3669.
 176. Gu L.Q., Shim J.W. Single molecule sensing by nanopores and nanopore devices // Analyst. – 2010. – Vol. 135. – P. 441–451.
 177. Halder S., Kanaparthi R.K., Samanta A., Chattopadhyay A. Differential effect of cholesterol and its biosynthetic precursors on membrane dipole potential // Biophys. J. – 2012. – Vol. 102. – P. 1561–1569.
 178. Hama H., Young D.A., Radding J.A., Ma D., Tang J., Stock S.D., Takemoto J.Y. Requirement of sphingolipid alpha-hydroxylation for fungicidal action of syringomycin E // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 478. – P. 26–28.
 179. Hamilton K., Barber K., Davis J., Neil K., Grant C. Phase behaviour of amphotericin B multilamellar vesicles // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – Vol. 1062. – P. 220–226.
 180. Hamilton-Miller J.M.T. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics // Bacteriol. Rev. – 1973. – Vol. 37. – P. 166–196.
 181. He F., Lin Y., Li R., Tang G., Wu D. Effects of lipid chain length on the surface properties of alkylaminomethyl rutin and of its mixture with model lecithin membrane // Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2011. – Vol. 87. – P. 164–172.
 182. Head B.P., Patel H.H., Insel P.A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – Vol. 1838. – P. 532–545.
 183. Heerklotz H., Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin // Eur. Biophys. J. – 2007. – Vol. 36. – P. 305–314.
 184. Hein M., Madefessel C., Haag B., Teichmann K., Post A., Galla H.J. Implications of a non-lamellar lipid phase for the tight junction stability. Part II: Reversible modulation

- of transepithelial resistance in high and low resistance MDCK-cells by basic amino acids, Ca^{2+} , protamine and protons // Chem. Phys. Lipids. – 1992. – Vol. 63. – P. 223–233.
185. Hein M., Post A., Galla H.J. Implications of a non-lamellar lipid phase for the tight junction stability. Part I: Influence of basic amino acids, pH and protamine on the bilayer-hexagonal II phase behaviour of PS-containing PE membranes // Chem. Phys. Lipids. – 1992. – Vol. 63. – P. 213–221.
 186. Herz J., Beffert U. Apolipoproteine receptors: linking brain development and Alzheimer's disease // Nature Rev. Neurosci. – 2000. – Vol. 1. – P. 51–58.
 187. Hidaka Y., Asami K. Measurement of dipole potential in bilayer lipid membranes by dielectric spectroscopy // J. Membr. Biol. – 2014. – Vol. 247. – P. 721–727.
 188. Hille B. Ion channels of excitable membranes. Publishers Sunderland, Massachusetts USA. –2001. – P. 814.
 189. Hirakura Y., Lin M.C., Kagan B.L. Alzheimer amyloid abeta1-42 channels: effects of solvent, pH, and Congo Red // J. Neurosci. Res. – 1999. – Vol. 57. – P. 458–466.
 190. Hirakura Y., Yiu W.W., Yamamoto A., Kagan B.L. Amyloid peptide channels: blockade by zinc and inhibition by Congo red (amyloid channel block) // Amyloid. – 2000. – Vol. 7. – P. 194–199.
 191. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // J. Physiol. – 1952. – Vol. 117. – P. 500–544.
 192. Holder S., Zemskova M., Zhang C., Tabrizizad M., Bremer R., Neidigh J.W., Lilly M.B. Characterization of a potent and selective small-molecule inhibitor of the PIM1 kinase // Mol. Cancer Ther. – 2007. – Vol. 6. – P. 163–172. (PDB ID: 2O63).
 193. Huang H.W. Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime // Biophys. J. – 1986. – Vol. 50. – P. 1061–1070.
 194. Huh N.W., Porter N.A., McIntosh T.J., Simon S.A. The interaction of polyphenols with bilayers: conditions for increasing bilayer adhesion // Biophys. J. – 1996. – Vol. 71. – P. 3261–3277.
 195. Hultmark D., Engström A., Bennich H., Kapur R., Boman H.G. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae* // Eur. J. Biochem. – 1982. – Vol. 127. – P. 207–217.
 196. Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T., Boman H.G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal protein from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* // Eur. J. Biochem. – 1980. – Vol. 106. – P. 7–16.
 197. Hutchinson M.L., Tester M.A., Gross D.C. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction // Mol. Plant-Microbe. Interact. – 1995. – Vol. 8. – P. 610–620.
 198. Hwang T.C., Koeppe R.E., Andersen O.S. Genistein can modulate channel function by a phosphorylation-independent mechanism: importance of hydrophobic mismatch and bilayer mechanics // Biochem. – 2003. – Vol. 42. – P. 13646–13658.

199. Iacobellis N.S., Lavermicocca P., Grgurina I., Simmaco M., Ballio A. Phytotoxic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1992. – Vol. 40. – P. 107–116.
200. Idkowiak-Baldys J., Grilley M.M., Takemoto J.Y. Sphingolipid C4 hydroxylation influences properties of yeast detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 569. – P. 272–276.
201. Insel P.A., Patel H.H. Membrane rafts and caveolae in cardiovascular signaling // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2009. – Vol. 18. – P. 50–56.
202. Israelachvili J.N., Marcelja S., Horn R.G. Physical principles of membrane organization // *Q. Rev. Biophys.* – 1980. – Vol. 13. – P. 121–200.
203. Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W. Theory of self assembly of lipid bilayers and vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – Vol. 470. – P. 185–201.
204. Issé B.A., Fidelio G.D., Fariás R.N. Thyroid hormones affect the membrane dipolar organization. Is it a general event in their non-genomic action? // *J. Membr. Biol.* – 2003. – Vol. 191. – P. 209–213.
205. Issé B.A., Yunes Quartino P., Fidelio G.D., Fariás R.N. Thyroid hormones-membrane interaction: reversible association of hormones with organized phospholipids with changes in fluidity and dipole potential // *Chem. Phys. Lipids.* – 2013. – Vol. 175-176. – P. 131–137.
206. Jang H., Arce F.T., Capone R., Ramachandran S., Lal R., Nussinov R. Misfolded amyloid ion channels present mobile beta-sheet subunits in contrast to conventional ion channels // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 97. – P. 3029–3037.
207. Jendrasiak G.L., Hasty J.H. The hydration of phospholipids // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1974. – Vol. 337. – P. 79–91.
208. Jennings M.L., Solomon A.K. Interaction between phloretin and the red blood cell membrane // *J. Gen. Physiol.* – 1976. – Vol. 67. – P. 381–397.
209. Jewell S.A., Petrov P.G., Winlove C.P. The effect of oxidative stress on the membrane dipole potential of human red blood cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1828. – P. 1250–1258.
210. Johnson G.A., Ellis E.A., Kim H., Muthukrishnan N., Snively T., Pellois J.P. Photoinduced membrane damage of *E. coli* and *S. aureus* by the photosensitizer-antimicrobial peptide conjugate eosin-(KLAKLAK)₂ // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – P. e91220.
211. Jordan P.C. Electrostatic modeling of ion pores. II. Effects attributable to the membrane dipole potential // *Biophys. J.* – 1983. – Vol. 41. – P. 189–195.
212. Joshi S., Bisht G.S., Rawat D.S., Maiti S., Pasha S. Comparative mode of action of novel hybrid peptide CS-1a and its rearranged amphipathic analogue CS-2a // *FEBS J.* – 2012. – Vol. 279. – P. 3776–3790.
213. Juhasz J., Davis J.H., Sharom F.J. Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of 'lipid raft' mixtures // *Biochem. J.* – 2010. – Vol. 430. – P. 415–423.

