

МЕЖДУНАРОДНАЯ АССОЦИАЦИЯ АКАДЕМИЙ НАУК

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА

ИНСТИТУТ БОТАНИКИ

Х.М. КАСУМОВ

СТРУКТУРА И МЕМБРАННАЯ
ФУНКЦИЯ ПОЛИЕНОВЫХ
МАКРОЛИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

*Под редакцией академика Национальной
Академии наук Азербайджана Дж. А. Алиева*



МОСКВА • «НАУКА»



БАКУ • «ЭЛМ»

•2009•

УДК 615.1/.4

ББК 52.81

К28

Рецензенты:

академик РАН П.Г. Костюк,

академик РАН Н.Н. Никольский,

член-корреспондент РАН Г.Р. Иваницкий,

доктор биологических наук, проф. А.А.Лев,

доктор биологических наук, проф. В.Н. Парфенов,

доктор биологических наук Л.В. Щагина

доктор биологических наук, проф. И.Н.Алиева

доктор физико-математических наук А.М.Гаджиев

Касумов Х.М. Структура и мембранныя функция полиеновых макролидных антибиотиков /Х.М. Касумов; под ред. академика Дж.А. Алиева; Совет по книгоизданию МААН; Ин-т теоретической и экспериментальной биофизики Российской АН; Ин-т цитологии Российской АН; Ин-т ботаники НАН Азербайджана. – Москва: «Наука»; Баку: «Элм», 2009. – 512 с.

ISBN 978-5-02-037023-4.

ISBN 978-9952-453-01-0

В монографии приведены современные данные о структуре и свойствах мембраноактивных полиеновых антибиотиков и их производных, изложены данные об их биологическом действии, выявлена роль бимолекулярных липидных мембран в расшифровке молекулярного механизма взаимодействия полиеновых антибиотиков с мембранами. В основе механизма действия полиеновых антибиотиков лежит образование ими в мембранах в комплексе со стеринами структурных ионных каналов молекулярных размеров, избирательно проницаемых для ионов и органических соединений. Большая длительность жизни полиеновых каналов в проводящем состоянии и доступность их молекул к химической трансформации открывают широкие перспективы для выяснения молекулярного механизма переноса ионов через каналы. Исследования кинетики проводимости мембран и свойств одиночных ионных каналов в присутствии полиеновых антибиотиков с установленной структурой молекул позволили выявить основные принципы сборки и разборки каналов в мембранах. Рассматриваются практические аспекты использования полиеновых антибиотиков в медицине.

Книга предназначена для биофизиков, химиков, биохимиков, фармакологов и микробиологов.

К 1907000000
655(07) – 2009

© Совет по книгоизданию МААН,
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН; Институт цитологии РАН; Институт ботаники НАН Азербайджана, 2009
© Касумов Х.М., 2009

ПРЕДИСЛОВИЕ

Х.М. Касумов является известным специалистом в области биофизики мембранных транспорта, молекулярной организации ионных каналов в липидных мембранах. Исследования Х.М. Касумова связаны с изучением механизма избирательного переноса ионов и органических веществ через мембранные, разработкой теоретических основ мембранных технологий, изучением взаимосвязи структуры и мембранных функций каналообразующих соединений.

Х.М. Касумов с 1967 г. по 1980 г. работал в Институте биологической физики АН СССР. Он начал свою работу в лаборатории радиобиологии, руководимой проф. Л.Х. Эйдус. В 1968 г. поступил в целевую аспирантуру в этом же институте, где работал в лаборатории биофизики мембран под руководством лауреата Государственной премии СССР, проф. Либермана Е.А. В 1972 г., успешно завершив аспирантуру, Х.М. Касумов защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности "биофизика". В период с 1973 г. по 1980 г. он работал в лаборатории проф. Г.Н. Берестовского, в группе биофизики мембран, руководимой доктором физ.-мат. наук Л.Н. Ермишкиным. В 1980 г. Х.М. Касумов успешно защитил докторскую диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности "биофизика". Несмотря на предложение со стороны дирекции оставаться работать в Институте биологической физики АН СССР, Х.М. Касумов возвращается в Баку и продолжает там свою научную работу.

Х.М. Касумов первый из советских исследователей выявил большой класс мембраноактивных полиеновых антибиотиков и начал изучение молекулярного механизма их действия на бислойные липидные мембранные. Он теоретически обосновал, а затем экспериментально доказал, что в основе механизма действия полиеновых антибиотиков лежит образование ими в мембранах в комплексе с холестерином каналов молекулярных размеров, проницаемых для ионов и органических соединений. Необходимо отметить, что попытки зарегистрировать ионные каналы в присутствии полиеновых антибиотиков предпринимались учеными из США, Англии и Италии, но они оказались безрезультатными. Более того, в одном из известных на западе журналов «Biophysical Journal, 1977, v. 17, № 3, p. 269-274» итальянскими учеными Ромине и др. была опубликована статья под названием: "Доказательство того, что нистатин не обладает способностью формировать каналы в тонких липидных мембранах". Де-

тальный анализ полученных экспериментальных данных позволил Х.М. Касумову определить условия формирования полиеновыми антибиотиками в мембранах ионных каналов. Х.М. Касумову впервые удалось обнаружить образование в липидных мембранах одиночных ионных каналов и исследовать их физико-химические свойства. Публикация основных результатов исследований в престижном журнале "Nature" (Англия) принесла Х.М. Касумову известность. Научные труды Х.М. Касумова опубликованы в таких авторитетных западных и российских журналах как "Biochimica et Biophysica Acta", "Studia Biophysica", "Pol. J. Chemistry", "Биофизика", "Успехи современной биологии", "Биологические мембранны", "Цитология", "Химико-фармацевтический журнал", "Антибиотики и медицинская биотехнология", "Антибиотики и химиотерапия". Основные результаты исследований докладывались Х.М. Касумовым на многих биофизических и биохимических конгрессах, съездах и симпозиумах.

Данная монография Х.М. Касумова представляет значительную ценность для развития теории функционирования ионных каналов в клеточных мембранах. Исследования, проведенные им, имеют существенное практическое значение. Полиеновые антибиотики и их производные являются эффективными соединениями, используемыми в медицинской практике в борьбе с грибковыми инфекциями. Х.М. Касумову удалось классифицировать полиеновые антибиотики, исходя как из их молекулярной структуры, так и способности эффективно взаимодействовать с клеточными мембранами, что указывает путь синтеза и целенаправленного отбора мембраноактивных полиеновых антибиотиков. Считаю, что предлагаемая монография Х.М. Касумова окажется полезным пособием для научных работников, занимающихся проблемами мембранологии и разработкой новых лекарственных препаратов.

**ДИРЕКТОР ИНСТИТУТА
ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОФИЗИКИ РАН**

**ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК**

ИВАНИЦКИЙ Г.Р.

ОТ АВТОРА

*Светлой памяти родителей
моих посвящается*

Все явления, свойственные живым организмам, в той или иной степени связаны с клеточными мембранами. Значение мембран в жизнедеятельности клетки и организма в целом трудно переоценить. Достаточно привести несколько примеров, чтобы можно было судить о важности исследования структуры и функции мембран. Мембранны участвуют в процессах адгезии и узнавании клеток друг другом, мембранны нервных клеток генерируют электрические импульсы, мембранны скелетных мышц и миокарда участвуют в сокращении и расслаблении мышц, мембранны, расположенные в стенках кишечника, участвуют в процессах всасывания и переваривания пищи. Фоточувствительные мембранны сетчатки глаза трансформируют световую энергию в энергию электрического импульса. Мембранны хлоропластов зеленых растений и митохондрий используют солнечную энергию для фотосинтеза, синтезируя из воды и углекислоты сахара, которые используются в качестве горючего при клеточном дыхании [Govindjee, 1982; Алиев и др., 1985, 1986; Алиев, Гулиев, 1990]. В мембранны локализованы специальные рецепторы, преобразующие энергию звука в электрические импульсы, а также передающие центральной нервной системе информацию о запахах, изменениях температуры и давления. В основе всех вышеперечисленных процессов лежит изменение ионной проницаемости клеточных мембранны. Одним из классических примеров изменения ионной проницаемости мембранны можно привести возникновение нервного импульса. В ответ на внешний стимул происходит колебание мембранныного потенциала приводящее к изменению проницаемости мембранны для ионов Na^+ и K^+ [Тасаки, 1957; Ходжкин, 1965; Ходоров, 1969; Либерман, 1969, 1970].

Несмотря на детальное количественное описание Ходжкиным и Хаксли электрического поведения возбудимых мембранны, механизм переноса ионов через мембранны все еще остается малоизученным. Относительно механизма переноса ионов через мембранны высказаны две основные гипотезы: 1) гипотеза о существовании в мембранных особых переносчиков, обладающих сродством к тем или иным

ионам; 2) гипотеза о наличии в возбудимой мембране специальных каналов, характеризующихся высокой ионной селективностью и способностью открываться и закрываться в ответ на изменение величины мембранныго потенциала.

Основу всех клеточных мембран составляет бимолекулярный слой липидов. Методом реконструкции липидов клеточных мембран удалось выяснить основные механизмы транспорта ионов через мембранны. Молекулы липидов, попадая в водную среду, ведут себя как анизотропные вещества, обладающие свойствами жидких кристаллов. В зависимости от соотношения липид/вода молекулы липидов могут образовывать в растворах ряд мезоморфных структур. Так, например, капля липидов, попадая на поверхность воды, образует мономолекулярный слой липидов, причем таким образом, что полярные хвосты липидов обращены в воду, а неполярные углеводородные цепочки жирных кислот в воздух. Затем молекулы липидов образуют мицеллярную шаровидную структуру так, что внутрь шарика обращены углеводородные хвосты молекул липидов, а в водную среду обращены полярные головки. Молекулы липидов могут образовать ламеллярные структуры в виде двух плоских мономолекулярных слоев и в виде замкнутых везикул (липосом) и, наконец, молекулы липидов могут формировать гексагональную структуру по типу капля масла в воде, либо капля воды в масле.

Для изучения электрических характеристик и транспортных процессов мембран удобно использовать ламеллярные структуры в виде плоских бимолекулярных мембран. Однако получить устойчивые плоские бимолекулярные пленки долгое время никому не удавалось. В начале 60-х–70-х годов в США Мюллер и Монталь впервые сумели на отверстии в тефлоновой ячейке получить устойчивую липидную мембрану, разделяющую два водных раствора, и исследовать их электрические характеристики [Mueller, Rudin, 1963, 1964; Montal, Mueller, 1972]. Сравнительный анализ электрических характеристик клеточных и бислойных липидных мембран (БЛМ) показал, что по многим параметрам характеристики клеточных мембран совпадают с бислойными мембранами: по электрической емкости, толщине, напряжению разрыва, коэффициенту поверхностного напряжения, проницаемости для воды, потенциалу покоя и показателю преломления [Mueller et al., 1963; Котык, Яначек, 1980]. Однако сопротивление бислойных мембран на много порядков - в 10^5 - 10^6 раз превышает сопротивление клеточных мембран. И благодаря именно

этому свойству бислойных мембран удалось в дальнейшем выявить основные механизмы ионного транспорта через мембранны. Но успех пришел не сразу. Начались интенсивные поиски веществ, которые могли бы уменьшить сопротивление бислойных мембран.

Прогресс, достигнутый в изучении механизма мембранныго транспорта, связан в значительной степени с веществами антибиотической природы [McLaughlin, Eisenberg, 1975]. В середине 60-х годов в Институте биоорганической химии им. М.М.Шемякина был синтезирован гидрофобный макроциклический депептидный антибиотик валиномицин, под действием которого было обнаружено уменьшение сопротивления мембран на несколько порядков [Лев, Бужинский, 1967; Mueller, Rudin, 1967]. В присутствии валиномицина мембрана становилась избирательно проницаемой для катионов щелочных металлов [Лев и др., 1966; Лев, Бужинский, 1967; Mueller, Rudin, 1967; Готлиб и др., 1968; Бужинский и др., 1968, 1970; Либерман и др., 1970]. Валиномицин оказался способным дискриминировать такие близкие по своим физико-химическим свойствам ионы, как Na^+ и K^+ . Коэффициент дискриминации 1000 в пользу ионов K^+ [Mueller, Rudin, 1967; Бужинский и др., 1968; Овчинников и др., 1974]. Исследуя зависимость проводимости мембран от концентрации валиномицина и от концентрации проникающих ионов, удалось установить, что валиномицин работает в мемbrane по механизму подвижных переносчиков [Лев, Бужинский, 1967; Mueller, Rudin, 1967; Овчинников и др., 1974]. Таким образом, впервые на бислоях был экспериментально установлен механизм переноса ионов через мембрану с помощью подвижных переносчиков.

В конце 60-х – начале 70-х годов были обнаружены еще два мембраноактивных антибиотика – аламетицин и грамицидин А.

Аламетицин (первоначально антибиотик U 22324) продуцируется с весьма высоким выходом (10 мг/мл) микроорганизмом *Trichoderma viride* [Meyer, Reussen, 1967; Reusser, 1967]. Аламетицин представляет собой циклический октадекапептид (м.в. 27 000), который образован 18 аминокислотами с высоким содержанием необычной аминокислоты- α -метилаланина (α – аминоизомасляной кислоты, Aib) [Овчинников и др., 1974; Martin et al., 1975, 1976]. По своему действию на БЛМ аламетицин сильно отличается как от макроциклических комплексонов типа валиномицина или нактинов, так и от грамицидина. Основная особенность аламетицина заключается в том, что в его присутствии проводимость бислоев чрезвычайно силь-

но зависит от приложенного напряжения и от структуры липида, формирующего БЛМ [Cherry et al., 1972]. Индуцируемая антибиотиком проводимость сильно зависит от величины мембранныго потенциала [Mueller, Rudin, 1967, 1968 a, b, 1969; Eisenberg et al., 1973]. Эта зависимость характеризуется наличием участков вольтамперных характеристик с отрицательным сопротивлением. Отрицательное сопротивление, в свою очередь, является важной характеристикой возбудимых биологических мембран [Mueller, Rudin, 1968 a, b]. Напряжение, при котором начинается рост проводимости, пропорционально логарифму обратной концентрации аламетицина и солей [Eisenberg-Grunberg, 1972]. Было показано, что при введении аламетицина в очень высоких концентрациях ($0,5 \cdot 10^{-5}$ М) по одну сторону мембраны на вольтамперных кривых появляется участок с отрицательным наклоном.

Измерения мембранныго потенциала в условиях солевого градиента показывают, что бислои из нейтральных или отрицательно заряженных липидов в присутствии аламетицина обладают преимущественной катионной проницаемостью. Однако при адсорбции на их поверхности органических поликатионов (спермина, гистонов, протамина) эти бислои проницаемы в большей степени для анионов. Таким образом, ионная проницаемость мембран с аламетицином определяется их поверхностным зарядом [Eisenberg-Grunberg, 1972; Mueller, Rudin, 1968 a, b]. Если в условиях солевого градиента ввести аламетицин со стороны более концентрированного раствора, то на вольтамперной характеристике мембраны появляется участок с отрицательным сопротивлением, а в точке нулевого тока, отвечающей мембранныму потенциалу в отсутствие внешнего поля, сохраняется высокая дифференциальная проводимость. Участок с отрицательным сопротивлением может появиться и в том случае, когда диффузионный потенциал равен нулю, в частности при добавлении протамина с одной стороны мембраны. Этот эффект объясняется тем, что при адсорбции протамина возникает асимметрия поверхностного заряда [Eisenberg-Grunberg, 1972; Mueller, Rudin, 1968 a, b].

Независимо от величины потенциала зависимость проводимости мембран от концентрации аламетицина пропорциональна шестой-девятой степени. Это указывает на то, что в переносе ионов участвует ансамбль взаимодействующих молекул антибиотика. Аналогичная зависимость характерна и для скорости изменения проводимости в условиях фиксации напряжения. Высокий порядок зависимости про-

водимости мембран наблюдается и от концентрации солей при постоянной концентрации аламетицина в водных растворах [Mueller, Rudin, 1968 a, b].

При малых концентрациях аламетицина и снижения напряжения на мемbrane можно видеть флуктуации одиночных ионных каналов [Gordon, Haydon, 1972; Gordon, 1973; Haydon, Hladky, 1972; Eisenberg-Grunberg, 1972; Mueller, 1975; Molle et al., 1988; Kaduk et al., 1998]. Аламетициновые каналы функционируют в мемbrane независимо друг от друга. Для аламетицина обнаружено, что каждый открытый канал может иметь несколько состояний проводимости и в определенных условиях их число достигает семи [Gordon, Haydon, 1972; Gordon, Haydon, 1975; Mueller, Rudin, 1968 a, b; Boheim, 1974; Kolb, Bamberg, 1977; Boheim, Kolb, 1978; Kolb, Boheim, 1978].

Анализ дискретных изменений тока БЛМ, связанных с процессами открывания и закрывания ионного канала, показал, что каналы аламетицина не взаимодействуют друг с другом при функционировании. Каким же образом напряжение на БЛМ влияет на проводимость мембранных с функционирующими каналами? В ряде работ показано, что экспоненциальная зависимость проводимости БЛМ от величины приложенного напряжения в системе большого числа каналов связана с изменением вероятности образования и разрушения пор [Mayro et al., 1972; Gordon, Haydon, 1972; Boheim, 1974; Boheim, Kolb, 1978; Kolb, Boheim, 1978].

Молекулярные модели структуры аламетицинового канала основаны на предположении о том, что молекулы антибиотика образуют олигомеры, адсорбированные на границе раздела мембрана – водный раствор [Baumann, Mueller, 1974; Bamberg et al., 1976]. Под действием электрического поля комплексы антибиотика с ионом, несущие заряд, входят в мембрану и пронизывают ее насеквоздь. Полярные концы молекул аламетицина служат якорем, удерживающим пору в мембране. Внутреннюю полость канала выстилают гидрофильные амидные группы пептида, а наружная поверхность образована гидрофобными боковыми цепями аминокислот. Диаметр поры увеличивается при включении в олигомер еще одной молекулы аламетицина и уменьшается при диссоциации субъединиц, формирующих пору. Это предположение позволяет объяснить и множественность состояний проводимости и катионную селективность канала.

Другая модель предполагает, что олигомеры, формирующие поры, имеют в своем составе фиксированное число молекул, которые

погружены вглубь мембраны. Различные уровни проводимости канала возникают вследствие конформационных изменений в олигомере или при изменении числа мономеров внутри агрегата молекул [Gordon, Haydon, 1975; Hall, 1975].

В этой связи интересна работа по исследованию проводящих свойств аналога аламетицина ges-Aib-Lenges-Pheol-Phe – аламетицина, которая характеризуется тем, что этот аналог формирует полностью α – спиральную структуру [Molle et al., 1988; Kaduk et al., 1998]. Молли и Кадук с соавторами обнаружили, что аналог аламетицина формирует в бислоях потенциалзависимые каналы со многими уровнями проводимости, но, в отличие от исходного аламетицина, без короткоживущих проводящих состояний [Molle et al., 1988; Kaduk et al., 1998]. Была предложена модель, согласно которой в пределах ансамбля молекул аламетицина, расположенного в мембране, существует конформационное равновесие α – спираль $\leftrightarrow \beta$ – структура [Fringeli, Fringeli, 1979]. Под действием электрического поля осуществляется сдвиг в сторону спиральных структур, которые, по мнению авторов, образуют проводящую пору [Fringeli, Fringeli, 1979].

Очень привлекательной является модель, учитывающая большой дипольный момент α – спиралей этого пептидного антибиотика и предполагающая, что аламетициновая пора образуется путем потенциал зависимого флип-флопа α – спиральных диполей [Boheim, Kolb, 1978]. Согласно этой модели, в отсутствие электрического поля антипараллельные диполи, ориентированные перпендикулярно плоскости бислоя, плотно прилегают друг к другу, образуя устойчивые агрегаты, не проводящие ионы. Приложенное напряжение ведет к переориентации (флип-флопу) части диполей вдоль электрического поля с образованием различных агрегатов, в которых преобладают параллельно ориентированные диполи. Из-за электростатического отталкивания между ними возникают значительные полости, заполняемые водой (поры), которые и обуславливают проводимость мембран для ионов.

На основании термодинамического анализа включения молекул аламетицина в мембрану была предложена модель, согласно которой аламетицин включается в бислой и агрегирует в нем. Предполагается, что сборка аламетициновых каналов обусловлена потенциалзависимостью включения антибиотиков из водной среды в

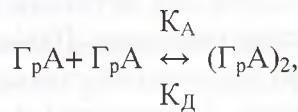
мембрану и последующим их распределением в липидной фазе [Schwarz et al., 1986]. Проводимость аламетицинового канала значительно выше грамицидинового.

Грамицидин А занимает особое место среди мембранотропных соединений, использующихся для изучения механизмов транспорта ионов через биологические мембранны [Finkelstein, Anderson, 1981]. Это наиболее простой по химической структуре и наиболее изученный пептидный антибиотик. Грамицидин А является антибиотиком полипептидной природы и продуцируется культурой микроорганизма *Bacillus brevis* [Hotchkiss, Dubas, 1941; Hotchkiss, 1944]. Первичная структура грамицидина А была установлена Саржесом и др. [Sarges, Witkop et al., 1964, 1965]. Молекула антибиотика представляет собой линейный пентадекапептид, характерной особенностью которого является чередование L и D-аминокислот. Природный антибиотик является смесью грамицидинов А, В и С и содержит 72% А, 9% В и 19% С изомера соответственно [Gross, Witkop, 1965]. Несмотря на значительную гетерогенность природной смеси грамицидинов, основным и преобладающим компонентом ее является грамицидин А. В функциональном отношении все аналоги грамицидина довольно близки друг к другу и поэтому многие исследователи используют природную смесь грамицидинов, рассматривая ее как индивидуальное вещество [Bamberg, Benz, 1976].

Было обнаружено антимикробное действие грамицидина А [Хантер, Шварц, 1969; Ristov et al., 1975]. Механизм антимикробного действия грамицидина А заключается в увеличении пассивной проницаемости биологических мембран для одновалентных катионов и протонов. На моделях биологических мембран - БЛМ и липосомах показано, что и в данном случае грамицидин А является индуктором пассивной катионной и протонной проницаемости мембран [Mueller, Rudin, 1967; Liberman, Topaly, 1968; Tosteson et al., 1968; Goodall, 1970, 1973; Hladky, Haydon, 1970, 1972].

Молекулы грамицидина А формируют в модельных липидных мембранах ионные каналы с определенной проводимостью. Прямой способ оценки числа молекул, участвующих в формировании грамицидинового канала состоит в измерении зависимости проводимости мембран от концентрации грамицидина А. Было выдвинуто предположение, что канал грамицидина формируется двумя молекулами антибиотика и, исходя из этого, считается, что проводимость мем-

бран должна быть пропорциональна квадрату концентрации антибиотика [Tosteson et al., 1968; Goodal, 1970]. Если гипотеза димера верна, то процесс формирования канала может быть описан как бимолекулярная реакция между двумя мономерами грамицидина А:



где K_A и K_D – константы ассоциации и диссоциации двух мономеров.

В хорошем соответствии с моделью димера находятся и результаты релаксационных экспериментов. Кроме того, подтверждение гипотезы димера было получено в экспериментах с производными грамицидина А [Veatch, et al., 1974, Veatch, Blout, 1974; Veatch, Stryer, 1974; Veatch, 1976; Apell et al., 1974]. Таким образом, димерная природа канала грамицидина А считалась установленным фактом. Но в последующем появилась работа [Stark et al., 1986], где выдвигалась агрегационная (мицеллярная) модель организации ионных каналов грамицидина А. Авторы исследовали на черных бислоях из диолеоилфосфатидилхолина, модифицированных малыми концентрациями грамицидина, кинетику изменения тока при скачке потенциала (обычно с нулевого уровня до 80 мВ) для грамицидина и его димеризованного аналога – малонилбис-дезформил-грамицидина. Данные, полученные при этом, удовлетворительно объясняются в предположении, что проводящее состояние канала формируется при латеральной ассоциации нескольких молекул грамицидина А с последующим включением их в мембрану.

Молекулярная модель грамицидина А впервые была предложена Урри и др. [Urty, 1971, 1972] и независимо Рамасандраном и Чандрасекараном [Ramachandran, Chandrasekaran, 1972]. На основе расчетов энергии конформации молекул Урри предложил систему так называемых π_{LD} -спиралей. Согласно этой модели, мономеры грамицидина А, свернутые в один из типов π_{LD} – спиралей, соединены в димер одним из возможных способов «голова к голове», «голова к хвосту» или «хвост к хвосту». В более поздних работах Урри и др. [Urty et al., 1971], когда были выполнены эксперименты на БЛМ, обсуждается только один вариант структуры димера, согласно которому молекулы объединены по типу «голова к голове» ($\bar{\pi}_{LD}\bar{\pi}_{LD}$). Из четырех предложенных типов спиралей наиболее вероятной

представляется π_{LD^6} -спираль, имеющая 6,3 аминокислотных остатков на виток. В этом случае длина димера составляет 25-30 Å, а внутренний диаметр канала 4 Å. Внутренняя полость канала выстлана карбонильными группами, ориентированными параллельно или антипараллельно оси спирали. Гидрофобные остатки аминокислот образуют наружную поверхность канала. Длина димера совпадает с наименьшей толщиной углеводородной части липидного бислоя. Позднее Витч и др. предложили альтернативную модель канала грамицидина А [Veatch et al., 1974]. С помощью тонкослойной хроматографии авторы выделили четыре конформационных типа димеров и индивидуально охарактеризовали их методами кругового дихроизма (КД), инфракрасной (ИК) и ядерно-магнитно-резонансной (ЯМР) спектроскопии. Был постулирован новый класс двойных спиралей, в которых 2 мономера закручены вокруг общей оси. Структуру двойной спирали стабилизируют только межмолекулярные водородные связи. Двойная спираль может быть параллельной ($\uparrow\uparrow\pi\pi_{LD^6}$) или антипараллельной ($\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD^6}$). Геометрические размеры двойных спиралей близки к параметрам, соответствующим димерам, образованным из одиночных π_{LD^6} -спиралей.

На основании измерений ЯМР спектров грамицидина А установлена конформация основной цепи молекулы – левая антипараллельная двойная спираль $\downarrow\uparrow\pi\pi_{LD^6}$ [Арсеньев и др., 1984]. Структурные характеристики молекул грамицидина А удовлетворяют требованиям, предъявляемым к пространственной структуре трансмембранных каналов.

С момента появления двух альтернативных моделей канала грамицидина А усилия исследователей были направлены на то, чтобы установить какая из моделей наиболее адекватно описывает экспериментальные результаты.

Механизм, посредством которого электрическое поле влияет на число проводящих каналов, до сих пор не выяснен. Урри высказал предположение о существовании проводящей и непроводящей структуры в мембране [Urry, 1972]. Согласно этому предположению, проводящей структурой является π_{LD^6} -спираль, а непроводящей – антипараллельная β_2 -спираль, имеющая иную конформацию. Оба

типа спиралей находятся в равновесии: антипараллельная $\beta_2 \Leftarrow \pi_{LD^6}$.

Урри приводит доводы в пользу того, что антипараллельная β_2 - спираль обладает более низким дипольным моментом, чем π_{LD^6} - спираль. Действие электрического поля на мембрану заключается в том, что оно сдвигает равновесие в сторону структур с большим дипольным моментом, которые являются проводящими. Такое объяснение не согласуется с данными, полученными Бамбергом и Бенцем [Bamberg, Benz., 1976].

Другое возможное объяснение влияния электрического поля на процесс формирования канала основывается на предположении Гордона [Gordon, 1973] о том, что существует неактивная форма грамицидина А, которая располагается на границе мембранны с водной фазой. Поскольку константа диэлектрической проницаемости мононера больше, чем константа углеводородной части мембранны, монономер под действием электрического поля способен двигаться внутрь мембранны и изменить конформацию на проводящую.

Получен ряд селективности грамицидинового канала для протонов и одновалентных ионов щелочных металлов: $H^+ >> NH_4^+ > C_s^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$. Это указывает на то, что канал является катион-избирательным [Myers, Hydon, 1972; Heitz et al., 1986]. Характер движения протонов в грамицидиновом канале пока не ясен. Протоны могут двигаться в виде гидроксоний – катионов. Но вероятнее всего в канале протоны переносятся вдоль цепочки молекул воды в результате перераспределения водородных и ковалентных связей.

Разработаны несколько математических моделей, описывающие движение ионов через грамицидиновый канал. Наиболее простой и при этом удовлетворительно описывающей экспериментальные результаты (характер вольтамперных кривых, концентрационные зависимости для грамицидионовых каналов в бислойных мембранных, а также величины бионных потенциалов) является модель, предложенная Урбаном и Хладки [Urban, Hladky, 1979, 1980]. Ими было установлено, что в условиях равновесия вода находится главным образом у входа в канал, а внутри канала имеется девять молекул воды, расположенных в один ряд и связанных между собой водородными связями. В этой модели грамицидиновый канал представ-

ляется узкой порой и транспорт ионов через канал рассматривается и описывается как однорядная диффузия [Finkelstein, Andersen, 1981], причем предполагается, что в канале одновременно могут находиться не более двух ионов [Schagina et al., 1978, 1983]. Формально, по модели Урбана прохождение ионов представляется как результат их скачкообразного движения от одного места связывания к другому, причем последовательно преодолеваются три энергетических барьера. Два из них расположены у входа в канал с каждой его стороны, а средний разделяет места связывания, т.е. энергетические ямы. Надо отметить, что такого рода энергетический профиль лишь весьма приблизительно отвечает профилю, рассчитанному методом молекулярной динамики и на основании теории молекулярных взаимодействий. При расчетах в основном учитывалось электростатическое взаимодействие иона со структурами, образующими встроенный в бимолекулярный липидный слой внутрипептидный канал [Mackay et al., 1984; Хугорский, 1984; Ring, 1986; Etchebest, Pullman, 1986 a, b; Etchebest et al., 1985; Shapovalov et al., 1999].

В работе Льва А.А. и его сотрудников исследуется характер вольтамперных характеристик одиночных грамицидиновых каналов при симметричных и асимметричных условиях сорбции на мембранах анионов I – анилинонафталин-8-сульфоната (АНС⁻), в которой показано, что в результате сорбции АНС⁻ на мембранах изменяется ряд катионной избирательности грамицидиновых каналов [Осипов и др., 1988]. Сопоставление экспериментальных данных с расчетными, полученными на основании широко распространенной модели димерного внутрипептидного канала, выявило ряд несоответствий, которые можно объяснить значительно проще, если принять иную модель ионных каналов. Авторы предложили модель, согласно которой трансмембранный переход ионов происходит за счет перехода ионов по поверхности дефекта в бислойе, возникающего в результате внедрения молекул грамицидина в мембрану. При этом предполагается «прыжковый» механизм перемещения ионов от одного места связывания их к другому. Эта модель позволяет объяснить также ряд явлений, характерных для грамицидиновых каналов. Так, явление блокирования тока через грамицидиновый канал в присутствии непроникающих через него ионов должно иметь место в тех случаях, когда ионы-блокаторы сильно взаимодействуют с местами связывания на поверхности липидного слоя

[Heitz. et al., 1986]. В результате этого уменьшается количество свободных мест, необходимых для миграции носителей тока.

Время нахождения аламетициновых и грамицидиновых каналов в открытом проводящем ионы состоянии оказалось очень коротким (~ 1 с). Стало ясно, что исследовать молекулярный механизм переноса ионов через мембрану в присутствии аламетицина и грамицидина А не представляется возможным из-за очень малого промежутка времени нахождения канала в открытом состоянии.

Поиск мембронтропных соединений продолжался. В середине 70-х и в начале 80-х годов XX-го столетия был обнаружен еще один класс канaloобразующих соединений – полиеновые антибиотики (ПА) [Ermishkin et al., 1976, 1977; Kasumov et al., 1979, 1981]. Основными представителями этого класса соединений являются амфотерицин В, нистатин, микогептин и леворин, структура и физико-химические характеристики которых будут описаны дальше в специальном разделе монографии. При введении этих антибиотиков в водные солевые растворы, окружающие мембранны, их проводимость нарастала дискретными скачками [Ermishkin et al., 1976, 1977; Kasumov et al., 1979, 1981]. Было установлено, что ПА увеличивают проницаемость мембран, содержащих в своем составе холестерин, для одновалентных анионов и катионов щелочных металлов по механизму образования ионных каналов [Касумов, 1986 а]. Оказалось, что полиеновые каналы находятся в проводящем состоянии большую долю времени по сравнению с аламетициновыми и грамицидиновыми каналами. Расчеты показали, что среднее время нахождения канала в проводящем состоянии больше одной минуты [Ermishkin et al., 1976, 1977]. В руках исследователей оказался уникальный инструмент для изучения молекулярного механизма переноса ионов через мембранны. Исследование в этом направлении облегчились тем обстоятельством, что молекулы ПА доступны к химической модификации. Имея ряд производных полиеновых молекул, модифицированных в различных частях лактонного кольца, можно изучить роль отдельных функциональных группировок в полиеновой молекуле и установить взаимосвязь между структурой молекул и их функцией в липидных мембранных. Так, например, гидрирование со-пряженных двойных связей влияет на скорость сборки полиеновых каналов. Сборка одиночных ионных каналов в присутствии гидрированного амфотерицина В происходит при концентрациях в 100-1000

раз больших, чем в присутствии исходного амфотерицина В. Блокирование зарядов на полярных группах молекул антибиотиков приводит к резкому уменьшению времени жизни канала в проводящем состоянии. Изменение структуры гидрофильной цепи полиеновой молекулы влияет на избирательную проницаемость каналов и на величину их проводимости [Kasumov et al., 1979, 1981, Ермишкин, 1980; Ермишкин, Зильберштейн, 1982; Касумов, 1986 а].

Получение производных путем химической модификации различных частей полиеновой молекулы и наряду с этим изучение их свойств на БЛМ создали уникальную возможность для выяснения взаимосвязи структуры и функции внутри данного класса соединений. Это позволяет создать теоретически обоснованную рекомендацию к синтезу новых антибиотиков с заданными свойствами, внести значительный вклад в изучение молекулярного механизма ионной избирательности биологических мембран и принципов функционирования ионных каналов в клеточных мембранах.

До сих пор практически ничего не известно о структуре и молекулярной организации ионных каналов клеточных мембран. Считается, что важнейшая роль в структуре канала принадлежит специальным мембранным белкам. Одним из возможных способов идентификации каналообразующих белков является реконструкция клеточных каналов на БЛМ. Существует и другой способ идентификации канального комплекса – с помощью методов генетической инженерии [Aliev et al., 1993, 1994, 1995]. В качестве примера можно привести работу Стивенса и Нода [Stevens, 1984; Noda et al., 1984], в которой установлена структура кДНК, кодирующая потенциалзависимый Na^+ канал в электрическом органе угря. Натриевый (Na^+) канал представляет собой полипептид с молекулярным весом 200 кД, состоящий из 4-х доменов, гомологичных друг другу. Однако все еще нет полной уверенности в том, что выделенный белок образует потенциалзависимый Na^+ канал. Для этого требуется транслировать иРНК, синтезированную на матрице кДНК, например, в ооцитах лягушки. С помощью методов генной инженерии можно обнаружить ген, синтезирующий определенный тип канального белка, и тем самым установить молекулярную природу ионных каналов, функционирующих в клеточных мембранах.

Автор выражает благодарность Президенту Государственной Нефтяной Компании Азербайджанской Республики Господину Ровнагу Абдуллаеву, Вице-Президенту Нефтяной Компании академику Хошбахту Юсиф-заде за спонсорскую поддержку в публикации монографии, Президенту НАНА академику М.К. Керимову, академику НАНА Т.М. Нагиеву, к.б.н. Бабаеву П.И., к.б.н. Бабаеву Р.И. и коллективу лаборатории Института ботаники НАНА за помощь при подготовке данной монографии к печати.

Автор также выражает благодарность рецензентам монографии академику Российской АН и НАН Украины Костюку П.Г., академику РАН Никольскому Н.Н., член-корр. РАН Иваницкому Г.Р., д.б.н., проф. Парfenovу В.Н., Лауреату Государственной премии, д.б.н., проф. Льву А.А., д.б.н. Щагиной Л.В., сотрудникам НАН Азербайджана д.ф.м.н. Гаджиеву А.М. и д.б.н., проф. Алиевой И.Н. за положительную оценку научного труда автора.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю благодарность ответственному редактору академику Дж.А. Алиеву за огромную помощь и внимание автору, за ценные советы и полезные замечания, что, несомненно, улучшило содержание и повысило качество данного издания.

Чл.-корр. Национальной Академии наук Азербайджана Х.М. Касумов

ВВЕДЕНИЕ

Я сделал все, что мог, кто может, пусть сделает лучшее.
Цицерон

Feci, quod potui, faciant meliora potentes.
Cicero

Исследование молекулярного механизма избирательной проницаемости клеточных мембран для ионов и органических соединений является одной из ключевых проблем молекулярной биологии и биофизики мембранных транспорта. В настоящее время известно, что трансмембранный перенос ионов и органических соединений через биологические мембранны осуществляется в основном с помощью двух основных механизмов - с помощью подвижных переносчиков и каналов (пор). Существование ионных каналов было постулировано несколько десятков лет назад, в частности, при изучении механизма распространения нервного импульса по нервным волокнам животных, а также при исследовании механизма активного транспорта ионов через плазматические мембранны клеток. Натриевые и калиевые каналы возбудимых мембран, проницаемость которых зависит от величины и знака приложенного к мембране напряжения, имеют в своем составе селективные "фильтры", благодаря которым через каналы переносятся ионы одного вида [Hodgkin, Huxley, 1952; Катц, 1968; Hille, 1970; Маркин и др., 1974; Taylor, 1974, 1987; Ходоров, 1975]. Управление работой каналов возбудимых мембран осуществляется при взаимодействии электрического поля с высокоспециализированными образованиями в каналах - «воротами» [Armstrong, 1974; Armstrong, Bezanilla, 1975; Алмерс, 1981].

За последние десятилетия были достигнуты большие успехи в области исследования пассивного ионного транспорта через возбудимые мембранны. Пассивная проницаемость каналов постсинаптических мембран тесно связана с работой ацетилхолинового рецептора [Rang, 1974; Gage, 1976; Вульфиус, Каваленко, 1978; Nelson et al., 1980]. Взаимодействие нейромедиатора с ацетилхолиновым рецептором инициирует цепь событий, приводящих к открыванию ионных каналов на чрезвычайно малые промежутки времени [Nelson et al., 1980; Quast, 1980]. Используемые в этих работах электрофизиологические методы, благодаря своей высокой чувствительности и хоро-

шему разрешению по времени, позволили не только количественно описать свойства ионных каналов, но и изучить зависимость свойств этих каналов от различных физико-химических параметров, воздействующих на функционирующие в клеточных мембранах ионные каналы. Высокая избирательная проницаемость клеточных мембран для ионов обусловлена функционированием в них транспортных систем - ионных каналов. Изучение их молекулярной организации, избирательности, механизма сборки и разборки являются фундаментальными задачами молекулярной биофизики.

В настоящее время широко распространено представление о том, что принципы структурной организации и функционирования каналов в биологических и модельных мембранах могут быть во многом сходны. В связи с этим большое внимание уделяется изучению структуры и мембранный активности каналаобразующих соединений. Наиболее известными представителями из них являются ПА [Holz, 1979; Касумов, 1986 а; Brajtburg, Bolard, 1996], аламетицин [Mayro et al., 1972], моназомицин [Akasaki et al., 1963; Muller, Finkelstein, 1972; Bamberg, Jahko, 1976; Moore, Neher, 1976; Heyer et al., 1976] и грамицидин А [Утту, 1971, 1972]. В основе биологического действия этих антибиотиков лежит увеличение ионной проницаемости мембран по механизму образования ионных каналов. Расшифровка на молекулярном уровне механизма функционирования каналов в липидных мембранах может привести к пониманию основных принципов работы каналов клеточных мембран и избирательного регулирования транспорта ионов через мембранны клеток.

Одним из важнейших достижений в области современной биофизики мембран явилось выяснение принципов функционирования ионных каналов в электровозбудимых и хемовозбудимых мембранах клеток. Общим для этих транспортных систем, отличающихся механизмом запуска ионной проницаемости, является то, что в ответ на активирующий сигнал трансмембранные каналы отвечают возникновением серий дискретных флуктуаций их ионной проводимости. Несмотря на несомненные достижения в области выявления первичной структуры интегральных белков, формирующих ионные каналы, до настоящего времени остается неизвестной физическая природа перехода ионных каналов из открытого в закрытое состояние и обратно. Выяснение физических основ такого рода переключений на исключительно сложных по своей структуре нативных мембранных системах представляется крайне трудным, хотя и совершенно необходимым для понимания природы этого важнейшего процесса. Од-

нако в силу целого ряда методических трудностей невозможно было подойти к решению вопроса о молекулярных механизмах избирательного ионного транспорта через мембранны. Решение этой задачи стало возможным благодаря созданию бимолекулярного слоя липидных мембран, на которых хорошо моделировались селективные и возбудимые свойства клеточных мембран. Отсутствие информации о химическом составе и структуре каналов клеточных мембран стимулировало быстрое развитие исследований механизмов ионного транспорта на БЛМ, модифицируя их мембранотропными каналообразующими соединениями с известной структурой молекул. В настоящее время известен широкий круг химически совершенно разнородных веществ, которые, будучи включенные в липидные бислои, приводят к появлению дискретных уровней флуктуаций проводимости мембран. При этом остается неясной связь между структурой модификаторов и свойствами образованных ими каналов. Прогресс, достигнутый в изучении механизма транспорта ионов через мембранны, связан с веществами антибиотической природы. Среди них следует отметить антибиотики пептидной природы-аламетицин и грамицидин [Овчинников и др., 1974]. В конце 60-х и начале 70-х годов был обнаружен новый класс мембрано-активных каналообразующих соединений – полиеновые макролидные антибиотики. Основными представителями этого класса антибиотиков являются амфотерицин В, нистатин, микогептин, леворин, трихомицин, филиппин, для которых установлена химическая структура. Интерес к исследованию механизма действия ПА связан с тем, что они с одной стороны являются структурными каналоформерами, а с другой, для многих из них установлена химическая структура. Исследования на БЛМ показали, что ПА формируют в мембранах в комплексе с холестерином и другими чувствительными к нему стеринами трансмембранные каналы молекулярных размеров [Ермishkin et al., 1976]. Исследования на БЛМ дают значительно большую информацию о свойствах одиночных ионных каналов, а также мембран с большим числом каналов, так как позволяют экспериментально подтвердить наше представление об элементарных единицах проводимости, а также получить информацию о молекулярных процессах работы ионных каналов в мембранах. Важной особенностью липидных мембран является то, что ряд параметров можно заранее задавать и контролировать. Использование ПА в качестве инструмента для подобного рода исследований важно потому, что позволяет детально разобраться в молекулярных механизмах перестройки канального ком-

плекса в зависимости от структуры молекул, формирующих канал, так и от условий внешней среды.

В силу целого ряда методических трудностей в настоящее время не представляется возможным исследовать молекулярный механизм работы мембранных систем проницаемости. Чтобы подойти к решению данного вопроса необходимо, по меньшей мере, знать структуру молекул, образующих системы проницаемости, а также иметь возможность независимо изучать отдельные, независимые системы проницаемости с широким варьированием внешних и внутренних параметров. Такая возможность появилась в начале 60-х годов, когда были сделаны несколько важных фундаментальных открытий. Первое открытие связано с созданием плоского стабильного липидного бислоя [Mueller et al., 1963]. Бислои представляют собой хорошую модель липидного матрикса клеточных мембран, на которой стали возможны широкие исследования физико-химических свойств липидной части мембраны, а также реконструкция систем проницаемости, выделенных из клеточных мембран. Второе открытие связано с обнаружением низкомолекулярного соединения, вызывающего изменение ионной проницаемости, как на БЛМ, так и на клеточных мембранах [Mueller et al., 1962]. Это оказалось неидентифицированное вещество белковой природы, выделенное из бактерий *Aerobacter cloaceae*, в присутствии которого липидные мембранные приобретали некоторые свойства, характерные для возбудимых клеточных мембран: N - образную вольтамперную характеристику, которая, в условиях фиксации тока, сопровождалась триггерными перебросами потенциала [Mueller, Rudin, 1963; Ehrenstein et al., 1970]. В связи с этим это вещество было названо "excitability inducing material" (EIM). Благодаря такому свойству EIM появилась возможность моделировать свойства возбудимых клеточных мембран в простых экспериментальных условиях. Вслед за этим было обнаружено довольно много веществ с установленной химической структурой, вызывающих изменение проницаемости липидных мембран для ионов. Известны несколько групп ионофоров: депсипептиды типа валиномицина; нактины и эннатинины, краун-эфиры – переносчики одновалентных катионов; нигерицин – обменный переносчик одновалентных катионов; переносчики двухвалентных катионов – X537 и A2123; жирорастворимые слабые кислоты – переносчики протонов, являющиеся разобщителями окислительного фосфорилирования в митохондриях; и три группы антибиотиков: грамицидин А, аламетицин и полиеновые макролидные антибиотики, образующие в мем-

бранах ионные каналы [Либерман, Топалы, 1968; Либерман и др., 1968; Liberman, Topaly, 1968; Касумов и др., 1969; Овчинников и др., 1974; Jiebisch, Tosteson, 1978; Ermishkin et al., 1976, 1977; Kasumov et al., 1979, 1981; Ермишкин, Зильберштейн, 1982; Касумов, 1986 б]. Структура молекул антибиотиков, образующих ионные каналы, имеет несколько общих признаков: 1) все указанные выше каналоформирующие молекулы амфи菲尔ны – обладают сродством к двум фазам: водной и органической. С одной стороны такое свойство молекул приводит к сильной сорбции антибиотика на мембрану, а с другой стороны, позволяет молекулам образовать водную пору. Внешняя часть молекул в поре – гидрофобна, а внутренняя часть молекул гидрофильна и образует хорошо поляризуемые группы, которые обращены внутрь канала; 2) молекулы антибиотиков имеют достаточную длину, чтобы пронзить мембрану насекомое в виде димера, состоящий из двух половинок; 3) основная часть полярных групп молекулы антибиотика должна образовывать либо внутримолекулярные, либо межмолекулярные водородные связи; 4) заряженные или сильно полярные группы могут находиться на одном конце молекулы и служить якорем, удерживая полярный конец молекулы на исходной стороне мембранны, позволяя молекуле прошить гидрофобную часть мембранны. Только при этих условиях молекулы антибиотиков могут свободно погрузиться в мембрану и формировать трансмембранный проводящий канал [Mueller, 1975; Ермишкин, 1980; Ермишкин, Зильберштейн, 1982]. Еще одно фундаментальное открытие на пути к выяснению молекулярных механизмов пассивного ионного транспорта – это возможность наблюдать и исследовать работу отдельных молекулярных комплексов, одиночных ионных каналов. Добавление малых количеств ЕМ в водный раствор приводит к нарастанию проводимости скачками примерно одинаковой величины. При еще меньших концентрациях ЕМ можно зарегистрировать работу минимальной единицы проводимости – одиночного ионного канала [Ермишкин, Зильберштейн, 1982]. При анализе работы одиночных ионных каналов на ЕМ были видны два уровня проводимости канала 80 и 400 пСм в 0,1 М KCl. Между двумя уровнями проводимости наблюдались случайные переходы и вероятность этих переходов зависела от величины мембранныго потенциала. Наблюдение одиночных каналов дает значительно большую информацию, чем исследование мембранны с большим числом каналов. Прежде всего, оно дает прямое экспериментальное подтверждение нашему представлению об элементарных единицах проводимости как на ли-

пидных бислоях, так и на клеточных мембранах. Кроме того, наблюдение одиночных каналов проводимости позволяет получить информацию о молекулярных процессах, протекающих в канале. Изучение механизма ионной проницаемости липидного бислоя, исследование свойств одиночных ионных каналов на липидных мембранах в присутствии веществ с известной структурой молекул представляет собой реальный путь к выяснению на молекулярном уровне механизмов работы и управления систем проницаемости. Для того, чтобы эти исследования велись на молекулярном уровне, необходимо знать химическую структуру воздействующей на мембрану молекулы. К настоящему времени для трех типов антибиотиков известна химическая структура молекул – грамицидин, аламетицин и полиеновые макролидные антибиотики. Грамицидин и аламетицин не являются структурными каналоформерами, т.е. не удается получить четких и достоверных данных зависимости проводимости мембран от концентрации указанных антибиотиков. Предполагается, что под действием грамицидина имеет место квадратичная зависимость проводимости от концентрации антибиотика. В случае аламетицина зависимость проводимости мембран от концентрации антибиотика более крутая. Эта проводимость пропорциональна 6-ой степени концентрации аламетицина. В отличие от грамицидина и аламетицина, полиеновые макролидные антибиотики являются классическими структурными каналоформерами. В присутствии ПА удается получить полную зависимость проводимости мембран от концентрации антибиотиков (вплоть до сопротивления электродов). Зависимость проводимости мембран от концентрации ПА оказалась пропорциональна 8-10-ой степени. Исследование свойств ионных каналов, образуемых ПА и их производными с известной структурой молекул, представляет собой реальный путь к выяснению на молекулярном уровне механизмов работы и управления систем проницаемости. Интересно отметить, что зарегистрированные с помощью микроЭлектродной техники одиночные ионные каналы в мемbrane клеток водоросли *Nitella* по проводимости, типу состояний и среднему времени жизни близки к полиеновым ионным каналам [Krawchik, 1973].

Важную информацию о молекулярных перестройках канального комплекса в мембранах можно получить с помощью кинетических экспериментов. Исследуя кинетику проводимости БЛМ от структуры каналоформирующих молекул, можно судить не только о молекулярных перестройках ионного канала, вызывающих изменение

проводимости мембран, но и о физико-химических процессах, протекающих внутри самой мембранны. Обнаруженная инактивация проводимости мембран при исследовании таких различных по своей структуре и свойств веществ, как грамицидин А [Schagina et al., 1989], антибиотики полиеновой структуры [Касумов и др., 1982 а; Ibragimova et al., 2006], позволяет сделать предположение об общих принципах функционирования модификаторов различной природы, сделать шаг к пониманию механизма трансмембранного переноса ионов и веществ через липидные и клеточные мембранны.

ПА являются одним из самых эффективных препаратов для лечения грибковых инфекций, глубоких системных микозов и широко используются в клинической медицине уже много десятилетий [Brajtburg, Bolard, 1996]. Интерес к ПА еще более возрос в связи с обнаружением их противоопухолевой и противовирусной активности [Gordon, Schaffner, 1968; Россолимо и др., 1969; Rubissow, 1970; Шорин и др., 1971; Бажанов, 1972; Яременко и др., 1975, 1977; Гатчина, 1976; Fuska, Proksa, 1976]. Противопуховая активность выявлена у алиомицина [Umezava, 1967], филипина [Mondovi et al., 1971], лиеномицина [Шорин и др., 1971], люцензомицина [Mondovi et al., 1971], трихомицина [Miyamura, Niwayama, 1959], триенина [Aszalos et al., 1968], антибиотика 661 [Gordon, Schaffner, 1968; Россолимо и др., 1969; Rubissow, 1970], антивирусная – у филипина [Majuk et al., 1977] и метилового эфира амфотерицина В [Jordan, Seet, 1978]. Выявлена способность ПА снижать уровень холестерина в крови и благоприятно влиять на процесс жировой дистрофии печени [Schaffner, Gordon, 1968; Климов и др., 1971; Климов, Никифорова, 1971; Михайлец и др., 1972; Нестерова, Слободская, 1976; Терешин, Экземпляров, 1978]. Приходится, однако, отметить, что токсичность указанных антибиотиков резко ограничивает их применение и требует создания новых лекарственных форм. Недостаточность сведений о механизме действия полиенов на молекулярном уровне исключала возможность проведения целенаправленного синтеза эффективных производных [Hartsel et al., 1993]. Отсюда последовало широкое развитие фундаментальных исследований в области изучения молекулярного механизма действия ПА. Этому во многом способствовала расшифровка химической структуры ПА и разработка путей модификации полиеновой молекулы. Химическая трансформация функциональных групп молекул ПА может дать важную информацию о молекулярных процессах, протекающих в канале. Синтез новых производных путем химической модификации раз-

личных частей молекул ПА и наряду с этим изучение их физико-химических свойств на БЛМ создали уникальную возможность для изучения молекулярного механизма ионной избирательности мембран и выяснения взаимосвязи структуры и функции внутри данного класса соединений. Исследования в этом направлении позволили создать теоретическую основу для синтеза новых лекарственных соединений с заданными терапевтическими свойствами.

Во всем мире ведутся интенсивные поиски новых ПА, исследуется их биологическая активность и механизм действия на молекулярном уровне. Об этом достаточно ярко свидетельствует тот факт, что подавляющая часть этих работ (более 1000) была опубликована в течение последних 30-35 лет. Однако, несмотря на большое число изданных за рубежом обзорных статей, посвященных ПА, они, как правило, разбросаны и не обобщены.

При подготовке монографии я стремился с максимальной полнотой осветить вопросы, касающиеся структуры, физико-химических свойств и функции ПА в клеточных и липидных мембранах.

ГЛАВА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПА И ИХ ДЕЙСТВИЕ НА КЛЕТКИ

1.1. Классификация и химическое строение ПА

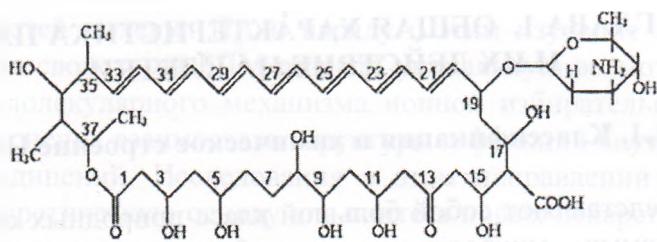
ПА представляют собой большой класс природных соединений, продуцируемых микроорганизмами *Streptomyces* (*Actinomycetes*) [Waksman, Lechevalier, 1962; Waksman et al., 1965; Zotchev, 2003].

Полиеновые макролидные антибиотики получают путем экстракции их из мицелия или всей культуральной жидкости различными органическими растворителями: н-бутанолом, метанолом, изопропанолом, этанолом, ацетоном [Hosoya et al., 1955; Craveri, Giolitti, 1956; Kaplan et al., 1958; Dutcher et al., 1959; Wooldridge, 1960; Bhaye et al., 1961; Цыганов и др., 1963, 1965]. Экстракты антибиотиков в дальнейшем подвергают вакуум-упарке или осаждают петролейным и диэтиловым эфиром [Craveri, Giolitti, 1956; Dutcher et al., 1959; Borowski et al., 1960; Bhate et al., 1961]. Сырцы антибиотиков подвергают далее весьма сложным методам химической очистки. Чаще всего на первой стадии применяют отмывку из сырца побочных примесей органическими растворителями – петролейным эфиром, ацетоном [Taber et al., 1954], диэтиловым эфиром, бензолом с последующим растворением сырца в других растворителях при различных значениях pH, реэкстракцией антибиотиков из полученных растворов селективными извлекателями или фракционным осаждением.

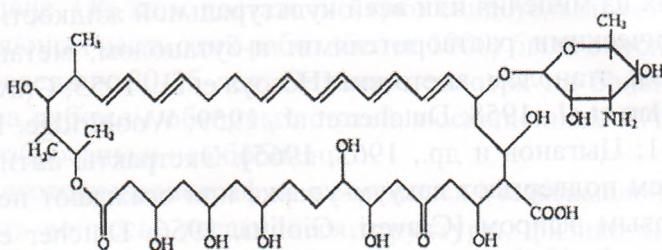
В 1949 году Браун и Хазен впервые сообщили, что многие актиномицеты являются токсичными по отношению к грибковым клеткам и два года спустя, выделили из них нистатин, который обладал широким спектром антитрибковой активностью [Brown, Hazen, 1949, 1957; Hazen, Brown, 1950, 1951].

Современный перечень ПА содержит более 200 антибиотиков. Основными представителями полиеновых макролидных антибиотиков являются амфотерицин В, нистатин, микогептин, кандидин D, леворин A₂ и перимицин, химическая структура которых представлена на рис. 1.1.1. Наиболее изученный из указанных выше антибиотиков амфотерицин В. Молекулярный вес ПА ~ 1000. ПА – непептидные антибиотики.

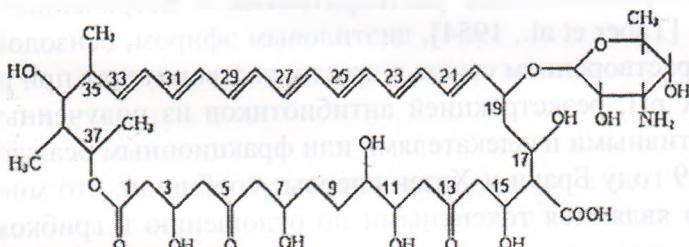
Полиены относятся к числу макролидных соединений и характеризуются тем, что в состав их молекул входит лактонное макроциклическое кольцо, содержащее определенное число двойных связей. В отличие от антибиотика эритромицина и его аналогов, ПА обладают



АМФОТЕРИЦИН В



НИСТАТИН

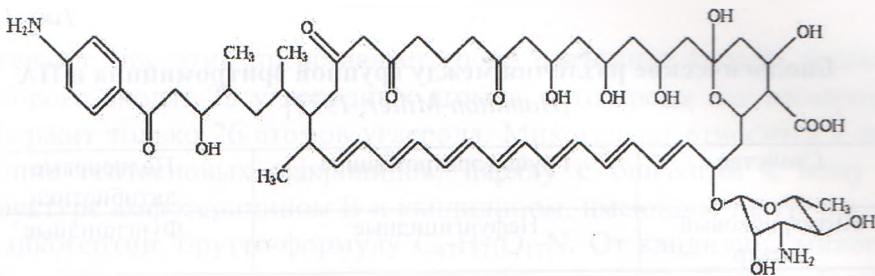


МИКОГЕПТИН

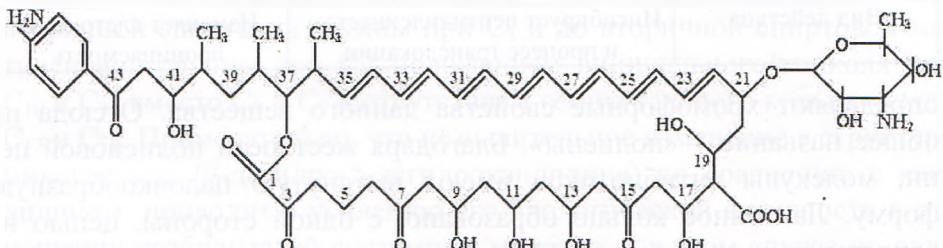
Rис. 1.1.1. Химическая

противогрибковой активностью. В таб. 1.1.1 показаны биологические различия между группой эритромицина и ПА.

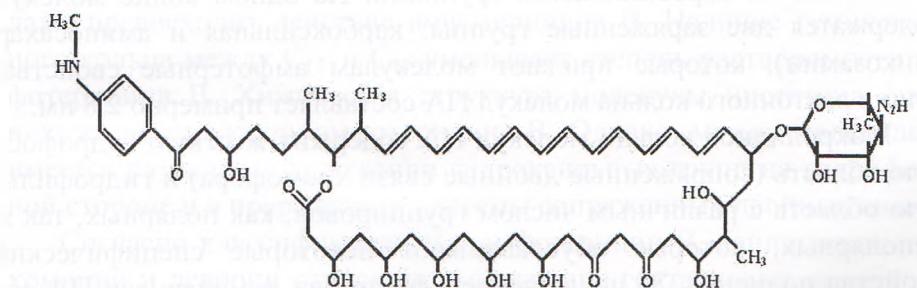
Макролидные антибиотики представляют собой большую группу природных соединений, которые обладают высокой биологической активностью и используются в клинической практике как антибактериальные, противогрибковые, антипаразитарные и имуннодепрессивные препараты [Zotchev, 2003]. ПА активны в отношении дрожжей, различных грибов и других эукариотов, но не действуют на



КАНДИЦИДИН Д



ЛЕВОРИН А₂



ПЕРИМИЦИН

структурой ПА.

бактерии (за исключением микоплазм, выращиваемых в присутствии стеринов) и на сине-зеленые водоросли [Hammond, 1977]. Макролиды образуются в основном бактериями и некоторыми видами грибов, синтез которых осуществляется с помощью фермента поликетидсингетазы путем поэтапной конденсации карбоновых кислот [Zotchev, 2003].

В химической структуре всех ПА имеется макролидное кольцо, содержащее то или иное число сопряженных двойных связей, которые

Таб. 1.1.1.

Биологические различия между группой эритромицина и ПА
 [Hamilton-Miller, 1973]

Свойство	Группа эритромицина	Полиеновые антибиотики
Антигрибковый спектр	Неfungицидные	Fungiцидные
Антимикробный спектр	Действует против грамположительных бактерий	Небактерицидные
Место действия	70 – S рибосома	Клеточные мембранные
Вид действия	Ингибирует пептидилсинглетазу и процесс транслокации	Изменяет клеточную проницаемость

определяют хромофорные свойства данного вещества. Отсюда их общее название – «полиены». Благодаря жесткости полиеновой цепи, молекулы антибиотиков имеют вытянутую палочкообразную форму. Лактонное кольцо образовано, с одной стороны, цепью из сопряженных двойных связей (тетраены-октаены), а с другой стороны – цепочкой с гидрофильными радикалами, в основном гидроксильными и карбонильными группами. На одном конце молекул содержатся две заряженные группы: карбоксильная и аминосахар (микозамин), которые придают молекулам амфотерные свойства. Длина лактонного кольца молекул ПА составляет примерно 2,8 нм.

Макролидное кольцо молекул ПА содержит жесткую гидрофобную область (сопряженные двойные связи хромофора) и гидрофильную область с различным числом группировок, как полярных, так и неполярных, которые обуславливают некоторые специфические свойства полиенов. За исключением филипина, в молекулах ПА содержится аминосахар (микозамин), карбоксильные, карбонильные и гидроксильные группы, которые придают им амфотерные и некоторые другие специфические свойства [Соловьев и др., 1960; Hamilton-Miller, 1973 b]. Некоторые ПА могут содержать аминосахар, карбоксильную, алифатическую или ароматическую боковые группы в определенных положениях. ПА содержат гидроксилированный участок и систему ненасыщенных конъюгированных двойных связей, имеющих исключительно *транс* конфигурацию. В молекулах ПА имеется гидрофобная цепь, в состав которой входят сопряженные двойные связи хромофора, и гидрофильная цепь, составленная гидроксильными и карбонильными группами. В химической структуре ПА находятся от 20-44 атомов углерода, а также от 3 до 8 сопряженных конъюгированных двойных связей. Амфотерицин В, кандиндин, ми-

когептин, нистатин представляет собой лактонное кольцо, в состав которого входят 38 углеродных атомов, в то время как пимарицин содержит только 26 атомов углерода. Микогептин относится к подгруппе гептаеновых макролидов, наряду с близкими к нему по структуре амфотерицином В и кандидином, имеющим такую же, как и микогептин, брутто-формулу $C_{47}H_{71}O_{17}N$. От кандидина микогептин отличается только окисленной до кетогруппы вторичной спиртовой группы при C_5 и восстановленной до вторичной спиртовой кетогруппы при C_7 , от амфотерицина В – окисленными до кетогруппы вторичной спиртовой группы при C_5 и до вторичной спиртовой метиленовой группы при C_7 , положением вицинального гликоля при C_{10} и C_{11} вместо C_8 и C_9 и отсутствием гемикетального кольца между C_{13} и C_{17} . Примечательно, что незначительное изменение в структуре микогептина (7-дегидро-5-дегидрокандидина) по сравнению с кандидином приводит к усилению его биологической активности в отношении возбудителей системных микозов, и в этом случае по силе своего действия микогептин сравним с действием амфотерицина В, а при оральном введении микронизированного порошка антибиотика даже превосходит действие амфотерицина В. Наличие гемикетального кольца между C_{13} и C_{17} уменьшает степень растворимости амфотерицина В. Химическая структура молекулы нистатина очень похожа на структуру амфотерицина В. Однако, между молекулами имеется различие в расположении гидроксильных групп на гидрофильной стороне и в прерывности системы сопряженных двойных связей.

Согласно классификации ПА амфотерицин В, кандидин, трихомицин и леворин относятся к подгруппе гептаеновых антибиотиков, в то время как пимарицин и нистатин представляют подгруппу тетраенов. Нистатин относится к тетраеновой группе по той причине, что одна насыщенная связь разделяет хромофорную цепочку на диеновый и тетраеновый участки. В остальном нистатин структурно аналогичен амфотерицину В. В структуре макролактонного кольца ПА имеются водорастворимые полярные группировки, обладающие высокой биологической активностью. Хромофорная система с определенным числом двойных связей, входящая в структуру молекул полиенов, определяет конформационную жесткость всего макролактонного кольца [Ostrosky-Zeichner et al., 2001; Volpon, Lancelin., 2002]. В структуре молекул ПА имеется гемикетальное кольцо, содержащее 8 углеродных атомов, соединенное гликозидной связью с макролактонным кольцом. Атом углерода при расположении C_{19} соединяется гликозидной связью с аминосахаром (рис. 1.1.1). Из всех по-

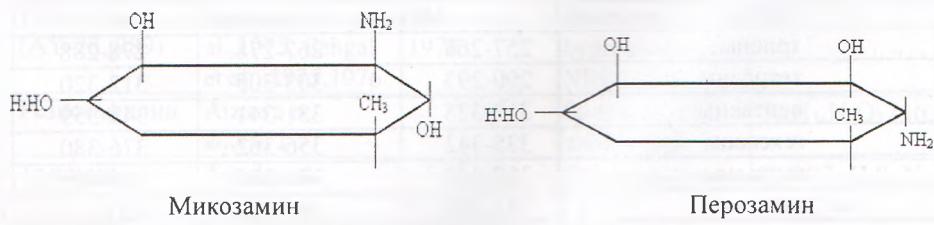
лиенов в биологическом аспекте наиболее подробно изучен амфотерицин В. В гидрофильной цепи амфотерицина В (C_3 - C_{15}) содержится семь гидроксильных групп и шестичленное кетальное кольцо, соединенные между собой углеродными атомами в положении C_{13} и C_{17} . При положении углеродных атомов C_{16} и C_{19} содержится соответственно карбоксильная группа и остаток микозамина. В гидрофильной цепи молекулы амфотерицина В содержатся гидроксильные и карбонильные группы. Еще одна гидроксильная группа локализована в конце гидрофобной части молекулы при положении углеродного атома C_{35} . Гидрофильная и гептаеновая цепь в макролактонном кольце представлены, соответственно, углеродными атомами C_1 - C_{15} и C_{20} - C_{33} , которые располагаются параллельно друг к другу [Borowski et al., 1970; Harrand et al., 1982]. Гептаеновая цепочка C_{20} - C_{33} представляет собой жесткую систему, состоящую из семи двойных связей. В гидрофильной цепи молекулы амфотерицина В содержатся гидроксильные и карбонильные группы. Гидроксильные группы в молекуле расположены в одной плоскости.

На биологическую активность ПА оказывает влияние ряд функциональных групп, входящих в структуру молекул. Аминосахар у большинства гликозилированных молекул ПА представлен в виде микозамина, в то время как другие полиены вместо микозамина содержат перозамин [Omura, Tanaka, 1984]. Карбоксильная функциональная группа в молекулах большинства ПА связана с углеродным атомом при положении C_{16} . Установлено, что химическая модификация аминной и карбоксильной группы влияет на физико-химические свойства и биологическую активность молекул ПА [Касумов, 1986 а; Gary-Bobo, 1989; Borowski, 2000; Курбанов, Касумов, 2004]. Кандицидин и леворин содержат на гидрофобном конце молекулы метильную группу и ароматическую группировку р-аминоацетофенона. В структуре макролактонного кольца имеются водорастворимые полярные группировки, обладающие высокой биологической активностью. В структуре молекул имеется еще полиеновый хромофор с определенным числом двойных связей, который определяет конформационную жесткость всего макролактонного кольца [Ostrosky-Zeichner et al., 2001; Volpon, Lancelin, 2002].

В настоящее время определена химическая структура для пимарицина [Golding et al., 1966], фунгихромина [Cope, Johnson, 1958; Ceder, 1964; Cope et al., 1962; Pandey et al., 1982], филипина [Bergy, Eble, 1968; Ceder, Ryhange, 1964; Dhar et al., 1964], люцензомицина (этрускомицина) [Gaudiano et al., 1966 а, б, с], римоцидина [Cope et

ал., 1965, 1966 а], нистатина [Chong, Rickards, 1970; Borowski et al., 1971 а; Falkowski et al., 1982; Thomas et al., 1982; Shenin et al., 1993], амфотерицина В [Borowski et al., 1970; Cope et al., 1966 б; Ganis et al., 1971], микогептина [Borowski et al., 1964/1965, 1972; Боровский, Шенин, 1973; Borowski et al., 1978], леворина А₂ [Borowski et al., 1965/1966, Боровский и др., 1977; Zielinski et al., 1979 а, б, с], перимицина [Borowski et al., 1960/1961], кандидина [Borowski et al., 1971 б; Synak et al., 1983], кандицина [Zielinski et al., 1979 а], лиеномицина [Pawlak et al., 1979, 1980], тетрамицина [Dornberger et al., 1979], тетрина [Pandey et al., 1971; Rinehart et al., 1971], лагозина [Dhar et al., 1959, 1960, 1964; Berry, Whiting, 1964; Pandey et al., 1982], чаинина [Pandey et al., 1972], ауренина [Ушакова и др., 1971], микотицина [Wasserman et al., 1967], флавофунгина [Bognar, 1960, 1966; Bognar et al., 1970], рофламикоина [Schlegel et al., 1979], трихомицина [Gumienniak et al., 1979].

ПА разделяются на две подгруппы. К первой подгруппе относятся антибиотики, не содержащие ароматическую группировку (амфотерицин В, нистатин, кандидин, микогептин) [Mechlinski et al., 1970; Borowski et al., 1971 b; Borowski et al., 1964/1965; Шенин, Терешин, 1977]. Кандидин представляет собой смесь трех компонентов. Основной компонент получил название кандидин, а два других соответственно, кандидицин и кандидоин. Нистатин также представляет собой смесь нескольких компонентов, которые были выделены в чистом виде и охарактеризованы как нистатин A₁, A₂, A₃ и В. Нистатин A₁ является основным компонентом этой антибиотической смеси, структура которого установлена Боровским [Боровский и др., 1977]. В состав молекул неароматических полиеновых соединений входят карбоксильная и аминосахарная группы. Аминосахар относится к микозамину или перозамину, структура которого показана на рис. 1.1.2.



Puc. 1.1.2.

Ко второй подгруппе относятся антибиотики, содержащие в своем составе кроме аминосахара (микозамина) дополнительную ароматическую группировку (см. глава 4): леворин, кандицидин, гамицин,

аскозин, перимицин [Hickey et al., 1952; Waksman et al., 1965; Deshpande et al., 1966; Borowski et al., 1965/1966]. Ультрафиолетовые спектры (УФ) ПА характеризуются тремя максимумами поглощения, благодаря наличию в структуре молекул ненасыщенных двойных связей [Hamilton-Miller, 1973 a; Thomas, 1976]. Согласно классификации ПА амфотерицин В, кандидицин, трихомицин и леворин относятся к подгруппе гептаеновых антибиотиков, в то время как пимарицин и нистатин представляют подгруппу тетраенов. Нистатин иногда называют гидрированным гептаеном, так как одна насыщенная связь разделяет хромофор на диеновую и тетраеновую систему двойных связей. В структуре молекул ПА имеется гемикетальное кольцо, содержащее 8 углеродных атомов, соединенное гликозидной связью с макролактонным кольцом. Атом углерода при положении C₁₉ гликозидной связью соединяется с аминосахаром (рис. 1.1.1). Перицин содержит в своей структуре аминосахар – перозамин [Borowski et al., 1960/1961].

Полиены классифицируются как *n*-ены, где *n* равно числу конъюгированных двойных связей. В зависимости от числа двойных связей в хромофоре полиенов ПА разделяются на несколько групп – триены, тетраены, пентаены, гексаены, гептаены, октаены [Oroshnik et al., 1955; Hamilton-Miller, 1973 a; Hammond, 1977; Kotler-Brajtburg et al., 1979]. В таблицах 1.1.2-1.1.5 приведен краткий перечень и указаны некоторые характеристики типичных антибиотиков из группы полиенов [Hamilton-Miller, 1973 a; Hammond, 1977]. Биологическая активность ПА зависит от таких функциональных групп как - карбоксильная, гидроксильная, аминная и метильная группы, которые присоединяются к макролактонному кольцу в процессе его синтеза. Полиеновые макролиды наиболее удобно классифицировать по числу двойных связей и УФ спектрам поглощения:

Группа*	Максимумы поглощения, нм		
триены	257-268	267-278	278-288
тетраены	290-293	303-305	312-320
пентаены	317-325	331-341	348-359
гексаены	335-342	356-362	376-380
гептаены	358-369	376-384	399-408
октаены	375-380	397-402	420

Примечание: * - в эту классификацию не укладываются пентаены типа флавофунгина и гексаены типа дермостатина, так как в силу определенных структурных особенностей они имеют УФ спектр с двумя максимумами поглощения; ** - принадлежность этой группы к полиеновым макролидам полностью не доказана [Ветлугина, Никитина, 1980, 2002].

Триеновые антибиотики. Триеновые антибиотики - это мало-численная группа антибиотиков, которые представляют собой мало-стабильные аморфные порошки, характеризующиеся максимумами поглощения в области 257-268, 267-278, и 278-288 нм. Триены интересны с точки зрения структурных особенностей, отличающих их от других ПА. Так, например, в составе микотриенина содержится два атома азота, однако в нем не определены ни аминосахар, ни амино-фенол. В молекулах микотриенина, хромотриенина и триена обнаружена аминокислота - аланин. Протицин отличается от других полиенов содержанием фосфора. Спектр биологического действия триенов различен. Одни подавляют рост грибов и дрожжей (ММ-8, микотриенин, рапамицин, хромотриенин), другие - рост бактерий (резистафилин, протицин, аурантинин). Из-за низкой стабильности и высокой токсичности эти антибиотики практического применения пока не нашли [Ветлугина, Никитина, 1980, 2002]. Ниже в таблице 1.1.2 приводится перечень и некоторые свойства триеновых антибиотиков.

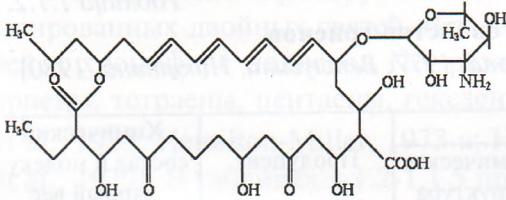
Таблица 1.1.2.

Некоторые свойства триенов

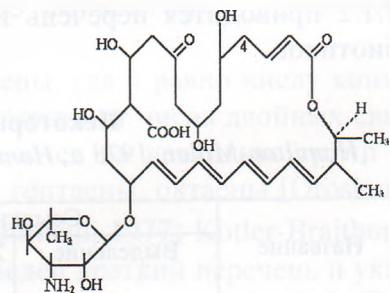
[Hamilton-Miller, 1973 a; Hammond, 1977; Ветлугина, Никитина, 1980]

Название	Ссылки		Продуцент	Химический состав и молекулярный вес
	Выделение	Химическая структура		
ММ-8	Armstrong et al., 1965	Не установлена	Streptomyces sp. ACC 1293	N, 4
Аурантинин	Nishikiori et al., 1978	“—”	Bacillus aurantinus	C ₃₅ H ₅₄ O ₉ (582)
Микотриенин	Coronelli et al., 1967	“—”	Streptomyces sp.	C ₃₆ H ₅₀ N ₂ O ₈ (638)
Протицин	Neseman et al., 1972	“—”	Bacillus licheniformis var. mesentericus	C ₃₁ H ₄₅ O ₇ P (560)
Рапамицин (AY-23, 989)	Vezina et al., 1975; Sehgal et al., 1975, 1976	Baker et al., 1978	Streptomyces hygroscopicus NRR1 5491	-
Резистафилин	Aizawa et al., 1971	“—”	Streptomyces antibioticus	C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O ₇ (463)
Триенин	Aszalos et al., 1968	“—”	Streptomyces sp.	C, 54.7; H, 8; N, 1.3 (1300)
Хромотриенин (антибиотик 141-18)	Полторак и др., 1972; Виноградова и др., 1973	“—”	Actinomyces chromogenes var. trienicus 141-18	-

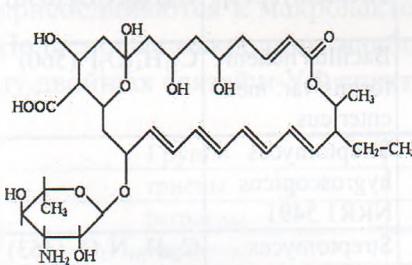
Тетраеновые антибиотики. Тетраеновые антибиотики – довольно многочисленная группа, содержащая свыше 40 антибиотических веществ. Среди них в медицинской практике используются нистатин и пимарицин. Тетраены классифицируют по наличию в молекуле аминосахара микозамина. В некоторых тетраенах содержится нейтральный сахар. Однако большинство тетраенов не может быть классифицировано только по этому признаку, так как у них не изучена углеводная часть. Некоторые тетраены отличаются друг от друга некоторыми структурными особенностями. Например, люцензомицин и пимарицин содержат эпоксидные группы, а в молекуле тетрагексина сочетаются тетраеновый и гексаеновый хромофоры. Многие из тетраенов недостаточно охарактеризованы в химическом отношении. Однако для некоторых тетраеновых антибиотиков – римоцидина, тетрамицина, тетрина А и этрускомицина установлена химическая структура, рис. 1.1.3.



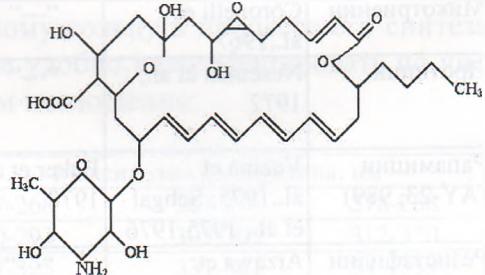
РИМОЦИДИН (АНТИБИОТИК РА 85)



ТЕТРИН А



(C₃₄H₅₃NO₁₄) ТЕТРАМИЦИН



ЭТРУСКОМИЦИН

Рис. 1.1.3. Химическая структура тетраеновых ПА.

Некоторые свойства тетраеновых антибиотиков приведены в таблице 1.1.3.

Таблица 1.1.3.

Некоторые свойства тетраенов, содержащих микозамин
 [Ветлугина, Никитина, 1980]

Название	Ссылки		Продуцент	Химический состав и молекулярный вес
	Выделение	Химическая структура		
Абхазомицин	Барашкова и др., 1975	“—”	<i>Actinomyces badiocolor</i> var. <i>abhasus</i>	-
Акитамицин (тойямицин)	Soeda, Fujita, 1959a; Fujita, 1959	“—”	<i>Streptomyces akitaensis</i> , <i>Streptomyces toyamaensis</i>	-
Альботетрен	Котенко и др., 1970	“—”	<i>Actinomyces albus sterilis</i>	-
Амфотерицин А	Vandeputte et al., 1956	Gold et al., 1956, Gandidano et al., 1966 a, b, c,	<i>Streptomyces nodosus</i>	C,60.3; H,8.4; N,1.7 (915)
Антибиотик 18-45	Силаев, Тохтамуратов, 1965; Тохтамуратов, Силаев, 1967	“—”	<i>Actinomyces</i> sp.	-
Антибиотик 18-80	Силаев, Тохтамуратов, 1965; Тохтамуратов, Силаев, 1967	“—”	<i>Actinomyces</i> sp.	-
Антибиотик 7071-RP	Despois et al., 1956	“—”	Близкий к <i>Streptomyces kitasatoensis</i>	-
Антибиотик 17.732	Calot, Cercos, 1963	“—”	<i>Streptomyces arnatus</i> , <i>Streptomyces erumpens</i>	-
Антибиотик A-7	Chakrabarti, Chandra, 1976	“—”	<i>Streptomyces</i> sp. Ac ₇	-
Антибиотик A-5283	Backus, Dann, 1960	“—”	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Антибиотик AC ₂ 435	Pal, Nandi, 1964	“—”	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Антибиотик ВН 890	Martin et al., 1972	“—”	<i>Streptomyces misionensis</i>	-
Антибиотик I ₄ B	Taguchi, Nakano, 1957	“—”	<i>Streptomyces fungicidicus</i>	-

продолжение таблицы 1.1.3

Антибиотик MYC-4	Thirumalachar, 1971	“___”	Streptomyces sp. HAMYC-4	-
Антибиотик Р-42Б	Тохтамуратов, Силаев, 1965	“___”	Actinomyces tumemacerans	-
Антибиотик РА-86	Brit.Pat.719878, 1954; Fr.Pat. 1063828, 1955	“___”	Streptomyces rimosus	-
Антибиотик РА 166	Koe et al., 1958	Rinehart et al., 1971	Streptomyces sp.	C ₃₅ H ₅₃ NO ₁₄ (712)
Антибиотик RP-9971	Fr. Pat. 2620	“___”	Streptomyces gaseariensis	-
Антибиотик Т-2676	Fugano et al., 1970	“___”	-	-
Антимикон А (антибиотик С-381)	Raubitschek et al., 1952; Waksman et al., 1952; Waksman, 1961	“___”	Streptomyces aureus	-
Ареномицин В	Цыганов и др., 1973	Шенин и др., 1973	Actinomyces tumemacerans var. griseoarenicolor	C ₃₆ H ₅₅ NO ₁₃
Ауреофусцин	Ветлугина, Никитина, 1980	“___”	Streptomyces aureofuscus	C ₂₅ H ₃₇ NO ₁₀ (511)
Гуамицин	Machado Fernandes de Albuqueque et al., 1969; Decio de Andrade et al., 1971	“___”	Streptomyces guanamiceticus	-
Люцензомицин (этрускомицин, антибиотик 1163)	Arcamone et al., 1957	“___”	Streptomyces lucensis	C ₃₆ H ₅₃ NO ₁₃ (708)
Нистатин (микостатин, фунгистатин, фунгицидин)	Hazen, Brown, 1950; Dutcher et al., 1958	Chong, Ricks, 1970; Birch et al., 1964; Dutcher et al., 1955	Streptomyces albulus	C ₄₇ H ₇₅ NO ₁₇ (926)
Пимарицин (теннекитин)	Struyk et al., 1957, 1958	Golding et al., 1966	Streptomyces natalensis	C ₃₃ H ₄₇ NO ₁₄ (666)
Плюмбомицин А	Барашкова, 1970; Цыганов и др., 1972а	“___”	Actinomyces plumbeus	-

продолжение таблицы 1.1.3

Плюмбомицин D	Барашкова, 1970; Цыганов и др., 1972а	“—”	<i>Actinomyces plumbeus</i>	-
Протоцидин	Sakamoto, 1957; Arima et al., 1960	“—”	<i>Streptomyces</i> sp. N 964-A	-
Римоцидин (антибиотик РА 85)	Davisson et al., 1951; 1960	Cope et al., 1966; Falkowski et al., 1976	<i>Streptomyces rimosus</i>	$C_{38}H_{62}NO_{17}$ (742)
Систомикозин	Brit. Pat. № 712547; Ehrlich, et al., 1955	“—”	<i>Streptomyces viridosporus</i>	$C_{29}H_{45}NO_{15}$ (618)
Тетрагексин	Craveri, Giolitti, 1957; Craveri et al., 1962 a; 1965, 1974	“—”	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Тетраенин А	Thirumalachar et al., 1971	“—”	<i>Streptomyces fragmentans</i>	-
Тетраенин В	Thirumalachar et al., 1971	“—”	<i>Streptomyces fragmentans</i> var. <i>aguatica</i> , <i>Chainia cinnamomea</i>	-
Тетрамедин	Цыганов и др., 1973 а	“—”	<i>Actinomyces mediocidicus</i>	-
Тетрамикоин А	Rahalkar et al., 1972	“—”	<i>Chainia grisea</i>	-
Тетрамикоин В	Rahalkar et al., 1972	“—”	<i>Chainia grisea</i> var. <i>fusca</i>	-
Тетрамицин	Dornberger et al., 1971, 1979	“—”	<i>Streptomyces noursei</i> var. <i>jenensis</i>	$C_{34}H_{52}NO_{14}$ (699)
Тетрин А	Gottlieb, Pote, 1960	Pandey et al., 1971	<i>Streptomyces</i> sp.	$C_{42}H_{54}NO_{13}$ (681)
Тетрин В	Gottlieb, Pote, 1960	Rinechart et al., 1971	<i>Streptomyces</i> sp.	$C_{32}H_{50}NO_{14}$ (697)
Унамицин А	Matsuoka, Umezawa, 1960	“—”	<i>Streptomyces fungicidicus</i>	$C_{52.2}H_{7.8}N_{1.7}O_{38.3}$
Флавовиридомицин	Мицкевич и др., 1973	“—”	<i>Actinomyces flavoviridis</i> var. <i>fungicidicus</i>	-
Хромин	Wakaki et al., 1952, 1953	“—”	<i>Streptomyces</i> sp. С-6, близкий к <i>Streptomyces antibioticus</i>	-

Эндоцицин А (геликсин А)	Gottlieb et al., 1951; Smeby et al., 1952; Tressner, Backus, 1956; Vining, Taber, 1957; Johnson, Dietz, 1971	“—”	Streptomyces endus (разновидность Streptomyces hygroscopicus)	-
Юамицин	Matsuoka, 1960; Matsuoka, Umezawa, 1960	“—”	Streptomyces fungicidicus	-

Пентаеновые антибиотики. Это многочисленная группа ПА, содержащая свыше 50 антибиотических веществ. В результате исследования структуры пентаенов было выявлено значительное разнообразие колебательной структуры хромофоров и согласно современной классификации они были разделены на 5 групп: 1) адеопентаены; 2) ДДМ-пентаены; 3) метилпентаены; 4) карбонил - конъюгированные пентаены; 5) β , δ -дикетопентаены [Северинец, 1970; Ветлугина, Никитина, 1980]. Сведения о пентаеновых антибиотиках обобщены в таб. 1.1.4 а, б.