214. Julmanop C., Takano Y., Takemoto J.Y., Miyakawa T. Protection by sterols against the cytotoxicity of syringomycin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J. Gen. Microbiol. – 1993. – Vol. 139. – P. 2323–2327.
215. Jury E.C., Flores-Borja F., Kabouridis P.S. Lipid rafts in T cell signalling and disease // Semin. Cell Dev. Biol. – 2007. – Vol. 18. – P. 608–615.
216. Kakio A., Nishimoto S.I., Yanagisawa K., Kozutsumi Y., Matsuzaki K. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 24985–24990.
217. Kamiński D.M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments // Eur. Biophys. J. – 2014. – Vol. 43. – P. 453–467.
218. Kao F.S., Pan Y.R., Hsu R.Q., Chen H.M. Efficacy verification and microscopic observations of an anticancer peptide, CB1a, on single lung cancer cell // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1818. – P. 2927–29235.
219. Kappel T., Anken R.H., Hanke W., Rahmann H. Gangliosides affect membrane-channel activities dependent on ambient temperature // Cell Mol. Neurobiol. – 2000. – Vol. 20. – P. 579–590.
220. Kasianowicz J.J., Bezrukov S.M. Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations // Biophys. J. – 1995. – Vol. 69. – P. 94–105.
221. Kasumov Kh.M., Karakozov S.D. Effect of amphotericin B added to one side of a membrane // Biofizika (Article in Russian). – 1985. – Vol. 30. – P. 281–284.
222. Katsu T. Application of calcein-loaded liposomes for the determination of membrane channel size // Biol. Pharm. Bull. – 1999. – Vol. 22. – P. 978–980.
223. Kaulin Y.A., Schagina L.V., Bezrukov S.M., Malev V.V., Feigin A.M., Takemoto J.Y., Teeter J.H., Brand J.G. Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes // Biophys. J. – 1998. – Vol. 74. – P. 2918–2925.
224. Kaulin Y.A., Takemoto J.Y., Schagina L.V., Ostroumova O.S., Wangspa R., Teeter J.H., Brand J.G. Sphingolipids influence the sensitivity of lipid bilayers to fungicide, syringomycin E // J. Bioenerg. Biomembr. – 2005. – Vol. 37. – P. 339–348.
225. Kawahara M., Koyama H., Nagata T., Sadakane Y. Zinc, copper, and carnosine attenuate neurotoxicity of prion fragment PrP106-126 // Metallomics. – 2011. – Vol. 3. – P. 726–734.
226. Kaye R., Pensalfini A., Margol L., Sokolov Y., Sarsoza F., Head E., Hall J., Glabe C. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 4230–4237.
227. Kaye R., Sokolov Y., Edmonds B., McIntire T.M., Milton S.C., Hall J.E., Glabe C.G. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 46363–46366.

228. Keller S.L., Bezrukov S.M., Gruner S.M., Tate M.W., Vodyanoy I., Parsegian V.A. Probability of alamethicin conductance states varies with nonlamellar tendency of bilayer phospholipids // *Biophys. J.* – 1993. – Vol. 65. – P. 23–27.
229. Kiernan J.A. Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes // *Biotechnic. & Histochem.* – 2001. – Vol. 76. – P. 261–277.
230. Kikuchi T., Hasumi K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis *in vitro* and *in vivo* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol. 1596. – P. 234–245.
231. Killian J.A., Burger K.N.J., deKruijff B. Phase separation and hexagonal HII phase formation by gramicidins A, B and C in dioleoylphosphatidylcholine model membranes: a study of the role of the thryptophan residues // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – Vol. 897. – P. 269–284.
232. Kim J.K., Lee E., Shin S., Jeong K.W., Lee J.Y., Bae S.Y., Kim S.H., Lee J., Kim S.R., Lee D.G., Hwang J.S., Kim Y. Structure and function of papiliocin with antimicrobial and anti-inflammatory activities isolated from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 41296–41311.
233. Kim T., Lee K.I., Morris P., Pastor R.W., Andersen O.S., Im W. Influence of hydrophobic mismatch on structures and dynamics of gramicidin a and lipid bilayers // *Biophys. J.* – 2012. – Vol. 102. – P. 1551–1560.
234. Kinraide T.B., Yermiyahu U., Rytwo G. Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes // *Plant. Physiol.* – 1998. – Vol. 118. – P. 505–512.
235. Kleinberg M.E., Finkelstein A. Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayer membranes // *J. Membr. Biol.* – 1984. – Vol. 80. – P. 257–269.
236. Klymchenko A.S., Duportail G., Mély Y., Demchenko A.P. Ultrasensitive two-color fluorescence probes for dipole potential in phospholipid membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100. – P. 11219–11222.
237. Kolb H.A., Lauger P. Spectral analysis of current noise generated by carrier-mediated ion transport // *J. Membr. Biol.* – 1978. – Vol. 41. – P. 167–187.
238. Kollmitzer B., Heftberger P., Rappolt M., Pabst G. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids // *Soft. Matter.* – 2013. – Vol. 9. – P. 10877–10884.
239. Komura S., Andelman D. Physical aspects of heterogeneities in multi-component lipid membranes // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2014. – Vol. 208. – P. 34–46.
240. Korchev Y.E., Alder G.M., Bakhramov A., Bashford C.L., Joomun B.S., Sviderskaya E.V., Usherwood P.N., Pasternak C.A. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced pores: channel-like behavior in lipid bilayers and patch clamped cells // *J. Membr. Biol.* – 1995. – Vol. 143. – P. 143–151.
241. Korchev Y.E., Bashford C.L., Alder G.M., Kasianowicz J.J., Pasternak C.A. Low conductance states of a single ion channel are not «closed» // *J. Membr. Biol.* – 1995. – Vol. 147. – P. 233–239.
242. Kourie J.I., Culverson A.L., Farrelly P.V., Henry C.L., Laohachai K.N. Heterogeneous amyloid-formed ion channels as a common cytotoxic mechanism:

- implications for therapeutic strategies against amyloidosis // *Cell Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 36. – P. 191–207.
243. Koynova R., Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1376. – P. 91–145.
 244. Kremer J.J., Murphy R.M. Kinetics of adsorption of beta-amyloid peptide Abeta(1-40) to lipid bilayers // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2003. – Vol. 57. – P. 159–169.
 245. Kremer J.J., Pallitto M.M., Sklansky D.J., Murphy R.M. Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes // *Biochem.* – 2000. – Vol. 39. – P. 10309–10318.
 246. Kuwano M., Endo H., Yamamoto M. Temperature-sensitive mutation in regulation of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1972. – Vol. 112. – P. 1150–1156.
 247. Kuzmin P.I., Akimov S.A., Chizmadzhev Y.A., Zimmerberg J., Cohen F.S. Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt // *Biophys. J.* – 2005. – Vol. 88. – P. 1120–1133.
 248. Lagace T.A., Ridgway N.D. The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1833. – P. 2499–2510.
 249. Lairion F., Disalvo E.A. Effect of phloretin on the dipole potential of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylglycerol monolayers // *Langmuir.* – 2004. – Vol. 20. – P. 9151–9155.
 250. Lal R., Lin H., Quist A.P. Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1768. – P. 1966–1975.
 251. Langner M., Pruchnik H., Kubica K. The effect of the lipid bilayer state on fluorescence intensity of fluorescein-PE in a saturated lipid bilayer // *Z. Naturforsch. C.* – 2000. – Vol. 55. – P. 418–424.
 252. Lanio M.E., Morera V., Alvarez C., Tejuca M., Gómez T., Pazos F., Besada V., Martínez D., Huerta V., Padrón G., de los Angeles Chávez M. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus* // *Toxicon.* – 2001. – Vol. 39. – P. 187–194.
 253. Laradji M., Kumar P.B. Anomalously slow domain growth in fluid membranes with asymmetric transbilayer lipid distribution // *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* – 2006. – Vol. 73. – P. 040901.
 254. Larbi A., Dupuis G., Khalil A., Douziech N., Fortin C., Fülöp T. Differential role of lipid rafts in the functions of CD4+ and CD8+ human T lymphocytes with aging // *Cell Signal.* – 2006. – Vol. 18. – P. 1017–1030.
 255. Lashuel H.A., Hartley D., Petre B.M., Walz T., Lansbury P.T. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 291.
 256. Lashuel H.A., Hartley D.M., Petre B.M., Wall J.S., Simon M.N., Walz T., Lansbury P.T. Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abeta40 in vitro