Таблица 1.1.4 а

Классификация пентаеновых антибиотиков [Северинец, 1970; Ветлугина, Никитина, 1980]

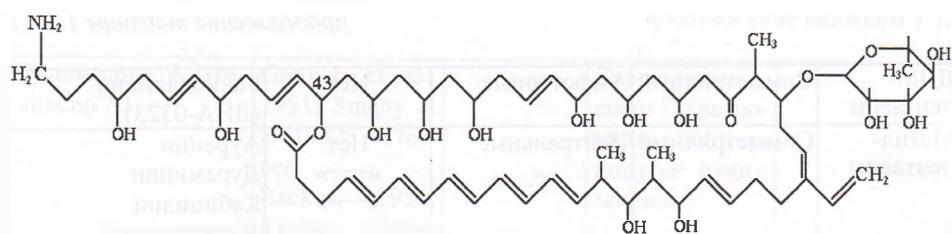
Группа	УФ спектр	Кислотно-основные свойства	Сахар	Антибиотик
Адеопентаены	Симметричный	Амфотерные	Микозамин «—» «—» «—» L-рамноза	Капацидин Ректилавендомицин Эйроцидины А, В 2814Р(микопентаены) Гангтокмицин Дистамицин В Лиеномицин Квинквамицин Пентаен гз Фунгихроматин
		Кислые	-	Алиомицин
		Нейтральные	Нет	Пентанейцин
		Ступенчатый	Амфотерные	Микозамин - -
				Пентафунгин РА 153 58 1579

продолжение таблицы 1.1.4 а

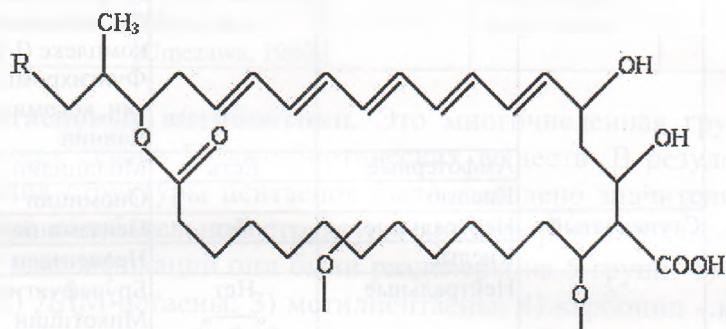
ДДМ-пентаены	Симметричный	Амфотерные	Нет	Ганибаллицин (ЛИА-0323)
Метил-пентаены	Симметричный	Нейтральные	Нет	Ауренин
			«—»	Дурамицин
			«—»	Кабицидин
			«—»	Ксантолицин Молдицидин В Пентаен 661 Руброхлорин Филиппиновый комплекс (I-IV) Фунгихромин (лаго- зин, когомицин) Чаинин
Ступенчатый	Амфотерные	Есть	Молдцидин А	
		-	Ономицин	
	Кислые	Нет	Пентамицин	
	Нейтральные	-	Неопентаен	
Карбонил-конъюги-рованные пентаены	-	Нейтральные	Нет «—» «—» «—» «—» «—» «—»	Брунефунгин Микотицин А (флавофунгин) Микотицин В Розеофунгин А, В Рофламикоин Сургумицин Флавопентаен
β,δ-дикето-пентаены	Симметричный	Амфотерные	-	Генимицин

Согласно Гамильтону-Миллеру пентаеновые антибиотики можно разделить на три основные группы: метилпентаены, лактонсопряженные (конъюгированные) пентаены и пентаены, содержащие в своем составе микозамин [Hamilton-Miller, 1973]. Достигнуты определенные успехи в исследовании химической структуры пентаеновых антибиотиков. Более подробно в химическом отношении изучены и определены структуры метилпентаенов - ауренина, филипина, фунгихромина, лактонсопряженных пентаенов - брунефунгина, микотицина А, В, рофламикоина, частично розеофунгина. и адеопентаенов – лиеномицина, эйроцидина А, В. Более подробную информацию о пентаеновых антибиотиках можно найти в работе [Ветлугина, Никитина, 1980].

Для некоторых из пентаеновых антибиотиков установлена химическая структура, рис. 1.1.4.

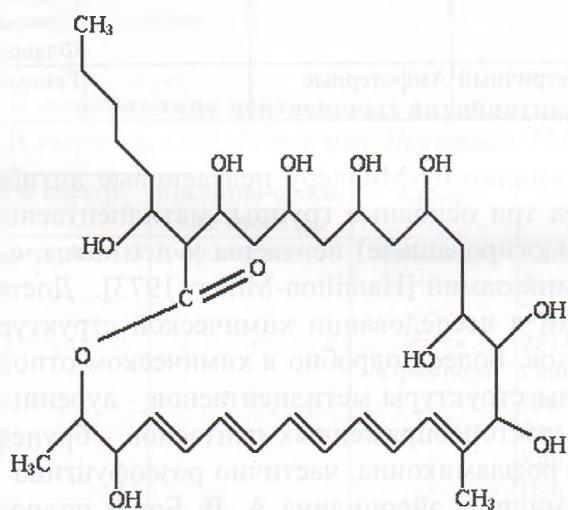


(C₆₇H₁₀₇NO₁₈) ЛИЕНОМИЦИН



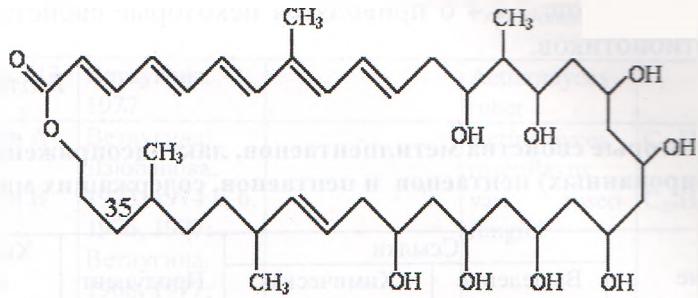
(C₄₀H₆₅O₁₅) ЭЙРОЦИДИН А: R=CH₃

(C₃₉H₆₅O₁₅) ЭЙРОЦИДИН В: R=H

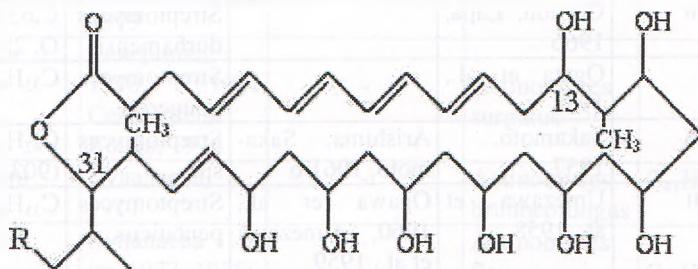


(C₃₃H₅₄O₁₁) АУРЕНИН

Рис. 1.1.4. Химическая структура

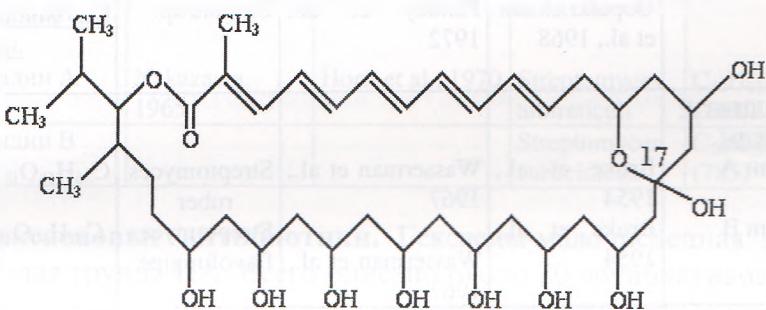


(C₄₁H₆₈O₁₀) БРУНЕФУНГИН



(C₃₆H₅₈O₁₀) МИКОЦИТИН А: R=H

(C₃₇H₆₀O₁₀) МИКОЦИДИН В: R=CH₃



(C₄₀H₆₆O₁₂) РОФЛАМИКОИН (ФЛАВОМИКОИН)

пентаеновых антибиотиков.

Ниже в таблице 1.1.4 б приводятся некоторые свойства пентаеновых антибиотиков.

Таблица 1.1.4 б

Некоторые свойства метилпентаенов, лактонсопряженных (конъюгированных) пентаенов и пентаенов, содержащих микозамин

Название	Ссылки		Продуцент	Химический состав и молекулярный вес
	Выделение	Химическая структура		
<u>Метилпентаены</u> Ауренин	Ushakova et al., 1970		Streptomyces aureorectus	C ₃₃ H ₅₄ O ₁₁ (626)
Дурхамицин	Gordon, Lapa, 1966		Streptomyces durhamensis	C, 63.8; H, 10.2; O, 25.5
Кабицидин	Ogata et al., 1958		Streptomyces gougeroti	C ₃₅ H ₆₀ O ₁₃ (688)
Молцидин А	Sakamoto, 1957	Arishima, Sakamoto, 1961 b	Streptomyces sp.	C ₄₂ H ₈₁ NO ₁₉ (903)
Пентамицин	Umezawa et al., 1958	Ogawa et al., 1960, Umezawa et al., 1959	Streptomyces pentaticus	C ₃₅ H ₆₀ O ₁₃ (688)
Филиппин (I-IV)	Whitfield et al., 1955	Pandey, Rinehart, 1970	Streptomyces filipensis	C ₃₅ H ₅₈ O ₁₁ (655) (филиппин III)
Фунгихромин (лагозин, когомицин)	Tytell et al., 1955	Cope et al., 1962	Streptomyces cinnamomeus var. cinnamomeus	C ₃₅ H ₅₈ O ₁₂ (671)
Чаинин	Gopalkrishnan et al., 1968	Pandey et al., 1972	Chainia sp.	C ₃₃ H ₅₄ O ₁₀ (610)
Лактонсопряженные пентаены				
Микотицин А	Bruke et al., 1954	Wasserman et al., 1967	Streptomyces ruber	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀ (650)
Микотицин В	Bruke et al., 1954	Wasserman et al., 1967	Streptomyces flavofungine	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₀ (664)
Флавофунгин А	Bognar et al., 1970		Streptomyces flavofungine	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀ (650)
Флавофунгин В	Bognar et al., 1970		Actinomyces albilanatus	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₀ (664)
Флавомикоин	Schlegel, Thrum, 1968	Schlegel, Thrum, 1971, a, b	Streptomyces roseoflavus var. jenensis	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₀ (720)

Антибиотик 713	Ветлугина, 1977	-	<i>Actinomyces ruber</i>	-
Розеофунгин А Розеофунгин В	Ветлугина, Дзюбанова, 1973, 1974 а, б, 1976, 1977; Ветлугина, 1968, 1977; Ветлугина и др., 1968	-	<i>Actinomyces roseoflavus var. roseo- fungini</i>	$C_{38}H_{63}O_{10}$ (679) $C_{39}H_{70}O_{10}$ (698)
Рофламикоин (флавомикоин)	Sclegel, Thrum, 1971а,б; Schlegel et al., 1979	-	<i>Streptomyces roseoflavus</i>	$C_{41}H_{63}O_{10}$ (715)
Сургумицин	Северинец, 1970, 1971 Северинец, Конев, 1974	-	<i>Actinomyces surgutus</i>	-
Брунефунгин	Кулалаева, 1977	-	<i>Actinomyces brunneofungus</i>	$C_{41}H_{63}O_{10}$ (720)
Флавопентин	Кулалаева и др., 1977, 1978; Полторак и др., 1976	-	<i>Actinomyces flavus</i> <i>Actinomyces kanamyceticus</i>	$C_{41}H_{63}O_{10}$ (720)
Антибиотик А - 23/791	Ветлугина и др., 1979	-	<i>Actinomyces roseoflavus arai</i>	-
<u>Пентаены, содержащие ми- козамин.</u>				
Эуроцидин А	Nakazawa, 1965	Horii et al., 1970	<i>Streptomyces albireticuli</i>	$C_{40}H_{65}NO_{15}$ (799)
Эуроцидин В			<i>Streptomyces curocidicus</i>	$C_{39}H_{63}NO_{15}$ (785)

Гексаеновые антибиотики. Гексаены-малочисленная и малоизученная группа ПА. Всего описано около 20 антибиотиков. В таблицах 1.1.5 а, б приводится перечень и некоторые физико-химические свойства гексаеновых антибиотиков [Ветлугина, Никитина, 1980, 2002].

Среди гексаеновых антибиотиков флавацид и фрадицин обладают слабокислыми свойствами.

Таблица 1.1.5 а.

Некоторые свойства гексаеновых антибиотиков

Название антибиотика	Продуцент	Состояние вещества, т. пл., °C
Антибиотик 0725-I	<i>Streptoverticillium syringium</i>	Аморф. < 240 (разл.)
Антибиотик 0725-II	↔↔	Аморф. 170 (разл.)
Антибиотик 0725-III	↔↔	Аморф. < 240 (разл.)
Антибиотик 0725-IV	↔↔	Аморф. < 240 (разл.)
Антибиотик 0725-V	↔↔	Аморф. 190 (разл.)
Гексамицин, $C_{33-37}H_{60-69}O_{16-13}$	<i>Streptomyces</i> sp.	Аморф. 120-125
Гексафунгин	<i>Streptomyces hygroscopicus JA 5001</i>	Аморф. 125-135 (разл.)
Гексин	<i>Streptomyces</i> sp.	Аморф. 165-175 (разл.)
Грекомицин	<i>Actinomyces chromogenes</i> var. <i>graecus</i>	Аморф. 190-200 (разл.)
Дермостатин (виридофульвин)	<i>Streptomyces viridogriseus</i>	Крист.
Кандигексин I	<i>Streptomyces viridoflavus IMRU 3685</i>	Крист.
Криптоцидин, $C_{52}H_{83-86}NO_{17}$	<i>Streptomyces</i> sp.	Крис., разл. 100-115
Медиоцидин	<i>Streptomyces mediocidicus</i>	Аморф.
Мицелин IMO	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Крис., 214-222 (разл.)
Тетрагексин	<i>Streptomyces</i> sp. ATCC 14972	Аморф. не плавится до 250
Флавацид	<i>Streptomyces flavus</i>	Аморф. 200 (разл.)
Фрадицин (мицелин) $C_{30}H_{34}N_4O_4$	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Streptomyces roseoflavus</i> , <i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Крис., 300
Эндомицин В (геликсин В)	<i>Streptomyces endus</i> (разновидность <i>Streptomyces hygroscopicus</i>) <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>enhygrus</i>	Аморф.

Таблица 1.1.5 б.

Некоторые свойства гексаеновых антибиотиков

Название антибиотика	УФ спектр максимумы, нм ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	Удельное вращение $[\alpha]_D$	Основная литература
Антибиотик 0725-I	336(410), 356(750), 378(800)	—	Конев и др., 1974
Антибиотик 0725-II	335(420), 356(840), 378(900)	—	Конев и др., 1974
Антибиотик 0725-III	335(450), 356(980), 378(1050)	—	Конев и др., 1974
Антибиотик 0725-IV	335(430), 356(790), 378(840)	—	Конев и др., 1974
Антибиотик 0725-V	336(445), 356(900), 379(950)	—	Конев и др., 1974

продолжение таблицы I.1.5 б

Гексамицин, C ₃₃₋₃₇ H ₆₀₋₆₉ O ₁₆₋₁₃	336(176), 356(233), 376(232) в MeOH	—	Eisenbrandt, 1967; Eisenbrandt et al., 1968
Гексафунгин	308(370), 319(370), 337(503), 358(826), 378(870)	-8 (с 1 80% MeOH)	Thrum et al., 1976
Гексин	337 (377), 357 (523), 377(495)	—	Thirumalachar, Rahalkar, 1971
Грекомицин	338(708), 357(990), 376(810)	+53 (с 1 ДМФА)	Барашкова и др.. 1977
Дермостатин А, C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁ Дермостатин В, C ₄₁ H ₆₆ O ₁₁ (виридофульвин)	223(130), 282(112), 383(1000)	-82 (с 0,2 MeOH)	Thirumalachar, Menon, 1962; Bhate et al., 1962; Narasimhachari, Swami, 1968, 1970
Кандигексин I	323(300), 340(550), 357 (900), 379 (1000)	—	Martin, McDaniel, 1974 a, b
Криптоцидин, C ₅₂ H ₈₃₋₈₆ NO ₁₇	290, 305, 320, 341(370), 358(370), 380(610) в 80% MeOH	—	Sakamoto, 1959; Arishima, Sakamoto, 1960
Медиоцидин	339—340, 356—357, 377—378 в MeOH	—	Utahara et al., 1954
Мицелин IMO	243, 294, 335, 355, 373 в MeOH	+70 (с 1 диок- сан)	Ogata et al., 1957; Utahara et al., 1959
Тетрагексин	290(420), 304(616), 318(630), 350(466), 368(440) в MeOH	—	Craven et al., 1962 a, 1965, 1974
Флавацид	341 (4 10), 358 (630), 379(635) в EtOH	—	Takahashi, 1953; Kuroya, 1954; Japan Pat N 1593, 1955
Фрадицин (мицелин) C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₄	340, 356, 376	+ 65(с 1 диок- сан)	Swart et al., 1950; Hickey, Hidy, 1951; Aiso et al., 1952; Arai, Aiso, 1953;
Эндомицин В (геликсин В)	340 (170), 359 (245), 378(250) в EtOH	—	Ball et al., 1957; Utahara et al., 1959; Gottlieb et al., 1951; Smeby et al., 1952; Tresner, Backus, 1956; Vining, Taber, 1957

Большинство гексаеновых антибиотиков изучено слабо. Первым представителем группы карбонил-конъюгированных гексаенов является дермостатин А и В [Bhate et al., 1962], структура которого показана на рис. 1.1.5.

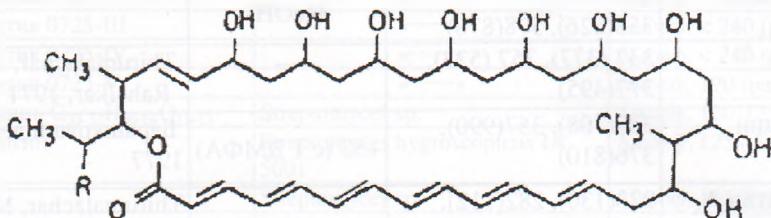


Рис. 1.1.5. Структура дермостатина А и В [Ветлугина, Никитина, 1980]. Дермостатин А: R=CH₃. Дермостатин В: R=CH₂CH₃.

Гептаеновые антибиотики. Это многочисленная группа, включающая более 60 антибиотических соединений. Согласно классификации, предложенной Боровским и Шафнером, все гептаены делятся на 3 группы, в зависимости от содержащихся в них аминосахаров и ароматических аминов: 1) неароматические гептаены, содержащие один атом азота, входящий в состав микозамина; 2) ароматические гептаены, содержащие два атома азота (один содержится в микозамине, другой - в *n*-аминоацетофеноне); 3) ароматические гептаены, также содержащие два атома азота (один входит в состав аминосахара, второй - в состав N-метил-*n*-аминоацетофенона [Боровский Шафнер, 1961]. В таб. 1.1.6 приведена классификация гептаеновых антибиотиков.

Таблица 1.1.6.

Классификация гептаеновых антибиотиков
[Боровский, Шафнер, 1961; Ветлугина, Никитина, 1980].

Группа	Сахар	Антибиотик
Неароматические гептаены	Микозамин	Амфотерицин В Антибиотик В _K 217 γ Антибиотик Х-63 Кандидин Микогептин Моникамицин Нурсимицин Тбилимицин

Ароматические гептаены, содержащие n-аминоацетофенон	Микозамин	Антибиотик 2339 Антибиотик 2789 Антибиотик 67-121В Антибиотик АYF-А (эйфактин А) Антибиотик АYF-В (эйфактин В) Антибиотик DJ-400B ₂ Антибиотик ЛИА-0179 Антибиотик РА 150 АЗаколютин (F-17-C) Аскозин Ауреофунгин Вацидин А Гамицин Гентамицин Кандимицин Леворин A ₀ , A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄ Леворин В Трихомицин А, В, С Флавумицин А
Ароматические гептаены, содержащие N-метил-n-аминоацетофенон	Микозамин	Антибиотик 67-121А Антибиотик DJ-400В Кандимицин
	Перозамин	Перимицин
	O-β-D-манногипопранозил-(1→4)-D-микозамин	Антибиотик 67-121С

На рис. 1.1.6 показана химическая структура кандидина, относящийся к группе неароматических антибиотиков (для амфотерицина В и микогептина, также входящие в состав неароматических антибиотиков, структура приведена на рис. 1.1.1).

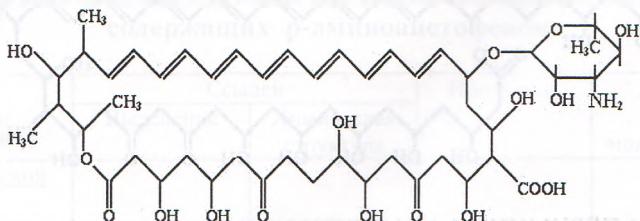
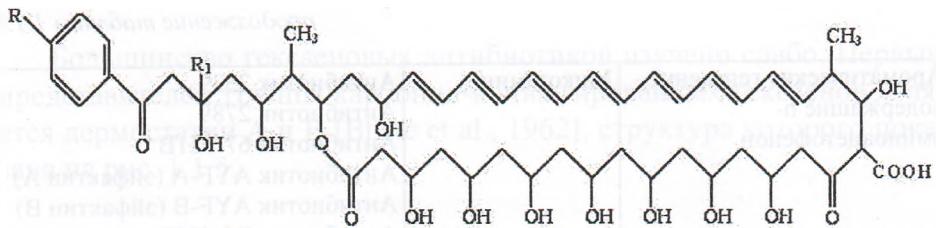
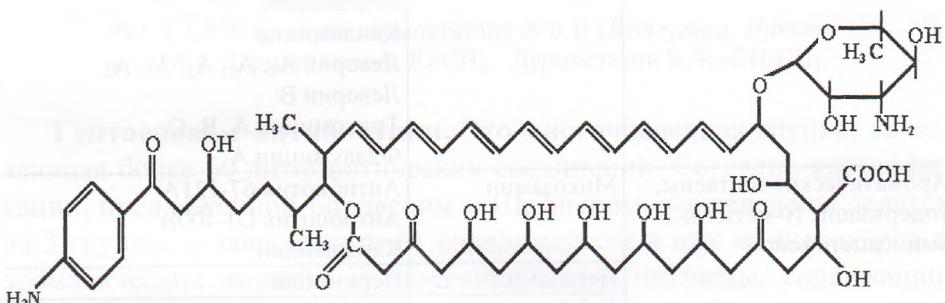
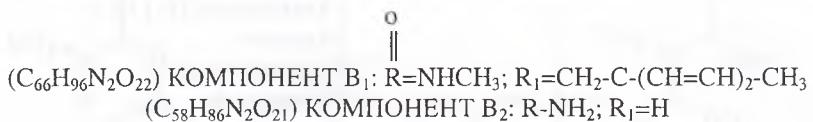


Рис. 1.1.6. Химическая структура кандидина (C₄₇H₇₁NO₁₇).

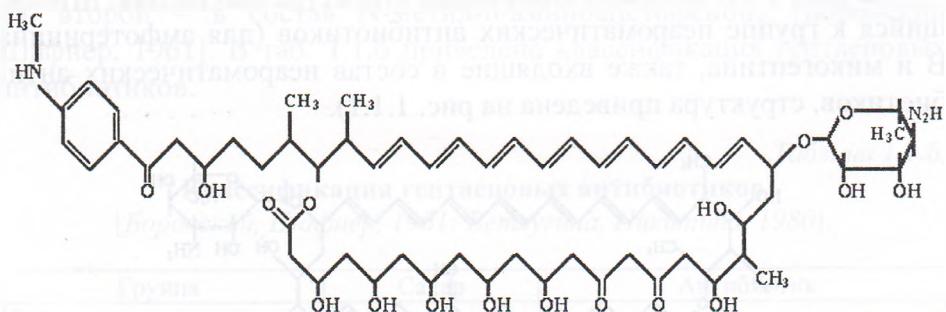
На рис. 1.1.7 показана структура антибиотиков, относящихся к группе ароматических гептаенов.



АНТИБИОТИК DJ 400 - СТРУКТУРА КОМПОНЕНТОВ B₁ И B₂:

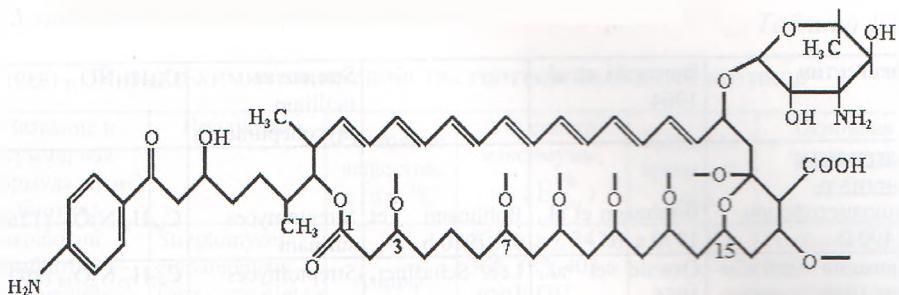


(C₆₈H₈₄N₂O₁₉) ВАЦИДИН А (АУРЕОФАЦИН)

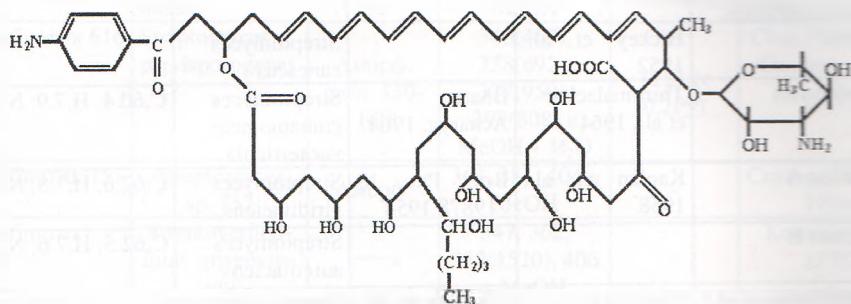


(C₅₉H₈₃N₂O₁₇) ПЕРИМИЦИН А (АНТИБИОТИК 1968, АНТИБИОТИК NC-1968, АМИНОМИЦИН, ФУНГИМИЦИН)

Рис. 1.1.7. Структура ароматических антибиотиков.



(C₆₁H₈₆N₂O₂₁) ТРИХОМИЦИН А



(C₆₀H₉₁N₂O₁₉) ФЛАВУМИЦИН А

Продолжение рис. 1.1.7.

Ниже в таблице 1.1.7 и 1.1.8 приведены физико-химические свойства гептаеновых антибиотиков.

Таблица 1.1.7

Физико-химические свойства гептаенов без ароматической группировки, гептаенов с N-метил-р-аминоацетофеноном и гептаенов, содержащих р-аминоацетофенон

Название	Ссылки		Продуцент	Химический состав и молекулярный вес
	Выделение	Химическая структура		
Без ароматической группировки: Амфотерицин В	Gold et al., 1956	Mechlinski et al., 1970; Nicolaou et al., 1988	Streptomyces nodosus	C ₄₇ H ₇₃ NO ₁₇ (924)
Кандидин	Taber et al., 1954	Borowski et al., 1971	Streptomyces viridoflavus	C ₄₇ H ₇₁ NO ₁₇ (922)

продолжение таблицы 1.1.7

Микогептин	Borowski et al., 1964		Streptoverticillium mycoheptinicum	C ₄₈ H ₇₇ NO ₁₇ (939)
<u>Содержание N-метил-p-аминоацетофенон</u> ДJ 400 В	Bohlmann et al., 1970 a, b	Bohlmann et al., 1970 b	Streptomyces surinam	C ₆₆ H ₉₆ N ₂ O ₂₂ (1269)
Перимцин (антибиотик 1968, антибиотик NC-1968, аминомицин, фунгимицин)	Oswald et al., 1956	Lee, Schaffner, 1969	Streptomyces coelicolor var. aminophilus	C ₄₇ H ₇₅ N ₂ O ₁₄ (892)
<u>Содержание p-аминоацетофенон:</u> Аскозин	Hickey et al., 1952		Streptomyces canescens	
Ауреофунгин	Thirumalachar et al., 1964	Bhate, Acharya, 1964	Streptomyces cinnamomeus var. terricola	C,60.4; H,7.9; N,2.2
Ауфактин А	Kaplan et al., 1958	Brit. Pat. № 719878 1954	Streptomyces viridifaciens	C,62.6; H,7.8; N,2.7
Ауфактин В			Streptomyces aureofaciens	C,62.5; H,7.6; N, 2.8
Азаколутин (Г-17-С)	Pridham et al., 1956	Cravieri et al., 1960	Streptomyces cinnamomeus, var. azacoluta	
Вацидин А (ауреофацин)	Igarashi et al., 1956	Ziminski et al., 1979	Streptomyces aureofaciens	C ₅₈ H ₈₄ N ₂ O ₁₉ (1113)
Гамицин	Thirumalachar et al., 1961	Desphande et al., 1966	Streptomyces primprina	C,59.9; H,7.8; N,2.7; O,20.1
Гептамицин	Henis et al., 1957		Streptomyces sp.	
DJ 400 B ₂	Bohlmann et al., 1970 a	Bohlmann et al., 1970 a, b	Streptomyces surinam	C ₅₈ H ₈₆ N ₂ O ₂₁ (1147)
Кандицидин	Lechevalier et al., 1953	Waksman et al., 1965	Streptomyces griseus	C ₆₃ H ₈₅ N ₂ O ₁₉ (1200)
Леворин А	Borowski et al., 1965/66		Streptomyces levoris	C ₅₉ H ₉₃ N ₂ O ₂₂ (1181)
Леворин В	Borowski et al., 1965/66			
Трихомицин А	Hosoya et al., 1952, 1955; Hattori et al., 1956; Герольд и др., 1966	Hattori, 1962 a, b; Nakano, 1961 a, b	Streptomyces abikoensis	C ₆₁ H ₈₆ N ₂ O ₂₁ 2H ₂ O (1230)
Флавумицин А	Кругликова и др., 1975	Шенин, Кругликова, 1977; Кругликова, Шенин, 1976; Кругликова, 1977	Streptomyces flavus	C ₅₄ H ₁₀₈ N ₂ O ₂₀ (1088)

Таблица 1.1.8

Физико-химические свойства гептагеновых антибиотиков

Название и суммарная формула антибиотика	Производитель	Состояние вещества, т. пл., °C	УФ спектр максимумы, нм (E _{1cm} ^{1%})	Удельное вращение, [α] _D	Основная литература
Азаколутин (антибиотик F-17-C, антибиотик C)	<i>Streptomyces cinnamomeus</i> forma azacoluta	Аморф.	330 (пл.), 342, 365, 383, 408 в EtOH	-	Pridham et al., 1956; Craveri et al., 1960. 1962 b
Антибиотик 388	<i>Streptoverticillium echimense</i>	Аморф. разл. 132-135	340 (пл.) 359, 379, 402 в MeOH	+5,19 (ДМФА)	Batra et al., 1977
Антибиотик 616	<i>Streptomyces parvisporogenes</i>	Аморф. разл. 130-140	340(467), 358(692), 377(959), 397(808) в MeOH + H ₂ O	+261 (с 0,2Py)	Chas Pfiser and Co.. Inc., 1960
Антибиотик 757	<i>Streptomyces</i> sp. 757	Аморф.	361, 381, 404 в MeOH	-	Craveri. Giolitti. 1956
Антибиотик 0185	<i>Streptoverticillium griseoviridifluti</i>	«—»	347, 362, 382(1520), 406 в MeOH	-	Конев и др.. 1978
Антибиотик 2339	<i>Actinomyces levoris</i>	«—»	361, 380, 404 в MeOH	-	Кореняко и др.. 1961: Khokhlova et al., 1963: Хохлова и др.. 1963
Антибиотик 2368	<i>Streptomyces</i> sp.	«—»	-	-	Toхтамуратов, Силаев. 1967
Антибиотик 2789	<i>Actinomyces levoris</i>	«—»	361, 380, 404 в MeOH	-	Кореняко и др.. 1964: Khokhlova et al.. 1963: Хохлова и др.. 1963
Антибиотик 67-121A	<i>Actinoplanes caeruleus</i>	Аморф. 185-190	342, 363, 382, 403 в MeOH	+151.6	Weinstein et al., 1977
Антибиотик 67-121B	«—»	Аморф. 175-182	342, 363, 382. 403 в MeOH	+199.7	Weinstein et al., 1977
Антибиотик 67-121C	«—»	Аморф. 175-180	342, 363, 382. 403 в MeOH	+143.8	Weinstein et al., 1977
Антибиотик 1645 Р ₁	<i>Streptomyces</i> sp.	Аморф., разл. 130	344, 362, 383, 404 в MeOH	+220 (с 0,1 Py)	Decio de Andrade et al., 1961
Антибиотик 2814 Н	Близкий <i>Streptoverticillium netropsis</i>	Аморф.	362(788), 384 (1276), 406(1310) в MeOH	+200 (с 0,1) MeOH-HCl	Thrum, 1960 a, b
Антибиотик АЕ-56	<i>Streptomyces</i> sp.	«—»	322, 365, 388. 412 в H ₂ O	+347 (с 0,2) ДМФА	Thadee, Faivre-Amiot, 1960
Антибиотик AF-1231 C ₈₅ H ₁₂₇ N ₄ O ₃₃	«—»	«—»	363(220), 384(285), 405 (245) в MeOH	+353 (Py)	Arishima, Sakamoto, 1961 a

продолжение таблицы 1.1.8

Антибиотик A-2	<i>Streptomyces</i> sp. Ac ₂	Аморф., разл. 142	360, 380, 402	-	Mukharjee, Chandra, 1975
Антибиотик AYF-A (эйфактин А) C ₂₅ H ₃₅₋₃₇ NO ₇	<i>Streptomyces</i> <i>aureofaciens</i> <i>Streptomyces</i> <i>viridifaciens</i>	Крист.	344, 363, 383 (526), 409 в ДМФА	-	Kaplan et al., 1958; Brit. Pat. № 719878, 1954
Антибиотик AYF-B (эйфактин В) C ₂₅ H ₃₅₋₃₇ NO ₇	<i>Streptomyces</i> <i>aureofaciens</i> <i>Streptomyces</i> <i>viridifaciens</i>	«—»	344, 363, 383 (526), 409 в ДМФА	+50 (с 2 МеOH)	Kaplan et al., 1958; Brit. Pat. № 719878, 1954
Антибиотик C-11	Близкий <i>Streptomyces</i> <i>hachijo ensis</i>	Аморф. выше 150	360, 380, 405	-	Takemoto et al., 1964
Антибиотик G-83 (C ₂₁ H ₃₄ O ₈ N) _n	<i>Streptomyces</i> <i>cariofaciens</i>	Аморф., 170 (разл.)	361 (460), 379 (580), 402 (430)	-	Farbwerke- Hoechst, 1962
Антибиотик ЛИА-0179A ₁	<i>Streptomyces</i> sp.	-	276 (250), 288 (220), 340 (380), 358 (720), 378 (1040), 400 (980)	-	Моргунова и др., 1970
Антибиотик ЛИА-0179A ₂	«—»	-	276 (75), 208 (105), 340 (520), 358 (760), 378 (1080), 400 (960)	+136±19 (0,1 ДМФА)	Моргунова и др., 1970
Антибиотик ЛИА-0179B	«—»	-	276 (100), 288 (140), 340 (440), 358 (700), 378 (1040), 400 (935)	-	Моргунова и др., 1970
Антибиотик ЛИА-0331	<i>Actinomyces</i> <i>chromogenties</i>	Аморф.	358, 379, 401	-	Завьялова и др., 1970
Антибиотик PA150 C ₅₄ H ₃₂ N ₂ O ₁₈	<i>Streptomyces</i> sp.	Крист., разл. выше 260	340, 358(730), 377(1033), 397 (895) в 80% МеOH	+148 (с 0,2 ДМФА) +294 (с 0,2 Ру) -34 (0,1 Н, HCl- ДМФА)	Koe et al., 1958; English, McBride, 1958
Антибиотик x-63	<i>Streptomyces</i> sp.	Аморф. выше 300 (разл.)	363(468), 383 (700), 406(656) в МеOH – ДМФА	-	Kannan et al., 1967
Антифиугин 4915	<i>Streptomyces</i> <i>paucisporogenes</i>	Крист. разл. 100	360(540), 379,5(764), 405 (636) в 70% МеOH	-	Hagemann et al., 1959

продолжение таблицы 1.1.8

Аскозин $C_{82}H_{84}O_{20}N_2$	<i>Streptomyces canescus</i>	Крист.	234, 240, 288, 326, 340. 358(480), 376(640), 399(540) в MeOH	+12 (ДМФА) -13 (0.1 н. HCl- MeOH)	Hickey et al., 1952; US Pat. № 2723216; US Pat. № 2748053
Ауреофунгин	<i>Aradus cinnamomeus</i> var. <i>terricola</i>	Аморф.	359, 379, 402 в EtOH	+83,7 (с 0,3 ДМФА)	Bhate, Acharya, 1964; Thiru- nalachar et al., 1964
Гамицин	<i>Streptomyces pimprina</i>	Аморф. разл. выше 160	345, 363, 383(962), 406(918) в MeOH	+216 (с 0,2 Py)	Bhate et al., 1961; Menon, Lavate, 1961; Thirumalachar et al., 1961; Bhate, Acharya, 1963; Maniar, Mavdikar, 1962; Divekar et al., 1966; Deshpande, Kerur, 1966
Гептаен	<i>Actinoplanes aureus</i>	Аморф.	340, 358, 378, 402	-	Celmer et al., 1977
Гептамицин	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-	Henis et al., 1957
Гептафунгин А	<i>Streptomyces longisporolavendulae</i>	Аморф.	-	-	Kalasz et al., 1972
Гепцин	<i>Actinosporangium griseoroseum</i>	«—»	359, 379(800) 401 в MeOH	+90+5 (с 0,2 ДМФА)	Цыганов и др., 1970
Гризокарнин	<i>Streptoverticillium griseo-carneum</i>	Крист. 135- 145	270, 280, 340, 357, 376, 400 в MeOH	-	Campos et al., 1974
Грубилин	<i>Streptomyces</i> sp.	Аморф.	-	-	Uri et al., 1959
Кандимицин	<i>Streptomyces ehimensis</i>	Крист., разл. выше 150	362, 382, 406 в MeOH	-	Shibata et al., 1954; Japan Pat. № S148
Криптомицин	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-	-	-	Цыганов и др., 1972 б
Моникамицин	<i>Streptoverticillium cinnamomeus</i> var. <i>monicae</i>	Аморф. разл. выше 210	365, 385, 410 в MeOH	+416 (с 0,25 Py)	Gupta, 1964
Неогептаен	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-	Тирумалахиар и др., 1966
Нурсимицин	<i>Actinomycetes levoris</i>	-	366, 388, 412	-	Шенин и др., 1969
Партрицин	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Аморф.	341, 359, 379, 401 в EtOH	-	Bruzzeze et al., 1974; Ruozzi et al., 1978

Такамицин	<i>Streptomyces takataensis</i> , <i>Streptomyces reticuli</i>	-	360, 380, 406	-	Iwashita et al., 1962; Fr. Pat. N 1425264
Тбилимицин	<i>Streptomyces chartreusis</i> var. <i>tibilisus</i>	Аморф.	369, 380, 404, 450	-	Шенин и др., 1975; Кругликова, 1977
Фульвомидин А	<i>Actinomyces fulvoviolaceus</i> var <i>achromogenes</i>	Аморф. выше 300	340, 357(867), 378(1030), 400(915) в МеOH	+140 (с 0,1 Py) +191 (с 0,2 ДМФА)	Цыганов и др., 1970, 1975
Фульвомидин В	«—»	«—»	340, 362(762), 379(840), 401(735) в МеOH	-6 (с 0,1 ДМФА)	Цыганов и др., 1975; Кругликова, 1977
Фульвомидин С	«—»	«—»	340, 359(460), 382(880), 405(870) в МеOH	+530 (с 0,2 Py) +335 (с 0,2 ДМФА)	Цыганов и др., 1975; Кругликова, 1977
Эйротин А	<i>Streptomyces griseus</i>	Аморф. 340-360 (разл.)	360, 380, 405 в EtOH	-	Soeda, Fujita, 1959 b; Hosoya et al., 1959

Октаеновые антибиотики. В группу октаеновых антибиотиков входят всего несколько антибиотических веществ: охрамицин, октаен, октамицин. Охрамицин образуется микроорганизмами *Streptoverticillium orinoci* 1882 F1. В структуре молекулы охрамицина содержатся 8 сопряженных двойных связей [Cassinelli et al., 1967]. Охрамицин-амфотерное соединение. В его молекуле предполагают наличие двух хромофоров-октаенового и ароматического типа. Суммарная формула C₄₆H₇₇N₃O₁₅. Предполагается также, что охрамицин относится к группе немакролидных ПА. Антибиотик подавляет рост грамположительных бактерий и дрожжей, слабо грибов. Антибиотик октаен активен в отношении грамположительных бактерий, не активен к дрожжеподобным грибам. Октамицин образуется *Actinoplanes ianthinogenes* subsp. *oestatuscini* [Гаузе и др., 1979]. Антибиотик октамицин подавляет рост грамположительных микроорганизмов и не активен в отношении грамотрицательных бактерий, грибов и дрожжей.

В следующем разделе приводятся сравнительные физико-химические характеристики двух, широко используемых в фундаментальных и прикладных исследованиях, полиеновых макролидов: ароматического гептаенового антибиотика леворина А и неароматического гептаенового антибиотика микогептина.

1.2. Физико-химические и биологические свойства леворина А

Леворин представляет собой аморфный порошок желтого цвета без четкой температуры плавления. Он хорошо растворяется в диметилсульфоксиде (ДМСО), диметилформамиде (ДМФА) и пиридине. Слабо растворяется в низших спиртах. Растворимость в спиртах увеличивается в присутствии 20-30% воды [Малышкина и др., 1970 а, б]. Не растворяется в воде, хлороформе, безводном ацетоне, диэтиловом и петролейном эфирах. Леворин обладает амфотерными свойствами, ионизируясь, он образует в кислой среде катион, а в щелочной - анион [Соловьев и др., 1960; Малышкина и др., 1970]. По химической природе леворин относится к группе ароматических полиеновых макролидов [Borowski et al., 1965/66; Малышкина, 1966]. Макролактонное кольцо леворина включает в себя полиеновый хромофор с семью сопряженными двойными связями, что находит отражение в УФ спектре леворина. Последний имеет три основных максимума поглощения при следующих длинах волн: 358-360, 378-380 и 400-403 нм. УФ спектр, при указанных выше длинах волн, характерен для гептаеновых противогрибковых антибиотиков [Oroshnik et al., 1955]. ИК спектр леворина содержит полосы, указывающие на присутствие в нем лактонной (1710 cm^{-1}) и гидроксильных (3400 cm^{-1}) группировок, а также сопряженных – $\text{C}=\text{C}$ – связей (1000 cm^{-1}) и ароматического амина (1250 , 1530 и 1600 cm^{-1}). В состав леворина входят аминосахар-микозамин и ароматический кетон p -аминоацетофенон. Микозамин содержат многие полиеновые макролиды. Впервые он был выделен из амфотерицина В в виде его тетраацетата [Dutcher et al., 1956-1957], а затем была установлена его структура [Walters et al., 1957] и пространственная конфигурация [Von Saltza et al., 1961].

Наличие в структуре леворина p -аминоацетофенона было установлено при изучении продуктов щелочного гидролиза с помощью бумажной и тонкослойной хроматографии, а также на основании УФ спектра поглощения хлороформного экстракта щелочного гидролизата [Малышкина и др., 1963 а, б; Borowski et al., 1965/66; Малышкина, 1966]. На присутствие свободной карбоксильной группы в леворине указывает его способность к образованию натриевой соли. Последняя хорошо растворяется в воде и обладает высокой биологической активностью [Малышкина и др., 1959; Малышкина, 1966; Малышкина и др., 1970 б]. В связи с наличием в леворине гептаенового хромофора, содержащего двойные сопряженные связи, и лак-

тонной группировки он неустойчив к воздействию кислорода воздуха, УФ света, влаги, температуры, а также кислот и щелочей. Неочищенный препарат леворина наряду с биологически неактивными примесями содержит примесь противогрибкового неполиенового антибиотика левористатина [Цыганов и др., 1963]. Наличие левористатина определяется с помощью бумажной или тонкослойной хроматографии [Башкович и др., 1967]. Выделение и очистка леворина производится экстракционными методами [Малышкина, 1966; Малышкина и др., 1963; Кульбах и др., 1970]. Выбор метода очистки зависит от варианта штамма *Actinomyces levoris* и от метода выделения неочищенного препарата [Малышкина, 1966; Цыганов, 1970; Зурабова и др., 1970; Наместникова, Львова, 1970].

Макролидный гептаеновый антибиотик леворин неоднороден по составу и включает два близких по химической структуре, но неидентичных по своим свойствам ароматических гептаенов: леворин А и леворин В [Borowski et al., 1965/66; Малышкина, 1965; Цыганов, Яковлева, 1970].

Соотношение их в препаратах леворина изменяется в зависимости от штамма и метода выделения. При культивировании штамма *Actinomyces levoris* 26/1 были получены препараты, содержащие леворин А и В почти в равных соотношениях. Образцы леворина, полученные из селекционированных штаммов, содержат главным образом, леворин А [Малышкина, 1966; Цыганов, 1970; Зурабова и др., 1970; Наместникова, Львова, 1970]. Следовательно, в результате селекции штамм 26/1 почти полностью утрачивает способность образовывать леворин В [Зурабова и др., 1970].

Разделение леворина на леворины А и В и получение их в очищенном виде было произведено методом противоточного распределения в системе метанол-хлороформ-бортный буфер pH 8,25 (2:2:1) [Цыганов, Яковлева, 1970]. Леворины А и В являются ароматическими гептаенами, различающимися по УФ спектру, элементарному составу и коэффициенту распределения в указанной выше системе растворителей [Borowski et al., 1965/1966; Малышкина, 1966]. Некоторые физико-химические характеристики леворинов А и В приведены в таб. 1.2.1.

На рис. 1.2.1 представлены УФ спектры леворина А и В. Максимумы поглощения леворина В батохромно смешены на 5-6 нм по сравнению с леворином А, а тонкая структура УФ спектра леворина В менее деградирована. Это указывает на различие в строении хромофоров леворина А и В.

Таблица 1.2.1.

Физико-химические характеристики леворина А и В
 [Малышкина и др., 1970]

Брутто формула	УФ спектр		Элементарный состав			Коэффициент нейтрализации	Коэффициент распределения	Азотсодержащая часть молекулы
	λ , максимум	$E^{1\%}$	C	H	N			
Леворин А <chem>C59H93O22N2</chem>	340 358 378 400	450 790 900 800						p-амино-ацетофенон, микозамин
Леворин В <chem>C52H98O23N2</chem>	342 363 382 406	375 620 980 950	60,43	7,89	2,38	1180	0,8	p-амино-ацетофенон, микозамин

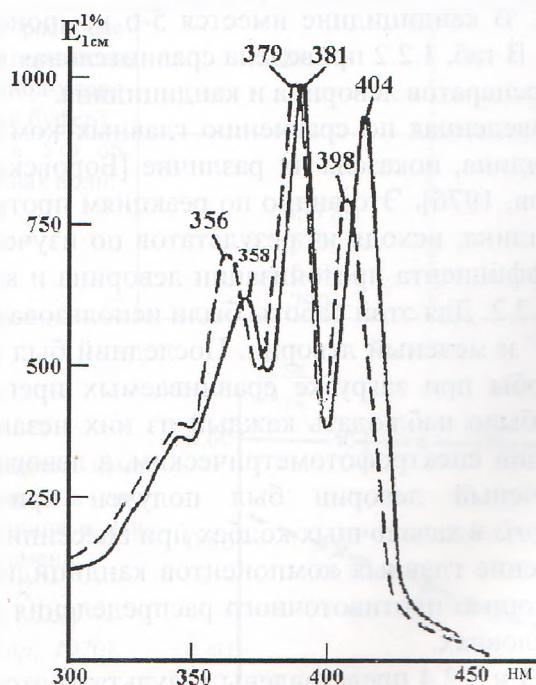


Рис. 1.2.1. УФ спектры леворина А (—) и леворина В (----)
 [Малышкина и др., 1970].

Антифунгальный спектр леворина А и В практически идентичен [Borowski et al., 1965/1966]. Леворин А менее токсичен, чем леворин В и поэтому медицинская промышленность выпускает препараты, содержащие в своем составе леворин А. Гептаеновые антибиотики разделяются на ароматическую и неароматическую группы [Боровский, Шафнер, 1961]. Леворин по этой классификации относится, наряду с кандицидином, трихомицином, аскозином и др., к группе ароматических гептаенов, содержащих микозамин и р-аминоацетофенон.

По данным УФ спектра, бумажной хроматографии и противоточного распределения при числе переносов не более 200 леворин наиболее близок кандицидину, но не идентичен ему [Малышкина, 1966]. Дальнейшие исследования показали, что леворин А не является индивидуальным веществом, а представляет собой комплекс, состоящий из 3-4 гептаенов [Bosshardt, Bickel, 1968; Яковлева, 1968]. Сравнение леворина А и кандицидина, полученного от фирмы "Penick", методом противоточного распределения при 600 переносах показало различие их по компонентному составу. Показано, что кандицидин представляет собой значительно более сложный комплекс, чем леворин А. В кандицидине имеется 5-6 компонентов, которых нет в леворине. В таб. 1.2.2 приведена сравнительная характеристика исследуемых препаратов леворина и кандицидина.

Работа, проведенная по сравнению главных компонентов леворина и кандицидина, показала их различие [Боровский и др., 1967; Hansen, Thomson, 1976]. Это видно по реакциям протонизации леворина и кандицидина, исходя из результатов по изучению динамики изменения коэффициента протонизации леворина и кандицидина во времени, рис. 1.2.2. Для этой работы были использованы кандицидин фирмы "Penick" и меченный леворин. Последний был взят из тех соображений, чтобы при загрузке сравниваемых препаратов в одну трубку можно было наблюдать каждый из них независимым методом – кандицидин спектрофотометрическим, а леворин – радиометрическим. Меченный леворин был получен при ферментации *Actinomyces levoris* в качалочных колбах при внесении изотопа – ^{14}C ацетата. Выделение главных компонентов кандицидина и меченого леворина с помощью противоточного распределения производили в аналогичных условиях.

На рис. 1.2.3 и 1.2.4 представлены результаты этого сравнения в вышеуказанной системе при 600 переносах и УФ спектры главных компонентов кандицидина и леворина. Работа с меченным леворином

Таблица 1.2.2.

**Сравнительная характеристика леворина (партия 320368)
и кандидина фирмы “Penick”(партия 8461 NIF-1)**
[Малышкина и др., 1970]

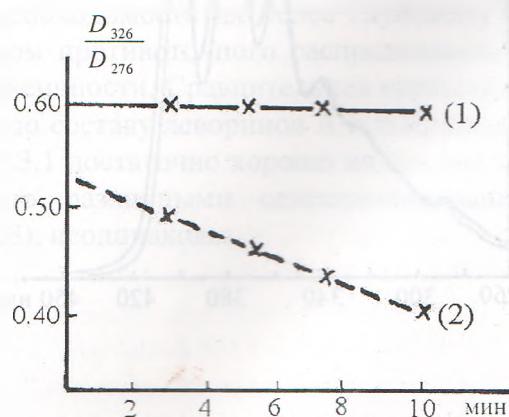
№№ п/п	Тесты	Леворин	Кандидин
1	Биологическая активность (метод диффузии в агар)	46 000 ЕД/мг	39 000 ЕД/мг
2	Внешний вид	Порошок желтого цвета с зеленоватым оттенком	Порошок желтого цвета с зеленоватым оттенком
3	Содержание летучих веществ	4,7 %	4,4 %
4	Содержание сульфатной золы	2,9 %	2,0 %
5	Коэффициент протонизации D_{326} / D_{276}	0,6 (3 мин.) 0,6 (5 мин.) 0,6 (7 мин.) 0,59 (10 мин.)	0,5 (3 мин.) 0,47 (5 мин.) 0,44 (7 мин.) 0,43 (10 мин.)
6	Наличие левористатина	отсутствует	отсутствует
7	LD_{50} в/б	4,3 мг/кг=197800 ЕД/кг	2,8 мг/кг=109200 ЕД/кг
8	Коэффициент распределения (50 переносов, система: метанол-хлороформбогатый буфер)	0,89	0,89
9	Поглощение в УФ области при длинах волн: 342 нм 360 -- 380 -- 402 --	355 нм 520 -- 610 -- 720 --	300 нм 435 -- 500 -- 598 --

Рис. 1.2.2. Динамика изменения коэффициента протонизации леворина и кандидина во времени.

1 – леворин (—);

2 – кандидин (---)

[Малышкина и др., 1970].



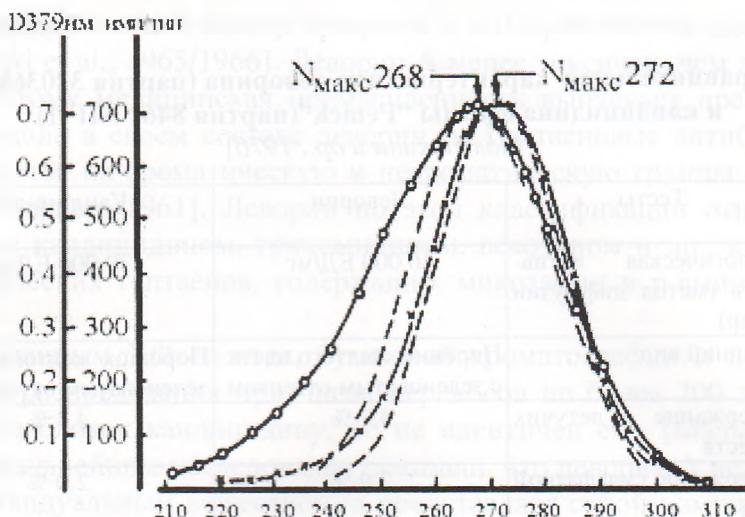


Рис. 1.2.3. Кривые распределения кандицидина и меченого леворина, внесенных в одну трубку, в системе: метанол-хлороформ-бортный буфер pH 8,25 (2:2:1). Число переносов – 600.
 ---x--- меченный леворин (экспериментальная кривая);
 ---o--- кандицидин (экспериментальная кривая);
 ----- теоретическая кривая [Малышкина и др., 1970].

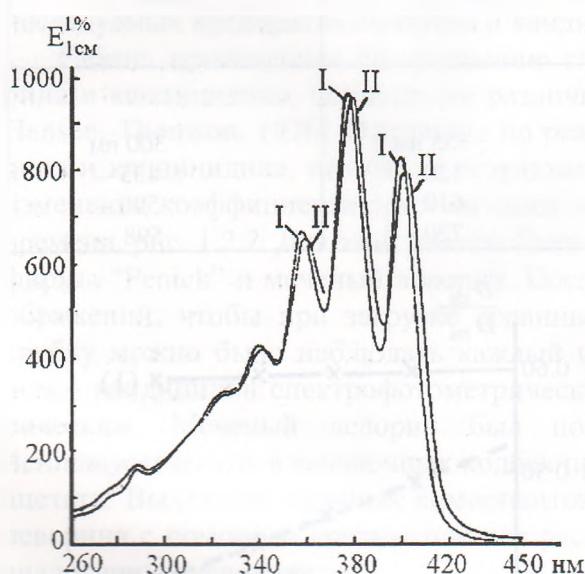


Рис. 1.2.4. УФ спектры главных компонентов леворина и кандицидина в метаноле:
 I – леворин; II – кандицидин
 [Малышкина и др., 1970].

показала, что главные компоненты кандицидина и леворина близки, но не идентичны. Следует отметить, что главные компоненты в обоих случаях не представляют собой индивидуальных веществ (имеет место несовпадение экспериментальных и теоретических кривых), но не трудно заметить, что это несовпадение у кандицидина больше и иное, чем у леворина, несмотря на то, что условия их очистки в аппарате Крейга были идентичны. Это обстоятельство подтверждает предыдущий вывод о том, что кандицидин более сложный и иной комплекс, чем леворин. Неидентичны также и УФ спектры главных компонентов леворина и кандицидина (метанол). У кандицидина имеет место батохромный сдвиг максимумов на 2 нм. Таким образом, различия между леворином и кандицидина, помимо компонентного состава, заключаются, по-видимому, и в различии пространственного строения хромофора или всего макролактонного кольца их главных компонентов.

1.3. Типовой состав леворина А и свойства составляющих его компонентов

Ранее было установлено, что леворин не однороден по составу и включает два близких, но не идентичных по свойствам ароматических гептаэна – леворин А и леворин В [Малышкина, 1966; Borowski et al., 1965/1966; Цыганов, Яковлева, 1970]. Наиболее изученный из них леворин А также оказался комплексным [Bosshardt, Bickel, 1968; Цыганов, Яковлева, 1970], как и многие из известных ПА гептаенового ряда: кандицидин, трихомицин, гамицин и другие. Наличие комплексной природы леворина, возможность количественных и качественных изменений составляющих его биологически активных веществ, предопределило необходимость их более глубокого сравнительного изучения методом противоточного распределения, биологической активности и токсичности. Сравнительная характеристика полученных комплексов по составу леворинов А и В приведена в таблице 1.3.1. Из таблицы 1.3.1 достаточно хорошо видно, что свойства леворина, образуемого различными селекционированными штаммами (26/1, 12-13-15, 28), неодинаковы.

Таблица 1.3.1.

Сравнительная характеристика леворина, продуцируемого различными шаммами *Actinomyces levoris* [Цыганов, Яковлева, 1970]

Штамм	№№ партий	1 % Е 1 см	Активность леворина ЕД/мг	% содержания леворина		LD ₅₀ * мг/кг
				A	B	
26/1	06.05.66	740	35400±1410	20	20	12,9
	07.05.66	665	34200±2830	84,8	15,2	7,7
	08.06.66	610	30300±240	81,2	18,8	7,6
	10.06.66	590	28000±870	79,7	20,3	8,2
12-13-15	14.07.66	710	37000±1070	89,8	10,2	15,9
	15.07.66	770	35000±1880	88,4	11,6	15,2
28						

*LD₅₀ вычисляли по методу Кербера [Беленъкий, 1963].

Можно предположить, что свойства препарата, прежде всего, зависят от особенностей основного по количественному содержанию гептаэна леворинового комплекса – леворина А.

С целью изучения свойств леворина А в последующем было предпринято исследование его типового состава в трех партиях препарата, соответствующих разным штаммам продуцента методом противоточного распределения. В качестве системы применяли смесь метанола-хлороформа-боратного буфера с pH 8,2 (2:2:1). Навеску антибиотика (46,2 мг; 52,6 мг для леворина из штаммов № 26/1, № 28 и № 12-13-15 соответственно растворяли вначале в верхней, затем в нижней фазе системы и вносили в 9 и 10 трубки прибора. Сделав 200 переносов, анализировали содержимое трубок по верхней фазе и строили кривые распределения ($\lambda_{\text{макс}} = 380$ нм). При большом числе переносов, леворин А разделялся на несколько компонентов. Изучен типовой состав леворина А и свойства, составляющих его компонентов [Малышкина, 1965]. Расчет теоретических кривых позволил выявить до пяти индивидуальных компонентов в составе леворина А и определить их количества [Цыганов, 1970; Филиппова, Шенин, 1974]. Компоненты были обозначены как A₀, A₁, A₂, A₃, A₄. В вышеуказанной системе и условиях исследования они имели соответственно коэффициенты распределения 0,55; 0,73; 0,84 и 1,13. Качественный и количественный состав комплекса леворина А, у изученных вариантов *Actinomyces levoris*, оказался различным,

что иллюстрируется в таб. 1.3.2. Выделенные вещества незначительно различались по положению максимумов поглощения в УФ свете. При хроматографии на бумаге хлороформных экстрактов щелочных гидролизатов в каждом из компонентов был обнаружен р-аминоацетофенон, свидетельствовавший о принадлежности их к ароматическим гептаенам.

Таблица 1.3.2.

Количественное соотношение компонентов A_0 , A_1 , A_2 , A_3 в препаратах леворина А, полученных при биосинтезе различных вариантов *Actinomyces levoris* [Цыганов, Яковлева, 1970]

Препараты леворина А	Содержание компонентов, %			
	A_0	A_1	A_2	A_3
Штамм № 26/1	-	8,7	72,5	18,8
Штамм № 28	1,6	11,1	70,0	17,3
Штамм № 12-13-15	6,7	18,2	60,0	15,1

Изучен качественный и количественный состав этих компонентов, исследована их биологическая активность с использованием методов диффузии в агар и серийных разведений [Цыганов, 1970]. Биологическая активность компонентов леворина уменьшается в ряду: $A_4 > A_3 > A_2 > A_1 > A_0$. Качественных различий в спектре антибиотического действия обнаружить не удалось. Определен элементный состав этих антибиотиков и изучены их физико-химические характеристики с помощью ИК и УФ спектроскопии [Филиппова, Шенин, 1974]. В структурном отношении и по типовому составу эти компоненты несколько отличаются друг от друга. Предполагается, что между хромофорами леворина A_1 и A_4 и хромофорами леворина A_0 , A_2 и A_3 существуют стерические различия [Филиппова, Шенин, 1974]. Установлена структура некоторых компонентов леворина А - A_0 , A_2 , A_3 [Боровский и др., 1977].

Для изучения антибиотической активности выделенных препаратов использовали метод диффузии в агар, применяя в качестве стандарта препарат леворина и метод серийных разведений [Васильева и др., 1973; Кокушина и др., 1970 б]. Тест-культурой служила *Candida albicans* ATCC 11651. Первый метод дает возможность определить активность компонентов в ЕД, принятых при анализе леворина, второй, исключая зависимость от стандарта, характеризует минимальную бактериостатическую концентрацию в мкг/мл. Результаты представлены в таб. 1.3.3.

Таблица 1.3.3.

Активность компонентов A₀, A₁, A₂, A₃

[Цыганов, Яковлева, 1970]

Наименование препарата	Метод диффузии в агар, ЕД/мл	Метод серийных разведений, мкг/мл
A ₀	2040 ± 93	0,4 – 0,6
A ₁	15900 ± 274	0,06 – 0,07
A ₂	25800 ± 540	0,02 – 0,04
A ₃	37100 ± 1080	0,01 – 0,02

Результаты опытов показывают, что самым активным является компонент A₃. Уменьшение уровня активности происходит постепенно в сторону компонента A₀. Активность компонента A₀ в 18 раз ниже компонента A₃ и в 12 раз ниже, чем у компонента A₂. Закономерность уменьшения активности от компонента A₃ к компоненту A₀ сохранялась, если для определения биологической активности использовали метод серийных разведений.

С целью выявления возможных изменений в спектре антимикробного действия компонентов проводили испытание активности в отношении 16 различных тест-микробов (таб. 1.3.4). При этом каче-

Таблица 1.3.4.

Антимикробный спектр, количественное соотношение,**активность и токсичность компонентов A₀, A₁, A₂ и A₃**

[Цыганов, Яковлева, 1970]

Тест-организм	Минимальная бактериоскопическая концентрация, мкг/мл			
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃
Bacillus subtilis	5	5	5	5
Sarcina lutea	5	5	5	5
Candida albicans	0,6	0,06	0,04	0,02
Candida tropicalis	5	0,6	0,3	0,15
Candida Krusei	2,5	1,2	0,6	0,082
Saccharomyces cerevisiae	0,08	0,005	0,002	0,002
Torula utilis	0,08	0,04	0,02	0,005
Trichophyton gypseum	5	5	5	4
Alternaria humicola	10	10	10	10
Aspergillus niger	5	2,5	2,5	2,5
Fusarium solani	5	5	5	5
Pen. Granulatum	0,31	0,04	0,04	0,04
Cladosporum herbarum	4,5	2,5	2,5	2,5
Epidermophyton K.W.	5	5	5	5
Actinomyces endus	5	5	5	5
Actinomyces fradiae	10	10	5	10

Количественное соотношение, %				
Штамм № 26/1	-	8,7	72,5	18,8
Штамм № 28	1,6	11,1	70,0	17,3
Штамм № 12-13-15	6,7	18,2	60,0	15,1
Активность компонентов				
Метод диффузии в агар, ЕД/мл	2040±93	15900±274	25800±540	37100±1080
Метод серийных разведений, мкг/мл	0,4-0,6	0,06-0,07	0,02-0,04	0,01-0,02

ственных различий в спектре антимикробного действия не обнаружено. Количественные показатели активности оказались неодинаковыми в зависимости от компонентов и тест-микробов.

Из таб. 1.3.3 видно возрастание активности от компонента A_0 к компоненту A_3 . Однако следует отметить, что указанное является справедливым только в том случае, если в качестве тест-организмов используются дрожжи и дрожжеподобные грибы. При действии на грибы, актиномицеты и споровые бактерии активность выражалась одинаковыми показателями у разных компонентов. Это, вероятно, свидетельствует о различном механизме действия препаратов на указанные группы микроорганизмов.

Одним из важных проявлений биологической активности антибиотических препаратов является переносимость их для животных. Сравнительная токсичность отдельных компонентов комплекса леворина А была проверена при внутрибрюшинном введении белым мышам, таб. 1.3.5.

Таблица 1.3.5.

**Сравнительная токсичность компонентов A_0 - A_1 - A_2 - A_3
для белых мышей при внутрибрюшинном введении**
[Цыганов, Яковлева, 1970]

Наименование препарата	LD_{50}	
	мкг/кг	ЕД/кг
A_0	44,2 ± 1,2	90000 ± 2500
A_1	5,8 ± 1,0	92000 ± 15900
A_2	6,7 ± 1,7	173000 ± 52000
A_3	15,0 ± 1,3	55500 ± 48000

Несмотря на сравнительно одинаковую степень чистоты компонентов, о чем свидетельствуют близкие показатели Е-величин – 820, 850, 910 и 855 (для компонентов A_0 - A_1 - A_2 - A_3), переносимость их

для мышей оказалась различной, так же как и ранее отмечавшаяся антибиотическая активность.

Сопоставляя свойства исходных препаратов леворина (таб. 1.3.2) с содержанием в основном комплексе леворина А компонентов, можно отметить определенную зависимость. Наиболее токсичным и наименее биологически активным оказался полиен леворин, полученный из *Actinomyces levoris* № 12-13-15. Он содержал наибольшие количества компонентов A₀ и A₁ (6,7% и 18,2%) сравнительно токсичных и мало активных. Очевидно, что на биологические свойства готовых препаратов леворина оказывают влияние количество и свойства составляющих его компонентов.

Направленный биосинтез леворина для обогащения его наиболее выгодными для химиотерапии компонентами составляет одну из перспектив дальнейшего совершенствования препарата.

1.4. Производные леворина А

В последнее время в терапии человека и животных получили широкое распространение антибиотики тетрациклической группы, цитостатики и стероидные гормоны. Однако применение этих препаратов вызывает вторичные кандидозы, аллергии различных органов. Для лечения вторичных инфекций с успехом применяют ПА – нистатин, амфотерицин В, кандинцидин, гамицин, леворин и водорастворимые препараты амфотерицина В, нистатина, микогептина и леворина. Благодаря хорошей растворимости в воде и лучшей всасываемости последние терапевтически эффективны в значительно меньших дозах, по сравнению с нерастворимыми основаниями при пероральном введении в виде таблеток с кишечно-растворимым покрытием, при аэрозоль-ингаляционном применении, а также в виде примочек, клизм, орошений, полосканий и т.д. [Ашбель и др., 1970; Лещенко, Рабинович, 1966; Кульбах и др., 1966; Кульбах и др., 1970; Наумчик и др., 1970; Михайлец и др., 1970, 1973].

В литературе описан общий метод получения водорастворимых натриевых солей тетраеновых, пентаеновых, гексаеновых и гептаеновых антибиотиков [Butler, 1966; Кульбах, Карпенко, 1960; Беленький и др. 1959; Кульбах, Карпенко, 1965; Кульбах и др., 1970]. Данный метод заключается в титровании суспендированного в безводном растворителе антибиотика метилатом или бутилатом натрия до характерных для каждого препарата значений рН, зависящих от рК его функциональных групп. Описано получение биологически ак-

тивных, но мало стабильных при хранении и не применяемых в медицинской практике гидрохлоридов нистатина [Rapi et al., 1963], амфотерицина В, кандидина [Waksman et al., 1965], сульфатов и фосфатов амфотерицина В и цитратов трихомицина [Butler, 1966].

Биологически активные химические производные ПА, растворимые в воде, получают путем блокировки свободных аминогрупп такими реакциями, как N-ацилирование [Bartner et al., 1957/1958; Lechevalier et al., 1961; Ragni et al., 1961]. Подробно изучены ацетилпроизводные кандидина [Ragni et al., 1961], амфотерицина В, кандидина и трихомицина [Lechevalier et al., 1961]. Они являются кислотными, благодаря наличию свободной карбоксильной группы. При нейтральном значении pH в метаноле эти антибиотики легко образуют водорастворимые соли при взаимодействии со щелочными агентами. Для ацетилированных полиенов отмечается снижение ингибирующего действия на гликозид дрожжей и снижение биологической активности по сравнению с исходными антибиотиками при сохранении противомикробного действия [Mechlinski, 1973]. Описаны получение и химические свойства водорастворимых сукцинилпроизводных ПА [Lechevalier et al., 1961]. Показано, что чувствительность большинства клинических штаммов *Candida* сохраняется как к сукцинатам, так и их натриевым солям, несмотря на снижение биологической активности производных в 8-10 раз по сравнению с исходными антибиотиками [Mechlinski, 1973]. Считается, что водорастворимые натриевые соли N-сукцинатов могут применяться при системных микозах [Mechlinski, 1973].

Водорастворимые производные нистатина, пимарицина, трихомицина и амфотерицина В получены путем их обработки в щелочной среде полисахаридами (амилоза, инулин, декстран), окисленными до полиальдегидов или окисленным на 90% кукурузным крахмалом [Цыганов, 1970]. Полученные производные содержат 72% исходного антибиотика и имеют биологическую активность, равную 40% от активности исходного антибиотика. Водорастворимые формы ПА, пригодные для парентерального применения, получены с помощью натриевой соли дезоксихолевой кислоты [Bartner et al., 1957/1958; Lechevalier et al., 1961]. Дезоксихолат нистатина не нашел практического применения из-за нестабильности и быстрой желатинизации его водных растворов, а фунгизон, являющийся пока уникальной лекарственной формой для лечения большинства больных с системными грибковыми заболеваниями, при длительном употреблении вызывает тяжелые побочные явления (нефрит, тошнота, рвота,

потеря аппетита, боль в суставах и т.д.) [Lechevalier et al., 1961; Butler, 1966].

Для лечения кандидозных инфекций и аспергиллеза используется исходный леворин и его натриевая соль [Голутвина, Мороз, 1970; Некачалов, Яробкова, 1970]. Первоначально предложенный метанольный способ получения натриевой соли леворина был сложен и неэкономичен из-за проведения процесса в безводной среде. Из-за большого расхода ядовитого метанола и огнезрывоопасного этил-ацетата, который используется на стадии упаривания, наблюдалась частичная инактивация антибиотика [Беленький и др., 1959; Кульбах, Карпенко, 1960; Кульбах, Карпенко, 1965; Кульбах и др., 1970 а, б]. Для преодоления указанных недостатков был предложен новый способ получения натриевой соли леворина [Холодова и др., 1968]. Полученная новым способом натриевая соль леворина представляет собой порошок темно-желтого цвета, вяжущего вкуса, растворимый в воде, ДМФА, ДМСО, практически нерастворимый в ацетоне, ментленхлориде. Биологическая активность препарата не менее 25 000 ЕД/мг по левориновому стандарту. В качестве дозы на токсичность предложена доза 200 ЕД в объеме 0,5 мл воды внутривенно, тест-доза на пирогенность – 3 000 ЕД на 1 кг веса животного. Натриевая соль леворина, подобно исходному антибиотику, термолабильна и процесс ее инактивации значительно ускоряется на свету (рис. 1.4.1) [Холодова и др., 1968]. При +4°C в защищенном от света месте порошок сохраняется без потери биологической активности и экстинкции в течение 1 года.

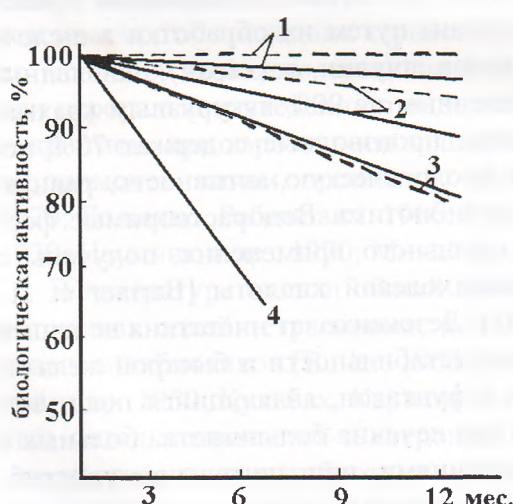
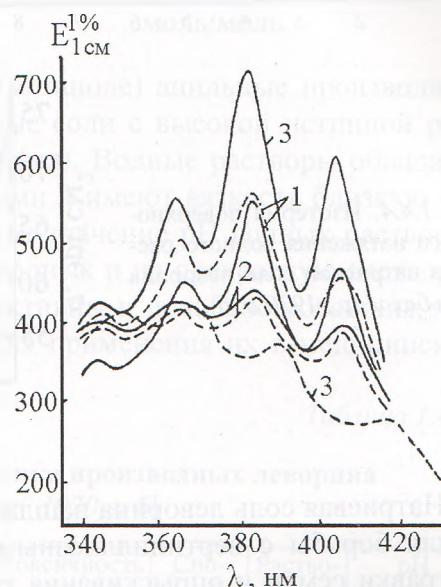


Рис. 1.4.1. Инактивация натриевой соли леворина при различных условиях хранения.
1 - +4°C в темноте;
2 - +25°C в темноте;
3 - +25°C на свету;
4 - +37°C в темноте;
— активность; 4 ----- экстинкция
[Кульбах и др., 1970 а, б]

Несмотря на хорошую растворимость, натриевая соль леворина в воде находится в виде тонкой коллоидной дисперсии, в то время как в этиловых и метиловых спиртовых растворах препарат диспергирован до молекул и образует истинные растворы. Об этом свидетельствуют УФ спектры водных и метанольных растворов антибиотика, в которых наблюдается значительное ослабление молярного поглощения при переходе в область больших длин волн в воде по сравнению с метанольными растворами (рис. 1.4.2) [Кульбах и др. 1968 а, б; Филиппова и др., 1987].

Рис. 1.4.2. УФ спектры поглощения водорастворимых производных леворина.
 ----- в воде; —— в метаноле;
 1 – натриевая соль N-диацетиллеворина; 2 - натриевая соль сукцинил леворина; 3 - натриевая соль леворина [Кульбах и др., 1970 а, б].



Относительная вязкость растворов натриевой соли леворина значительно уменьшается с нагревом до +35°C и с изменением pH (рис. 1.4.3). Минимум вязкости (pH 5,4-5,5) соответствует минимуму растворимости амфолита леворина, что подтверждает изоэлектрическое состояние молекулы антибиотика в данной точке [Кульбах и др., 1968].

Водные растворы леворина обладают поверхностно-активными свойствами и снижают поверхностное натяжение воды на 25-30% (рис. 1.4.4) [Кульбах и др., 1968]. Поскольку механизм действия леворина, как и других антибиотиков, состоит в адсорбции его на клеточные мембранны [Цыганов, 1970], эффективное количество поверхностно-активного вещества снижается в четыре раза по сравнению с исходным антибиотиком.

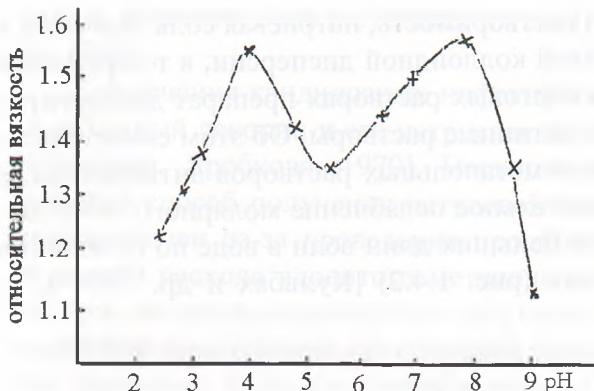
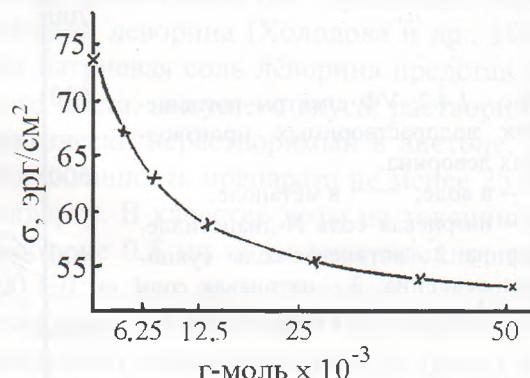


Рис. 1.4.3. Зависимость относительной вязкости раствора натриевой соли леворина от pH [Кульбах и др., 1970 а, б].

Рис. 1.4.4. Изотерма поверхностного натяжения водного раствора натриевой соли леворина [Кульбах и др., 1970 а, б].



Натриевая соль леворина нашла применение в сельском хозяйстве для борьбы с вертициллиозным увяданием хлопчатника путем протравки семян и опрыскивания растений водным раствором препарата, что значительно повышает урожайность хлопка [Жабинская, 1969].

Амфотерный характер леворина, наличие в его молекуле одной карбоксильной и двух аминогрупп дает возможность получать его производные, как с основаниями, так и с кислотами. При блокировке аминогрупп ацильными радикалами получены малоактивные производные леворина с ангидридами одноосновных и двуосновных кислот N-ацетил, сукцинил, малеинил, фталил - леворин. Биологическая активность производных колеблется в пределах 1000-6000 ЕД/мг и зависит от степени ацилирования (рис. 1.4.5). Наблюдается заметное увеличение интенсивности полос поглощения в ИК области при 1630 и 1570 cm^{-1} , соответствующих амидным связям. Реакция с нингидрином отрицательная, что свидетельствует об отсутствии свободных аминогрупп у ацилированных производных.

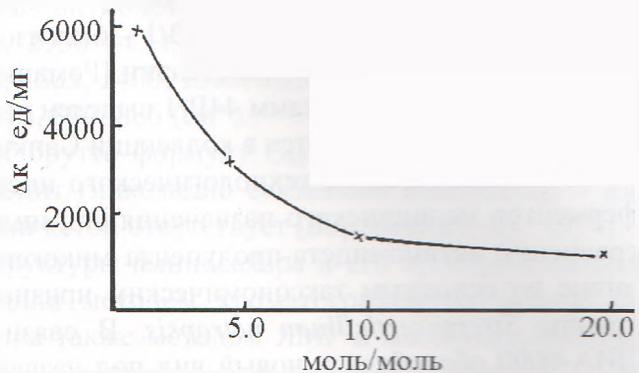


Рис. 1.4.5. Зависимость биологической активности леворина от степени ацилирования [Кульбах и др., 1970 а, б].

При нейтральном pH в воде (метаноле) ацильные производные леворина легко образуют натриевые соли с высокой истинной растворимостью в воде (более 200 мг/мл). Водные растворы обладают поверхностно-активными свойствами и имеют вязкость близкую к 1 (1,07). Но, несмотря на нейтральное значение pH водных растворов натриевых солей ацильных производных и на прекрасную растворимость их в воде, препараты малоактивны и довольно токсичны, что является главным препятствием для применения их в медицинской практике (таб. 1.4.1).

Таблица 1.4.1.

Сравнительная характеристика производных леворина
[Кульбах и др., 1970 а, б]

№ п/п	Производные	Актив- ность ЕД/мг	Токсичность (LD ₅₀)		Спос- соб введе- ния	Раство- ри- мость	pH 0,1%-го водного раствора
			мг/кг	ЕД/кг			
1	Натриевая соль леворина	25000	1,53	38250	в/в	вода	9,0 – 10,0
2	Натриевая соль ацетил-леворина	600	5,0	30000	в/в	"	7,0
3	Натриевая соль сукци- нил-леворина	1000	7,0	7000	в/в	"	7,0

1.5. Физико-химические и биологические свойства микогентина

При изучении актиномицетов с мутовчатым ветвлением спороносящих гиф было обращено внимание на культуры, образующие смеси ПА – пентаена и гептаена [Цыганов и др., 1965; Конев, Цыганов, 1967; Боровский и др., 1965; Невинский и др., 1971; Конев, Цы-

ганов, 1973; Жукова, Фурсенко, 1973]. Из продуктов жизнедеятельности одной из них - штамма 44В/1 – был изолирован и описан оригинальный антибиотик – микогептин [Романкова и др., 1971; Жукова, Фурсенко, 1973]. Штамм 44В/1 выделен из образца почвы Киргизии в 1963 г. и сохраняется в коллекции Санкт-Петербургского научно-исследовательского технологического института антибиотиков и ферментов медицинского назначения под индексом ЛИА-0090. При сравнении актиномицета-продуцента микогептина показано его отличие по основным таксономическим признакам от близких видов группы *Streptoverticillium netropsis*. В связи с этим актиномицет ЛИА-0090 обособлен в новый вид под названием *Streptoverticillium mycoheptinicum* [Конев, Цыганов, 1967; Жукова, Фурсенко, 1973].

Гептаеновый макролидный антибиотик микогептин представляет собой аморфный порошок ярко-желтого цвета [Borowski et al., 1964/65; Боровский и др., 1965; Невинский и др., 1971; Боровский и др., 1973]. Не имеет четкой температуры плавления, темнеет при 150°C. Растворим в ДМСО, ДМФА, пиридине и низших органических кислотах. Слабо растворим в низших спиртах. Не растворим в углеводородах, эфире, ацетоне, тетрагидрофуране. Прибавление 5-20% воды к органическому растворителю увеличивает его растворимость. При pH 10-11 образует растворимые в воде биологически активные соли [Боровский и др., 1973].

По химической природе микогептин относится к подгруппе ненарomaticеских гептаеновых макролидных антибиотиков. Макролактонное кольцо включает полиеновый хромофор с семью сопряженными двойными связями. В УФ спектре микогептина (рис. 1.5.1) имеются максимумы поглощения при следующих длинах волн: 347, 362, 382, 406 нм ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$ 495, 940, 1600, 1800 соответственно).

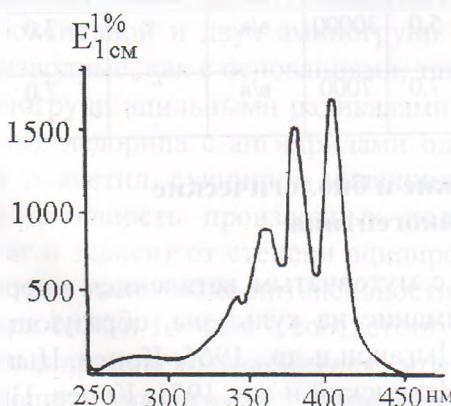


Рис. 1.5.1. УФ спектр поглощения микогептина в метаноле [Боровский и др., 1973].

В ИК спектре (KBr) антибиотика содержатся полосы поглощения: 3420 (OH), 3020, 2930 (-CH, CH₂), 1780, 1720 (лактон), 1640, 1580 (-CH=CH-), 1515, 1505, 1460, 1390, 1320, 1300, 1280, 1220, 1180, 1105 (-C=C-), 1075, 1015, 890, 886 (см⁻¹).

Микогептин имеет брутто формулу C₄₈H₇₇NO₁₇. В состав молекулы микогептина входит гликозидно связанный аминосахар – микозамин, ароматический кетон отсутствует [Боровский и др., 1973].

Доказательство структуры аминосахара и его пространственной конфигурации проводили методом хроматографии на бумаге кислотных гидролизатов, а также методом ЯМР и массспектрометрии триацетил- и триацетилмоносильных производных [Borowski et al., 1964/1965]. Показано, что микозамин, входящий в молекулу микогептина, имеет пиранозную форму кресла D-конфигурации [Borowski et al., 1972; Golik et al., 1972]. Функциональный анализ антибиотика указывает на наличие карбонила, карбоксильной группы и гидроксильных групп. При гидрировании микогептина на палладии поглощается 7 молей водорода, что говорит об отсутствии изолированных двойных связей. При гидрировании на платине в уксусной кислоте поглощается еще один моль водорода за счет наличия в молекуле карбонила. На присутствие свободной карбоксильной группы в молекуле указывает способность микогептина образовывать натриевую соль. Натриевая соль микогептина хорошо растворима в воде и биологически активна [Райгородская и др., 1967; Боровский и др., 1973].

В связи с наличием в молекуле микогептина гептаенового хромофора, содержащего систему сопряженных связей, антибиотик неустойчив к воздействию кислорода воздуха. УФ света и температуры. В щелочной и кислой среде антибиотик быстро инактивируется за счет разрыва лактонной связи и отщепления микозамина [Холодова и др., 1970; Боровский и др., 1973].

От других представителей подгруппы неароматических гептацинов: кандинина [Taber et al., 1954], амфотерицина В [Vandeputte et al., 1955-1956], кандинина [Borowski et al., 1966] и кандинона [Borowski et al., 1966], тбилимицина [Шенин и др., 1970] микогептин дифференцируется по своей хроматографической подвижности в ряде систем на бумаге или в тонком слое силикагеля, методами противоточного распределения и протонизации [Малышкина, 1966; Райгородская и др., 1967; Боровский и др., 1973]. Наибольшее отличие микогептина от амфотерицина В, кандинина и тбилимицина получено в опытах по противоточному распределению при 200 переносах, в

системе метанол-хлороформ-боратный буфер pH 8,2 (2:2:1), рис. 1.5.2.

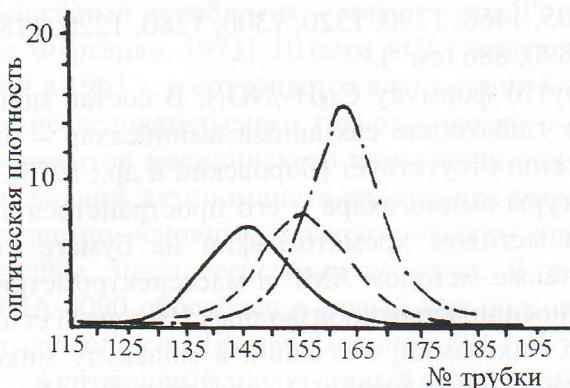


Рис. 1.5.2. Кривые противоточного распределения кандинина, амфотерицина В и микогептина в системе метанол-хлороформ-боратный буфер pH 8,2 (2:2:1) при 200 переносах: — амфотерицин В; - - - кандинин; - - - - микогептин [Боровский и др., 1973].

Как видно из рисунка, максимум концентрации амфотерицина В находится в 146 трубке, кандинина-в 155 трубке, микогептина-в 162 трубке. Известно, что кандинин и кандиодин находятся в этой системе в 143 и в 132 трубках соответственно [Borowsky et al., 1966]. Среди гептаенов микогептин по своим свойствам находится ближе к гептаену 2814-Н. Микогептин продуцируется культурой *Actinomyces netropsis*. Однако идентичность этих веществ может быть установлена лишь непосредственным сравнением их. Актиномицет, образующий микогептин, продуцирует также пентаеновый антибиотик и токсическое вещество [Шенин и др., 1970]. Пентаеновый антибиотик из группы адеопентаенов активен на грибы и дрожжи, но в отличие от микогептина превосходит его по токсичности [Северинец, 1971]. Спектрофотометрический метод позволяет определить наличие пентаеновых примесей в микогептине при их содержании до 3% [Невинский и др., 1966; Берштейн, Лохина, 1972]. Токсическое вещество ($C_{22}H_{24}NO_6$, т. пл. 154° , $\lambda_{\text{макс}} 255, 345 \text{ нм}$), выделенное ранее, как сопутствующее неполиеновому антибиотику ауреотрицину, на основании физико-химических свойств было идентифицировано, как ауреотин [Celmer, Colomons, 1955].