- accumulate protofibrils, including amyloid pores // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 332. – P. 795–808.
257. Latorre R., Alvarez O. Voltage-dependent channels in planar lipid bilayer membranes // *Physiol. Rev.* – 1981. – Vol. 61. – P. 77–150.
 258. Latorre R., Donovan J.J. Modulation of alamethicin-induced conductance by membrane composition // *Acta Physiol. Scand. Suppl.* – 1980. – Vol. 481. – P. 37–45.
 259. Laver D.R. The barrel-stave model as applied to alamethicin and its analogs reevaluated // *Biophys. J.* – 1994. – Vol. 66. – P. 355–359.
 260. Lee D.W., Min Y., Dhar P., Ramachandran A., Israelachvili J.N., Zasadzinski J.A. Relating domain size distribution to line tension and molecular dipole density in model cytoplasmic myelin lipid monolayers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – Vol. 108. – P. 9425–9430.
 261. LeFevre P.G., Marshall J.K. The attachment of phloretin and analogues to human erythrocytes in connection with inhibition of sugar transport // *J. Biol. Chem.* – 1959. – Vol. 234. – P. 3022–3026.
 262. Lehtonen J.Y., Adlercreutz H., Kinnunen P.K. Binding of daidzein to liposomes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – Vol. 1285. – P. 91–100.
 263. Lewis J.R., Cafiso D.S. Correlation between the free energy of a channel-forming voltage-gated peptide and the spontaneous curvature of bilayer lipids // *Biochem.* – 1999. – Vol. 38. – P. 5932–5938.
 264. Lewis V., Hooper N.M. The role of lipid rafts in prion protein biology // *Front. Biosci (Landmark Ed).* – 2011. – Vol. 16. – P. 151–168.
 265. Lin H.A.I., Bhatia R., Lal R. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 13. – P. 2433–2444.
 266. Lin M.C., Mirzabekov T., Kagan B.L. Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 44–47.
 267. Lockhart C., Klimov D.K. Binding of A β peptide creates lipid density depression in DMPC bilayer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1838. – P. 2678–2688.
 268. Loew L.M. Design and characterization of electrochromic membrane probes // *J. Biochem. Biophys. Methods* – 1982. – Vol. 6. – P. 243–260.
 269. Loew L.M., Scully S., Simpson L., Waggoner A.S. Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential // *Nature.* – 1979. – Vol. 281. – P. 497–499.
 270. Loew L.M., Simpson L.L. Charge-shift probes of membrane potential: a probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer // *Biophys. J.* – 1981. – Vol. 34. – P. 353–365.
 271. Lofgren H., Pascher I. Molecular arrangements of sphingolipids. The monolayer behaviour of ceramides // *Chem. Phys. Lipids.* – 1977. – Vol. 20. – P. 273–284.
 272. Londoño-Londoño J., Lima V.R., Jaramillo C., Creczynski-Pasa T. Hesperidin and hesperetin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2010. – Vol. 499. – P. 6–16.

273. Lu X.M., Jin X.B., Zhu J.Y., Mei H.F., Ma Y., Chu F.J., Wang Y., Li X.B. Expression of the antimicrobial peptide cecropin fused with human lysozyme in *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 87. – P. 2169–2176.
274. Luchian T., Mereuta L. Phlorizin- and 6-ketocholestanol-mediated antagonistic modulation of alamethicin activity in phospholipid planar membranes // Langmuir. – 2006. – Vol. 22. – P. 8452–8457.
275. Lundbaek J.A. Lipid bilayer-mediated regulation of ion channel function by amphiphilic drugs // J. Gen. Physiol. – 2008. – Vol. 131. – P. 421–429.
276. Lundbaek J.A., Andersen O.S. Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers // J. Gen. Physiol. – 1994. – Vol. 104. – P. 645–673.
277. Lundbaek J.A., Maer A.M., Andersen O.S. Lipid bilayer electrostatic energy, curvature stress, and assembly of gramicidin channels // Biochem. – 1997. – Vol. 36. – P. 5695–5701.
278. Malev V.V., Schagina L.V., Gurnev P.A., Takemoto J.Y., Nestorovich E.M., Bezrukov S.M. Syringomycin E channel: a lipidic pore stabilized by lipopeptide? // Biophys. J. – 2002. – Vol. 82. – P. 1985–1994.
279. Malewicz B., Momsen M., Jenkin H.M. Combined effect of acyclovir and amphotericin B on the replication of pseudorabies virus in BHK-21 cells // Antimicrob. Agents Chemother. – 1983. – Vol. 23. – P. 119–124.
280. Malkov D.Y., Sokolov V.S. Fluorescent styryl dyes of the RH series affect a potential drop on the membrane/solution boundary // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – Vol. 1278. – P. 197–204.
281. Manas E.S., Xu Z.B., Unwalla R.J., Somers W.S. Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods // Structure. – 2004. – Vol. 12. – P. 2197–2207. (PDB ID: 1X7R, 1X7J).
282. Manna M., Mukhopadhyay C. Cause and effect of melittin-induced pore formation: a computational approach // Langmuir. – 2009. – Vol. 25. – P. 12235–12242.
283. Mao Y., Shang Z., Imai Y., Hoshino T., Tero R., Tanaka M., Yamamoto N., Yanagisawa K., Urisu T. Surface-induced phase separation of a sphingomyelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerates Abeta oligomerization // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – Vol. 1798. – P. 1090–1099.
284. Marassi F.M., Opella S.J., Juvvadi P., Merrifield R.B. Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy // Biophys. J. – 1999. – Vol. 77. – P. 3152–3155.
285. Marty A., Finkelstein A. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin. Differences in its one-sided and two-sided action // J. Gen. Physiol. – 1975. – Vol. 65. – P. 515–526.
286. Maselli A., Pierdominici M., Vitale C., Ortona E. Membrane lipid rafts and estrogenic signalling: a functional role in the modulation of cell homeostasis // Apoptosis. – 2015. – Vol. 20. – P. 671–678.

287. Matkó J., Szöllösi J. Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated? // *Immunol. Lett.* – 2002. – Vol. 82. – P. 3–15.
288. Matson M., Carlsson N., Beke-Somfai T., Nordén B. Spectral properties and orientation of voltage-sensitive dyes in lipid membranes // *Langmuir.* – 2012. – Vol. 28. – P. 10808–10817.
289. Matsumori N., Tahara K., Yamamoto H., Morooka A., Doi M., Oishi T., Murata M. Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by ²H NMR spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131. – P. 11855–11860.
290. Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation // *Biochem.* – 1996. – Vol. 35. – P. 11361–11368.
291. Matsuzaki K., Sugishita K., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K., Epanand R.M. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2 // *Biochem.* – 1998. – Vol. 37. – P. 11856–11863.
292. McIntosh T.J. Hydration properties of lamellar and non-lamellar phases of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine // *Chem. Phys. Lipids.* – 1996. – Vol. 81. – P. 117–131.
293. McIntosh T.J., Simon S.A. Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2006. – Vol. 35. – P. 177–198.
294. McLaughlin S. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces // *Cur. Topics Membr. Transp.* – 1977. – Vol. 9. – P. 71–144.
295. Medoff G., Kwan, C.N., Schlessinger D., Kobayashi G.S. Potentiation of rifampicin, rifampicin analogs, and tetracycline against animal cells by amphotericin B and polymyxin B // *Cancer Res.* – 1973. – Vol. 33. – P. 1146–1149.
296. Melnik E., Latorre R., Hall J.E., Tosteson D.C. Phloretin-induced changes in ion transport across lipid bilayer membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1977. – Vol. 69. – P. 243–257.
297. Menestrina G. Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations // *J. Membr. Biol.* – 1986. – Vol. 90. – P. 177–190.
298. Mereuta L., Asandei A., Luchian T. Meet me on the other side: trans-bilayer modulation of a model voltage-gated ion channel activity by membrane electrostatics asymmetry // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. e25276.
299. Milani A., Benedusi M., Aquila M., Rispoli G. Pore forming properties of cecropin-melittin hybrid peptide in a natural membrane // *Molecules.* – 2009. – Vol. 14. – P. 5179–5188.
300. Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B. Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol. 1558. – P. 95–108.

301. Mirzabekov T., Lin M.C., Yuan W.L., Marshall P.J., Carman M., Tomaselli K., Lieberburg I., Kagan B.L. Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – Vol. 202. – P. 1142–1148.
302. Mirzabekov T.A., Lin M.C., Kagan B.L. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 1988–1992.
303. Modolo L.V., Li L., Pan H., Blount J.W., Dixon R.A., Wang X. Crystal structures of glycosyltransferase UGT78G1 reveal the molecular basis for glycosylation and deglycosylation of (iso)flavonoids // *J. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 392. – P. 1292–1302. (PDB ID: 3HBF).
304. Moffett S., Brown D.A., Linder M.E. Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 2191–2198.
305. Mohammad M.M., Movileanu L. Impact of distant charge reversals within a robust beta-barrel protein pore // *J. Phys. Chem. B.* – 2010. – Vol. 114. – P. 8750–8759.
306. Montal M., Muller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties // *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* – 1972. – Vol. 65. – P. 3561–3566.
307. Montana V., Farkas D.L., Loew L.M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential // *Biochem.* – 1989. – Vol. 28. – P. 4536–4539.
308. Moore A.J., Beazley W.D., Bibby M.C., Devine D.A. Antimicrobial activity of cecropins // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1996. – Vol. 37. – P. 1077–1089.
309. Morf W.E. Calculation of liquid-junction potentials and membrane potentials on the basis of the Planck theory // *Analyt. Chem.* – 1977. – Vol. 49 – P. 810–813.
310. Morgan M.J., Kim Y.S., Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2007. – Vol. 9. – P. 1471–1483.
311. Morris C.J., Beck K., Fox M.A., Ulaeto D., Clark G.C., Gumbleton M. Pegylation of antimicrobial peptides maintains the active peptide conformation, model membrane interactions, and antimicrobial activity while improving lung tissue biocompatibility following airway delivery // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – Vol. 56. – P. 3298–3308.
312. Mouritsen O.G. Model answers to lipid membrane questions // *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – Vol. 3. – P. a004622.
313. Movileanu L., Neagoe I., Flonta M.L. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers // *Int. J. Pharm.* – 2000. – Vol. 205. – P. 135–146.
314. Muddana H.S., Chiang H.H., Butler P.J. Tuning membrane phase separation using nonlipid amphiphilics // *Biophys. J.* – 2012. – Vol. 102. – P. 489–497.
315. Muller W., Windisch H., Tritthart H.A. Fluorescent styryl dyes applied as fast optical probes of cardiac action potential // *Eur. Biophys. J.* – 1986. – Vol. 14. – P. 103–111.
316. Mulligan C.N. Environmental applications for biosurfactants // *Environ. Pollut.* – 2005. – Vol. 133. – P. 183–198.

317. Murphy R.M. Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1768. – P. 1923–1934.
318. Nagiec M.M., Young C.L., Zaworski P.G., Kobayashi S.D. Yeast sphingolipid bypass mutants as indicators of antifungal agents selectively targeting sphingolipid synthesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 307. – P. 369–374.
319. Nelson O., Tu H., Lei T., Bentahir M., de Strooper B., Bezprozvanny I. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1 // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 1230–1239.
320. Nettles K.W., Bruning J.B., Gil G., Nowak J., Sharma S.K., Hahm J.B., Kulp K., Hochberg R.B., Zhou H., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S., Kim Y., Joachimiak A., Greene G.L. NFκB selectivity of estrogen receptor ligands revealed by comparative crystallographic analyses // *Nat. Chem. Biol.* – 2008. – Vol. 4. – P. 241–247. (PDB ID: 2QA8).
321. Neumann A., Baginski M., Czub J. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132. – P. 18266–18272.
322. Neumann A., Czub J., Baginski M. On the possibility of the amphotericin B-sterol complex formation in cholesterol- and ergosterol-containing lipid bilayers: a molecular dynamics study // *J. Phys. Chem. B.* – 2009. – Vol. 113. – P. 15875–15885.
323. Nisnevitch M., Nakonechny F., Nitzan Y. Photodynamic antimicrobial chemotherapy by liposome-encapsulated water-soluble photosensitizers // *Bioorg. Khim.* – 2010. – Vol. 36. – P. 396–402.
324. Ollila F., Halling K., Vuorela P., Vuorela H., Slotte J.P. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 399. – P. 103–108.
325. Ostroumova O.S., Gurnev P.A., Schagina L.V., Bezrukov S.M. Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning // *FEBS Letters.* – 2007. – Vol. 581. – P. 804–808.
326. Ostroumova O.S., Malev V.V., Kaulin Yu.A., Gurnev Ph.A., Takemoto J.Y., Schagina L.V. Voltage-dependent synchronization of gating of syringomycin E ion channels // *FEBS Letters.* – 2005. – Vol. 579. – P. 5675–5679.
327. Palacios D.S., Dailey I., Siebert D.M., Wilcock B.C., Burke M.D. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – P. 6733–6738.
328. Paladino S., Sarnataro D., Zurzolo C. Detergent-resistant membrane microdomains and apical sorting of GPI-anchored proteins in polarized epithelial cells // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2002. – Vol. 291. – P. 439–445.
329. Paquet M.J., Fournier I., Barwicz J., Tancrede P., Auger M. The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by 2H NMR // *Chem. Phys. Lipids.* – 2002. – Vol. 119. – P. 1–11.