Выделение и очистку микогептина производят экстракцией мицелия низшими спиртами. Разделение на пентаеновую и гептаеновую фракции основано на их различной растворимости. При концентрации экстракта до 1/5 объема выпадает осадок, содержащий до 50% гептаена. Промывка такого сырца 80% этанолом или изопропанолом позволяет полностью очистить гептаен от пентаена [Боровский и др., 1965; Borowsky et al., 1964/1965].

Структура микогептина установлена на основе изучения продуктов деградации антибиотика [Borowski et al., 1972; Golik et al., 1972; Боровский и др., 1973] по схеме, успешно использованной для доказательства структуры амфотерицина В [Borowski et al., 1970], нистатина А₁ [Borowski et al., 1971 а] и кандидина [Borowski et al., 1971 б].

Озонолиз микогептина с последующим переходом к углеводороду дал 5-метилэйкозан, строение которого было доказано массспектрометрическим сравнением с 5-метилэйкозаном, полученным из кандидина и нистатина А₁. Выделение углеводорода говорит об углеводородном скелете фрагмента С₁-С₂₀ [Боровский и др., 1973].

Локализация кислородных функций во фрагменте С₁-С₂₀ показана путем установления структуры соответствующих полиолов и их дейтероаналогов, образующихся при озонолизе микогептина с обработкой продуктов озонолиза последовательно литийалюминогидридом (или литийалюмодейтеридом), перидатом натрия и боргидридом натрия. Продукты реакции исследовались массспектрометрически в виде их метиловых эфиров, при этом в случае литийалюминогидрида были выделены полиолы, массспектры которых были идентичны массспектрам метиловых эфиров декапентаола и 5-оксиметилдекагексаола, полученных при аналогичной деградации молекулы нистатина А₁ [Боровский и др., 1973].

Использование же литийалюмодейтерида позволяет получить тридейтеро- и тетрадейтеропроизводные соответственно. Изучение фрагментационных ионов их метиловых эфиров позволяет определить положения, в которых находится дейтерий. Ионом с наибольшим *m/e* является ион 232 (Р-2х32) и 339 (Р-31).

На основании этих данных можно заключить, что карбонильные группы находятся у С₅ и С₁₃, карбоксильные у С₁ и С₁₆. Наличие дейтерия у конечного атома углерода говорит об ориентации фрагмента С₁-С₂₀ в молекуле микогептина, т.е. хромофорная часть начинается с С₂₀. При озонолизе эта связь разрывается и образуемый альдегид далее восстанавливается литийалюмодейтеридом.

При обработке перидатом натрия сохраняется гликольная система, что говорит о том, что гидроксильная группа у С₁₉ блокирована. Такая блокировка может быть объяснена только тем, что с углеродным атомом при С₁₉ связан микозамин.

Структура углеродного скелета гептаенового хромофора, включающего фрагмент С₁₉-С₃₅, была доказана окислением пергидромикогептина KMnO₄ и CrO₃. Среди продуктов окисления была выделе-

на диосновная кислота с наиболее длинной углеводородной цепью (окисление идет по кислородным функциям по обеим сторонам хромофора). Массспектр диметилового эфира этой кислоты был идентичен массспектру диметилового эфира 2-метилгептадекановой кислоты, выделенной из пергидроамфотерицина В, нистатина А₁ и кандидина [Боровский и др., 1973].

Строение фрагмента С₃₆-С₃₈ и его положение в молекуле микогептина было доказано образованием 2,4-диметилгексантриола-1, 3, 5 и его дейтероаналога при озонолизе антибиотика с последующим восстановлением литийалюмогидридом (или литийалюмодейтеридом). Метиловые эфиры обеих соединений имели массспектры, идентичные с массспектрами метиловых эфиров 2,4-диметилгексантриола-1, 3, 5 и 1-дейтеро-2, 4-диметилгексантриола-1, 3, 5, полученными при аналогичной деградации молекулы кандидина. Положение дейтерия у С₃₃ показывает, что он является конечным углеродным атомом хромофора [Боровский и др., 1973].

При озонолизе микогептина с последующим восстановлением литийалюмогидридом, окислением перйодатом натрия и снова восстановлением боргидридом натрия был выделен фрагмент, строение которого было доказано ЯМР-спектроскопией. Это доказывает локализацию лактонного кольца у С₁ и С₃₇ [Боровский и др., 1973].

Ввиду наличия в молекуле микогептина двух кетонных групп возможно образование внутренних гемикетальных колец. Присутствие внутренних кетальных колец было показано экспериментально в случае амфотерицина В [Borowski et al., 1970; Mechlinski et al., 1970].

Таким образом, структура микогептина очень близка к структуре полиеновых макролидных антибиотиков: кандидина, амфотерицина В, нистатина А₁.

Изучение биологической активности микогептина и его лекарственных форм *in vitro* проводили методом серийных разведений в питательной среде. В ряд пробирок с последовательными двукратными разведениями антибиотика, как правило, в пределах концентраций от 100 до 0,003 мкг/мл, вносили определенное количество грибковых клеток и через 1-4 суток, в зависимости от скорости появления видимого роста в контрольных пробирках без антибиотика, устанавливали минимальную фунгистатическую концентрацию антибиотика (МФсК) [Кокушина и др., 1973].

Результаты этих исследований представлены в табл. 1.5.1. Микогептин подавляет *in vitro* рост большого количества грибов. К нему чувствительны дрожжеподобные грибы рода *Candida*, криптококки,

аспергиллы, пенициллы и другие грибы. Важным свойством микогентина является способность угнетать рост возбудителя кокцидиодоза, одного из наиболее опасных и плохо поддающихся лечению грибковых заболеваний. В определенных концентрациях микогентин подавляет жизнедеятельность дерматофитов и простейших – трихомонад [Кокушина и др., 1973].

Таблица 1.5.1.

Противомикробный спектр микогентина (мкг/мл)
[Кокушина и др., 1973].

Микрорганизмы	МФсК
<i>Candida albicans</i>	0.8
<i>Candida tropicalis</i>	3.14
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.8
<i>Achorion schönleinii</i>	3.14
<i>Epidermophyton Kaufmann – Wolf</i>	1.57
<i>Microsporum lanosum</i>	6.25
<i>Trichophyton gypseum</i>	1.57
<i>Trichophyton rubrum</i>	3.14
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.17
<i>Hormodendrum pedrosoi</i>	1.5
<i>Penicillium granulatum</i>	0.8
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1.57
<i>Coccidioides immitis</i>	0.06-0.5
<i>Alternaria humicola</i>	0.8
<i>Botrytis cinerea</i>	3.14
<i>Fusarium solani</i>	1.57
<i>Nocardia madurae</i>	6.25
<i>Actinomyces globisporus</i>	6.25
<i>Micromonospora parva</i>	2.5
<i>Trichomonas foetus</i>	1.25
<i>Bacterium coli</i>	50,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	50,0

Как и другие ПА, микогентин *in vitro* обладает фунгистатическим действием. Это подтверждалось появлением роста грибов при высеах на среды без антибиотика из пробирок, где видимый рост гриба отсутствовал, а также увеличением МФсК при более продол-

жительной инкубации посевов, чем это требовалось при обычном определении. На рис. 1.5.3 показано изменение величины МФсК микогептина по отношению к *Candida immitis* в зависимости от срока инкубации. Так, штамм 158 в течение 3 суток не дал видимого роста при концентрации 0,5 мкг/мл, а через 10 суток рост не был установлен лишь в пробирке с концентрацией микогептина 7,8 мкг/мл. Аналогичное явление наблюдалось и при определении чувствительности других штаммов [Кокушина и др., 1973].

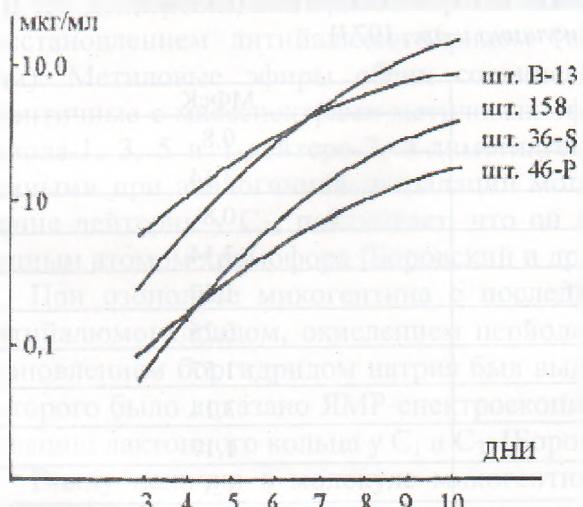


Рис. 1.5.3. Изменение МФсК микогептина для штаммов *Coccidioides immitis* в зависимости от сроков инкубации [Кокушина и др., 1973].

Биологическая активность микогептина снижается в присутствии сыворотки крови, особенно с высоким содержанием холестерина. Добавление в питательные среды 20% нормальной кроличьей сыворотки (63 мг% холестерина) повышало МФсК микогептина на 5-15%, а добавление сыворотки крови кроликов с искусственно вызванной гиперхолестеринемией (1000 мг%) – на 20-40%.

Многократное пассирование дрожжеподобных грибов рода *Candida* на средах с микогептином приводит к повышению их резистентности в 2,5-4 раза. У таких штаммов изменяются морфологические и биохимические свойства, снижается иммуногенная активность.

Экспериментальное изучение лечебных свойств микогептина и его лекарственных форм проведено на различных моделях грибковых инфекций и на модели трихомонадной инвазии. Чаще всего для изучения перпаратов использовали модель генерализованного кандидоза и кокцидиоидоза [Кокушина и др., 1973].

Кандидоз у белых мышей вызывали внутривенным введением 10-12 млн. клеток *Candida albicans*. Кокцидиоидоз воспроизводили, заражая мышь внутрибрюшинно. Животным вводили 500000 артроспор или взвесь всех мицелиальных элементов. Обе инфекции были смертельны для мышей. Гибель всех животных без лечения, как правило, наблюдалась в течение 2-х недель [Кокушина и др., 1973].

Для испытания действия микогептина на простейших использовали искусственно усиленную спонтанную инвазию кишечника мышей трихомонадами.

Нерастворимые препараты микогептина применяли перорально в виде суспензии, приготовленной на 0,25% растворе карбоксиметилцеллULOЗЫ. Препараты, растворимые в воде внутривенно вводили на 5% растворе глюкозы, а внутрь на дистиллированной воде. Лечение проводили 1 раз в день на протяжении 7-10 дней.

В процессе разработки технологии получения микогептина было установлено, что его эффективность может изменяться в зависимости от биологических особенностей штамма-продуцента антибиотика.

Сравнение лечебного действия различных партий микогептина, полученных при ферментациях штаммов *Streptoverticillium mycoherpeticum* 24 и 44 В/1, показывает определенное преимущество второго, хотя по физико-химическим свойствам антибиотики не имели отличий. В табл. 1.5.2 и 1.5.3 приведены результаты сравнительного изучения этих препаратов при кандидозе и кокцидиоидозе.

Таблица 1.5.2.

**Сравнительная эффективность препаратов
микогептина, выделенных из разных штаммов,
при генерализованном кандидозе.
Лечение *per os*, 1x10 дней [Кокушина и др., 1973].**

Штамм- продуцент	Доза мико- гептина, ЕД/кг	Количество мышей в группах	Всего пало через			
			9 дней	2 недели	1 месяц	52 дня
24	2000	16	2	2	3	3
	1000	17	3	4	9	12
	500	16	3	5	10	12
	250	17	4	7	13	15
44 В/1	2000	16	0	0	1	1
	1000	17	0	0	3	5
	500	16	1	2	8	11
	250	17	1	6	14	16
Без лечения	-	15	14	-	-	-

Таблица 1.5.3.

Сравнительная эффективность препаратов микогептина, полученного из разных штаммов, при кокцидиоидозе у мышей.
Лечение *per os*, 1x10 дней [Кокушина и др., 1973].

Штамм-продуцент	Доза микогептина, ЕД/кг	Количество мышей в группах	Всего пало через					Средняя продолжительность жизни
			11 дней	1 месяц	2 месяца	130 дня		
24	20000	16	1	7	13	16	24,6	
	10000	15	6	14	15	-	16,1	
	5000	16	6	16	-	-	13,5	
	2500	16	10	16	-	-	10,9	
44 В/І	20000	15	1	4	9	15	59,0	
	10000	16	2	8	13	16	37,2	
	5000	16	3	15	15	16	21,8	
	2500	16	6	14	16	-	17,5	
Без лечения	-	21	21	-	-	-	9,0	

В то же время сравнение химиотерапевтической эффективности антибиотиков, полученных на регламентных и обогащенных средах, не обнаружило каких-либо различий между ними, что позволило в значительной степени увеличить выход микогептина.

Для подтверждения целесообразности клинического изучения микогептина были испытаны 5 стандартных партий антибиотика, наработанных на опытно-производственной установке в Ленинградском научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов.

Препараты вводили животным перорально в дозах, указанных в табл. 1.5.4, на протяжении 10 дней, начиная со следующего после заражения дня. Как показывают результаты, лечение микогептином в дозах 20.000 и 50.000 ЕД/кг оказывало выраженное действие как при генерализованном кандидозе, так и при кокцидиоидозе. В первом случае выживаемость в большинстве групп составила 100%, а в остальных погибли единичные животные. При второй инфекции все мыши, не получавшие препарата, погибли через 16 дней, а среди леченных животных выживаемость в среднем составила 84% [Кокушкина и др., 1973; Михайлец и др., 1973] Отдельные партии микогептина в обоих случаях практически не отличались между собой. Животные хорошо переносили лечение. Введение препаратов по той же схеме незараженным мышам не вызывало каких-нибудь побочных явлений или гибели животных.

Таблица 1.5.4.

Результаты изучения химиотерапевтической активности стандартных партий микогептина при экспериментальных микозах [Кокушина и др., 1973].

Партия микогептина	Биологическая активность, ЕД/мг	Доза		Кандидоз		Кокцидиоидоз	
		ЕД/кг	мг/мг	Количество мышей		всего	пало через 10 дней
				всего	пало		
20370	900	20000	22,2	20	1	20	3
		50000	55,5	19	2	19	2
30370	900	20000	22,2	19	0	20	4
		50000	55,5	20	0	20	3
40470	840	20000	23,8	20	0	19	5
		50000	59,5	20	0	19	2
50570	860	20000	23,2	20	0	20	3
		50000	58,1	19	1	19	3
80570	845	20000	23,6	20	1	20	4
		50000	59,0	20	0	20	3
Без лечения	-	-	-	26	21	30	30

Микогептин при пероральном применении обладает широким спектром химиотерапевтического действия и его лечебные свойства проявляются в большом диапазоне доз. Для сохранения жизни 50% животных, зараженных *Candida albicans*, например, достаточно суточного введения препарата в дозе 500 ЕД/кг (см. табл. 1.5.2).

Однако, под влиянием одного десятидневного курса лечения микогептином не происходило полного излечения всех мышей при кандидозе. Это подтверждается гибелью животных через определенное время после отмены препарата, а также результатами посевов органов забитых мышей.

Даже при лечении большими дозами микогептина у части животных, выживших до конца опыта, были выделены культуры *Candida albicans* из печени, селезенки и почек. У всех животных были получены ретрокультуры из ткани головного мозга. Это, вероятно, указывает на плохую проницаемость гематоэнцефалического барьера мышей для микогептина в этой лекарственной форме.

При кокцидиоидозе об отсутствии сансирующего эффекта говорят рецидив и генерализация инфекции, приведшие к гибели всех мышей на протяжении 4-х месяцев после окончания лечения. Специфический характер гибели был подтвержден результатами патолого-анатомического исследования павших животных: во всех случаях

были обнаружены характерные для кокцидиоидоза поражения внутренних органов – легких, печени, селезенки, лимфатических узлов брюшной полости. На генерализацию инфекции указывало наличие свободных тканевых форм гриба в смыве из брюшной полости. Эти факты обусловлены, вероятно, фунгистатическим механизмом действия антибиотика. Поэтому лечение должно быть продолжительным или состоять из нескольких повторных курсов. Сочетанное применение микогептина и некоторых антигенных препаратов из *Candida immitis* позволило существенно повысить эффективность лечения экспериментального кокцидиоидоза.

Кроме того, следует учесть, что для изучения микогептина были использованы тяжелые смертельные инфекции, а при кокцидиоидозе, для ускорения гибели животных, их заражали дозой гриба, многократно превосходящей минимальную смертельную дозу. При заражении мышей меньшими количествами грибных клеток, гибель животных наступала значительно позднее и, при этом, в большей степени проявлялось влияние микогептина на течение инфекции. Это наглядно демонстрирует рис. 1.5.4, на котором показана динамика гибели мышей, зараженных разными дозами *Candida immitis* 158, и влияние на нее лечения микогептином. Антибиотик вводили перорально в дозе 25.000 ЕД/кг в течение 10 дней.

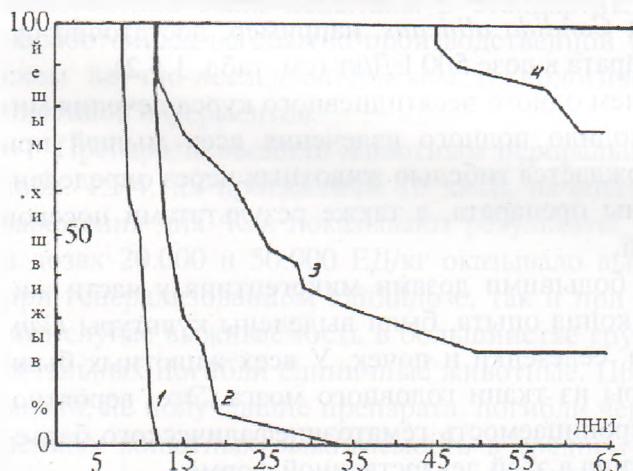


Рис. 1.5.4. Влияние инфицирующих доз на эффективность лечения микогептином экспериментального кокцидиоидоза мышей: 1 – $6,5 \cdot 10^5$ артроспор; 2 – $6,5 \cdot 10^3$ артроспор; 3 – $6,5 \cdot 10^5$ артроспор + микогептин; 4 - $6,5 \cdot 10^3$ артроспор + микогептин [Кокушина и др., 1973].

Изучение микогептина на других моделях показало, что его эффективность проявляется при экспериментальном криптококкозе и гистоплазмозе. Однако, несмотря на активность его *in vitro* в отношении дерматофитов, при экспериментальной микроспории и три-

хофитии морских свинок наружное применение микогептина в виде мази было безрезультатным.

Протистоидный эффект микогептина был подтвержден у экспериментальных животных. При пероральном введении микогептина в комплексе с поливинилпирролидоном (ПВП) в дозе 120 мг/кг после 10-дневного курса лечения 85% мышей, у которых была вызвана трихомонадная инвазия кишечника, оказались свободными от простейших. Известный противотрихомонадный препарат – метронидазол, вводимый таким же путем в дозе 125 мг/кг, санировал всех животных, но все же эффективность микогептина в отношении трихомонад можно признать достаточно высокой [Кокушина и др., 1973].

Важным положительным качеством микогептина по сравнению с используемыми в медицинской практике противогрибковыми антибиотиками – леворином и нистатином – является его высокая эффективность при лечении генерализованных микозов, когда он вводится внутрь. Леворин, например, при 10-дневном курсе лечения экспериментального генерализованного кандидоза дозами от 10 до 200 мг/кг вообще не оказывает влияние на течение инфекции [Кокушина и др., 1973]. Результаты лечения *per os* подтверждают, что микогептин при таком пути введения всасывается в желудочно-кишечном тракте. Однако можно полагать, что резорбция его при этом происходит недостаточно полно. Одним из направлений при создании лекарственных форм микогептина является увеличение степени дисперсности порошка, вплоть до получения водорастворимых производных.

В экспериментальных условиях было установлено, что препараты микогептина, солюбилизированные дезоксихолатом натрия или ПВП, обладают выраженным лечебным эффектом при экспериментальных микозах, как при введении их перорально, так и внутривенно. Выраженное лечебное действие в эксперименте наблюдается и при применении натриевой соли микогептина. Изучение микогептина и его лекарственных форм в опытах на животных показало их достаточно высокую эффективность при пероральном введении и позволило перейти к клиническому изучению антибиотика.

Показаниями для лечения микогептином были грибковые заболевания, вызванные грибами, чувствительными к антибиотику. Это такие глубокие микозы, как кокцидиоидоз, криптококкоз, споротрихоз, хромомикоз, плесневые микозы, различные формы кандидоза и др. Микогептин применяли в капсулах или таблетках по 500000 ЕД 2 раза в день. Курс лечения продолжали до 2-х недель и при необхо-

димости повторяли. Результаты лечения 95 больных подтвердили практическую ценность микогептина и целесообразность его широкого применения [Кокушина и др., 1973].

1.6. Производные микогептина

Проведено исследование компонентного состава – микогептина, продуцируемого различными штаммами – исходным 44B/1 и селекционированными 777/2, 24, 56. Выделение антибиотика из культуральной жидкости и химическую очистку осуществляли известным способом [Боровский и др., 1965; Этингов и др., 1973]. Полное удаление из препарата пентаэна контролировали на основании УФ спектра и расчетным методом [Невинский и др., 1971; Этингов и др., 1973]. Условия выделения, очистки и анализа антибиотика для всех штаммов были одинаковы. Степень очистки всех образцов доводили до одного уровня. Компонентный состав микогептина изучали с помощью метода аналитического противоточного распределения при 600 переносах в системе метанол – хлороформ – боратный буфер pH 8,2 (2:2:1).

Таблица 1.6.1.

Характеристика микогептина, образуемого штаммами 44B/1, 777/2, 24 и 56 *Streptoverticillium mycoheptinicum* [Этингов и др., 1973].

№ штамма	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ при 382нм	Активность, мкг/мл	УФ спектр, λ_{\max} , нм (метанол)	ИК спектр, ν (см^{-1}) KBr	Содержание компонентов (%) с коэффициентом распределения	
					$K_o=2,3$	$K_p=3,7$
44B/1	1380	860	273, 283, 345, 363, 382, 406	1724-1710, 1566, 1384, 1070, 1014	20	80
777/2	1450	900	273, 283, 345, 363, 382, 406	1726-1714, 1564 1382, 1070, 1010	22	78
24	1400	870	273, 283, 345, 363, 382, 406	1724-1714, 1566, 1384, 1070, 1008	18	82
56	1360	850	273, 283, 345, 363, 382, 406	1726-1710, 1564, 1386, 1070, 1014	17	83

В табл. 1.6.1 и на рис. 1.6.1 представлены данные, характеризующие свойства и компонентный состав антибиотика, образуемого

вышеописанными штаммами. Из приведенных данных видно, что гептаен для всех изучаемых культур является идентичным – микогептином. Данные хроматографического разделения показывают, что микогептин представляет собой смесь двух гептаеновых компонентов с коэффициентами распределения 2,3 и 3,7. Количество второго (основного) компонента составляет примерно 80%. Соотношение гептаеновых компонентов в препаратах, образуемых разными штаммами, сохраняется практически без изменения – 1:4 соответственно для компонентов с $K_p=2,3$ и $K_p=3,7$.

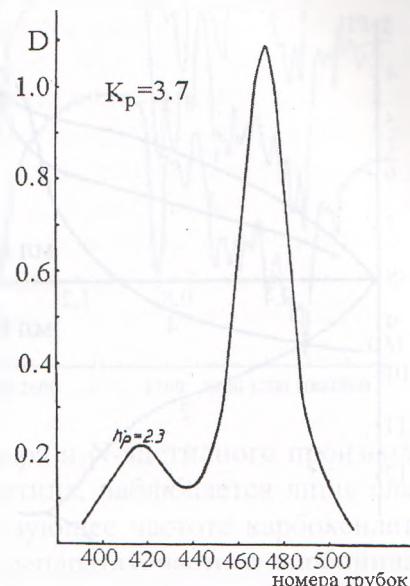


Рис. 1.6.1. Кривая противоточного распределения микогептина, продуцируемого штаммом 44В/1 при 600 переносах в системе метанол-хлороформ-бортный буфер pH 8,2 (2:2:1). Вид кривых для препаратов, продуцируемых штаммами 777/2, 24 и 56, аналогичен. [Этингов и др., 1973].

Изучение условий и степени ионизации кислотно-основных групп амфотерного антибиотика микогептина проведено методами потенциометрического титрования и инфракрасной спектроскопии. В работе использовали высокоочищенные препараты микогептина с $E_{1\text{cm}}^{1\%}=1400\pm50$ (382 нм, метанол), которые, в зависимости от поставленной задачи, применяли в форме свободного основания, метилового эфира и N-ацетилпроизводного. Потенциометрическое титрование образцов осуществляли в 66%-ном водном ДМФА метанольными растворами соляной кислоты и гидроокиси калия. ИК спектры веществ снимали в твердом состоянии (таблетки с KBr) на спектрофотометре ИКС-14 [Этингов и др., 1973].

На рис. 1.6.2 представлены кривые титрования микогептина, метилового эфира и N-ацетильного производного антибиотика. По ре-

зультатам титрования только свободного основания исходного микогептина (кривые 1 и 2), нельзя различить процессы ионизации карбоксильной или аминогруппы, тем более, что они находятся в зависимости от добавленного титранта - кислоты или щелочи. Одновременно кривые титрования производных антибиотика (кривые 3 и 4) определяют при добавлении кислоты ионизацию аминогруппы метилового эфира (карбоксильная группа химически блокирована) и при добавлении щелочи ионизацию карбоксильной группы N-ацетильного производного (блокирована аминогруппа).

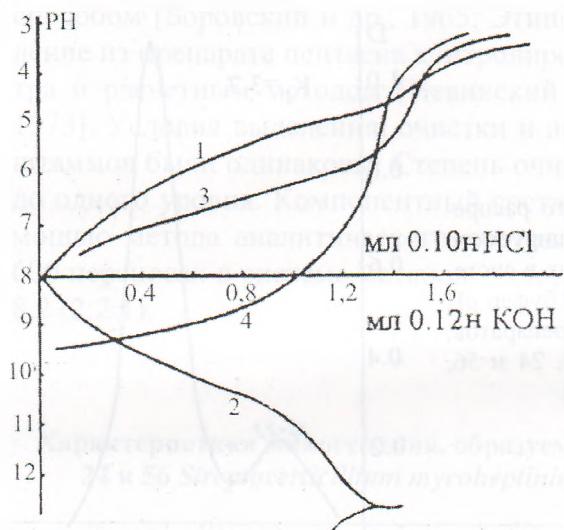


Рис. 1.6.2. Кривые потенциометрического титрования микогептина. 1 – свободное основание (кислая ветвь); 2 – свободное основание (щелочная ветвь); 3 – N – ацетилмикогептин; 4 – метиловый эфир микогептина [Этингов и др., 1973].

Вычисленные на основании кривых титрования константы ионизации микогептина и его производных представлены в табл. 1.6.2. Сопоставление значений рК микогептина и его однозарядных аналогов позволяет отнести первую константу к ионизации карбоксильной группы, вторую – к ионизации аминогруппы.

Таблица 1.6.2.

Константы ионизации микогептина и его производных [Этингов и др., 1973].

Препараты микогептина	pK ₁	pK ₂
Метиловый эфир микогептина	5,6	10,0
N – ацетилмикогептин	6,6	-
Микогептин (свободное основание)	-	8,9

Подтверждение механизма ионизации микогептина как диполярного иона видно по данным ИК спектров исследуемых препаратов (рис. 1.6.3). Сравнение спектров исходного антибиотика и его производных выявило спектральные различия, связанные с ионизацией кислотно-основных группировок.

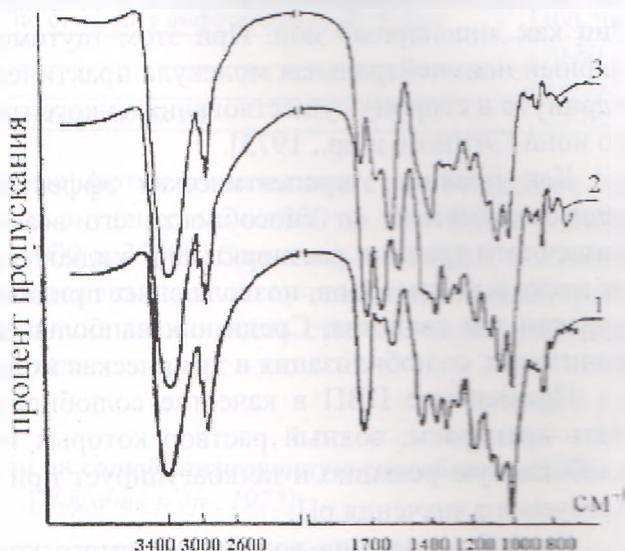


Рис. 1.6.3. ИК спектры метилового эфира микогептина (1), N-ацетилмикогептина (2) и свободного основания микогептина (3) [Этингов и др., 1973].

Так в ИК-спектрах метилового эфира и N-ацетилного производного, в отличие от исходного микогептина, наблюдается лишь слабоинтенсивное поглощение, соответствующее частоте карбоксилатиона, и четко проявляется во всех препаратах частота карбонила. Объясняется это тем, что в эфире карбоксильная группа блокирована, а в N-ацетилпроизводном нет условий для ее ионизации. Исходя из общей схемы равновесий между существующими формами диполярного вещества, рассчитаны микроконстанты соответствующих равновесий и константа таутомерного равновесия диполярного иона с нейтральной молекулой [Альберт, Сержент, 1964]:

$$K_1 = k_1 + k_2; \quad \frac{1}{K_2} = \frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_4};$$

$$K_T = \frac{k_1}{k_2} = \frac{k_4}{k_3}; \quad K_T = \text{antilg} (\text{p}K_{\text{эфира}} - \text{p}K_1) - 1,$$

где K_1 , K_2 и K_T – экспериментальные константы (см. табл. 1.6.2); k_1 , k_2 , k_3 , k_4 – микроконстанты; K_T – константа таутомерного равновесия.

Получены следующие значения величин констант:

$$K_T=10^3; \kappa_1=10^{-5,6}; \kappa_2=10^{-8,9}; \kappa_3=10^{-10}; \kappa_4=10^{-7}.$$

Таким образом, результаты потенциометрического титрования, согласуясь со спектральными исследованиями, определяют микогептин как диполярный ион. При этом таутомерное равновесие диполярный ион–нейтральная молекула практически полностью ($K_T=10^3$) сдвинуто в сторону существования микогептина в форме диполярного иона [Этингов и др., 1973].

Как правило, терапевтическая эффективность лекарственного вещества зависит от способности его всасываться из желудочно-кишечного тракта и растворяться в жидкостях организма. Существует несколько способов, позволяющих придавать лекарственным препаратам эти свойства. Среди них наибольшее значение имеют микронизация, солюбилизация и химическая модификация.

Применение ПВП в качестве солюбилизатора позволяет получить препараты, водный раствор которых имеет нейтральную или слабокислую реакцию и не коагулирует при установлении буфером требуемого значения рН.

Способ получения водорастворимого комплекса микогептина с ПВП [Наумчик, Вайнштейн, 1968; Наумчик и др., 1973] заключается в следующем: антибиотик и ПВП растворяют в подходящем растворителе – ДМФА, ДМФА с уксусной кислотой, ДМСО. Растворитель полностью отгоняют в вакууме при температуре, не превышающей 50°. Сухой остаток растворяют в воде и получают опалесцирующий раствор. Раствор центрифигируют. Прозрачный фугат доводят до требуемого значения рН с помощью анионита или буфера, затем лиофильно сушат. Получают водорастворимый комплекс антибиотика [Наумчик и др., 1973]. Основная характеристика водорастворимых комплексов микогептина с ПВП представлена в табл. 1.6.3.

На процесс солюбилизации влияет ряд факторов: выбор растворителя, соотношение количеств микогептина и ПВП, молекулярный вес ПВП [Вайнштейн, Наумчик, 1970]. Удельное содержание антибиотика в комплексе С и выход по антибиотику, определяемый как отношение содержания антибиотика в комплексе С к теоретическому содержанию С_т, являются характеристиками степени солюбилизации.

Таблица 1.6.3.

Характеристика комплекса микогептина с ПВП
 [Наумчик и др., 1973]

Содержание микогептина в комплексе (спектрофотометрически), мкг/мл	80-120
Биологическая активность (по стандарту амфотерицина В), ЕД/мг	100-200
Выход по активности, %	70-80
pH 1% водного раствора	3.8-5.0
LD ₅₀ внутривенно (для белых мышей), мг/мл	2.5-6.5

Исследовали различные партии микогептина с экстинцией от 900 до 1250 и с биологической активностью от 800 до 1250 ЕД/мг. ПВП с молекулярным весами 10000 и 35000. Оказалось, что ПВП с молекулярным весом 35000 является значительно лучшим солюбилизатором.

В табл. 1.6.4 представлена зависимость степени солюбилизации микогептина от растворителя.

Таблица 1.6.4.

Влияние растворителя на солюбилизирующую способность ПВП
 [Наумчик и др., 1973]

Растворитель	ДМФА	ДМФА+AcOH	ДМСО
Содержание микогептина в комплексе С, мкг/мл	10,1	85,5	1,7
Выход по антибиотику С/С _Т 100 %	8,8	75,0	1,5

Из табл. 1.6.4 видно, что наилучшие характеристики достигаются при использовании в качестве растворителя ДМФА, подкисленного уксусной кислотой.

Зависимость степени солюбилизации от исходного содержания микогептина в смеси с ПВП представлена на рис. 1.6.4. Из рисунка видно, что при содержании антибиотика в исходной смеси до 20% содержание микогептина в комплексе возрастает прямо пропорционально исходному содержанию антибиотика, достигая максимума, а затем резко падает. Избыток микогептина (свыше 20%) препятствует солюбилизации, что приводит к снижению содержания антибиотика в водорастворимом комплексе. При исходном содержании микогептина до 15% выход по антибиотику не зависит от соотношения ПВП и антибиотика и составляет 75-90%. Дальнейшее повышение исходного содержания антибиотика приводит к резкому снижению выхода.

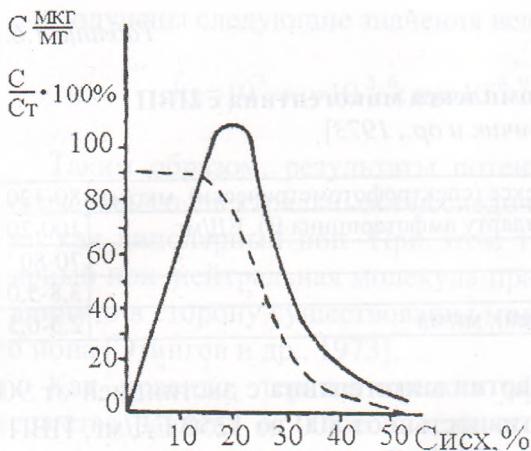


Рис. 1.6.4. Зависимость содержания микогептина в комплексе с ПВП – С, мкг/мг – сплошная линия и выхода по антибиотику – С/С_т·100% – пунктирная линия – от содержания микогептина в исходной смеси – С_{исх} %. [Наумчик и др., 1973].

Эффективность орально вводимых препаратов иногда можно достичь путем увеличения их дисперсности [Fincher, 1968].

Высокодисперсные препараты микогептина были получены методом его совместного осаждения с ПВП. Антибиотик и ПВП в соотношении 1:1 – 1:3 совместно растворяют в ДМФА, подкисленном уксусной кислотой. Затем к раствору добавляют 5-7 кратное количество осадителя (ацетона, этилацетата, эфира). Выпадает осадок в виде комплекса микогептина с ПВП. Осадок дважды промывают осадителем, сушат в вакууме. Основные характеристики такого комплекса приведены в табл. 1.6.5.

Таблица 1.6.5.

Характеристика высокодисперсного комплекса микогептина с ПВП [Наумчик и др., 1973]

Содержание микогептина в комплексе (спектрофотометрически), мкг/мл	250-350
Биологическая активность (по стандарту амфотерицина В), ЕД/мг	150-190
pH 1% водного раствора	5,2-5,8
LD ₅₀ внутривенно (для белых мышей), мг/мл	4-5

С целью получения водорастворимого препарата микогептина с нейтральным значением pH был также использован метод солюбилизации антибиотика с помощью поверхностно-активного вещества – натриевой соли дезоксихолевой кислоты [Кульбах, Карпенко, 1969]. В работе использовали микогептин с активностью 900 ЕД/мг, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 970$ при $\lambda_{\text{max}} = 382$ нм, дезоксихолевую кислоту фирмы «Спо-

фа» (ЧССР). Методика получения заключалась в следующем: 2 г микогептина растворяют в 40 мл ДМСО. Полученный раствор при энергичном перемешивании вливают в 200 мл 0,4% раствора хлорида натрия. Выпавший осадок центрифигируют, промывают 200 мл 0,4% раствора хлорида натрия, а затем промывают 200 мл воды. Отдельно готовят раствор дезоксихолата натрия. Для этого 1,55 г дезоксихолевой кислоты растворяют в 39,5 мл 0,1 н раствора едкого натра, доводят водой объем до 150 мл, добавляют 0,64 г двузамещенного фосфата натрия и перемешивают до полного растворения последнего. Полученный раствор соединяют с влажной пастой аморфного микогептина, энергично перемешивают до получения прозрачного раствора, а затем доводят pH до 7,4–7,8 0,3 н раствором однозамещенного фосфата натрия, фильтруют и лиофилизируют [Наумчик и др., 1973].

Готовый продукт представляет собой гигроскопичный порошок светло-коричневого цвета, легко растворяющийся в воде (pH раствора около 7,5). Биологическая активность его составляет 390–490 ЕД/мг; $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 400\text{--}450$ при $\lambda_{\text{max}} = 382$ нм, LD₅₀ при внутривенном введении белым мышам составляет 1–2 мг/кг. Стабильность комплекса микогептина с дезоксихолатом натрия приведена в табл. 1.6.6.

Таблица 1.6.6.

Стабильность комплекса микогептина с дезоксихолатом натрия при хранении в холодильнике [Наумчик и др., 1973]

№ п/п	№ партии	Исходные данные А, ЕД/мг	Срок хранения	После хранения А, ЕД/мг	% падения $\frac{A}{E}$
1	10769	490/450	2,5 года	425/465	8,2/0
2	10170	390/410	1,5 года	340/370	10,5/9,8
3	20170	395/400	-	380/370	7,7/6
4	30470	400/430	-	400/425	0/1

В литературе описаны общие методы получения натриевых солей тетраеновых, пентаеновых и гептаеновых антибиотиков. Эти методы основаны на титровании растворенного или суспендированного в растворителе антибиотика метилатом, бутилатом натрия или едким натром до характерных для каждого препарата значения pH, зависящих от pH его функциональных групп [Butler, 1966; Кульбах, Кар-

пенко, 1969; Кульбах и др., 1971]. Выход натриевой соли в зависимости от условий солеобразования колеблется от 40 до 80%.

Натриевая соль микогептина, полученная одним из описанных методов, представляет собой порошок темно-желтого цвета, со специфическим запахом, растворимый в воде, ДМСО, практически нерастворимый в ацетоне, метиленхлориде, эфире. Характерной реакцией на препарат является выпадение осадка антибиотика при подкислении его соляной кислотой до pH 5,0-6,0. Благодаря наличию системы ненасыщенных сопряженных двойных связей натриевая соль микогептина под действием кислорода воздуха, тепла, влаги, подобно другим ПА, подвержена деструкции с потерей биологической активности [Waksman et al., 1965]. Водные растворы препарата с концентрацией 1 мг/мл и исходной биологической активностью 1200 ЕД/мг при хранении при +4⁰ в защищенном от света месте в течение 10 дней теряют 15% биологической активности, а при комнатной температуре в течение месяца – до 50% [Васильева, Фрадкова, 1973]. В искусственном желудочном соке (pH 1,5) при температурах 30, 37, 50⁰ биологическая активность уже за 2 часа снижается соответственно на 53, 62, 82%; оптическая же плотность раствора при этих условиях остается практически на исходном уровне [Холодова и др., 1970].

Биологическая активность натриевой соли микогептина, в зависимости от активности исходного антибиотика и метода солеобразования, колеблется от 500 до 1200 ЕД/мг в пересчете на сухое вещество. Основные максимумы поглощения в УФ области лежат при длинах волн 350±1, 365±1, 383±1, 406±1 нм; удельный показатель поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 383 \pm 1$ нм зависит от чистоты полученной соли и колеблется от $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 700$ до $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1300$. Биологическая активность натриевой соли при хранении в защищенном от света месте при +4⁰ сохраняется в течение 1 года.

Исследование дисперсности рассмотренных выше препаратов, проведенное методом УФ спектроскопии, показало, что все они представляют собой колloidные растворы. На рис. 1.6.5 представлены УФ спектры водных растворов комплекса микогептина с ПВП, полученного методом отгонки при исходном соотношении микогептин: ПВП = 1:4 (кривая 1), комплекса микогептина с дезоксихолатом натрия (кривая 2) и натриевой соли микогептина (кривая 3), полученного по описанном выше методом. На этом же рисунке, кроме того, приведен УФ спектр микогептина в метаноле (кривая 4). Концентрации растворов в пересчете на микогептин составляют во всех

случаях 6,2 мкг/мл. По характеру УФ спектров и величине поглощения в максимальных точках видно, что дисперсность микогептина в 1-м случае значительно выше, чем во 2-м и 3-м, особенно при pH 4,1 (рис. 1.6.5 а) и pH 7,0 (рис. 1.6.5 б). При этих значениях pH микогептин осаждается из комплекса с дезоксихолатом натрия и натриевой соли в виде тонкой суспензии. Однако в комплексе с ПВП микогептин сохраняется в виде коллоидного раствора [Наумчик, Вайнштейн, 1967; Вайнштейн, Наумчик, 1970]. С повышением pH различие в дисперсности сокращается (рис. 1.6.5 в). Дисперсность во всех случаях возрастает с ростом pH, при этом характер спектра коллоидного раствора все более приближается к спектру истинного раствора антибиотика в метаноле.

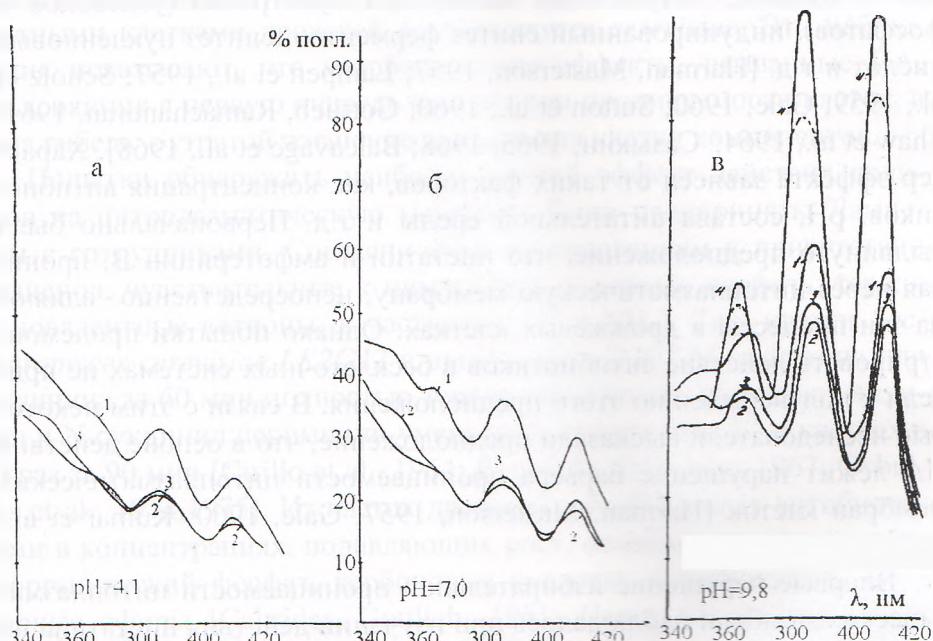


Рис. 1.6.5. УФ спектры водных растворов производных микогептина [Наумчик и др., 1973].