330. Paratcha G., Ibáñez C.F. Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2002. – Vol. 12. – P. 542–549.
331. Park S.C., Kim J.Y., Shin S.O., Jeong C.Y., Kim M.H., Shin S.Y., Cheong G.W., Park Y., Hahm K.S. Investigation of toroidal pore and oligomerization by melittin using transmission electron microscopy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 343. – P. 222–228.
332. Passechnik V. I., Sokolov V.S. Estimation of electrochrome dyes position in the bilayer through the 2nd harmonic of capacitive current // *Bioelectrochem.* – 2002. – Vol. 55. – P. 47–51.
333. Patra S.K. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1785. – P. 182–206.
334. Payán-Gómez S.A., Flores-Holguín N., Pérez-Hernández A., Piñón-Miramontes M., Glossman-Mitnik D. Computational molecular characterization of the flavonoid rutin // *Chem. Cent. J.* – 2010. – Vol. 4. – P. 12.
335. Petruk A.A., Marti M.A., Alvarez R.M. Thyroid hormone interactions with DMPC bilayers. A molecular dynamics study // *J. Chem. B.* – 2009. – Vol. 113. – P. 13357–13364.
336. Phillips R., Ursell T., Wiggins P., Sens P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function // *Nature.* – 2009. – Vol. 459. – P. 379–385.
337. Pickar A.D., Benz R. Transport of oppositely charged lipophilic probe ions in lipid bilayer membranes having various structures // *J. Membr. Biol.* – 1978. – Vol. 44. – P. 353–376.
338. Pierce S.K. Lipid rafts and B-cell activation // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2. – P. 96–105.
339. Pierchala B.A., Milbrandt J., Johnson E.M. Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent recruitment of Ret into lipid rafts enhances signaling by partitioning Ret from proteasome-dependent degradation // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26. – P. 2777–2787.
340. Pike A.C., Brzozowski A.M., Hubbard R.E., Bonn T., Thorsell A.G., Engstrom O., Ljunggren J., Gustafsson J.A., Carlquist M. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18. – P. 4608–4618. (PDB ID: 1QKM).
341. Pohl P., Rokitskaya T.I., Pohl E.E., Saporov S.M. Permeation of phloretin across bilayer lipid membranes monitored by dipole potential and microelectrode measurements // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1323. – P. 163–172.
342. Poolman B., Spitzer J.J., Wood J.M. Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1666. – P. 88–104.
343. Porter F.D. RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: a multiple congenital anomaly/mental retardation syndrome due to an inborn error of cholesterol biosynthesis // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – Vol. 71. – P. 163–174.

344. Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes // *Biochem.* – 1992. – Vol. 31. – P. 12416–12423.
345. Prangko P., Yusko E.C., Sept D., Yang J., Mayer M. Multivariate analyses of amyloid-beta oligomer populations indicate a connection between pore formation and cytotoxicity // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. e47261.
346. Qiu L., Lewis A., Como J., Vaughn M.W., Huang J., Somerharju P., Virtanen J., Cheng K.H. Cholesterol modulates the interaction of beta-amyloid peptide with lipid bilayers // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 96. – P. 4299–4307.
347. Qu X.M., Steiner H., Engstrom A., Bennich H., Boman H.G. Insect immunity: isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi* // *Eur. J. Biochem.* – 1982. – Vol. 127. – P. 219–224.
348. Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B., Kagan B., Ghiso J., Lal R. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 10427–10432.
349. Raghunathan M., Zubovski Y., Venable R.M., Pastor R.W., Nagle J.F., Tristram-Nagle S. Structure and elasticity of lipid membranes with genistein and daidzein bioflavonoids using X-ray scattering and MD simulations // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – Vol. 116. – P. 3918–3927.
350. Rajarathnam K., Hochman J., Schindler M., Ferguson-Miller S. Synthesis, location, and lateral mobility of fluorescently labeled ubiquinone 10 in mitochondrial and artificial membranes // *Biochem.* – 1989. – Vol. 28. – P. 3168–3176.
351. Ratajczak M.Z., Adamiak M. Membrane lipid rafts, master regulators of hematopoietic stem cell retention in bone marrow and their trafficking // *Leukemia.* – 2015. – Vol. 29. – P. 1452–1457.
352. Récamier K.S., Hernández-Gómez A., González-Damián J., Ortega-Blake I. Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes // *J. Membr. Biol.* – 2010. – Vol. 237. – P. 31–40.
353. Rest M.E., Kamminga A.H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W.N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis // *Microbiol. Rev.* – 1995. – Vol. 59. – P. 304–322.
354. Reyes J., Greco F., Motais R., Latorre R. Phloretin and phloretin analogs: mode of action in planar lipid bilayers and monolayers // *J. Membr. Biol.* – 1983. – Vol. 72. – P. 93–103.
355. Riazantseva M.A., Mozhaeva G.N., Kaznacheeva E.V. Calcium hypothesis of Alzheimer disease // *Usp. Fiziol. Nauk.* – 2012. – Vol. 43. – P. 59–72.
356. Rice S.O. Mathematical analysis of random noise. *In Selected papers on noise and stochastic processes*. Edit. Wax N. New York: Dover. – 1954. P. 133–294.
357. Roat M.I., Romanowski E., Araullo-Cruz T., Gordon Y.J. The antiviral effects of rose bengal and fluorescein // *Arch. Ophthalmol.* – 1987. – Vol. 105. – P. 1415–1417.
358. Róg T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M. Ordering effects of cholesterol and its analogues // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1788. – P. 97–121.

359. Rokitskaya T.I., Antonenko Y.N., Kotova E.A. Effect of the dipole potential of a bilayer lipid membrane on gramicidin channel dissociation kinetics // *Biophys. J.* – 1997. – Vol. 73. – P. 850–854.
360. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Membrane dipole potential modulates proton conductance through gramicidin channel: movement of negative ionic defects inside the channel // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 82. – P. 865–873.
361. Rosenhouse-Dantsker A., Mehta D., Levitan I. Regulation of ion channels by membrane lipids // *Compr. Physiol.* – 2012. – Vol. 2. – P. 31–68.
362. Rothwell J.A., Day A.J., Morgan M.R.A. Experimental determination of octanol–water partition coefficients of quercetin and related flavonoids // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53. – P. 4355–4360.
363. Sackmann E. Biological membranes architecture and function // In: Lipowsky R., Sackmann E. (eds) *Structure and Dynamics of Membrane*. Elsevier, Amsterdam. – 1995. – P. 1–64.
364. Sadovoy V., Silantyev A., Selimov M., Shchedrina T. An examination of chemical composition and molecular properties of grape berry skin flavonoids // *Food and Nutrition Sciences*. – 2011. – Vol. 2. – P. 1121–1127.
365. Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes // *Free Radic. Biol. Med.* – 1995. – Vol. 19. – P. 481–486.
366. Sakuma Y., Taniguchi T., Imai M. Pore formation in a binary giant vesicle induced by cone-shaped lipids // *Biophys. J.* – 2010. – Vol. 99. – P. 472–479.
367. Salter D.W., Custead-Jones S., Cook J.S. Quercetin inhibits hexose transport in a human diploid fibroblast // *J. Membr. Biol.* – 1978. – Vol. 40. – P. 67–76.
368. Samsonov A.V., Mihalyov I., Cohen F.S. Characterization of cholesterol–sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes // *Biophys. J.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1486–1500.
369. Sanderson J.M. Peptide–lipid interactions: insights and perspectives // *Org. Biomol. Chem.* – 2005. – Vol. 3. – P. 201–212.
370. Sasahara K., Morigaki K., Shinya K. Effects of membrane interaction and aggregation of amyloid β -peptide on lipid mobility and membrane domain structure // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – Vol. 15. – P. 8929–8939.
371. Sato H., Feix J.B. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2006. – Vol. 1758. – P. 1245–1256.
372. Schagina L.V., Gurnev Ph.A., Takemoto J.Y., Malev V.V. Effective gating charge of ion channels induced by toxin syringomycin E in lipid bilayers // *Bioelectrochem.* – 2003. – Vol. 60. – P. 21–27.
373. Scheidt H.A., Pampel A., Nissler L., Gebhardt R., Huster D. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2004. – Vol. 1663. – P. 97–107.

374. Schlamadinger D.E., Wang Y., McCammon J.A., Kim J.E. Spectroscopic and computational study of melittin, cecropin A, and the hybrid peptide CM15 // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – Vol. 116. – P. 10600–10608.
375. Scholz-Schroeder B.K., Hutchison M.L., Grgurina I., Gross D.C. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B 301 D on the basis of sypA and syrB1 biosynthesis mutant analysis // *Mol. Plant. Microbe Interact.* – 2001. – Vol. 14. – P. 336–348.
376. Segre A., Bachmann R.C., Ballio A., Bossa F., Grgurina I., Iacobellis N.S., Marino G., Pucci P., Simmaco M., Takemoto J.Y. The structure of syringomycins A1, E, G // *FEBS Lett.* – 1989. – Vol. 255. – P. 27–31.
377. Serfis A.B., Brancato S., Fliesler S.J. Comparative behavior of sterols in phosphatidylcholine-sterol monolayer films // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1511. – P. 341–348.
378. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1462. – P. 55–70.
379. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides // *Biopolymers.* – 2002. – Vol. 66. – P. 236–248.
380. Sharon M., Oren Z., Shai Y., Anglister J. 2D-NMR and ATR-FTIR study of the structure of a cell-selective diastereomer of melittin and its orientation in phospholipids // *Biochem.* – 1999. – Vol. 38. – P. 15305–15316.
381. Sheikh K., Giordani C., McManus J.J., Hovgaard M.B., Jarvis S.P. Differing modes of interaction between monomeric Ab 1–40 peptides and model lipid membranes: An AFM study // *Chem. Phys. Lipids.* – 2012. – Vol. 165. – P. 142–150.
382. Sheppard J.D., Jumarie C., Cooper D.G., Laprade R. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – Vol. 1064. – P. 13–23.
383. Shigemi R., Fukuda M., Suzuki Y., Morimoto T., Ishii E. L-arginine is effective in stroke-like episodes of MELAS associated with the G13513A mutation // *Brain Dev.* – 2011. – Vol. 33. – P. 518–520.
384. Shin S.Y., Kang J.H., Hahm K.S. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides // *J. Pept. Res.* – 1999. – Vol. 53. – P. 82–90.
385. Shinitzky M., Inbar M. Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1976. – Vol. 433. – P. 133–149.
386. Siccheri F., Moarefi I., Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck // *Nature.* – 1997. – Vol. 385. – P. 602–609. (PDB ID: 2HCK).
387. Silva P.M., Gonçalves S., Santos N.C. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 97.
388. Silvestro L., Gupta K., Weiser J.N., Axelsen P.H. The concentration-dependent membrane activity of cecropin A // *Biochem.* – 1997. – Vol. 36. – P. 11452–11460.

389. Silvestro L., Weiser J.N., Axelsen P.H. Antibacterial and antimembrane activities of cecropin A in *Escherichia coli* // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – Vol. 44. – P. 602–607.
390. Simon S.A., McIntosh T.J., Magid A.D., Needham D. Modulation of the interbilayer hydration pressure by the addition of dipoles at the hydrocarbon/water interface // Biophys. J. – 1992. – Vol. 61. – P. 786–799.
391. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes // Nature. – 1997. – Vol. 387. – P. 569–572.
392. Simons K., Toomre D. Lipid rafts and signal transduction // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2000. – Vol. 1. – P. 31–39.
393. Singh P., Cameotra S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // Trends Biotechnol. – 2004. – Vol. 22. – P. 142–146.
394. Singh P., Halder S., Chattopadhyay A. Differential effect of sterols on dipole potential in hippocampal membranes: implications for receptor function // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1828. – P. 917–923.
395. Smondyrev A.M., Berkowitz M.L. Effects of oxygenated sterol on phospholipid bilayer properties: a molecular dynamics simulation // Chem. Phys. Lipids. – 2001. – Vol. 112. – P. 31–39.
396. Sobko A.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Zakharov S.D., Cramer W.A. Lipid dependence of the channel properties of a colicin E1-lipid toroidal pore // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – P. 14408–14416.
397. Sobko A.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Zakharov S.D., Cramer W.A. Effect of lipids with different spontaneous curvature on the channel activity of colicin E1: evidence in favor of a toroidal pore // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 576. – P. 205–210.
398. Sokolov Y., Kozak J.A., Kayed R., Chanturiya A., Glabe C., Hall J.E. Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure // J. Gen. Physiol. – 2006. – Vol. 128. – P. 637–647.
399. Song L., Hobaugh M.R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J.E. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore // Science. – 1996. – Vol. 274. – P. 1859–1866. PDB ID: 7AHL
400. Song Y., Talaty N., Datsenko K., Wanner B.L., Cooks R.G. In vivo recognition of *Bacillus subtilis* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) // Analyst. – 2009. – Vol. 134. – P. 838–841.
401. Sonkina S., Tukhfatullina I.I., Benseny-Cases N., Ionov M., Bryszewska M., Salakhutdinov B.A., Cladera J. Interaction of the prion protein fragment PrP 185-206 with biological membranes: effect on membrane permeability // J. Pept. Sci. – 2010. – Vol. 16. – P. 342–348.
402. Srisailam S., Kumar T.K., Arunkumar A.I., Leung K.W., Yu C., Chen H.M. Crumpled structure of the custom hydrophobic lytic peptide cecropin B3 // Eur. J. Biochem. – 2001. – Vol. 268. – P. 4278–4284.

403. Sroda K., Michalak K., Maniewska J., Gryniewicz G., Szeja W., Zawisza J., Hendrich A.B. Genistein derivatives decrease liposome membrane integrity-calcein release and molecular modeling study // *Biophys. Chem.* – 2008. – Vol. 138. – P. 78–82.
404. Starke-Peterkovic T., Clarke R.J. Effect of headgroup on the dipole potential of phospholipid vesicles // *Eur. Biophys. J.* – 2009. – Vol. 39. – P. 103–110.
405. Starke-Peterkovic T., Turner N., Vitha M.F., Waller M.P., Hibbs D.E., Clarke R.J. Electric field strength of membrane lipids from vertebrate species: membrane lipid composition and Na⁺-K⁺-ATPase molecular activity // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90. – P. 4060–4070.
406. Starr F.W., Hartmann B., Douglas J.F. Dynamical clustering and a mechanism for raft-like structures in a model lipid membrane // *Soft Matter.* – 2014. – Vol. 10. – P. 3036–3047.
407. Steiner H., Andreu D., Merrifield R.B. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 939. – P. 260–266.
408. Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Boman H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity // *Nature.* – 1981. – Vol. 292. – P. 246–248.
409. Sternal K., Czub J., Baginski M. Molecular aspects of the interaction between amphotericin B and a phospholipid bilayer: molecular dynamics studies // *J. Mol. Model.* (Online). – 2004. – Vol. 10. – P. 223–232.
410. Stock S.D., Hama H., Radding J.A., Young D.A., Takemoto J.Y. Syringomycin E inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for biosynthesis of sphingolipids with very-long-chain fatty acids and mannose- and phosphoinositolcontaining head groups // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44. – P. 1174–1180.
411. Strichartz G.R., Oxford G.S., Ramon F. Effects of the dipolar form of phloretin on potassium conductance in squid giant axons // *Biophys. J.* – 1980. – Vol. 31. – P. 229–246.
412. Suchyna T.M., Tape S.E., Koeppe R.E., Andersen O.S., Sachs F., Gottlieb P.A. Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers // *Nature.* – 2004. – Vol. 430. – P. 235–240.
413. Suttman H., Retz M., Paulsen F., Harder J., Zwergel U., Kamradt J., Wullich B., Unteregger G., Stöckle M., Lehmann J. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells // *BMC Urol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 5.
414. Suzuki T. Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density // *Neurosci. Res.* – 2002. – Vol. 44. – P. 1–9.
415. Szabó Z., Budai M., Blasko K., Grof P. Molecular dynamics of the cyclic lipodepsipeptides' action on model membranes: effects of syringopeptin 22A, syringomycin E, and syringotoxin studied by EPR technique // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1660. – P. 118–130.
416. Taguchi N., Takano Y., Julmanop C., Wang Y., Stock S.D., Takemoto J.Y., Miyakawa T. Identification and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SYR1 gene