В результате проведенных экспериментальных исследований получен ряд высокодисперсных производных микогептина, которые в дальнейшем могут послужить основой для создания новых более эффективных лекарственных форм.

1.7. Действие ПА на проницаемость клеточных мембран и связывание ПА цитоплазматическими мембранами клеток

ПА привлекли внимание исследователей своей высокой антигрибковой активностью и практически полной безвредностью для бактерий. Благодаря этой особенности полиены сыграли важную роль в изучении тех биохимических различий, которые существуют между бактериями и грибами.

Еще в ранний период изучения ПА было продемонстрировано, что в их присутствии меняется интенсивность ряда метаболических процессов, протекающих в клетках дрожжей. Было установлено, что нистатин и амфотерицин В оказывает влияние на эндогенный гликозилаз и дыхание, потребление экзогенных субстратов (углеводов и фосфатов), индуцированный синтез ферментов, синтез нуклеиновых кислот и т.д. [Harman, Masterson, 1957; Lampen et al., 1957; Scholz et al., 1959; Gale, 1960; Sutton et al., 1960; Gottlieb, Ramachandran, 1961; Shaw et al., 1964; Сазыкин, 1965, 1968; Balcavage et al., 1968]. Характер эффекта зависел от таких факторов, как концентрация антибиотиков, pH, состава питательной среды и т.д. Первоначально было выдвинуто предположение, что нистатин и амфотерицин В, проникая через цитоплазматическую мембрану, непосредственно влияют на эти процессы в дрожжевых клетках. Однако попытки продемонстрировать действие антибиотиков в бесклеточных системах не привели к подтверждению этого предположения. В связи с этим некоторые исследователи высказали предположение, что в основе действия ПА лежит нарушение барьера проницаемости цитоплазматических мембран клеток [Harman, Masterson, 1957; Gale, 1960; Kumar et al., 1974].

Впервые нарушение избирательной проницаемости цитоплазматических мембран наблюдалось при изучении действия нистатина на проникновение в клетки дрожжей неорганического фосфата PO_4^{3-} . Было показано, что нистатин полностью подавляет поглощение фосфата PO_4^{3-} клетками *Candida albicans* [Osteux et al., 1958]. Проникновение фосфата в клетки *Candida albicans* резко тормозит и амфотерицин В [Drouhet, 1968]. Гентамицин полностью прекращает поглощение фосфата клетками *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*, *Debaryon nicotiane* в минимальных концентрациях. Дальнейшие исследования показали, что ПА изменяют ионную проницаемость клеток [Bradley, 1958; Ghosh, Chatterjee, 1961; Gottlieb et al., 1961; Kinsky, 1961 a, b; Lampen, Arnow, 1959;

Kerridge et al., 1976; Chen et al., 1978; Kerridge, 1979]. В опытах с *Neurospora crassa* [Kinsky, 1961 a, b] показано, что при кратковременном действии нистатина (10^{-6} М) из клеток *Neurospora crassa* выходят низкомолекулярные вещества цитоплазмы - аминокислоты, свободные и фосфорилированные сахара, неорганический фосфат и т.д. Действие нистатина на проницаемость клеток *Neurospora crassa* не зависело от возраста культуры. Это косвенно свидетельствует о том, что для активности полиенов интенсивность биохимических процессов в клетке не играет роли, иными словами, антибиотики нарушают функции уже существующей структуры. В опытах Готлиба и др. [Gottlieb et al., 1961] филипин подавлял как аэробное, так и анаэробное окисление глюкозы, ацетата и эндогенных субстратов интактными клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Эти наблюдения показывают, что метаболические эффекты, вызванные ПА, объясняются в первую очередь изменением проницаемости клеток, а сама гибель – утратой жизненно важных для клетки компонентов.

Попытки обнаружить наиболее ранний эффект действия полиенов на цитоплазматическую мембрану были предприняты Лампеном с сотрудниками. Согласно этим исследованиям в присутствии полиенов, чувствительные к ним клетки, в первую очередь, теряли моновалентные катионы, в частности, K^+ и NH_4^+ . Так, клетки *Saccharomyces cerevisiae LK2G12* в присутствии $2 \cdot 10^{-6}$ М нистатина или филипина за 60 мин полностью теряли ионы калия. N-ацетил кандидин и N-сукцинил перимицин уменьшали содержание K^+ в клетках в 10 раз за 90 мин [Cirillo et al., 1964; Borowski, Gybulska, 1967; Gybulska et al., 1974, 1975]. Из клеток дрожжей, обработанных антибиотиками в концентрациях, подавляющих рост, освобождаются ионы K^+ , неорганический фосфат, карбоновые кислоты, аминокислоты, фосфорные эфиры [Caltrider, Gottlieb, 1961; Henis, Grossowicz, 1960; Marini et al., 1961; Osteux et al., 1958; Scholz et al., 1959; Stachiewicz, Quastel, 1963; Peña, 1975]. Степень повреждения можно определить по разнообразию и размерам освобождаемых в среду продуктов. Было показано, что подавление гликолиза, вызываемое нистатином в низкой концентрации при нейтральной рН, может быть снято добавлением в питательную среду ионов K^+ и NH_4^+ . Известно, что ионы калия необходимы для обеспечения активности ряда гликолитических ферментов в дрожжевых клетках [Kinsky, 1967]. Методом пламенной фотометрии было показано, что в клетках, подвергающихся воздействию антибиотиков, содержание калия действительно заметно падает. При рН 4 катионы не ослабляют действия нистатина, по-

видимому, из-за необратимого инактивирования ферментов гликолиза в результате проникновения в клетку подкисленной среды [Сазыкин, 1968; Palacios, Serrano, 1978]. Добавление ионов K^+ и NH_4^+ , хотя и восстанавливало гликолиз, но не предотвращало подавление нистатином роста *Saccharomyces cerevisiae*.

Быстрое действие нистатина на проницаемость клеток для катионов подтверждено также результатами экспериментов Слаймана [Slayman, Slayman, 1962], которые показали, что под действием нистатина в концентрации $2 \cdot 10^{-7}$ М мембранный потенциал гиф *Neurospora crassa* через 2 мин исчезает. Полиены вызывают также утечку ионов K^+ из клеток *Chlorella vulgaris* [Borowski et al., 1974].

Под действием полиенов из клеток выходят не только ионы K^+ и NH_4^+ , но и ряд других водорастворимых неорганических низкомолекулярных веществ. Так, пентаеновый антибиотик фунгихромин вызывал освобождение свободных аминокислот из клеток *Verticillium albo-atrum* [Ross, 1959]. Под влиянием полиенов теряют ряд внутриклеточных компонентов и простейшие, что было показано в опытах с *Leishmania donovani* [Gosh, Chatterjee, 1962 a, b; Ghosh, Chatterjee, 1963 a,b; Ghosh, Chatterjee, 1961]. Клетки этого организма в присутствии нистатина $2 \cdot 10^{-6}$ М освобождали в среду неорганический фосфат, свободные аминокислоты и РНК (но не ДНК) [Ghosh, Ghosh, 1963 b].

Исследования, проведенные Лампеном и др. [Sutton et al., 1961; Harsch, Lampen, 1963; Lampen, Arnow, 1963; Cirillo et al., 1964; Liras, Lampen, 1974 a, b], показали, что различные полиены в разной степени изменяют проницаемость мембран дрожжевых клеток. В качестве примера можно рассмотреть те изменения проницаемости, к которым приводят действия N-ацетилкандинина, нистатина и филипина. Под действием указанных выше антибиотиков наблюдалась быстрая утечка из клеток ионов K^+ . Влияние N-ацетилкандинина на гликолиз может быть снято путем добавления ионов K^+ и NH_4^+ в весьма широком интервале концентраций антибиотика. В случае нистатина этот эффект достигался только при низкой концентрации антибиотика. Несколько большие концентрации нистатина обуславливали освобождение из клеток ионов аммония и фосфата. Все эти ионы требовались для восстановления в клетках процессов гликолиза. Дальнейшее повышение концентрации нистатина в среде вело к выходу из клетки нуклеотидов [Kottke, Sisler, 1962]. При более высокой концентрации антибиотика для получения эффекта в питательную среду требуется добавлять еще и другие кофакторы. Подавление гликоли-

за, вызванное филипином, не удается ни снять, ни предупредить добавлением катионов и кофакторов даже при низких концентрациях антибиотика. Полученные данные свидетельствуют о том, что ПА по разному эффективны в изменении проницаемости мембран и по степени эффективности располагаются в следующем ряду: филипин > нистатин > N-ацетилкандидин.

По мере увеличения концентрации антибиотика число показателей нарушения функции цитоплазматической мембраны увеличивается [Sutton et al., 1961]. Соответствующие опыты были проведены с нистатином на клетках *Saccharomyces cerevisiae LK2G12*, как тест-объекте, при нейтральных рН. При самой низкой концентрации нистатина $1 \cdot 10^{-7}$ М в среде клетки теряли ионы K^+ , что сопровождалось подавлением гликолиза. Филипин вызывает освобождение K^+ , неорганического фосфата, аминокислот и сорбозы, тогда как нистатин (тетраен, C_{46}) вызывает освобождение K^+ и фосфата, но не сорбозы. Сукцинилперимицин (гептаен, C_{63}) – синтетическое производное перимицина, вызывает выход в среду только ионов K^+ . Сэттон и др. исследовали освобождение из клеток дрожжей K^+ , NH_4^+ , нуклеотидов и белка, и обнаружили, что выход K^+ хорошо коррелирует с подавлением гликолиза, тогда как выход нуклеотидов и белка наблюдается только при высоких концентрациях полиенов [Sutton et al., 1961]. Нистатин, амфотерицин В, трихомицин и другие ПА сильно тормозили дыхание и гликолиз у дрожжей и плесневых грибов [Lampen et al., 1956; Fujii, 1957; Drouhet et al., 1958; Ribereau-Gayon et al., 1958; Bradley, 1958; Tsukahara et al., 1959; Tsukahara, 1960; Drouhet et al., 1960; Rhoades, Muchmore, 1960]. Нарушение углеводного обмена полиенами продемонстрировано в опытах с простейшими *Leishmania donovani* [Ghosh et al., 1960] и на высших растениях – листья *Nicotiana tabacum* [Drouhet et al., 1960]. Интересно, что подавление гликолиза группой полиенов с числом углеродных атомов, равным 46 и больше, уменьшалось в присутствии K^+ или NH_4^+ , тогда как активность полиенов с меньшими размерами молекулы при этом не снижалась [Lampen, Arnow, 1963] (см. таб. 1.7.1).

Было обнаружено, что антагонистическое действие ионов K^+ и NH_4^+ проявляется в средах с нейтральной реакцией, но не при значениях рН ниже 5.5 [Marini et al., 1961]. Катионы не уменьшают подавления роста и не снижают количества антибиотика, связываемого клетками. Показано, что среди всех исследованных ПА производное перимицина-сукцинилперимицин, образующее в комплексе с катионами водорастворимые соли, обладает наименьшим повреждающим

действием на клетки [Schaffner, Borowski, 1961; Borowski, Cybulsk, 1967; Liras, Lampen, 1974 b]. Он вызывает освобождение K⁺ только из клеток *Saccharomyces cerevisiae* и его действие на рост культуры обращается при добавлении в среду высоких концентраций K⁺.

Таблица 1.7.1.

Подавление гликолиза группой полиенов с различным числом углеродных атомов

Полиен	Количество атомов, C	Подавление гликолиза, мкг/мл	Полиен	Количество атомов, C	Подавление гликолиза, мкг/мл
нистатин	46-47	3	римоцидин	37	10
кандин	46	1	филипин	35	3-6
N-ацетил-кандин	48	5	этрускомицин	36	2-3
амфотерицин A	46-47	1-2	пимарицин	33	20-40
амфотерицин B	46-47	-	фунгихромин	33	5
фунгимицин (перимицин)	63	2-4			

Освобождение низкомолекулярных продуктов под действием полиенов сопровождается потерей клетками способности поглощать из среды питательные вещества и метаболиты. Нистатин в концентрациях, меньших по сравнению с теми, в которых он вызывает освобождение в среду аминокислот [Stachiewicz, Quastel, 1963; Rumler, Heins, 1983; Rao et al., 1985 a, b], подавляет поглощение клетками глицина. Дрожжи, обработанные N-ацетилкандином в концентрации 30 мкг/мл, быстро теряли накопленный ранее K⁺ [Harsch, Lampen, 1963]. При концентрации 100 мкг/мл способность клеток поглощать ионы K⁺ полностью утрачивалась. Антибиотик не оказывал специфического действия ни на транспорт катионов, ни на активность АТФ-азы.

При этих же условиях наблюдалась потеря клетками органических кислот и фосфорилированных сахаров. Еще более высокие концентрации нистатина приводили к появлению в среде белка (гликолитические ферменты оставались в клетке). Однако даже при самых высоких концентрациях нистатина в клетку не проникали глюкозо-6-фосфат и фруктозодифосфат, что указывает на известную специфичность действия ПА на цитоплазматическую мембрану. Полиены индуцируют также поступление во внутриклеточную жид-

кость фруктозы и Д-арabinозы [Никольский, 1977], изменяют проницаемость мембран по отношению к глюкозе и сахарозе [Kleinschmidt et al., 1972; Васянин и др., 1972], аминокислотам [Обуховская и др., 1979; Вирина и др., 1979 б]. Филиппин в концентрации 0,5 мкг/мл индуцирует выход гемоглобина и ионов К⁺ из эритроцитов человека [Teerlink et al., 1980]. Из клеток *Mycoplasma laidlawii* в присутствии филиппина наблюдается выход ионов К⁺ и цитоплазматического фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Показано, что НАДФ⁺, глюкозо-6-фосфат, Mg²⁺, Ca²⁺ не проникают через мембранны клеток *Mycoplasma laidlawii* модифицированные нистатином, амфотерицином В и этрускомицином. Одновалентные катионы Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺ и нейтральные молекулы (рибоза, ксилоза, эритрит, мочевина) проникают через мембранны в порядке уменьшения размера их гидратных оболочек [De Kruyff et al., 1974 а, б].

Исследования на БЛМ в присутствии ПА позволили теоретически обосновать и создать соответствующие методы изучения антибиотиков на нативных клеточных системах, в частности, на изолированных мышечных волокнах.

В работах Швинки и Кафнера методом двойного сахарозного мостика в режиме фиксации мембранныго потенциала на изолированном мышечном волокне травяной лягушки *Rana temporaria* было показано усиление амфотерицином В, метиловым эфиром амфотерицина В, нистатином, микогептином и леворином роста проводимости мышечного волокна для катионов щелочных металлов - Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺ [Швинка, Кафнер, 1989, 1991; Shvinka, Caffner, 1994, 1995; Shvinka, 2001]. По степени усиления роста проводимости мембран мышечных клеток полиены располагаются в следующий ряд: нистатин < метиловый эфир амфотерицина В < микогептин < амфотерицин В < леворин [Shvinka, Caffner, 1994]. В такой же ряд располагаются ПА по способности увеличивать ионную проницаемость бислойных липидных мембран [Касумов, 1986 а; Касумов и др., 1987; Микаилова, 1990]. Пороговые концентрации, вызывающие рост проводимости, для амфотерицина В меньше, чем для нистатина. Введение нистатина в концентрации 10⁻⁵ М к мембранам не оказывало влияния на проводимость мембран мышечных клеток, как при комнатной, так и при более высокой температуре. Среди исследованных ПА на липидных и клеточных мембранах наибольшей эффективностью обладает леворин [Касумов, 1986 а; Микаилова, 1990; Shvinka, Caffner, 1994, 1995].

Действие амфотерицина В на мембранны имеет обратимый харак-

тер. При удалении антибиотиков из инкубационного раствора проводимость мембран в течение нескольких секунд возвращается к исходному уровню. Обратимое изменение проницаемости мембран наблюдается также при действии нистатина на мембранные эритроциты человека и это изменение происходит в течение короткого времени [Cass, Dalmark, 1987]. Бислойные мембранные характеризуются большой постоянной времени восстановления проводимости после отмычки антибиотиков: 20 мин и 2 ч соответственно для нистатина и амфотерицина В. При повышенной температуре индуцированную проводимость рассчитывали как разность значений проводимости в конце интервала нагревания в присутствии антибиотика и без него. Наблюдалось уменьшение проводимости мембран при повышении температуры на 7°C по сравнению с ее величиной при комнатной температуре: для амфотерицина В в 4.4 раза и для нистатина в 1.7 и 1.6 раза для входящих и выходящих токов соответственно. Проницаемость мембран, индуцированной полиенами, уменьшалась при нагревании и это было установлено по выходу меченых ионов натрия из липосом, содержащих 5-20 мол% холестерина, по выходу ионов K⁺ из клеток *Candida albicans*, *Acholeplasma laidlawii* и из эритроцитов. Эффект температуры на проводимость липидных мембран был выше, чем на проводимость мембран эритроцитов. Изменение температуры на 10°C (с 26°C до 36°C) приводило к росту проводимости бислойных мембран в 10³-10⁴ раз. Дальнейшее увеличение температуры приводило к уменьшению проводимости мембран, что является результатом замедления реакции сборки и образования проводящих комплексов. Предполагается, что при высокой температуре проводящие комплексы быстрее диссоциируют и это замедляет рост индуцированной проводимости. Температурный коэффициент Q₁₀ для амфотерицина В характеризует энергию активации распада проводящего комплекса, а в случае нистатина - скорость латеральной диффузии непроводящих комплексов в мембране. Скорость латеральной диффузии в биологических мембранах может быть несколько ниже, чем в модельных мембранах из-за наличия в них белковых молекул. Константа скорости выхода K⁺ и Rb⁺ из мышечных клеток в среду возрастает, а константа скорости выхода ионов Na⁺ не изменяется. Зависимость K⁺-проводимости мембран и константы скорости выхода K⁺ от концентрации амфотерицина В в логарифмических координатах имеют близкие по величине значения и углы наклона кривых равны соответственно 1.8 - 1.6. Выход незелектролитов, катионов и анионов в изотоническом растворе холинхlorida из

эритроцитов, индуцированных $2 \cdot 10^{-5}$ М амфотерицином В, характеризуется степенной зависимостью с углами наклона кривых пропорционально 1.5-2.5-ой степени. Обмен K^+ на Li^+ в эритроцитах зависел от концентрации нистатина и она оказалась пропорциональной 3-й степени концентрации антибиотика. Сравнительный анализ действия нистатина и амфотерицина В показывает, что значения углов наклона кривых на клеточных мембранах меньше, чем на БЛМ. Различный угол наклона кривых обусловлен, по-видимому, увеличением времени жизни определенных форм антибиотика в биологических мембранах, лимитирующих скорость роста проводимости. Полученные выше результаты показывают, что проводящие комплексы, образованные амфотерицином В и нистатином в мышечной мемbrane, обладают меньшей устойчивостью, чем в БЛМ. Кинетика релаксации, индуцированной нистатином проводимости в мышечной мемbrane, находится в обратной температурной зависимости по сравнению с липидными мембранами. Следует отметить, что зависимость индуцированной проводимости от концентрации антибиотика в биологических мембранах слабее, чем в липидных мембранах [Швинка, Кафнер, 1989].

На основе полученных данных Лампен и Кинский [Lampen, Arnow, 1963; Marini et al., 1961; Kinsky, 1962 a, b; Kinsky, 1963] в зависимости от степени вызываемых эффектов расположили полиены в следующий ряд: нистатин < пимарицин < кандин < амфотерицин В < этрускомицин < филипин.

Можно было думать, что полиены, специфически присоединяясь к цитоплазматической мемbrane клеток грибов, лишают их функционировать в качестве барьера, обеспечивающего избирательную проницаемость. Лампен и его сотрудники [Lampen, 1962; Lampen et al., 1962; Lampen, Arnow, 1959; Lampen, 1969] обнаружили, что связывание нистатина цитоплазматическими мембранами клеток микроорганизмов является решающим фактором в проявлении биологического действия этого антибиотика.

Было установлено, что клетки грибов *Saccharomyces*, *Candida*, *Penicillium* связывают значительное количество нистатина и амфотерицина В [Lampen, Arno, 1959; Lampen et al., 1959; Foresti, Amati, 1983; Ellul et al., 1985]. Полиены не связываются с клетками прокариотов и не подавляют их роста [Gottlieb et al., 1958]. Бактерии, рост которых не подавлялся нистатином даже в концентрации 100 мкг/мл, например, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, поглощают ничтожное количество этого антибиотика. Этот эффект нельзя объяс-

нить защитными свойствами бактериальной стенки, поскольку лишенные ее протопласты *Bacillus megaterium* совершенно не абсорбировали нистатин и не разрушались даже в присутствии 100 μ антибиотика в 1 мл среды [Kinsky, 1962 b]. В данном случае, можно только предположить о наличии в цитоплазматических мембранах чувствительных грибов каких-то специфических, связывающих полиены, компонентов, отсутствующих в клетках бактерий. В отличие от бактериальных протопластов, наблюдалось значительное поглощение нистатина (концентрация в среде 5 μ на мл) протопластами чувствительного к нему гриба *Neurospora crassa*, что сопровождалось их разрушением. Нистатин, поглощенный грибковыми клетками, обнаруживался во фракции частиц цитоплазматической мембранны, осаждающихся во время центрифугирования в течение одного часа при 100 000 g [Kinsky, 1962 a, b].

Чувствительность протопластов и целых клеток *Saccharomyces cerevisiae* к нистатину и другим полиенам была одинаковой, т.е. связывающей полиены компонент сохранялся в протопластах [Shockman, Lampen, 1962]. Обнаружено, что связывание нистатина, амфотерицина В и филипина клетками *Saccharomyces*, *Candida*, *Neurospora* является решающим фактором в проявлении биологического действия этих антибиотиков [Gottlieb et al., 1961; Kinsky, 1964; Белосурова, 1977; Johnson et al., 1978; Самедова, Касумов, 1990]. Поскольку предварительная инкубация с фракцией цитоплазматической мембранны *Neurospora crassa* амфотерицина В или филипина понижала связывание добавленного затем нистатина, то из этого можно сделать заключение, что различные антибиотики полиеновой природы связываются одним и тем же компонентом мембранны [Kinsky, 1964; Archer, Gale, 1975].

Быстрая абсорбция нистатина из раствора наблюдалась в опытах с мембранный фракцией, выделенной из клеток *Leishmania donovani* [Ghosh, 1963 a, b].

Довольно подробно изучены различные факторы, влияющие на поглощение полиенов микроорганизмами. Как скорость поглощения, так и количество абсорбированного нистатина оказались больше в случае размножающихся клеток *Candida albicans* по сравнению с покоящимися [Ghosh, Ghosh, 1962; Ghosh, Ghosh, 1963 a]. Дрожжевая форма этого организма поглощала нистатин больше, чем плесневая [Ghosh, Ghosh, 1963; Berdicevsky, Grossowicz, 1977]. Поглощение полиенов клетками дрожжей усиливается при понижении рН среды. Максимум поглощения в случае *Candida albicans* наблюдался при

pH 3,0 [Lampen et al., 1959]. Клетки *Saccharomyces cerevisiae* связывали при pH 7 около 0,7γ, а при pH 4–до 3γ нистатина на 1 мг сухого веса [Marini et al., 1961; Beezer, Chowdry, 1980; Beezer, Sharma, 1981 a, b; Beezer et al., 1982; Beezer, Sharma, 1982]. Та же закономерность наблюдалась и в опытах с простейшими *Leishmania donovani* – максимальное количество нистатина связывалось мембраной при pH 4 [Ghosh, 1963 a, b]. Метиловый эфир нистатина, N-ацетил-производное нистатина и гидрированный нистатин (без двойных связей в полиеновой цепи) – пергидронистатин абсорбировались дрожжевыми клетками в значительно меньшей степени, чем исходный нистатин [Lampen, Arnow, 1959].

Опубликовано большое количество данных о влиянии различных веществ на поглощение полиенов – определялась возможность предотвращения связывания микроорганизмами ПА и делались попытки освободить уже связанный антибиотик. Большое количество самых разнообразных веществ в той или иной мере предотвращало поглощение ПА [Hammond, Klinger, 1976]. Сюда относятся альбумин сыворотки крови человека [Bradley, Jones, 1960; Lampen, Arnow, 1959], желчные кислоты [Lampen, Arnow, 1959; Schneierson et al., 1958], уранилацетат, арсенат натрия [Lampen, Arnow, 1959] и другие агенты самой разнообразной природы. Интересно отметить, что ионы урана обнаруживаются лишь на поверхности дрожжевой клетки и внутрь не проникают. Что касается желчных кислот, то их влияние на поглощение нистатина *Candida albicans* объясняется образованием биологически неактивных комплексов с антибиотиками [Lampen, Arnow, 1959]. На результаты испытаний antimикробного действия полиенов в некоторых случаях может оказаться влияние нестабильность их молекулы, в частности, способность к фотоокислению. Инактивация ПА видимым светом обычно протекает с умеренной скоростью, которая, однако, значительно увеличивается в присутствии флавинов [Kinsky, 1962 b]. Возможно, что указанным обстоятельством объясняются данные об ослаблении рибофлавином действия трихомицина на окисление L- и D-аминокислот клетками *Candida albicans* [Tsukahara, 1958, 1960, 1961].

В опытах с *Candida albicans* введение ненасыщенных жирных кислот с различной длиной углеводородной цепи в клеточные мембранны ослабляли абсорбцию нистатина дрожжевыми клетками [Ghosh, Ghosh, 1962]. Предполагалось, что ненасыщенные жирные кислоты могут конкурировать с полиенами за соответствующие рецепторы клеток, чем подтверждаются ранние данные об ослаблении

активности полиенов ненасыщенными жирными кислотами [Hickey, 1953].

Освободить уже связанные клетками или протопластами ПА значительно труднее, чем предотвратить их поглощение. Радиоактивный нистатин, связанный клетками *Saccharomyces cerevisiae* LK2G12, практически не вытесняется при инкубации дрожжей в среде с высокой концентрацией немеченого антибиотика [Lampen et al., 1962]. Обработка фракции частиц цитоплазматической мембранны *Neurospora crassa* рибонуклеазой, трипсином, а также нагревание или промывание клеток солевым раствором не освобождали нистатина. Нистатин быстро отделялся при обработке смесью этанолацетон, а также раствором эргостерина [Kinsky, 1962 b]. Быстрое и значительное (при определенных условиях на 80-85%) удаление нистатина из мембран протопластов *Saccharomyces cerevisiae* достигалось при воздействии дигитонина [Lampen et al., 1962] агента, легко реагирующего со стеринами. Обработка дигитонином мембранный фракции, выделенной из клеток *Leishmania donowani*, освобождала 95% ранее связанной с ним нистатина [Ghosh, 1963 b]. Эти результаты показывают, что специфическая токсичность ПА обусловлена присутствием в клеточной мембране гриба особого рецептора, связывающего антибиотик. Прямого доказательства проникновения полиенов через мембрану в цитоплазму нет. Хотя имеется сообщение о том, что низкие концентрации нистатина подавляют индуцированный синтез амилазы у *Penicillium chrysogenum*, что может быть объяснено не только нарушением синтеза белка в цитоплазме, но и торможением проникновения индуктора через мембрану [Horvath, Shentirmal, 1960]. Сравнительное изучение нистатина, амфотерицина В и филипина привело к заключению, что все эти антибиотики связываются с одним и тем же рецептором в мемbrane грибов [Kinsky, 1962 a, b; Pugh, Cawson, 1980].

Позже были проведены исследования по идентификации компонента цитоплазматической мембранны, непосредственно реагирующего с полиенами. Итогом этих работ явилось общепринятое в настоящее время представление о взаимодействии полиенов со стеринами микробной клетки, прежде всего – стеринами, входящими в состав ее мембранны.

ГЛАВА 2. «СТЕРИНОВАЯ» ГИПОТЕЗА МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПА

2.1. Взаимодействие ПА со стериновым рецептором клеток

В 1958 году Готлиб и др. сообщили, что добавление некоторых стеринов, например, холестерина, эргостерина, стигмастерина и ситостерина в питательную среду блокирует подавление роста, вызываемое ПА [Gottlieb et al., 1958]. Готлиб и др. показали, что стерины защищают грибы от действия филипина [Gottlieb et al., 1959, 1961]. Это объясняется тем, что *in vitro* происходит реакция между стерином и полиеном, вызывающая снижение концентрации свободного в среде полиена [Lampen et al., 1960]. Возможно, что *in vivo* также происходит реакция между полиеном и стеринами цитоплазматических мембран. На основании этих наблюдений было высказано предположение, что действие полиенов проявляется либо в подавлении синтеза стеринов, необходимых для роста грибов, либо в замещении стеринов, как кофакторов, участвующих в каких-то важных метаболических процессах [Gottlieb et al., 1958]. Вскоре было обнаружено, что стерины снижают концентрацию полиена в среде [Lampen et al., 1960]. С большой вероятностью можно было считать, что именно стерины вызывают такой эффект. Последующие работы многих исследователей подтвердили данное предположение. Основой фунгицидного действия ПА и причиной их специфической токсичности в отношении грибов является взаимодействие этих соединений со стеринами, локализованными в клеточной мембране [Kotller-Brajtburg et al., 1974; Hatten, Burger, 1979; Hammarstrom et al., 1980; Gruda et al., 1988; Bittman et al., 1981, 1983; Behnke et al., 1984; Bifano et al., 1984]. Установлено, что только клетки, в мембранных которых содержатся стерины, чувствительны к действию полиенов. Например, микоплазмы, содержащие стерины, подавляются полиенами. Лампен и др. показали, что клетки *Mycoplasma gallisepticum*, для роста которых необходимы стерины, в течение пяти дней не повреждаются филипином на среде, не содержащей стеринов, тогда как в присутствии стеринов рост быстро подавляется [Lampen et al., 1963]. Клетки *Mycoplasma laidlawii* могут расти на средах, не содержащих стеринов, но поглощают стерины при добавлении их к среде. Рост этого организма в присутствии холестерина подавляется филипином, а в отсутствие стеринов подавления роста клеток не проис-

ходит [Weber, Kinsky, 1965]. Более строгие доказательства связывания полиенов со стеринами были получены Лампеном и др., обнаружившими корреляцию между количеством нистатина, связанного протопластами дрожжей, и содержанием в них стеринов, причем при разрушении мембран различными способами стерины и связанные с ними полиены освобождались совместно [Lampen et al., 1962]. Более того, обработка мембран протопластов дигитонином приводила к освобождению связанного с ними полиена. Кинский обнаружил, что способность мембран *Neurospora crassa* связывать полиены уменьшалась при экстракции мембран органическими растворителями и снова увеличивалась при добавлении эргостерина [Kinsky, 1963].

В работе Накажима и Бриджмана показано, что филиппин при 0,04% -ой молярной концентрации взаимодействует с холестерином и образует филиппин-стериновые комплексы в клеточных мембранах мышечных клеток и аксона [Nakajima, Bridgman, 1981]. Однако не было обнаружено филиппин-стериновых комплексов в активных зонах мембран и ацетилхолинового рецептора в нервно-мышечных узлах лягушки. Эти результаты позволяют предположить, что пре- и постсинаптическая мембрана, и активные зоны ацетилхолинового рецептора характеризуются низким содержанием холестерина [Nakajima, Bridgman, 1981].

В настоящее время общеизвестно, что стерины – важные структурные компоненты клеточных мембран. Состав стеринов, содержащихся в различных клетках (в % сухого веса), показан в таб. 2.1.1. Одной из основных причин, позволяющих считать, что стерины принимают участие в связывании ПА клеточной мембраной, является тот факт, что стерины не обнаружены среди веществ, выделенных из бактерий [Fiertel, Klein, 1959; Asselieau, Lederer, 1960]. Таким образом, стерины, являясь одним из компонентов клеточных мембран, могли бы быть ответственны за связывание ПА. Специфическую токсичность ПА в отношении грибов, но не в отношении бактерий, можно объяснить присутствием стеринов в клеточной мембране грибов, дрожжах, плесенях и водорослях [Asselieau, Lederer, 1960; Marriott, 1975] и их отсутствием в бактериальных клетках [Bulgakova et al., 1981]. Из вышеуказанных данных видно, что антибиотическая активность полиенов распространяется именно на микроорганизмы, содержащие стерины. Биологическая роль стеринов в клеточных мембранах не совсем ясна. Предполагается, что стерины могут играть роль опорных элементов в цитоплазматической мембране [Lampen, 1966]. Поэтому, дальнейшие исследования

были связаны с изучением взаимодействия ПА со стеринами, содержащиеся в клеточных мембранах.

Таблица 2.1.1.

Содержание стеринов в различных клетках [Ахрем, Титов, 1970]

Вид клеток	% содержание стеринов от сухого веса	Вид стерина	Ссылка
<u>Бактерии</u>			
1. <i>Azotobacter chroococcum</i>	0.01	Многокомпонентная смесь стеринов, в которой отсутствует холестерин	Ахрем, Титов, 1970
2. <i>Escherichia coli</i>	0.0004	Равные количества шести стеринов: холестерина, кампестерина, β -ситостерина, стигмостерина, эргостерина и дигидрокампестерина	«--»
3. <i>Streptomyces olivaceus</i>	0.0035	Холестерин	«--»
<u>Грибы</u>			
1. <i>Neurospora crassa</i>	10	Эргостерин	«--»
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7-10	Эргостерин	«--»
3. <i>Saccharomyces cerevisiae 2243</i>	0.1-1.3	Эргостерин	«--»
<u>Эритроциты быка</u>			
Бактериальные протопласти <i>Staphylococcus aureus</i>	10	Холестерин	Хаггис и др., 1967
<u>Миelinовые оболочки нерва</u>	15-20	Холестерин	«--»
Митохондрии	~1	Холестерин	«--»

Гхош и Чаттерджи [Ghosh, Chatterjee, 1962 а, б; 1963 а, б] высказали предположение, что лейшманицидная активность нистатина обусловлена наличием в мембране *Leishmania donovani* компонента стериновой природы, связывающего антибиотик. Были проведены соответствующие эксперименты по выделению нистатина вместе со связывающим его компонентом. В результате проведенных исследований было установлено, что, связанный клетками нистатин, находится во фракции мембранны, содержащей высокое количество стерина. Эксперименты с митохондриями, выделенными из клеток

Neurospora, а также из печени крыс, показали, что ПА не оказывают никакого действия на окислительное фосфорилирование, накопление ионов и перенос электронов [Largy et al., 1958; Kinsky et al., 1965; Pressman, 1965]. Это связано с тем, что в митохондриях содержится небольшое количество холестерина. Подтверждением «стерииновой» гипотезы механизма действия полиенов послужили результаты опытов, проведенных с эритроцитами животных и человека, в мембране которых содержится холестерин. По данным Кинского и других авторов, все ПА в различной степени вызывали лизис эритроцитов, находящихся в изотоническом растворе [Kinsky et al., 1962; Kinsky, 1963; Brandriss et al., 1964; Butler et al., 1965; Kinsky et al., 1967 a, b].

Важными являются результаты опытов, проведенных с микроорганизмами *Mycoplasma laidlawii**^{*}, в зависимости от условий внешней среды, включающими или не включающими стерины в мембрану своей клетки. Микроорганизм *Mycoplasma laidlawii*^{*} представляет собой исключительно удобный объект для изучения специфичности взаимодействия ПА со стериинами [Kinsky, 1964]. Этот вид микроорганизма не может синтезировать стерины, однако при выращивании этих клеток в среде со стериинами последние легко включаются в состав цитоплазматических мембран клеток [Weber, Kinsky, 1965]. Предварительное включение холестерина в мембрану оказалось необходимым для последующего лизиса клеток в присутствии филипина. Опыты с *Mycoplasma laidlawii*, подтвердили связь между содержанием стерина в клетке и ее чувствительностью к полиенам [Razin, 1963; Razin et al., 1963]. В 1965 году Вебер и Кинский сообщили, что клетки *Mycoplasma laidlawii* чувствительны к филипину только в том случае, если культивируются на среде с холестерином [Weber, Kinsky, 1965]. Филибин и амфотерицин В подавляют рост и вызывают лизис культуры, выращиваемой в присутствии холестерина, но не оказывают такого эффекта на клетки, растущие на среде без стерина [Feingold, 1965; Weber, Kinsky, 1965]. Прессман [Pressman, 1965] обнаружил, что амфотерицин В не влияет на выход протонов из митохондрий, содержащих следовые концентрации стерина в своих мембранах.

Способность взаимодействовать с полиенами характерна для целого ряда стеринов. Поэтому «стерииновая» гипотеза, объясняющая

* Согласно современным представлениям вид *Mycoplasma laidlawii* отнесен к роду *Acholeplasma*, и поэтому этот организм правильнее называть *Acholeplasma laidlawii*.

специфичность токсического действия полиенов, позволяет предположить, что и другие микроорганизмы, если только содержат стерины, должны быть чувствительными к действию ПА.

Клетки *Acholeplasma laidlawii* чувствительны к филипину, нистатину и этрускомицину, если они выращиваются на среде с холестерином, холестанолом, эргостерином [De Kruyff et al., 1972, 1973 a, b; Elias et al., 1979; Readio, Bittman, 1982; Miller, 1984; Maurin et al., 1988]. Взаимодействие филипина и амфотерицина В с эргостерином значительно более выражено. За-ОН изомеры эпихолестерина, эпихолестанола и капростанола, включенные в клеточные мембранные клеток *Acholeplasma laidlawii*, почти не взаимодействуют с антибиотиками [De Kruyff et al., 1974 a, b].

Клетки, выращенные на среде в присутствии холестерина, а затем перенесенные в среду без холестерина и обработанные амфотерицином В, теряли жизнеспособность при относительно невысокой концентрации антибиотика – 2 μ г/мл. Напротив, клетки выросшие в отсутствие холестерина, продолжали размножаться с нормальной скоростью, несмотря на добавление к ним антибиотика.

Особый интерес представляют данные, полученные при сравнительном изучении действия нистатина на клетки *Saccharomyces cerevisiae* Y2243 с высоким и низким содержанием эргостерина (0,1 и 1,3 %). Чувствительность к нистатину в обоих случаях была одинаковой. Примерно одинаковым было и количество нистатина, абсорбированное клетками с высоким и низким содержанием эргостерина [Lampen et al., 1960]. Холестерин, эргостерин, ситостерин и стигмастерин ослабляли действие пимарицина (тетраена) и гамицина (гептаэна) на *Saccharomyces cerevisiae* [Perritt et al., 1960; Ramachandran, 1961]. Позднее эти данные были объяснены тем, что в дрожжах с высоким содержанием эргостерина последний накапливается, в основном, в цитоплазме, а в мемbrane его содержится не больше, чем обычно [Lampen et al., 1962]. Вследствие эстерификации и гликозилирования определенной части стеринов в составе клеток *Acholeplasma laidlawii* они оказались нечувствительными к нистатину. По этой причине объясняется относительная резистентность клеток к полиену [Razin, 1963]. Данные, полученные с помощью меченого 4-C¹⁴ – холестерина, показывают, что только определенная часть стеринов в клетках *Acholeplasma laidlawii* обладает чувствительностью к полиенам [Feingold, 1965].

Одним из наиболее сильных доводов в пользу «стериновой» гипотезы служит тот факт, что грибы далеко не единственные орга-

низмы, чувствительные к полиенам. Известно, что ПА токсичны для улиток [Seneca, Bergendahl, 1955] и планарий [Johnson et al., 1962]. Чувствительность некоторых водорослей к ПА может быть использована, как довод в пользу «стериновой» гипотезы. Показано, что амфотерицин В и нистатин ингибируют транспорт электронов и подавляют рост ряда водорослей, но не оказывают действия на синезеленые водоросли, которые совершенно лишены стеринов [Harsch, Lampen, 1963; Levin, Bloch, 1964; Nolan, Bishop, 1978; Sandman, Boger, 1981]. Имеется ряд доказательств в пользу стеринового механизма действия ПА. Показано, что филиппин-холестериновые комплексы образуются в мембранах эозинофильных клеток [Pimenta, Souza, 1984], в клетках эпителия щитовидной железы мышей [Fujita et al., 1981], в мембранах ресничного эпителия моллюсков [Stephenos, Good, 1990], в ядерных мембранных клеток асцитной карциномы Эрлиха [Kim, Okada, 1983]. Образование комплексов найдены в синаптических мембранах фоторецепторных клеток [Cooper, McLaughlin, 1984], в плазматических мембранах клеток эпидермиса некоторых животных [Berdan, Shivers, 1985], в трубочках аппарата Гольджи [Orci et al., 1981], в плазматических мембранах почечных клеток [Orci et al., 1982]. Были обнаружены также полиенхолестериновые комплексы в цитоплазматических мембранах сперматозоидов различных животных: мышей [Toshimori et al., 1985], хомячков [Toshimori et al., 1987; Suzuki, 1988; Clark, Koehler, 1990], кроликов [Diaz-Fontdevila et al., 1992], кабана [Seki et al., 1992] и рыб (полосатый данио) [Kessel et al., 1985]. Однако не было обнаружено специфических филиппин-стерииновых комплексов в области контакта нейромышечных клеток лягушки [Ko, Propst, 1986].

Таким образом, результаты многих исследований подтверждают «стериновую» гипотезу механизма действия полиенов. Необходимым условием чувствительности клеток к действию ПА является наличие стеринов и специфическое связывание их с антибиотиками в цитоплазматической мемbrane.

2.2. Взаимодействие ПА с чувствительными и резистентными к ним штаммами грибов

ПА активны против грибов и простейших [Ghannoum, Race, 1999; Espinel-Ingroff, 2001; Loiseau et al., 2002]. Однако некоторые грибы и простейшие оказываются устойчивыми к полиенам [Athar, Winner, 1971; Vanden Bossche et al., 1994; Ghannoum, Race, 1999;

Dannaoui et al., 2000; Espuelas et al., 2000; Al-Mohammed et al., 2005]. Нистатинорезистентный штамм *Candida stellatoidea* оказался резистентным к амфотерицинам А и В, филипину и другим полиенам [Bradley et al., 1961]. При пересевах *Candida albicans* на среде с кандидином резистентность развивалась и к амфотерицину В (хотя и не в такой же степени) [Hebeka, Solotorovsky, 1965]. Среди грибов виды *Pythium* отличаются резистентностью к полиенам. Хотя эти виды не синтезируют и не содержат стерины, но включение стеринов из среды в их цитоплазматическую мембрану может происходить, в результате чего чувствительность к полиенам повышается. Культивирование *Pythium* на средах с холестерином, стигмастерином, ситостерином и эргостерином вызывало по сравнению с контролем резкое увеличение выхода фосфора из клеток под действием филипина, что может служить косвенным доказательством включения этих стеринов в мембрану и соответственно реагирования с ними филипина. Перенос на среды, не содержащие стеринов, возвращал видам *Pythium* нечувствительность к полиенам [Schlosser, Gottlieb, 1966]. Причину такой устойчивости к ПА очевидно следует искать в молекулярной организации мембран клеток резистентных штаммов, в отличиях состава и структуры клеточных мембран таких штаммов от мембран чувствительных к полиенам грибковых клеток [Gale, 1984; Haynes et al., 1996; Pourshafie et al., 2004]. Физико-химические исследования в этом направлении были проведены в серии работ Соловьевой, Белоусовой, Вириной, Фейгина и др. на примере различных штаммов *Candida albicans* [Белоусова, 1975, 1976; Вирина и др., 1975, 1976, 1979 а, б; Соловьева и др., 1977 а, б; Левченко и др., 1979; Singh et al., 1979; Фейгин и др., 1978, 1979, 1981; Belousova et al., 1982; Ghannoum, Race, 1999].