- reveals that ergosterol is involved in the action of syringomycin // *Microbiol.* – 1994. – Vol. 140. – P. 353–359.
417. Takemoto J.Y., Brand J.G., Kaulin Y.A., Malev V.V., Schagina L.V., Blasko K. The syringomycins: lipodepsipeptide pore formers from plant bacterium *Pseudomonas syringae*. In Menestrina G., Dalla Serra M., Lazarovici P. (eds.), *Pore forming peptides and protein toxins*, Taylor&Francis, Inc. – 2003. – P. 315.
 418. Taniguchi Y., Ohba T., Miyata H., Ohki K. Rapid phase change of lipid microdomains in giant vesicles induced by conversion of sphingomyelin to ceramide // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1758. – P. 145–153.
 419. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity // *Mol. Cell Biochem.* – 2008. – Vol. 314. – P. 65–71.
 420. Te Welscher Y.M., van Leeuwen M.R., de Kruijff B., Dijksterhuis J., Breukink E. Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109. – P. 11156–11159.
 421. Tejuca M., Dalla Serra M., Ferreras M., Lanio M.E., Menestrina G. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolyisin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // *Biochem.* – 1996. – Vol. 35. – P. 14947–14957.
 422. Teshima T., Ueki Y., Nakai T., Shiba T. Structure determination of lepidopteran, self-defense substance produced by silkworm // *Tetrahedron.* – 1986. – Vol. 42. – P. 829–834.
 423. Thewalt J.L., Bloom M. Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams // *Biophys. J.* – 1992. – Vol. 63. – P. 1176–1181.
 424. Tillman T.S., Cascio M. Effects of membrane lipids on ion channel structure and function // *Cell Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol. 38. – P. 161–190.
 425. Tofoleanu F., Buchete N.V. Alzheimer A β peptide interactions with lipid membranes: fibrils, oligomers and polymorphic amyloid channels // *Prion.* – 2012. – Vol. 6. – P. 339–345.
 426. Torrado J.J., Espada R., Ballesteros M.P., Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting // *J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 97. – P. 2405–2425.
 427. Tosteson M.T., Tosteson D.C. The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers // *Biophys. J.* – 1981. – Vol. 36. – P. 109–116.
 428. Toume M., Tani M. Change in activity of serine palmitoyltransferase affects sensitivity to syringomycin E in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2014. – Vol. 358. – P. 64–71.
 429. Tret'iakova K.A. Modern concepts of the role of cholesterol in the body // *Usp. Sovrem. Biol.* (Article in Russian). – 1974. – Vol. 77. – P. 35–50.
 430. Trivella D.B., Bleicher L., Palmieri Lde C., Wiggers H.J., Montanari C.A., Kelly J.W., Lima L.M., Foguel D., Polikarpov I. Conformational differences between the wild type and V30M mutant transthyretin modulate its binding to genistein: implications to tetramer stability and ligand-binding // *J. Struct. Biol.* – 2010. – Vol. 170. – P. 522–531. (PDB ID: 3KGU, PDB ID: 3KGT).

431. Tsui-Pierchala B.A., Encinas M., Milbrandt J., Johnson E.M. Lipid rafts in neuronal signaling and function // *Trends Neurosci.* – 2002. – Vol. 25. – P. 412–417.
432. Tsybul'skaya M.V., Antonenko Yu.N., Tropsha A.E., Yaguzhinsky L.S. Iodine-containing hormones dipole modifiers of phospholipid membranes // *Biofizika* (in Russian). – 1984. – Vol. 29. – P. 801–805.
433. Valcarcel C.A., Dalla Serra M., Potrich C., Bernhart I., Tejuca M., Martinez D., Pazos F., Lanio M.E., Menestrina G. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // *Biophys. J.* – 2001. – Vol. 80. – P. 2761–2774.
434. Valenta C., Steininger A., Auner B.G. Phloretin and 6-ketocholestanol: membrane interactions studied by a phospholipid/polydiacetylene colorimetric assay and differential scanning calorimetry // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2004. – Vol. 57. – P. 329–336.
435. Valkov A., Nakonechny F., Nisnevitch M. Polymer-immobilized photosensitizers for continuous eradication of bacteria // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 14984–14996.
436. Van Laethem F., Leo O. Membrane lipid rafts: new targets for immunoregulation // *Curr. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 2. – P. 557–570.
437. Vance J.E. Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism // *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 75. – P. 69–111.
438. Vance J.E., Tasseva G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1831. – P. 543–554.
439. Veatch S.L., Keller S.L. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 85. – P. 3074–3083.
440. Venegas B., Gonza'lez-Damia'n J., Celis H., Ortega-Blake I. Amphotericin B channels in the bacterial membrane: role of sterol and temperature // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 85. – P. 2323–2332.
441. Verkman A.S., Solomon A.K. A stepwise mechanism for the permeation of phloretin through a lipid bilayer // *J. Gen. Physiol.* – 1982. – Vol. 80. – P. 557–581.
442. Vetrivel K.S., Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1801. – P. 860–867.
443. Vollenbroich D., Ozel M., Vater J., Kamp R.M., Pauli G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses, by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis* // *Biologicals.* – 1997. – Vol. 25. – P. 289–297.
444. Vollenbroich D., Pauli G., Ozel M., Vater J. Antimycoplasma properties and applications in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – P. 44–49.
445. Wade D., Andreu D., Mitchell S.A., Silveira A.M., Boman A., Boman H.G., Merrifield R.B. Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1992. – Vol. 40. – P. 429–436.

446. Wade D., Boman A., Wahlin B., Drain C.M., Andreu D., Boman H.G., Merrifield R.B. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87. – P. 4761–4765.
447. Waggoner A.S. Dye indicators of membrane potential // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* – 1979. – Vol. 8. – P. 47–68.
448. Walker E.H., Pacold M.E., Perisic O., Stephens L., Hawkins P.T., Wymann M.P., Williams R.L. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine // *Mol. Cell.* – 2000. – Vol. 6. – P. 909–919. (PDB ID: 1E90).
449. Walsh P., Vanderlee G., Yau J., Campeau J., Sim V.L., Yip C.M., Sharpe S. The mechanism of membrane disruption by cytotoxic amyloid oligomers formed by prion protein(106-126) is dependent on bilayer composition // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289. – P. 10419–10430.
450. Wang L. Measurements and implications of the membrane dipole potential // *Annu. Rev. Biochem.* – 2012. – Vol. 81. – P. 615–635.
451. Wang W., Smith D.K., Moulding K., Chen H.M. The dependence of membrane permeability by the antibacterial peptide cecropin B and its analogs, CB-1 and CB-3, on liposomes of different composition // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 27438–27448.
452. Wang Y.M., Kinraide T.B., Wang P., Hao X.Z., Zhou D.M. Surface electrical potentials of root cell plasma membranes: implications for ion interactions, rhizotoxicity, and uptake // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 22661–22677.
453. Weis R.M., McConell H.M. Two-dimensional chiral crystals of phospholipid // *Nature.* – 1984. – Vol. 310. – P. 47–49.
454. Wesołowska O., Henrich A.B., Łania-Pietrzak B., Wisniewski J., Molnar J., Michalak I., Michalak K. Perturbation of the lipid phase of a membrane is not involved of MRP1 transport activity by flavonoids // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2009. – Vol. 14. – P. 199–221.
455. Wesołowska O., Michalak K., Jadwiga Maniewska J., Hendrich A.B. Giant unilamellar vesicles – a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems // *Acta Biochim. Pol.* – 2009. – Vol. 56. – P. 33–39.
456. Wilmouth R.C., Turnbull J.J., Welford R.W., Clifton I.J., Prescott A.G., Schofield C.J. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana* // *Structure.* – 2002. – Vol. 10. – P. 93–103. (PDB ID: 1GP5, PDB ID: 3LM5, PDB ID: 3BPT).
457. Wiseman R.L., Zhang Y., Lee K.P., Harding H.P., Haynes C.M., Price J., Sicheri F., Ron D. Flavonol activation defines an unanticipated ligand-binding site in the kinase-RNase domain of IRE1 // *Mol. Cell.* – 2010. – Vol. 38. – P. 291–304. (PDB ID: 3LJO).
458. Wohlt J., Edholm O. The range and shielding of dipole-dipole interactions in phospholipid bilayers // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 87. – P. 2433–2445.

459. Woo H.J., Wallqvist A. Spontaneous buckling of lipid bilayer and vesicle budding induced by antimicrobial peptide magainin 2: a coarse-grained simulation study // *J. Phys. Chem. B.* – 2011. – Vol. 115. – P. 8122–8129.
460. Wu J.M., Jan P.S., Yu H.C., Haung H.Y., Fang H.J., Chang Y.I., Cheng J.W., Chen H.M. Structure and function of a custom anticancer peptide, CB1a // *Peptides.* – 2009. – Vol. 30. – P. 839–848.
461. Xu Y.C., Leung S.W., Yeung D.K., Hu L.H., Chen G.H., Che C.M., Man R.Y. Structure–activity relationships of flavonoids for vascular relaxation // *Phytochemistry.* – 2007. – Vol. 68. – P. 1179–1188.
462. Yamauchi K., Doi K., Kinoshita M., Kii F., Fukuda H. Archaeobacterial lipid models: highly salt-tolerant membranes from 1,2-diphytanylglycero-3-phosphocholine // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol. 1110. – P. 171–177.
463. Yang L., Harroun T., Weiss T., Ding L., Huang H. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores // *Biophys. J.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1475–1485.
464. Ye J.S., Zheng X.J., Leung K.W., Chen H.M., Sheu F.S. Induction of transient ion channel-like pores in a cancer cell by antibiotic peptide // *J. Biochem.* – 2004. – Vol. 136. – P. 255–259.
465. Yip C.M., Elton E.A., Darabie A.A., Morrison M.R., McLaurin J. Cholesterol, a modulator of membrane-associated Abeta-fibrillogenesis and neurotoxicity // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 311. – P. 723–734.
466. Yoshizaki F., Nakayama H., Iwahara C., Takamori K., Ogawa H., Iwabuchi K. Role of glycosphingolipid-enriched microdomains in innate immunity: microdomain-dependent phagocytic cell functions // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1780. – P. 383–392.
467. Yu X., Zheng J. Cholesterol promotes the interaction of Alzheimer β -amyloid monomer with lipid bilayer // *J. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 421. – P. 561–571.
468. Yun J., Lee H., Ko H.J., Woo E.R., Lee D.G. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1848. – P. 695–701.
469. Zager R.A. Polyene antibiotics: relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content // *Am. J. Kidney Dis.* – 2000. – Vol. 36. – P. 238–249.
470. Zakharov S.D., Hulleman J.D., Dutseva E.A., Antonenko Y.N., Rochet J.C., Cramer W.A. Helical alpha-synuclein forms highly conductive ion channels // *Biochem.* – 2007. – Vol. 46. – P. 14369–14379.
471. Zhan H., Lazaridis T. Influence of the membrane dipole potential on peptide binding to lipid bilayers // *Biophys. Chem.* – 2012. – Vol. 161. – P. 1–7.
472. Zhang C., Moretti R., Jiang J., Thorson J.S. The in vitro characterization of polyene glycosyltransferases AmphDI and NysDI // *Chembiochem.* – 2008. – Vol. 9. – P. 2506–2514.

- 473. Zhu D., Bungart B.L., Yang X., Zhumadilov Z., Lee J.C., Askarova S. Role of membrane biophysics in Alzheimer's-related cell pathways // *Front Neurosci.* – 2015. – Vol. 27. – P. 186.
- 474. Zonta B., Minichiello L. Synaptic membrane rafts: traffic lights for local neurotrophin signaling? // *Front Synaptic Neurosci.* – 2013. – Vol. 5. – P. 9.
- 475. Zotchev S.B. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy // *Curr. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 10. – P. 211–223.
- 476. Zurzolo C., van Meer G., Mayor S. The order of rafts. Conference on microdomains, lipid rafts and caveolae // *EMBO Rep.* – 2003. – Vol. 4. – P. 1117–1121.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает безграничную признательность своим учителям, д.б.н., проф. Людмиле Владимировне Щагиной и д.х.н., проф. Валерию Вениаминовичу Малеву, за научные консультации, плодотворное обсуждение полученных результатов и высказанные критические замечания.

Автор искренне благодарен члену-корр. РАН, д.м.н., проф. Владимиру Олеговичу Самойлову, привившему своим ученикам интерес к науке и направившему автора в сторону исследований мембранного транспорта.

Автор глубоко благодарен к.б.н. Светлане Сергеевне Ефимовой за многолетний совместный труд, неизменную дружескую поддержку и неоценимую помощь при подготовке рукописи диссертации.

Автор выражает благодарность всему дружному коллективу Группы моделирования ионных каналов Института цитологии РАН, Анастасии Алексеевне Захаровой, Роману Яковлевичу Медведеву, Вячеславу Александровичу Доронину, Екатерине Андреевне Безгачевой, а также ее бывшим сотрудникам Евгению Георгиевичу Чулкову, Филиппу Алексеевичу Гурьеву, Юрию Альфредовичу Каулину, Андрею Николаевичу Бессонову, Максиму Георгиевичу Ильину, сотрудникам Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Института цитологии РАН, Екатерине Вячеславовне Михайловой и Ольге Викторовне Степаненко, сотрудникам Секции молекулярного транспорта Национальных институтов здоровья США, и лично ее руководителю Сергею Михайловичу Безрукову, сотрудникам Лаборатории биополимеров Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, Марку Исааковичу Мосевичу и Владиславу Викторовичу Захарову, за работу над совместными проектами. Автор благодарит сотрудников Лаборатории биоэлектрохимии Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, и лично Юрия Александровича Чизмаджева и Валерия Сергеевича Соколова, за интересное обсуждение результатов и ценные предложения.

Автор также хотел бы выразить благодарность зав. Лаборатории ионных каналов клеточных мембран, д.б.н. Елене Валентиновне Казначеевой, и зав. Отделом внутриклеточной сигнализации транспорта, академику Николаю Николаевичу Никольскому за создание творческой атмосферы в коллективах.

Диссертация посвящается светлой памяти моей бабушки, Зинаиды Дмитриевны Соколовой.