Многие исследователи, изучающие проблему резистентности микроорганизмов к ПА, полагают, что основная причина устойчивости клеток дрожжей и дрожжеподобных грибов к этой группе антибиотиков состоит в изменении структуры стеринового компонента мембран в составе клеток мутантных штаммов, которые, как оказалось, были нечувствительны к действию полиенов [Manning, Robertson, 1959; Hebeka, Solotorovsky, 1962, 1965; Stanley, English, 1965; Woods, 1971; Molzahn, Woods, 1972; Hamilton-Miller, 1972 а, б; Grindle M. 1973; Gale, 1973; Fryberg et al., 1974; Hsu Chen, Feingold, 1974; Morris et al., 1974; Kim et al., 1975; Lomb et al., 1975; Barton et al., 1975; Вирина и др., 1976; Hammarstrom, Smith, 1976; Schiffman, Klein, 1977; Koh et al., 1977; Gale et al., 1975, 1977, 1978, 1980; Hidaka

et al., 1978; Cassone et al., 1979; Olds et al., 1981; Danilenko, Stepanyuk, 1982; Notario et al., 1982; Pesti et al., 1982; Kunemund, Hofer, 1983; Scholer, Polak, 1984; Takeo, 1985; Al Bassam et al., 1985; Mukhopadhyay et al., 2004]. Стерины в клетках устойчивых культур обладают более низким сродством к ПА, чем эргостерин [Fryberg et al., 1974; Mukhopadhyay et al., 2004]. Эргостерин является основным стериновым компонентом дрожжей и дрожжеподобных грибов дикого типа. Для подтверждения данного предположения необходимо было провести целенаправленный поиск путей преодоления полиен-резистентности. Основная задача этих исследований состояла в том, чтобы установить, как влияет подобное изменение состава стеринов на взаимодействие ПА с целыми клетками и непосредственно со стериновыми компонентами клеток резистентного и чувствительного штаммов. С этой целью был изучен резистентный штамм *Candida albicans*, в клетках которого эргостерин полностью отсутствовал и был заменен новым стериновым компонентом [Вирина и др., 1976]. Резистентный к ПА штамм R был выделен из клеток *Candida albicans* при пассировании исходной культуры в жидком сусле, с возрастающими концентрациями амфотерицина B. Штамм R оказался устойчивым к 50 мкг/мл амфотерицина B, к 5 мкг/мл леворина, к 25 мкг/мл нистатина [Вирина и др., 1976]. Однако исходный штамм обладал устойчивостью к ПА при более низких концентрациях антибиотиков: амфотерицина B (0.35 мкг/мл), леворина (0.15 мкг/мл), нистатина (0.7 мкг/мл) [Вирина и др., 1976]. Клетки резистентного штамма не отличаются по морфологии от исходной культуры, но при выращивании на жидком сусле сильно агрегируют и образуют меньшее количество биомассы на средах без антибиотиков. Уровень устойчивости не снижался после десяти пассажей в присутствии полиенов и при длительном хранении [Вирина и др., 1976].

Было установлено, что целые клетки и клеточные мембранны чувствительного и резистентного штаммов связывают одинаковое количество антибиотиков [Соловьева и др., 1977; Вирина и др., 1979 а]. Лишь в случае нистатина процент связывания для резистентного штамма оказался несколько ниже [Вирина и др., 1975]. При добавлении к растущей культуре чувствительного штамма стеринов, выделенных из мембран, как чувствительного, так и резистентного штамма, минимальная подавляющая концентрация антибиотика повышалась на порядок [Вирина и др., 1976]. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что полиены ассоциируют со стеринами обоих штаммов и что такая ассоциация при добавлении экзогенных стери-

нов как бы защищает клетки от действия антибиотика, предотвращая его комплексообразование с экзогенными стеринами, включенными в мемрану [Ландау, 1981]. Однако эксперименты, проведенные с целыми клетками и бислойными мембранами, содержащими стериновые компоненты чувствительного или резистентного штамма, показали, что в случае резистентного штамма, полиены почти не влияют на проницаемость мембран [Вирина и др., 1976, 1979 б]. Мембранны, содержащие стерин резистентного штамма, оказались нечувствительными к амфотерицину В. Изменение проницаемости бислойной мембраны в присутствии амфотерицина В (10^{-7} - 10^{-6} М) эффективно происходит только в том случае, если в нее добавлен стерин из клеток дикого типа, содержащий эргостерин в качестве основного компонента. Бислойные мембранны, включающие стерины из устойчивых клеток, не содержащих эргостерин, практически не изменяют проводимости при этих концентрациях антибиотика, что указывает на прямую связь стеринового состава клеток с фенотипическим проявлением резистентности к полиенам [Вирина и др., 1976]. Полученные данные дают основание утверждать, что стерины резистентного штамма в составе клеток и в растворе сохраняют способность связываться с полиенами на том же уровне, что и стерины чувствительного штамма, однако, по-видимому, у них снижена способность к образованию специфических комплексов с антибиотиками, изменяющие мембранный проницаемость в отношении ряда веществ. Сходное явление наблюдали ранее при изучении взаимодействия филипина с холестерином в мембранах *Acholeplasma laidlawii* при 0 и 20°C [De Kruyff, Demel, 1974]. Связывание антибиотика было одинаковым в обоих случаях, тогда как выход из клеток калия и изменение спектра поглощения филипина, характерное для образования комплекса, имели только при повышенной температуре. Предполагается, что ПА сначала связываются с клеткой неспецифически, а затем происходит их специфическое фиксирование на сайтах и образование комплексов с компонентами мембраны [Gale, 1974]. По-видимому, изменение стеринового компонента у резистентного штамма *Candida albicans* не отражается на первом этапе связывания амфотерицина В с клеткой, но лимитирует осуществление второго этапа взаимодействия.

Было высказано предположение, что основной причиной устойчивости стеринов, в частности эргостерина, является изменение состава стеринов в клетках резистентных штаммов [Woods, 1971, 1974; Molzahn et al., 1972; Fryberg et al., 1974; Bard, 1972; Вирина и др.,

1976; Mpona-Minga et al., 1988; Mbongo et al., 1998]. Как было показано в работе Вириной с соавторами при многократном пассивировании культуры *Candida albicans* в среде с возрастающей концентрацией амфотерицина В был выделен штамм, устойчивый к действию нистатина, леворина A₂ и амфотерицина В. Причем оказалось, что вместо эргостерина, характерного для клеточных мембран чувствительного штамма, в клетках резистентного штамма содержится гетерогенный стериновый компонент, поглощающий в области 212-242 нм, и не взаимодействующий с ПА [Вирина и др., 1976].

С помощью метода спиновых зондов исследовалось действие полиенов на мембранны чувствительных и резистентных штаммов [Соловьева и др., 1977 б; Aracava et al., 1981 а, б]. Для холестериноподобного зонда амфотерицин одинаково влиял на спектры ЭПР мембран обоих штаммов. Основная информация была получена из спектров ЭПР с использованием спинового зонда II, аминоксильный фрагмент которого локализован вблизи полярных групп мембранны. Время корреляции τ_c вращательной диффузии этого зонда в присутствии антибиотика увеличивалось в случае чувствительного штамма и не изменялось в случае резистентного. По-видимому, это указывает на изменения, происходящие в области полярных групп фосфолипидов и белков чувствительного штамма в присутствии полиена [Ландау, 1981].

ПА влияют на активность связанных с мембраной ферментов. Так, при концентрации филипина выше 0,2 мМ на 1 мг белка, наблюдается ингибирование АТФ-азной активности в мемbrane. Леворин, амфотерицин В и нистатин снижают активность щелочной фосфатазы, K⁺, Na⁺ - АТФ-азы и лактатдегидрогеназы в мембранный фракции. В случае резистентного штамма полиены тормозят активность щелочной фосфатазы примерно в 2 раза слабее, чем в случае чувствительного штамма [Соловьева и др., 1977 а]. Предварительная обработка мембран детергентами или совместное действие антибиотика и детергента предотвращает ингибирующее действие полиена на ферментативную активность [Соловьева и др., 1977 а]. Предполагается, что действие полиенов на работу ферментов является не прямым, а косвенным, и связано с влиянием антибиотиков на физико-химическое состояние мембран. Показано, например, что в присутствии полиенов щелочная фосфатаза не переходит в водную фазу. Ингибирование ферментативной активности обусловлено структурной перестройкой мембраны под действием полиенов. Действительно, активность мембранных ферментов зависит от фазового состоя-

ния липидов в мембране и при температуре фазового перехода липидов на графике Аррениуса для ферментативной активности наблюдается перегиб (излом) [De Kruyff et al., 1973 b; 1974 b; Tanaka et al., 1973]. Таким образом, ингибиование активности мембранных ферментов вызвано либо нарушением связи между холестерином и фосфолипидом, либо нарушением ассоциации фермента с мембранными липидами [Соловьев и др., 1977 а]. Показано, что филиппин активирует латентную K^+ - АТФ-азу [Gassner, Komnick, 1983]. Обогащенные Na^+ , K^+ - АТФ-азой микросомы солевых желез уток, выдерживаемых на высокосолевой диете, в основном ориентированы так, что субстрат недоступен к активному центру фермента и основная часть K^+ -АТФ-азы является латентной. Взаимодействующий со стериновыми компонентами мембран антибиотик филиппин в молярном соотношении филиппин:холестерин 2:1 втрое активирует K^+ - АТФ-азу.

2.3. Изучение комплексообразования ПА со стеринами методом электронной микроскопии

Данные, полученные при исследовании действия ПА на клеточных мембранах, показывают их специфичность к компоненту стериновой природы - холестерину. Приведенные выше результаты экспериментальных исследований могут лишь косвенно говорить об образовании комплекса между ПА и стеринами. В этом отношении электронная микроскопия дает возможность проследить за изменением морфологии различных мембранных систем, обработанных полиенами и показать наличие структурных образований на поверхности мембран.

Ранние эксперименты показали, что литическое действие амфотерицина В и нистатина на протопласты грибов, и эритроциты млекопитающих подавляется в растворе изотонической сахарозы [Kinsky et al., 1962; Kinsky, 1963]. Однако при этих же условиях не удается подавить литическое действие филиппина. Показано, что даже при очень низких концентрациях филиппина невозможно предотвратить гемолиз эритроцитов [Kinsky et al., 1967 а, б]. Объяснение этого явления состоит в том, что нистатин и амфотерицин В образуют в мембранах «поры», через которые слабо проникают молекулы сахарозы, тогда как филиппин сильнее повреждает мембрану и, тем самым, образует большие по размеру «поры», через которые способны проникать молекулы сахарозы. Гемолитическое действие амфотерицина В, пимарицина и нистатина при концентрациях 100 мкг/мл

полностью подавляется в присутствии низкомолекулярных соединений – фосфата и анионов сульфата [Kinsky et al., 1967 a, b]. Эти результаты предполагают, что филипин образует в мембране водные поры размером 80-100 Å, в то время как нистатин, амфотерицин В и пимарицин создают в мембранах водные поры сравнительно меньших размеров. Это предположение подтверждается данными, полученными методом негативного контрастирования. На электронно-микроскопических картинах мембран эритроцитов крысы и человека, обработанные филипином, показаны многочисленные «ниши», которые могут быть причиной лизиса этих клеток [Tillack, Kinsky, 1973; Kinsky et al., 1967 b]. «Ниши» в мембранах представлены в виде темных пятен в диаметре от 80 до 150 Å, окруженные светлым кольцом. Образование «ниш» происходит только при наличии холестерина в мембранах [Verkleij et al., 1973; Tillack, Kinsky, 1973; Meyer, 1979; Sekiya et al., 1979, 1982; Pesti et al., 1981; Meyer et al., 1983]. При изучении электронно-микроскопических картин мембран липосом, содержащих холестерин, обработанных филипином и другими ПА, можно было видеть изменение их ультраструктуры [Kitajima et al., 1976]. Особый интерес представляют некоторые внутриклеточные мембранные системы, не подверженные действию ПА. В ряде работ приводятся микрофотографии, свидетельствующие, что ядра и митохондрии в клетках простейших и грибов остаются неповрежденными даже при высоких концентрациях ПА [Ghosh, 1963 b; Ghosh, Chatterjee, 1963 a, b]. Это связано с тем, что в мембранах ядер и митохондрий содержатся следовые количества холестерина. В липосомах, содержащих холестерин, не наблюдается ультраструктурных изменений под действием гидрированного филипина - производного филипина без двойных связей [Kinsky et al., 1967 b]. Цитохимическим методом и методом замораживания-скалывания с помощью филипина определено содержание холестерина в фокальных затемнениях и мультиламеллярных тельцах хрусталика человека [Van Marle, Vrenson, 2000]. Фотофизическим методом показано образование в мембранах агрегатов филипина в комплексе с эргостерином [Loura et al., 2001].

В отличие от филипина ни один из других исследованных полиенов не образовывал подобных «ниш» в мембранах эритроцитов и в липосомах, приготовленных из лецитина с холестерином. Однако, при изучении ультраструктуры кристаллов холестерина в присутствии этрускомицина, пимарицина, амфотерицина В и нистатина наблюдалось изменение пограничной зоны кристаллов (размы-

вание границ, углов), свидетельствующее о взаимодействии молекул этих антибиотиков непосредственно с холестерином [Kinsky et al., 1967 b].

Тот факт, что не обнаружено четких структурных изменений в электронно-микроскопических картинах мембран, содержащих холестерин, после взаимодействия их с нистатином и другими антибиотиками, свидетельствует о недостатке метода негативного контрастирования.

Изучение ультраструктуры мембран, обработанных ПА, проводили методом замораживания-скалывания [Verkleij et al., 1973]. Этот метод основан на изучении поверхности скола быстро замороженных супензий мембран. При этом в плоскости скола могут оказаться как гидрофобные, так и гидрофильные области мембран, недоступные для прямого наблюдения любым другим электронно-микроскопическим методом. С помощью метода замораживания-скалывания Верклей и др., [Verkleij et al., 1973] показали, что филиппин вызывает образование агрегатов диаметром 150-250 Å в мембранах эритроцитов крыс, холестеринсодержащих мембран клеток *Acholeplasma laidlawii* и в липосомах, полученных из яичного лецитина с холестерином. Не наблюдалось изменений на сколотой поверхности в отсутствие холестерина. Электронно-микроскопические картины показывают наличие в них структурных образований при взаимодействии филипина с холестерином. Появление морфологически характерных агрегатов в тонкой структуре мембран, содержащих холестерин, при взаимодействии их с антибиотиками можно связать с образованием полиенхолестериновых комплексов [Tillack, Kinsky, 1973; Verkleij et al., 1973; Bastide et al., 1982; Backes, Rychnovsky, 1992].

Амфотерицин В не вызывает изменения сколотой поверхности лецитин-холестериновых липосом, мембран эритроцитов и холестерин-содержащих клеток *Acholeplasma laidlawii* в концентрациях от 10 до 20 мкг/мл [Verkleij et al., 1973]. Однако Нозава с сотрудниками [Nozawa et al., 1974] обнаружили, что амфотерицин В в концентрациях 2 мкг/мл вызывает глубокие ультраструктурные изменения в плазматических мембранах клеток *Epidermophyton floccosum* патогенных грибов человека. Этот антибиотик связывается с мембранами, образуя агрегаты размером 85 Å, представленные на электронно-микроскопических картинах в виде углублений на внутренней поверхности скола. Основным стериновым компонентом клеток *Epidermophyton floccosum* является эргостерин. Общие липиды, выде-

ленные из этих клеток, содержат 0,3 М эргостерина на моль фосфолипида [Nozawa et al., 1974]. В то же время указывается на то, что амфотерицин В при концентрации 20 мкг/мл не действует заметно на ультраструктуру мембран клеток *Acholeplasma laidlawii* и липосом, которые содержат только холестерин [Verkleij et al., 1973]. Из этих данных следует, что мембранны, содержащие эргостерин, более чувствительны к действию амфотерицина В, чем мембранны с холестерином. Различную степень изменения морфологии мембранных структур под действием ПА, видимо, можно связать с неадекватным механизмом комплексообразования антибиотиков со стеринами.

2.4. Исследование комплексообразования полиенов с холестерином методом УФ спектроскопии

ПА в водных и органических растворах характеризуются тремя основными максимумами поглощения в УФ области благодаря наличию сопряженных двойных связей в хромофорной части молекул (рис.2.4.1) [Hamilton-Miller, 1973 a, b; Feinstein et al., 1975; D'Amico et al., 1980]. При взаимодействии ПА с холестерином наблюдается изменение УФ спектра поглощения (рис. 2.4.1, 2.4.2). Увеличение числа двойных связей в молекуле полиена вызывает батохромный сдвиг максимумов поглощения и соответствующее изменение окраски антибиотиков, как это показано в таблице 2.4.1.

Таблица 2.4.1

Максимумы поглощения в УФ области основных ПА в зависимости от числа двойных связей

	Число двойных связей	Три максимума поглощения в УФ области, нм	Цвет
Триены	3	-	-
Тетраены	4	291,304,318	Светло-желтый
Пентаены	5	317,331,350	Желтый
Гексаены	6	340,358,380	Желто-оранжевый
Гептаены	7	361,382,405	Оранжевый

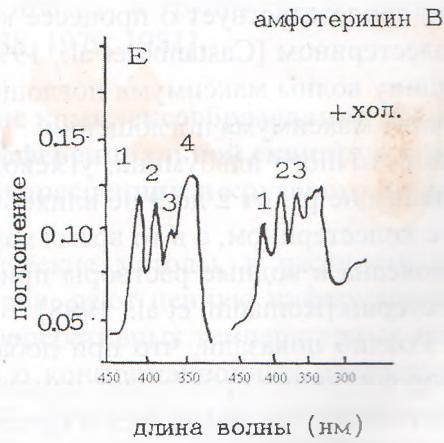
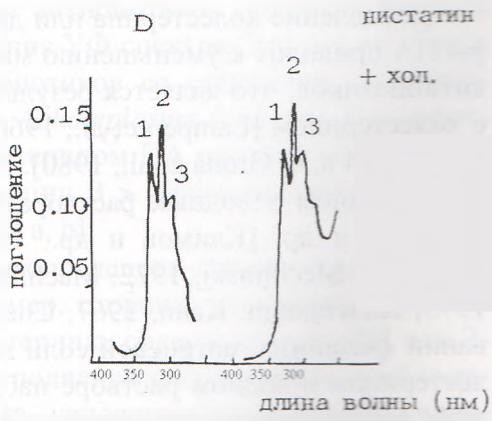
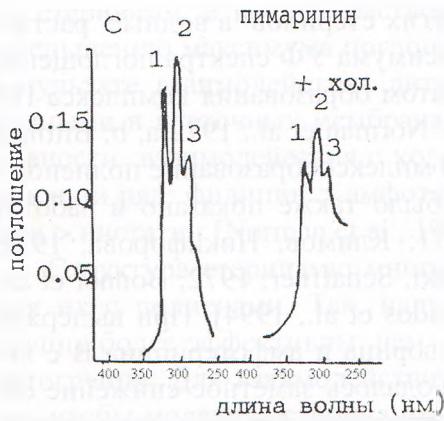
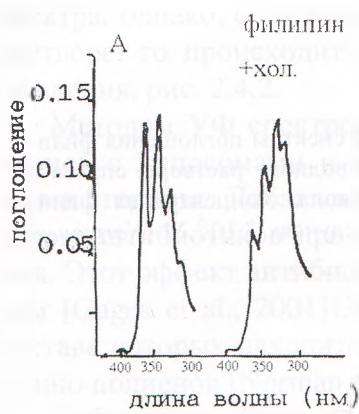


Рис. 2.4.1. УФ спектры поглощения ПА [Norman et al., 1972 a].

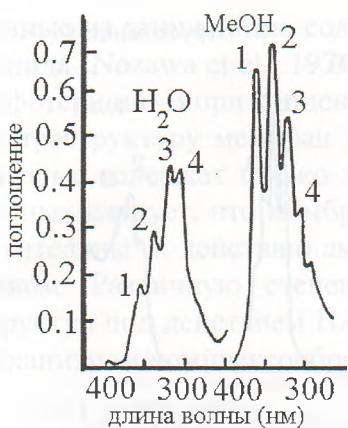


Рис. 2.4.2. УФ спектры поглощения филипина. Слева в водном растворе, справа в растворе метанола. Концентрация филипина в обоих случаях $3 \cdot 10^{-5}$ М [Norman et al., 1972 a, b].

Добавление холестерина или других стеринов в водные растворы ПА приводит к уменьшению максимума УФ спектра поглощения антибиотиков, что является результатом образования комплекса ПА с холестерином [Lampen et al., 1960; Norman et al., 1972 a, b; Bittman et al., 1974 a, b; Gruda et al., 1980]. Комплексообразование полиенов с холестерином в водных растворах было также показано в работах Климова и др. [Климов и др., 1971; Климов, Никифорова, 1971; Schaffner, Mechlinski, 1972; Mechlinski, Schaffner, 1972; Bonner et al., 1975; Kirschbaum, Kahn, 1967; Chapados et al., 1994]. При выдерживании филипина, натриевой соли леворина и амфотерицина В с холестерином в водном растворе наблюдалось заметное снижение общей интенсивности их спектров поглощения без изменения характера УФ спектра, что свидетельствует о процессе комплексообразования полиенов с холестерином [Castanbo et al., 1994]. Наличие стеринов не изменяет длину волны максимума поглощения полиенов, а изменяет лишь величину максимума поглощения.

Присутствие сывороточного альбумина, углеводов, фосфолипидов и мочевины в диапазоне pH от 2 до 9 не влияет на комплексообразование полиенов с холестерином, а в то время как добавление метанола, этанола и диоксана в водные растворы приводит к разрыву комплексов ПА-холестерин [Romanini et al., 1998].

Ранее Лампен и Готлиб показали, что при добавлении холестерина в водный раствор филипина происходит изменение спектра поглощения, однако этот спектр не изменяется в органических растворителях [Lampen et al., 1960; Gottlieb et al., 1961]. На рис. 2.4.2 показан УФ спектр филипин-холестеринового комплекса в водном растворе и в растворе метанола. При добавлении холестерина к филипину в органическом растворителе не происходит изменения УФ

спектра, однако, если холестерин добавляется к филипину в водном растворе, то происходит существенное изменение УФ спектра поглощения, рис. 2.4.2.

Методом УФ спектроскопии исследовалось взаимодействие полиенов с липосомами и клетками *Acholeplasma laidlawii*, содержащими стерины. Добавление липосом с холестеринами в водные растворы антибиотиков приводит к уменьшению максимума поглощения. Этот эффект антибиотиков зависит от липидного состава липосом [Gages et al., 2001] Липосомы, приготовленные из лецитина, в составе которых находится холестерин, менее чувствительны к действию полиенов [Norman et al., 1972 a, b].

Добавление клеток *Acholeplasma laidlawii*, выращенных на среде со стериинами, в водные растворы антибиотиков приводит также к уменьшению максимума поглощения УФ спектра. Это происходит в результате взаимодействия антибиотиков со стериинами, локализованными в клеточных мембранах *Acholeplasma laidlawii*. По эффективности взаимодействия с холестерином ПА располагаются в следующий ряд: филипин > амфотерицин В > этрускомицин > пимаринцин > нистатин [Norman et al., 1972 a, b].

Структура стерина во многом определяет степень взаимодействия их с полиенами. Так, например, стерины, содержащие 3β -ОН группу более эффективны, чем стерины, содержащие 3α -ОН или 3 -кетогруппу. Для взаимодействия полиенов со стериинами необходимо, чтобы молекула стерина имела неповрежденный скелет, гидрофобную область при C_{17} и группу 3β -ОН [Norman et al., 1972 a, b; Фейгин и др., 1978, 1979, 1981].

2.5. Изучение комплексообразования ПА с холестерином методами дифференциальной сканирующей калориметрии, флуоресценции и кругового дихроизма

Калориметрические методы, в частности метод сканирующей микрокалориметрии, дают ценную информацию о физико-химических свойствах кооперативных температурных переходов в растворах биополимеров и о конформационных превращениях белков и нуклеиновых кислот. Биологические мембранны представляют собой один из объектов, исследование которых методом сканирующей микрокалориметрии весьма перспективно. Из-за сложности этих систем имеются пока только качественные результаты [Melchior et al., 1970; Oldfield, Chapman, 1972]. Принцип метода основан на из-

мерении количества выделяемой или поглощаемой теплоты, связанной с макромолекулярными превращениями в растворах органических соединений.

Для того, чтобы получить представление о комплексообразовании полиэна с холестерином было изучено действие антибиотиков на энергию фазового перехода липидов. Чистый лецитин, молекула которого содержит одну ненасыщенную и одну насыщенную жирные кислоты (1-олеин-2-стеарил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин), испытывает четкий фазовый переход при 13°C из кристаллической в жидкокристаллическую структуру [Norman et al., 1972 a, b]. С помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что введение холестерина в липосомы, приготовленные из лецитина, вызывает заметное изменение величины энергии фазового перехода, в то время как добавление филипина к липосомам без холестерина приводит к незначительному уменьшению энергии фазового перехода. В растворах филипина липосомы, содержащие в своем составе лецитин с холестерином, испытывают фазовый переход при той же температуре. Эти данные говорят о том, что при взаимодействии филипина с холестерином происходит образование комплексов филипин-холестерин, приводящих в результате к ослаблению взаимодействия между холестерином и лецитином в мембранах [Norman et al., 1972 a].

В липидных мембранных клеток *Acholeplasma laidlawii*, выращенных на олеиновой кислоте, фазовый переход наблюдается ниже 0°C [De Kruyff et al., 1974 b]. Включение холестерина в клетки *Acholeplasma laidlawii* уменьшает энергию фазового перехода липидов в мембранах. Это свидетельствует о взаимодействии холестерина с фосфолипидами в мембранах. Однако добавление ПА к клеткам *Acholeplasma laidlawii* вновь увеличивает энергию фазового перехода. Такое изменение энергии фазового перехода происходит за счет образования комплекса полиенов с холестерином.

Принимая во внимание специфичность взаимодействия ПА с холестерином, многие исследователи высказали мнение, что антибиотики полиеновой структуры можно использовать в качестве флуоресцентной метки для определения содержания холестерина в биологических и бислойных мембранных [Schroeder et al., 1973; Drabikowski et al., 1973; Archer, 1975; Moulki et al., 1976; Flick, Gelernter, 1977; Iqbal, Weidekamm, 1979; Robinson, Karnovsky, 1980; Oehlschlager, Laks, 1980; Vertut-Croquin et al., 1983; Croquin et al., 1983; Colline et al., 1985; Szponarski, Bolard, 1987; Weakliem et al.,

1995; Ridente et al., 1996; Fournie et al., 1998]. Флуоресцентным методом можно определить специфичность взаимодействия полиенов с холестерином, содержащихся в биологических и модельных мембранах, кинетику образования комплекса антибиотика с холестерином [Strom et al., 1973 a, b; Crifo et al., 1971, 1976] и стехиометрию взаимодействия антибиотика с холестерином [Scroeder et al., 1973; Strom et al., 1973 a, b]. С этой точки зрения изучение интенсивности флуоресценции дает существенную информацию о структуре комплексов холестерина с ПА [Schroeder et al., 1973; Drabikowski et al., 1973; Castanho, Prieto, 1995].

Молекулы полиенов, содержащие естественную систему сопряженных двойных связей, имеют собственный спектр интенсивности флуоресценции с максимумом поглощения в ближней УФ области [Schroeder et al., 1973]. Было показано, что в отличие от нистатина и амфотерицина В, филипин дает сильную флуоресценцию с максимумом при 480 нм, положение которого не зависит от полярности среды [Drabikowski et al., 1973; Schroeder et al., 1972, 1973; Castanho, Prieto, 1992; Castanho et al., 1992]. Интенсивность флуоресценции филипина увеличивается с уменьшением полярности среды, но при этом максимум спектра не сдвигается. В исследованиях, проведенных Шредером и соавт. [Schroeder et al., 1973], введение холестерина в водный раствор филипина приводит к уменьшению квантового выхода флуоресценции на 25%. При этом происходит специфическое связывание молекул филипина с холестерином в стехиометрическом соотношении 1:1. Однако, в присутствии другого ПА пимарицина после введения холестерина наблюдается увеличение квантового выхода почти в 80 раз. Такое изменение интенсивности флуоресценции в ответ на введение холестерина может быть связано с различной физической природой взаимодействия ПА с холестерином. Под действием филипина изменение интенсивности флуоресценции наблюдается также и в том случае, если в среде присутствуют липосомы, полученные из лецитина и липидных фрагментов саркоплазматического ретикулума, в составе которых находится холестерин. Удаление холестерина приводило к значительному уменьшению величины максимума флуоресценции [Drabikowski et al., 1973]. Детально было изучено тушение флуоресценции филипина, индуцированного нитроксид-замещенными жирными кислотами и производными холестерина в липосомах, приготовленные из дипалмитоилфосфатидилхолина. При взаимодействии с липосомами филипин в основном локализуется в гидрофобной части мембран. При

3%-ой молярной концентрации филипина он находится в водной среде преимущественно в агрегатном состоянии и в таком состоянии он взаимодействует с липосомальным холестерином в стехиометрическом соотношении 1:1 [Castanho, Prieto, 1995].

Этрускомицин также имеет собственный спектр флуоресценции, максимум которого приходится на 410 нм [Strom et al., 1973 a, b; Nedeau et al., 1982]. Авторы исследовали взаимодействие этрускомицина с чистым холестерином, эргостерином, липосомами и с мембранами эритроцитов. Показано, что интенсивность флуоресценции сильно возрастает при взаимодействии этрускомицина с холестерином и эргостерином, а кинетика установления квантового выхода оказалась различной для исследованных систем. Методом флуоресценции показана высокая чувствительность филипина к мембранам, в состав которых содержится дипалмитоилфосфатидилхолин [Castanho et al., 1999].

Методом КД исследовалось комплексообразование гептаеновых антибиотиков с монослойными липосомами, содержащими различные концентрации холестерина [Bunow, Levin, 1977; Boudet, Bolard, 1979; Mizerski et al., 1983; Bolard et al., 1984; Bolard, 1984]. Показано, что в отличие от неароматического антибиотика амфотерицина В при взаимодействии ароматических антибиотиков с липосомами образуются только 2 типа комплексов: первый тип комплекса не приводит к изменению проницаемости липосомальных мембран, тогда как второй тип комплекса увеличивает проницаемость липосом для ионов. Концентрация холестерина и физическое состояние мембран влияют только на количество проникающих веществ. Эти результаты показывают, что имеются некоторые различия в механизме действия ароматических и неароматических антибиотиков.

Методом КД исследовалась способность молекул амфотерицина В обмениваться между липосомами. При комнатной температуре наблюдался быстрый обмен молекул амфотерицина В между липосомами одного состава, приготовленные из дипальмитоилфосфатидилхолина или из яичного лецитина [Bolard et al., 1981]. Амфотерицин В переносится также из фосфатидилхолиновых липосом в липосомы из яичного лецитина, однако переход амфотерицина В в обратном направлении не наблюдался. Перенос амфотерицина В в обоих направлениях происходил выше точки фазового перехода липидов (48°C). Эти результаты объясняются различными константами связывания молекул амфотерицина В с липидами, находящимися в кристаллическом и жидкокристаллическом состояниях.

Методами КД и УФ спектроскопии изучено взаимодействие филипина с модельными и клеточными мембранами, содержащие растительные стерины [Milhaud et al., 1988; Milhaud et al., 1989 a, b, c]. При изучении взаимодействия филипина с большими униламеллярными везикулами, содержащие стигмастерин, ситостерин, кампостерин и 24-метилполинастанол при молярном соотношении филипин:стерин меньше единицы было показано изменение в спектрах поглощения, что указывает на комплексообразование филипина со стеринами. При более высоком соотношении филипин:стерин филипин образовывал комплексы с фосфолипидами мембран. Методом линейного дихроизма показана локализация филипин-холестеринового комплекса в липосомальных мембранах и представлена молекулярная модель комплекса филипин-холестерин [Lopes et al., 2004].

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПА С МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАННЫМИ СИСТЕМАМИ

3.1. Мономолекулярные слои

Для изучения механизма действия ПА на молекулярном уровне Демелом и др. [Demel et al., 1965, 1968, 1972] было исследовано взаимодействие полиенов с липидными мономолекулярными слоями на границе раздела вода-воздух. Монослои приготавляли из холестерина, эргостерина, β,γ -дипальмитол-L- α -фосфатидилэтаноламина, γ -стеарил- β -олеил-L- α -фосфатидилхолина и других, содержащих фосфатидилхолин, соединений. Состав монослоя оказался определяющим фактором для степени проникновения в него филипина и нистатина. Наибольшее проникновение происходило в монослои холестерина. Пленки сжимали до заданной величины давления на поверхности, после чего растворы ПА в ДМФА или ДМСО осторожно вводили под монослои. Так, филибин в результате проникновения в монослои повышал поверхностное давление монослоя с 2 дин/см до 31 дин/см. Значительное проникновение полиенов было отмечено и в монослои эргостерина. При указанных выше условиях ни один из антибиотиков не взаимодействовал с монослоями, приготовленными из фосфолипидов, лишенных стеринов, или из общих липидных экстрактов, полученными из бактерий. Филибин увеличивал поверхностное давление монослоев, приготовленных из общих липидных экстрактов бычьих эритроцитов. Монослои, приготовленный из фракций липидов, экстрагированных из эритроцитов и содержащий холестерин, реагировал на добавление филибина сильнее, чем монослои, приготовленный из общей липидной фракции бактериальных клеток организма, нечувствительного к полиенам.

Демел и др. [Demel et al., 1965, 1968] в своих экспериментах наблюдали взаимодействие полиенов со стериновыми монослоями в широких пределах концентраций антибиотика. При низких концентрациях филибин вызывал намного большее увеличение поверхностного давления монослоя, полученного из холестерина, чем этрискомицин, амфотерицин В, пимарицин и нистатин. Это соответствует тому ряду активности, в котором антибиотики способны разрушать эритроциты млекопитающих или клетки грибов. Различия в эффективности антибиотиков могут быть объяснены различным сродством полиенов к стеринам. Гидрированный филибин оказался значительно слабее по степени гемолитического действия, чем ис-

ходный антибиотик [Kinsky et al., 1967 b]. Гидрированный филипин оказывает слабое действие на величину поверхностного давления монослоя из холестерина, чем исходный филипин [Demel et al., 1968].

Ряд работ посвящен исследованию взаимодействия полиенов с монослоями различного состава [Demel et al., 1965; Demel et al., 1968; Kinsky et al., 1966; Ockman, 1974; Saka, Mita, 1998]. Было показано, что филипин и нистатин не проникают в монослои липидов, экстрагируемых из бактерий (на которые эти антибиотики не действуют), но легко проникают в липиды, полученные из эритроцитов быка. Липиды эритроцитов быка были разделены на фракции нейтральных липидов и фосфолипидов. Полиены проникали в первую фракцию, но не во вторую (фракция нейтральных липидов богата холестерином). Показано, что филипин и нистатин легко проникают в монослои холестерина или эргостерина, но не взаимодействуют с фосфолипидами, в том числе с лецитином. Способность ряда полиенов проникать в монослои холестерина измеряли по вызываемому ими относительному увеличению поверхностного натяжения. Активность уменьшалась в следующем порядке (в скобках приведены величины молекулярного веса): филипин (654), этрускомицин (700), амфотерицин (960), пимарицин (681), нистатин (932). Степень дезорганизации мембран, по-видимому, больше зависит от соотношения стеринов и фосфолипидов, чем от присутствия стеринов как таковых. В монослоях холестерина и лецитина величина поверхностного натяжения при добавлении определенного количества филипина снижалась при увеличении процентного содержания фосфолипида. При высоком поверхностном натяжении проникновение филипина в слой холестерина сопровождалось небольшим увеличением поверхности пленки. Было подсчитано, что на каждые 100-250 молекул холестерина в слой внедряется одна молекула полиена, в результате которого происходит переориентация молекул стерина. При добавлении филипина к монослоям, приготовленных из смеси лецитин:холестерин увеличение поверхностного натяжения было совершенно непропорционально количеству молекул полиена, внедрившихся в пленку. Этот эффект служит хорошим доказательством того, что полиены вызывают сильную дезорганизацию липидов. На основании этих исследований были сделаны следующие заключения: а - полиены специфически взаимодействуют со стеринами; б - ПА вызывают переориентацию стеринов в мембранах, в результате чего изменяется их проницаемость [Demel et al., 1965; Demel et al., 1968; Kinsky et al., 1968].

Более детально было исследовано взаимодействие производных холестерина с филипином на чистых и смешанных монослоях [Norman et al., 1972 a]. В этой работе исследована величина поверхностного давления при введении филипина под монослоем, приготовленных из чистого стерина и из смеси лецитина и стерина в соотношении 1:1. При введении филипина под монослоем наблюдалось увеличение поверхностного давления в чистых стериновых монослоях с холестерином, стигмастерином и эпихолестерином. Не наблюдалось изменение поверхностного давления в присутствии андростан-3, капростанола, при разрыве кольца В в молекуле стерина, на примере эргокальциферола (витамина Д₂), а также при наличии кетофункциональных групп в молекуле стерина. В смешанных липидах холестериновых монослоев увеличение поверхностного давления было показано в присутствии холестерина и стигмастерина. ПА увеличивают поверхностное давление, если в состав монослоя вводится эргостерин и латостерин. Эпихолестерин, капростанол или кетостерины малоэффективны в смешанных монослоях. В чистых монослоях из стерина наблюдалось сильное увеличение поверхностного давления, при введении филипина под монослоем, тогда как в смешанных монослоях лецитин:эпихолестерин отмечалось небольшое увеличение поверхностного давления. Исследование взаимодействия ПА с монослоями показало, что наличие стерина является необходимым условием для полиеновой чувствительности. Только стерины с Зβ-ОН группой и неповрежденным циклопентанфенантреновым кольцом эффективно связываются с полиенами [Norman et al., 1972 a, b; Demel et al., 1965; Demel et al., 1968].

3.2. Липидные везикулы (липосомы)

В качестве модели для изучения механизма действия ПА широко используются липосомы – сферические мицеллы, образующиеся при набухании фосфолипидов в водных растворах [Bangham, 1971 a, b]. Полученные в обычных условиях липосомы состоят из концентрических бимолекулярных слоев фосфолипидов, разделенных водными прослойками. При использовании ультразвука удается получить однослойные липосомы – мельчайшие пузырьки, окруженные бимолекулярной фосфолипидной мембраной. Липосомы являются удобным инструментом при исследовании проницаемости модифицированных фосфолипидных мембран для различных ионов и органических соединений.

Действие ПА на липосомы подробно изучено Вейсманом и Сесса [Weissmann, Sessa, 1966, 1967]. В своих первых исследованиях они показали, что филипин, этрускомицин, амфотерицин В и нистатин при концентрациях от 10^{-4} до 10^{-3} М в различной степени способствовали выходу меченых ионов хромата и фосфата, а также глюкозы из липосом, приготовленных из яичного лецитина. Включение холестерина или эргостерина в липосомы заметно усиливало выход маркеров из липосом в присутствии амфотерицина В и нистатина. В тех же условиях филипин и этрускомицин также способствовали увеличению выхода маркеров из липосом. Последующие эксперименты показали, что в отсутствии стерина филипин оказывает свое действие и тогда, когда липосомы готовились с положительно или отрицательно заряженными липидами (со стеариламином или дициттил-фосфатом) [Sessa, Weissmann, 1967]. Филипин и этрускомицин в одинаковой степени способствуют освобождению хромата из липосом, независимо от содержания холестерина. Полученные данные приводят к выводу о том, что наблюдается разница в способах действия некоторых ПА – филипин ведет себя как этрускомицин, но отличается от амфотерицина В и нистатина. Различное действие филипина и амфотерицина В не согласуются с исследованиями Вебера [Weber, Kinsky, 1965] и Фейнгольда [Feingold, 1965], которые показали, что клетки *Acholeplasma laidlawii*, выращенные в среде, содержащей холестерин, были чувствительны к обоим антибиотикам.

Эти расхождения вынудили многих исследователей и дальше исследовать взаимодействие между полиенами и липосомами. Кинский и др. [Kinsky et al., 1968] показали, что включение холестерина в липосомы, приготовленные из лецитина, увеличивало как скорость, так и степень выхода глюкозы из липосом под действием низких концентраций филипина (10^{-6} до 10^{-5} М). Эти данные несколько отличаются от данных Вейсмана и Сесса, которые в своих работах использовали концентрацию филипина 10^{-4} - 10^{-3} М [Weissmann, Sessa, 1966, 1967]. В последующих экспериментах, исследуя проницаемость липосом под действием производных филипина, Сесса и Вейсман [Sessa, Weissmann, 1968] показали, что уже при низких концентрациях антибиотики оказывали эффективное действие на липосомы, содержащие холестерин. В результате усиливался выход ионов хромата из липосом. Обработанные филипином везикулы начинали пропускать рутениевый синий (м.в. 850), но не молекулы пероксидазы (м.в. 1900) [Gassner, Komnick, 1983].

В дальнейшем Сучен и Фейнгольд [Hsuchen, Feingold, 1973 a, b,

с] исследовали эффект амфотерицина В и нистатина на выход меченой глюкозы из липосом, содержащих различные жирные кислоты. В присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ М амфотерицина при введении холестерина в состав липосом, приготовленных из яичного лецитина, авторы наблюдали увеличение выхода меченой глюкозы. Нистатин и амфотерицин В уменьшают выход глюкозы из липидных везикул, приготовленных из дипальмитоиллекитина или дистеариллекитина без холестерина. Эти данные показывают, что в отсутствие холестерина эти антибиотики при концентрации от 10^{-6} до 10^{-5} М слабо влияют на выход глюкозы из липосом. По-видимому, состав липосом является важным фактором, определяющим чувствительность полиенов к мембранам. Исследования проницаемости липосом для ионов и нейтральных молекул в присутствии ПА были продолжены Де Круйффом с сотр. [De Kruyff et al., 1974 a, b]. Было показано, что филипин, амфотерицин В и нистатин вызывают выход ионов K^+ из липосом, который значительно возрастает при добавлении холестерина в липосомы. В присутствии этрускомицина при концентрации 50 мкг/мл наблюдается незначительный выход ионов K^+ из липосом, содержащих холестерин. Пимарицин до 100 мкг/мл не увеличивает выхода ионов K^+ из липосом даже тогда, когда они содержат высокую концентрацию холестерина [De Kruyff et al., 1974 a, b]. После добавления нистатина или амфотерицина В к липосомам, содержащим эквивалентные концентрации KCl и глюкозы, отмечался быстрый поток K^+ и почти не наблюдалось выхода меченой глюкозы. В присутствии филипина липосомы оказались проницаемы для ионов K^+ и глюкозы [De Kruyff et al., 1974 a]. Катаока и Битман в своих работах показали, что филипин способствует выходу из липосом, содержащих холестерин, меченого глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [Kataoka et al., 1973; Kataoka, Kaprowski, 1975; Bittman, Fischkoff, 1972; Blau, Bittman, 1977]. Высказано предположение, что изменение проницаемости липосом может быть результатом образования в них комплексов филипина с холестерином, составляющих в диаметре 150-250 Å. На электронно-микроскопических картинах эти комплексы представлены в виде «ниш» [Verkleij et al., 1973; Kinsky et al., 1967 b; Tillack, Kinsky, 1973]. По способности увеличивать выход ионов K^+ из липосом ПА располагаются в следующий ряд: амфотерицин В > филипин > этрускомицин > пимарицин [De Kruyff et al., 1974 a]. Структура стерина оказалась важным фактором, обуславливающим взаимодействие антибиотиков с липосомами. Наличие в молекулах стерина Зβ-OH группы, циклопентанфенантренового кольца и гидрофобной цепочки

при C_{17} является необходимым условием взаимодействия полиенов со стеринами в мембранах [Касумов, Либерман, 1972; Bolard et al., 1980; Bolard, Cheron, 1982; Bolard, 1986 a, b].

Используя метод ультрафильтрации озвученных липосом, приготовленных из смеси яичного лецитина, дицетилфосфата и холестерина в молярном соотношении 10:1:5, Наото с сотрудниками исследовали действие ПА на проницаемость липосом для ионов Na^+ и Cl^- , меченой глюкозы, сахарозы, инулина и декстрана [Naoto et al., 1980]. Обнаружено, что амфотерицин В и нистатин в концентрации 2 и 20 мкг/мл соответственно значительно повышают проницаемость липосом для глюкозы, ионов Na^+ и Cl^- . В присутствии 20 мкг/мл филипина наблюдалось повышение проницаемости липосом для всех маркеров, включая декстран с молекулярным весом 75 000. Увеличение проницаемости липосом для декстрана наблюдалось также в работе Тирлинка [Teerlink et al., 1980]. Из этих работ следует, что указанные антибиотики формируют в мембранах липосом поры определенных размеров.

Тирлинк с соавт. [Teerlink et al., 1980] исследовали влияние пимарицина, этрускомицина и амфотерицина В на выход ионов K^+ из неозвученных липосом с различным содержанием стеринов. Этрускомицин в концентрации 1,5 мкг/мл практически не увеличивает выход ионов K^+ из липосом при уровне холестерина в 20 мол%, но увеличивает выход ионов K^+ из липосом при повышении холестерина до 40 мол%. Доля освобожденного K^+ в присутствии этрускомицина возрастает вдвое при замене холестерина на эргостерин. Выход K^+ из липосом в присутствии 20 мкг/мл пимарицина наблюдается только при уровне холестерина в липосомах в 40-50 мол%. В этом случае замена холестерина на эргостерин также сильно увеличивает выход ионов K^+ из липосом. При уровне холестерина в 20 мол% получен максимальный выход ионов K^+ из липосом в присутствии амфотерицина В в концентрации 0,5 мкг/мл. При замене холестерина на эргостерин также наблюдался интенсивный выход ионов K^+ из липосом, однако концентрация амфотерицина В требовалась в 16 раз меньше, чем в случае холестерина. Имеются данные о том, что амфотерицин В и нистатин проявляют отличный друг от друга эффект на липосомы, в составе которых отсутствует стерин [Whyte et al., 1989]. Показано, что филипин оказывает влияние на поверхностный потенциал мембран вакуолей и гранул, меняя его на противоположный заряд [Orci et al., 1980].

С целью выяснения механизма формирования ионпроводящих

полиеновых структур в мембранах необходимо, прежде всего, исследовать на молекулярном уровне характерные особенности взаимодействия липидных компонентов мембран с ПА, как модификаторов мембранный проницаемости [Weismann et al., 1966; Abramson, Ockman, 1973; Bittman et al., 1974 a, b; Cohen, 1975; Gent, Prestegar, 1976; Bittman et al., 1976; Strom et al., 1976 a, b; Chen Winston, Bittman, 1977; Russel et al., 1977; Van Hoogevest, De Kruyff, 1978; Bittman, 1978; Blau, Bittman. 1978; Onki et al., 1979; Kelly et al., 1979; Nakamura et al., 1980; Prigent et al., 1980; Oehlschlager, Laks, 1980; Zagyansky, Jard, 1981; Strauss, 1981; Aracava et al., 1981 a, b; Cybulski et al., 1981; Blau et al., 1982; Wilfred, Selvakumar, 1983, Vertut-Croquin et al., 1984, 1985; Hunt et al., 1984; Yeagle, 1985; Dufourc, Smith, 1985; O'Neill et al., 1986; Cybulski, 1986; Hartsel et al., 1988, 1991]. Так, в этом отношении привлекают внимание работы Дюфурка и соавт. [Dufourc et al., 1984]. Исследуя методом ^2H -ЯМР влияние амфотерицина В на молекулярную организацию липидов в липосомах из димиристоилфосфатидилхолина с использованием селективно дейтерированного холестерина и эпихолестерина, они пришли к предположению о некотором «замораживании» подвижности холестерина в мембранах липосом в присутствии амфотерицина В. Этим же методом авторы исследовали влияние амфотерицина В на организацию многослойной мембраны из димиристоилфосфатидилхолина [Dufourc et al., 1984]. В результате был сделан вывод, что в присутствии этого антибиотика при температурах больших 25°C , димиристоилфосфатидилхолин находится в двух различных состояниях: свободном и связанном с амфотерицином В (со стехиометрией I:I). Авторы полагают, что в связанном состоянии жирнокислотная цепь липида находится в полностью *транс* конфигурации. Димиристоилфосфатидилхолин, не связанный с амфотерицином В, имеет при $25\text{--}40^\circ\text{C}$ большую упорядоченность, чем в чисто липидном бислое. В работе Клежана и Битмана исследована кинетика взаимодействия амфотерицина В и филипина со стеринами и изучено распределение стерина и фосфолипидов в мембранах липосом [Clejan, Bittman, 1985].

Методом светорассеяния была изучена концентрационная зависимость проницаемости липосом, индуцированной амфотерицином В. Было показано образование двух типов пор, проницаемые для ионов и воды, соответственно. При обработке липосом низкими концентрациями антибиотика в мембранах формируется первый тип пор, имеющий характер «ионных». При больших концентрациях ан-

тибиотика формируется второй тип пор - водных пор [Cohen, 1987, 1993].

Исследуя методами КД и УФ спектроскопии взаимодействие филипина с моноламеллярными липосомами, приготовленных из фосфолипидов сои в комплексе с некоторыми растительными стеринами, было показано, что при молярном соотношении филипин:стерин 1:1 в липосомах формируются антибиотик-стериныевые комплексы, а при более высокой концентрации филипина образуются комплексы антибиотика с фосфолипидами [Aracava et al., 1981; Milhaud et al., 1988]. Выяснить механизм ионной проницаемости мембран, модифицированных полиенами, можно только при учете взаимодействия всех структурных компонентов мембраны: антибиотиков, стеринов и фосфолипидов. В этом аспекте была изучена связь структуры антибиотиков (производные амфотерицина В) с биологической активностью на клетках и липидных мембранах в зависимости от содержания в бислоях холестерина и других стеринов [Gary-Bobo, 1989]. Активность производных амфотерицина В исследовали методом ^{31}P -ЯМР на крупных моноламеллярных липосомах при изучении транспорта протонов в градиенте pH (внутри 5.5, снаружи 7.5) в присутствии разобщителей окислительного фосфорилирования. В этих экспериментах производные амфотерицина В со свободной карбоксильной группой действовали как каналообразователи в бислоях, содержащих только эргостерин (или стерины с алкильной боковой цепью как у эргостерина), а в бислоях, содержащих другие стерины, действовали как переносчики. Таким образом, механизм индуцированной полиенами ионной проницаемости зависит от структурных компонентов мембраны.

При взаимодействии различных по структуре антибиотиков с липосомами меняется общая картина наблюдаемой индуцированной проницаемости [Pierce et al., 1978 a, b; Podo et al., 1979; Capuozzo, Bolard, 1985; Касумов и др., 1987; Sergeev et al., 1993]. Так, результаты исследования комбинированного эффекта амфотерицина В и люцензомицина на проницаемость для катионов в моноламеллярных липосомах показывают, что люцензомицин уменьшает проницаемость липосом и затрудняет сборку амфотерициновых каналов. Другой причиной антагонизма антибиотиков может быть формирование в мембранах «гибридных» нефункциональных каналов [Capuozzo, Bolard, 1985]. Показано также, что мембранны, содержащие инактивирующие каналы, ведут себя при определенных условиях как колебательный контур. При действии на такую мембрану

переменным электрическим полем, в ней наблюдаются резонансные изменения мембранного потенциала и проводимости каналов [Маркин и др., 1974]. Коломыткиным с соавторами было обнаружено повышение ионной проводимости мембран и увеличение доли времени нахождения амфотерициновых каналов в открытом состоянии при действии антител [Kolomytkin et al., 1989].

Результаты исследований при изучении проницаемости микробных клеток и липосом показывают, что механизм действия ПА на мембранах этих двух систем идентичен и изучение его механизма действия более детально представляется возможным на модельных мембранных системах [Hartsel et al., 1993; Coutinho, Prieto, 2003]. Несмотря на высокую чувствительность липосом при изучении их проницаемости для ионов и меченых соединений в присутствии различных ионофоров, они обладают следующими недостатками: 1) сложность получения однородных липосом; 2) отсутствие соответствующего контроля за состоянием липосом, что приводит к усреднению измеряемых характеристик; 3) наличие большого разброса размера липосом; 4) малая скорость измерения основного параметра – проницаемости, в то время как процессы, обуславливающие ионную проницаемость, оказываются достаточно быстрыми; 5) отсутствие возможности изучения быстрой кинетики электрических процессов в липосомальных мембранах и быстрое выравнивание градиента проникающего вещества в липосомах.

3.3. Плоские бислойные липидные мембранны

Изучение молекулярного механизма действия ПА непосредственно на клетках встречает большие трудности вследствие взаимосвязи процессов клеточного метаболизма. В этом отношении использование БЛМ является новым этапом в исследовании механизма действия полиенов.

По сравнению с монослоями и липосомами БЛМ более совершенная модель, на которой воспроизводятся важные функциональные и структурные особенности клеточных мембран. Хорошая корреляция данных, полученных на микробных клетках и модельных мембранах, показывает, что для раскрытия механизма действия ПА наиболее перспективной моделью являются бимолекулярные плоские липидные мембранны.

Бислойные мембранны характеризуются следующими преимуществами: 1) простота получения мембран различного липидного со-

ства; 2) визуальный и электрометрический контроль за состоянием мембранны (площадь мембранны, ее толщина); 3) прямое измерение величины проницаемости (измеряется ток ионов и поток меченых соединений через мембрану); 4) высокая чувствительность и точность измеряемых параметров (15%) позволяет регистрировать незначительное изменение проницаемости мембранны в присутствии модификатора; 5) высокая скорость измерения электрических характеристик мембранны и возможность регистрации кинетики мембранных процессов; 6) высокая информативность метода (измерение электрической проводимости мембранны, ее вольтамперной характеристики, селективности, емкости, быстрая смена состава электролита на одной и той же мемbrane и т.д.).

Основные сведения о молекулярном механизме функционирования ПА в мембранны были получены на БЛМ.

БЛМ формировались по способу, впервые описанному Мюллером с соавт. [Mueller et al., 1962, 1963]. Мембранны образовывали на отверстии в тефлоновой ячейке диаметром 0,3 мм и толщиной стенки примерно 30 мкм. Для приготовления мембранны использовали интегральные фосфолипиды и окисленный холестерин [Folch, Lees, 1957; Tien et al., 1966; Keyts, 1986]. Для проведения экспериментов использовались различные по составу мембранные растворы: 1) раствор общих фосфолипидов бычьего мозга в хлороформе с метанолом с исходной концентрацией 50 мг/мл, выделенные по методу Фолч и Лиз [Folch, Lees, 1957]; 2) раствор фосфолипидов, выделенные из митохондрий печени крысы и свиньи, в хлороформе с метанолом с исходной концентрацией 12 мг/мл; 3) раствор окисленного холестерина в декане, полученный по методике Тиена [Tien et al., 1966] с исходной концентрацией 50 мг/мл и чистого холестерина в гептане с исходной концентрацией 10 мг/мл; 4) раствор яичного лецитина фирмы "Merck" ФРГ; 5) раствор общих фосфолипидов, выделенных из бобов соевых семян, с исходной концентрацией 20 мг/мл; 6) раствор чистых фосфолипидов в гептане: фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин фирмы "Serva" (США) с исходной концентрацией 20 мг/мл. Для приготовления мембранны использовали также смеси мембранных растворов с холестерином и его производными в различных соотношениях с фосфолипидами. Стерины были любезно предоставлены Де Гиром (Нидерланды) и Институтом биоорганической химии Российской Академии Наук. Перед началом опыта исходные мембранные фракции путем испарения переводились в раствор гептана или декана, из них затем получались БЛМ.

В экспериментах использованы ПА природного происхождения – нистатин, амфотерицин В, микогептин, леворин А, трихомицин, кандинцидин и их производные, которые были нам любезно предоставлены Рижским заводом медпрепаратов, Ленинградским научно-исследовательским технологическим институтом антибиотиков и ферментов, проф. Боровским Э. из Гданьского политехнического института лаборатории по исследованию химической структуры ПА (Польша). В экспериментах были использованы производные ПА, модифицированные по аминным и карбоксильным группам, и по лактонному кольцу. Полиены растворялись в ДМСО, а затем добавлялись в водный раствор различного солевого состава. В опытах были также использованы водорастворимые препараты антибиотиков: Na-соль амфотерицина В, Na-соль микогептина, Na-соль нистатина и Na-соль леворина. Маточные растворы антибиотиков обновлялись каждую неделю. Это обеспечивало сохранение эффективности ПА и стабильность результатов. Водные растворы, окружающие мембрану, перемешивались с помощью магнитной мешалки. Величина pH изменялась добавлением KOH и CH₃COOH (слабо проникающий анион) в водных растворах нистатина, микогептина, амфотерицина В и его производных, а величина pH водных растворов, содержащих трихомицин, кандинцидин, леворин А и его производные, изменялась добавлением H₂SO₄, KOH и фосфата калия.

Первые исследования интегральной проводимости и измерение мембранныго потенциала проводилось методом сравнения падения напряжения на сопротивлении эквивалента и на мембране [Касумов, 1971]. Сопротивление мембран рассчитывали по формуле:

$$R_m = \frac{U_1 - U_2}{U_2} \cdot R_{экв.}, \quad (3.3.1)$$

где R_m – сопротивление мембраны, R_{экв.} – сопротивление эквивалента (стандартное высокоомное сопротивление известной величины), U₁ – напряжение, подаваемое на мембрану (100 мВ), U₂ – падение напряжения на мембране. Отсюда находится удельная проводимость мембраны:

$$g_m = \frac{1}{R_m \cdot S_m}, \quad (3.3.2)$$

где g_m – удельная проводимость мембраны, S_m – площадь черной мембраны.

Сопротивление мембран регистрировали с помощью усилителя постоянного тока У1-6, а кинетику изменения мембранных потенциала и сопротивления мембран с помощью электронного самописца ЭПП-09 или КСП-4. Температура водного раствора регулировалась с помощью ультратермостата У-1.

Для измерения бионных потенциалов и селективности мембран на градиент соли была разработана методика непрерывной смены раствора электролита с одной стороны мембраны [Поцелуев, 1978; Касумов, 1980]. Схема этого метода изображена на рис. 3.3.1, принцип которого состоит в следующем: концентрация электролита с одной стороны мембраны поддерживается постоянной. С помощью 2-х канального перистальтического насоса изменяли концентрацию электролита с одной стороны мембраны. По первому каналу в кювету подается раствор антибиотика заданной концентрации со скоростью 1,2 мл/мин. С той же скоростью по второму каналу из кюветы откачивается раствор. В течение этого процесса осуществляется непрерывное перемешивание раствора в кювете. Полное перемешивание антибиотика после добавления его в водный раствор происходит в течение ~ 1 с. Это время определялось предварительно при добавлении в раствор электролита – капли чернил. Концентрация электролита в кювете для описанного выше метода изменяется экспоненциально во времени от исходной и стремится к нулю:

$$C = C_{\text{исх.}} e^{-V}, \quad (3.3.3)$$

где V - общий объем жидкости/объем кюветы – число прокаченных объемов через кювету, C – концентрация электролита в кювете (как функция V). Этот метод является достаточно точным, удобным и не сложным для проведения экспериментов с измерением потенциала нулевого тока мембраны в зависимости от градиента концентрации электролита для различных солей. Его преимущества резко выражены при работе с электролитами большой концентрации (3-6 М), когда нет возможности увеличения градиента концентрации на мембране путем добавки с одной из ее сторон концентрированного раствора соли.

Для скачкообразного изменения концентрации электролита по одну сторону мембраны, а также замены одного типа соли на другой (бионная система) использовалось свойство неперемениваемости

двух растворов с различной плотностью. Для изменения условий, окружающих мембрану, использовали метод отмывки антибиотика в градиенте плотности сахарозы. Отмывающий раствор, содержащий 10% сахарозы, подается с помощью перистальтического насоса ко дну кюветы, а исходный раствор синхронно отсасывается сверху. При малой скорости подачи растворы разной плотности не перемешиваются и граница между ними хорошо видна. Момент прохождения границы через мембрану точно фиксируется. Через первый канал перистальтического насоса из кюветы с поверхности раствора откачивается жидкость.

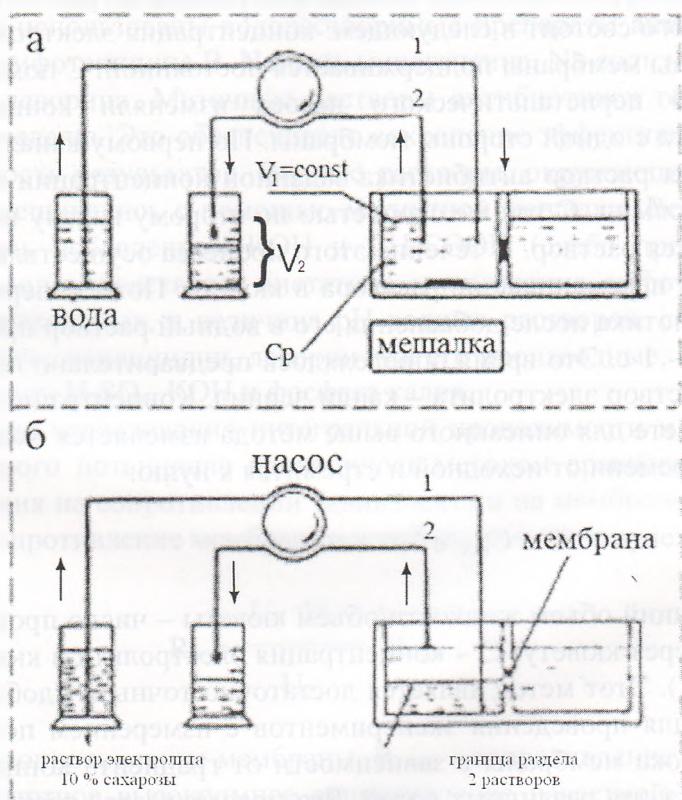


Рис. 3.3.1. Схема синхронной подачи и отмывки растворов, окружающих мембрану [Поцелуев, 1978; Касумов, 1986 a].

С помощью второго канала через трубочку, опущенную на дно кюветы, вливается раствор с другой концентрацией или другим типом электролита, содержащим 10% сахарозы, который имеет большую плотность по сравнению с исходным раствором в кювете. В

этом случае перемешивание в кювете не производится. Граница раздела двух растворов различной плотности перемещается и проходит через мембрану. Таким образом, с одной стороны мембранны скачкообразно меняются условия (концентрация или тип электролита и антибиотика). С другой стороны мембранны условия остаются постоянными. С помощью четырехканального перистальтического насоса можно синхронизировать смену растворов с обеих сторон мембранны и проводить эксперименты на одной мембране. Описанная методика особенно удобна в тех случаях, когда требуется исследовать поведение системы при скачкообразном выходе ее из состояния равновесия. Для характеристики инактивации проводимости мембран, модифицированных антибиотиками различной структуры, т.е. для характеристики ее экспоненциального участка вводится постоянная времени релаксации (τ) – время убывания проводимости в e раз. Такая оценка времени инактивации проводимости достаточно информативна, ввиду независимости этой величины от площади мембранны при прочих фиксированных условиях.

ГЛАВА 4. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ НЕАРОМАТИЧЕСКИХ ПА: НИСТАТИН, АМФОТЕРИЦИН В, МИКОГЕПТИН

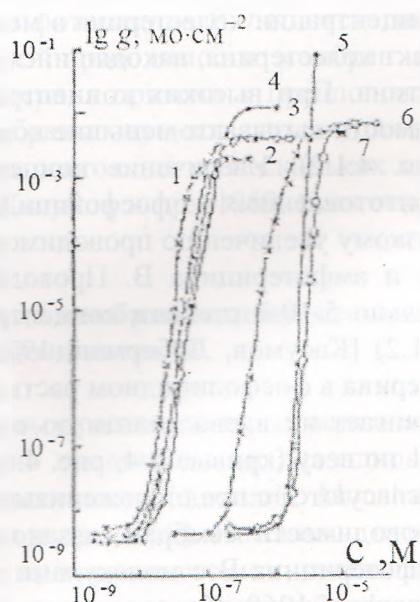
4.1. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации холестерина и антибиотиков

Возможность использования БЛМ для изучения механизма действия полиенов была впервые показана Van Зутфеном и Кинским. [Van Zutphen et al., 1966; Kinsky et al., 1967 с; Kinsky, 1970, 1971]. ПА филипин в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ М уменьшал время жизни (устойчивость) мембран, содержащих эквимолярное количество лецитина и холестерина, до 5 мин, хотя не влиял на время жизни мембран, лишенных холестерина (60 мин). В тех же концентрациях филипин не уменьшал сопротивления бимолекулярных мембран, содержащих холестерин [Andreoli, Monahan, 1968]. Было высказано предположение о том, что взаимодействие филипина с холестерином приводит не к порообразованию, а к разрыву клеточных мембран [De Kruijff, Demel, 1974]. Стехиометрия взаимодействия филипина с холестерином и образование комплекса филипин-холестерин такова, что на одну молекулу филипина приходится одна молекула холестерина. Согласно данному предположению, холестерин гидрофобно взаимодействует с системой двойных связей молекулы филипина внутри бислоя. Возможны два способа ориентации комплекса филипин-холестерин в мемbrane. Согласно первому способу, гидроксильные группы филипина могут располагаться на мембрановодной поверхности, а система двойных связей молекулы филипина, взаимодействуя с холестерином, располагаться параллельно плоскости бислоя. Согласно второму способу, комплекс филипин-холестерин может располагаться перпендикулярно к поверхности бислоя [De Kruijff, Demel, 1974]. При этом гидрофильная сторона молекулы филипина оказывается в гидрофобной части мембранны и взаимодействует с гидрофильной стороной второго комплекса, образуя регулярный ряд комплексов филипин-холестерин. Отсутствие заряженных групп в молекуле филипина дает возможность латеральному перемещению всех комплексов внутри мембранны [De Kruijff, Demel, 1974], что является причиной разрыва мембранны. Однако при детальном исследовании этого антибиотика удалось показать, что филипин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М эффективно увеличивает проводимость

мембран (в 10^{-5} - 10^{-6} раз) [Самедова, 1984; Касумов и др., 1987]. В присутствии филипина мембранны, содержащие холестерин, становятся слабо избирательными для катионов. Потенциал на десятикратный градиент KCl равен +18 мВ. Нарастание проводимости мембран сопровождается суперпозицией дискретных уровней проводимости величиной 10-15 пСм [Самедова, 1984; Касумов и др., 1987].

Нистатин, амфотерицин В и микогептин при концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М в 10^5 - 10^6 раз понижает исходное удельное сопротивление мембран ($1 \cdot 5 \cdot 10^{-8}$ Ом·см 2), приготовленных из общих фосфолипидов бычьего мозга [Finkelstein, Cass, 1968; Касумов и др., 1969; Cass et al., 1970; Касумов, Либерман, 1972; Касумов и др., 1975 а; Singer, 1975] или из общих фосфолипидов эритроцитов овцы [Andreoli, Monahan, 1968; Dennis et al., 1970]. Проводимость мембран растет пропорционально 7-10-й степени концентрации амфотерицина В и нистатина [Finkelstein, Cass, 1968; Касумов и др., 1969; Касумов, Либерман, 1972] и 3-4-й степени концентрации микогептина (кривые 1-6, рис. 4.1.1) [Касумов и др., 1975 в]. Добавка холестерина к фосфолипидам мозга, так же как в случае митохондриальных липидов (см. рис. 4.1.2), понижает сопротивление мембран, увеличивая эффективность действия нистатина.

Рис. 4.1.1. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации нистатина - кривые 1-4, амфотерицина В - кривая 5 и микогептина - кривая 6. Кривая 1 получена на мембранах из фосфолипидов мозга с холестерином в весовом соотношении 20:1, кривая 2 – 10:1, кривая 3 – 4:1, кривая 4 – 2:1, кривая 6 – 3:1. Точки на кривой 4 – крестики (мембрана из окисленного холестерина); кружочки (из смеси холестерина и окисленного холестерина в весовом соотношении 2:1); треугольники (из фосфолипидов мозга с холестерином 2:1). Кривая 5 получена на одной и той же мемbrane из окисленного холестерина. Мембранны образовывались в растворе 10 мМ KCl, pH 6.5, 22°C [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 а].



Нистатин, амфотерицин В и микогептени не увеличивают проводимость мембран, приготовленных из липидов митохондрий печени, содержащих малое количество холестерина (~1% по весу) [Касумов, Либерман, 1972]. Добавление холестерина в липиды митохондрий приводит к резкому увеличению проводимости мембран в 10^4 – 10^5 раз (кривая 1,2, рис. 4.1.2). Эффективность антибиотиков зависит от

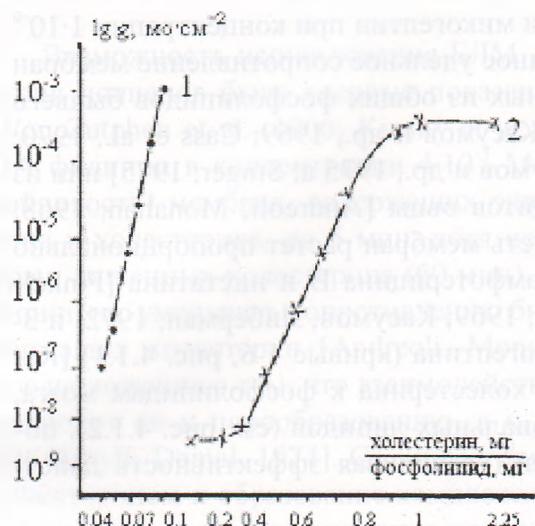


Рис. 4.1.2. Зависимость проводимости бимолекулярных фосфолипидных мембран от весового соотношения холестерин: фосфолипид в растворе гептана (по оси абсцисс указаны весовые соотношения). Мембранные формировались в растворе 10 мМ KCl, pH 6.5, 22°C. Кривая 1 получена при концентрации нистатина в водном растворе $1 \cdot 10^{-6}$ М. Кривая 2 получена при концентрации нистатина $6 \cdot 10^{-6}$ М, 22°C [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 а].

концентрации холестерина в мембранным растворе, так же как и эффект холестерина, находящийся в зависимости от концентрации нистатина. При высоких концентрациях нистатина увеличение проводимости вызывают меньшие концентрации холестерина (кривые 1,2, рис. 4.1.2). Увеличение концентрации холестерина в мембранах, приготовленных из фосфолипидов бычьего мозга, также приводит к резкому увеличению проводимости мембран в присутствии нистатина и амфотерицина В. Проводимость мембран растет пропорционально 5-10-й степени концентрации холестерина (кривая 1,2, рис. 4.1.2) [Касумов, Либерман, 1972]. Увеличение концентрации холестерина в фосфолипидном растворе не меняет угла наклона кривых и сдвигает их влево вплоть до соотношения фосфолипид:холестерин 2:1 по весу (кривые 2-4, рис. 4.1.1). Полученные результаты хорошо согласуются с предположениями ряда авторов о том, что повышение проводимости мембран связано с взаимодействием ПА нистатина и амфотерицина В с молекулами холестерина в мембранах [Andreoli, Monahan, 1968; Касумов и др., 1969; Cass et al., 1970; Dennis et al., 1970; Srivastava et al., 1985]. По нашим данным, как и по данным

Касса и Финкельштейна [Cass et al., 1970], проводимость растет пропорционально 8-10-ой степени концентрации нистатина и амфотерицина В. Однако в работе Андреоли и Монахана [Andreoli, Monahan, 1968] наблюдалась пропорциональность 4-5-ой степени концентрации антибиотика. Это различие, по-видимому, связано с эффектом растворителя – метанола и будет обсуждаться ниже. Увеличение концентрации холестерина выше некоторого предела (весовое соотношение фосфолипид:холестерин 1:1) не приводит к дальнейшему повышению эффективности нистатина (см. рис. 4.1.1, кривая 4 и рис. 4.1.2, кривая 2). На кривой 1, рис. 4.1.2, этот предел не достигнут из-за трудности измерения в наших условиях очень низких сопротивлений. Зависимость проводимости от концентрации нистатина для мембран из окисленного холестерина такая же, как на рис. 4.1.1 (кривая 4). Мембранны, полученные из смеси холестерина и окисленного холестерина, имеют такое же сопротивление, как и мембранны из окисленного холестерина (рис. 4.1.1, кривая 4). Кривая 5 на рис. 4.1.1 показывает зависимость проводимости мембран из окисленного холестерина от концентрации амфотерицина В. Угол наклона кривой зависимости проводимости мембран от концентрации амфотерицина В совпадает с кривыми, полученными для нистатина (рис. 4.1.1, кривые 1-4). Зависимость проводимости мембран от концентрации холестерина и антибиотиков представляет собой степенную функцию с показателем степени п равным: для холестерина 5-10 (рис. 4.1.2) и для антибиотиков - микогептина 4, амфотерицина В 7-8, нистатина 8-10 (рис. 4.1.1). Крутые зависимости проводимости мембран от концентрации антибиотиков и холестерина привели к предположению, что транспорт ионов через мембранны осуществляется с помощью многомолекулярных комплексов, состоящих из нескольких молекул антибиотиков и холестерина [Касумов и др., 1969; Cass et al., 1970; Касумов, 1971].

4.2. Избирательная проницаемость мембран в присутствии неароматических антибиотиков

Бимолекулярные мембранны в водных растворах нистатина и амфотерицина В оказались избирательно проницаемыми для одновалентных анионов по сравнению с катионами [Andreoli, Monahan, 1968; Finkelstein, Cass, 1968; Касумов и др., 1969]. Потенциал нулевого тока на десятикратный градиент проникающего иона составляет 36-40 мВ. Величина потенциала указывает на неполную избиратель-

ность мембран для анионов. У микогептана избирательность значительно хуже [Касумов и др., 1975 в].

Оценка избирательной проницаемости мембран для галогенов была сделана путем измерения бионных потенциалов и зависимости проводимости мембран от концентрации проникающих ионов. В таблице 4.2.1 приведены значения бионных потенциалов в присутствии нистатина и амфотерицина В. Результаты показывают, что

Таблица 4.2.1.

**Бионные потенциалы на мембранах из окисленного холестерина
в присутствии ПА при разных концентрациях электролитов
(по отношению KCl) 22°C [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 а].**

Антибиотик	Концентрация иона, М	Анионы							Ряды проницаемости
		Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	F ⁻	NO ₃ ⁻	C ₂ H ₃ O ₂ ⁻	SO ₄ ²⁻	
Нистатин 5·10 ⁻⁷ М	1·10 ⁻²	0	+7±1	+19±2	+25±2	-	-	-	Cl ⁻ >Br ⁻ >I ⁻ >F ⁻
	1·10 ⁻¹	0	+4±1	+8±1	+14±2	-	-	-	Cl ⁻ >Br ⁻ >I ⁻ >F ⁻
Нистатин 4·10 ⁻⁶ М	1·10 ⁻²	0	+2±1	+2±1	+2±1	-1±1	+30±3	+48±4	NO ₃ ⁻ >Cl ⁻ >Br ⁻ > >I ⁻ >F ⁻ > >C ₂ H ₃ O ₂ ⁻ > >SO ₄ ²⁻
	1·10 ⁻¹	0	+2±1	+2±1	+4±1	-4±1	+30±3	+48±4	NO ₃ ⁻ >Cl ⁻ > >Br ⁻ >I ⁻ >F ⁻ > >C ₂ H ₃ O ₂ ⁻ > >SO ₄ ²⁻
Амфотерицин В 3·10 ⁻⁸ М	1·10 ⁻²	0	+11±1	+15±1	+22±2	-	-	-	Cl ⁻ >Br ⁻ >I ⁻ >F ⁻
	1·10 ⁻¹	0	+6±1	+10±1	+15±2	-	-	-	Cl ⁻ >Br ⁻ >I ⁻ >F ⁻
	2	0	-	-	-	-20±2	-	-	NO ₃ ⁻ >Cl ⁻

мембранны обладают избирательной проницаемостью для солей галогенов в ряду: Cl⁻ > Br⁻ > I⁻ > F⁻. Двухвалентные анионы не проникают через мембранны, модифицированные неароматическими ПА. Зависимость проводимости мембранны от концентрации проникающих анионов при фиксированной концентрации антибиотиков также позволяет качественно сравнить проницаемость мембранны для Cl⁻, I⁻, F⁻, Br⁻. Как следует из рис. 4.2.1 а в присутствии нистатина лучше всего проникает Cl⁻, затем I⁻ и F⁻, а в присутствии амфотерицина В получается следующий ряд проницаемости: Cl⁻ > Br⁻ > F⁻ (рис. 4.2.1 б). На рис 4.2.1 в показана зависимость величины разности потенциалов при десятикратном трансмембранным градиенте галогенов Cl⁻, Br⁻, F⁻ от концентрации их солей. Полученный ряд проницаемости для галогенов говорит о том, что избирательность определяется не только размерами гидратных оболочек анионов, но и их кристаллическими

ским радиусом [Касумов, Либерман, 1972]. Ряды проницаемости, полученные из опытов с биоинными потенциалами и из зависимостей проводимости мембран от концентрации проникающего иона, совпадают.

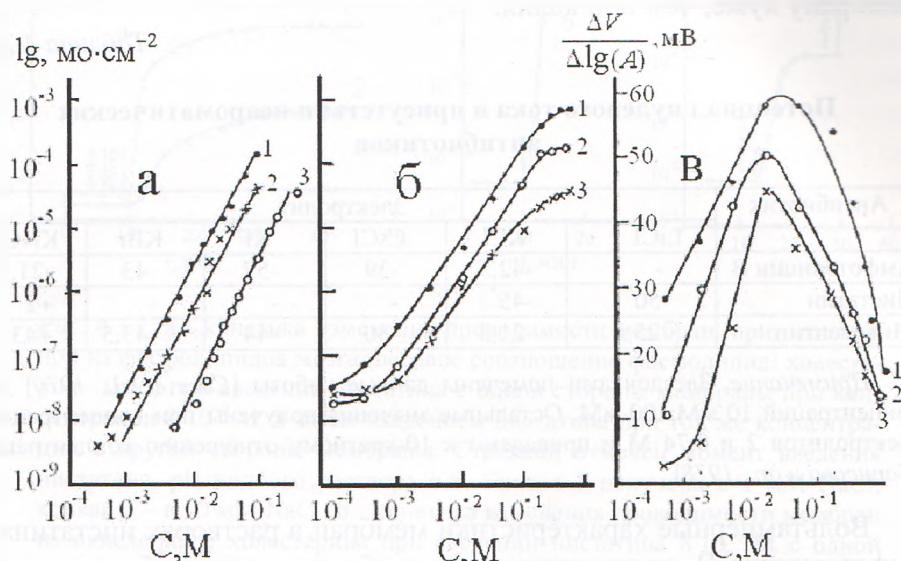


Рис. 4.2.1. а – зависимость проводимости бимолекулярных фосфолипидных мембран при весовом отношении холестерин:фосфолипид=0.4 от концентрации солей галогенов в присутствии $3 \cdot 10^{-6}$ М нистатина: 1 - Cl^- , 2 - I^- , 3 - F^- , pH 6.5; б – зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации солей галогенов в присутствии $3 \cdot 10^{-8}$ М амфотерицина В: 1 - Cl^- , 2 - Br^- , 3 - F^- . Каждая кривая получена на одной мемbrane из окисленного холестерина; в – зависимость разности потенциалов при десятикратном трансмембранным градиенте галогенов от их концентрации при pH 6.5 в присутствии $3 \cdot 10^{-8}$ М амфотерицина В. 1- Cl^- , 2- Br^- , 3- F^- . Каждая кривая получена на одной мемbrane из окисленного холестерина, $t=22^\circ\text{C}$ [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 а].

Избирательность БЛМ для ионов в присутствии антибиотиков с обеих сторон мембранны преимущественно, но не идеально, анионселективная. Так при отношении концентраций KCl с двух сторон мембранны, равном десяти, идеально селективная мембрана должна давать 58 мВ [Лев, 1976]. В опыте на мембранных с амфотерицином В и нистатином получается примерно 48-50 мВ.

В таблице 4.2.2 приведены значения потенциалов нулевого тока в присутствии неароматических антибиотиков, полученные на мембранных с высокой проводимостью, в растворах различных электролитов при отношении концентрации соли в двух водных растворах

1:10. Видно, что через мембрану с амфотерицином В и нистатином анионы проходят лучше, чем катионы. Анионная селективность мембран с микогептином значительно хуже. В KNO_3 наблюдается даже положительный потенциал, т.е. анион нитрата проходит через мембрану хуже, чем ион калия.

Таблица 4.2.2.

Потенциал нулевого тока в присутствии неароматических антибиотиков

Антибиотик	Электролит					
	LiCl	KCl	CsCl	KF	KBr	KNO_3
Амфотерицин В	-	-42,5	-39	-57	-43	-21,5
Нистатин	-50*	-45*	-	-	-	+2
Микогептин	-25,5	-21,5	-30	-44	-43,5	+43

Примечание. Звездочками помечены данные работы [Cass *et al.*, 1970] для концентраций 10 мМ:100 мМ. Остальные значения получены при концентрациях электролитов 2 и 0,74 М и приведены к 10-кратному отношению концентраций [Борисова и др., 1978].

Вольтамперные характеристики мембран в растворах нистатина и амфотерицина В, присутствующие по обе стороны мембранны в одинаковых концентрациях, симметричны, но не линейны. Градиент концентрации проникающего иона создает на мембране разность потенциалов и обычную выпрямляющую характеристику. Проводимость мембраны больше, если ток идет через мембрану со стороны большей концентрации проникающего иона [Касумов, Либерман, 1972].

4.3. Особенности изменения проводимости мембран неароматическими ПА

Действие нистатина, амфотерицина В и микогептина на проводимость бимолекулярных мембран имеет ряд особенностей, отличающихся их от действия других модификаторов мембранный проницаемости. В растворе, содержащем 10 мМ NaCl , при добавлении $8 \cdot 10^{-6}$ М нистатина с обеих сторон сопротивление мембраны из липидов мозга падает на 4-5 порядков. Если нистатин в той же концентрации добавляется только с одной стороны, то это никак не влияет на сопротивление мембраны, по крайней мере, за время длительности опыта (~ 1 ч). Добавление нистатина в той же концентрации с другой стороны мембраны приводит к падению сопротивления (рис. 4.3.1 *a*). Взаимодействие нистатина с мембраной происходит не сразу,

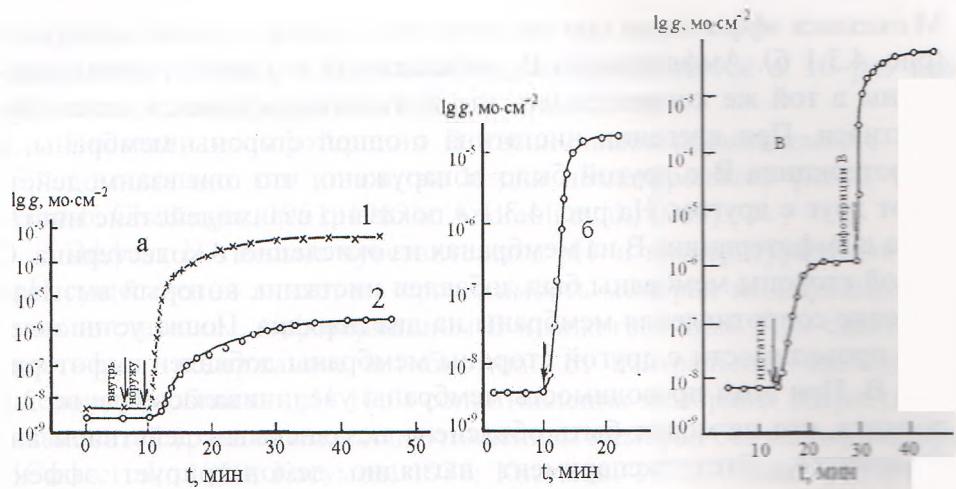


Рис. 4.3.1. а - кинетика изменения проводимости мембран, приготовленной из фосфолипидов мозга (весовое соотношение фосфолипид: холестерин - 0.06) при введении нистатина с одной стороны мембраны при концентрации $8 \cdot 10^{-6}$ М, а затем введением нистатина при той же концентрации с другой стороны мембраны. Стрелкой отмечен момент введения нистатина. pH водного раствора 6,5. Кривая 1 получена в 1 мМ NaCl , кривая 2 – в 10 мМ NaCl ; б - кинетика изменения проводимости мембран из окисленного холестерина при введении нистатина $8 \cdot 10^{-6}$ М с одной стороны мембраны в растворе 10 мМ NaCl , pH 6,5; в - кинетика изменения проводимости мембран из окисленного холестерина при введении нистатина $2 \cdot 10^{-6}$ М с одной стороны и $1.5 \cdot 10^{-7}$ М амфотерицина В с другой стороны мембраны в растворе 10 мМ NaCl , pH 6,5, 22°С [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 а].

а постепенно, в течение нескольких десятков минут, что видно по медленному падению сопротивления (рис. 4.3.1 а). Этот эффект не может быть объяснен скоростью перемешивания растворов. По скорости установления потенциала при создании градиента концентрации проникающего иона видно, что время перемешивания электролита в водном растворе не более 1 мин. Увеличение концентрации проникающих ионов в растворе уменьшает время установления проводимости при добавке одного и того же количества нистатина с обеих сторон мембранны (рис. 4.3.1 а, кривая 1). На мембранных из фосфолипидов мозга амфотерицин В, так же как и нистатин, неэффективен при добавлении только с одной стороны мембранны. Эффект резкого увеличения проводимости наблюдается только при симметричном введении амфотерицина В к мембранны. На мембранных из окисленного холестерина нистатин при концентрации $8 \cdot 10^{-6}$

М оказался эффективен при введении его с одной стороны мембранны (рис. 4.3.1 б). Амфотерицин В, добавленный с одной стороны мембранны в той же концентрации, что и нистатин, оказался менее эффективен. При введении нистатина с одной стороны мембранны, а амфотерицина В с другой было обнаружено, что они взаимодействуют друг с другом. На рис. 4.3.1 в показано взаимодействие нистатина и амфотерицина В на мембранах из окисленного холестерина. С одной стороны мембранны был добавлен нистатин, который вызывал падение сопротивления мембранны на два порядка. После установления проводимости с другой стороны мембранны добавлен амфотерицин В. При этом проводимость мембранны увеличивалась еще на 3.5 порядка, что не может быть объяснено независимым действием антибиотиков. Этот эксперимент наглядно демонстрирует эффект взаимодействия нистатина и амфотерицина В, в результате которого увеличивается проводимость мембран для ионов. Амфотерицин В в концентрации до $1 \cdot 10^{-4}$ М практически не увеличивает проводимость, когда находится в водном растворе с одной стороны мембранны. Однако введение амфотерицина В в водные растворы в значительно меньших концентрациях (10^{-7} М) с обеих сторон проводит к резкому нарастанию проводимости.

Нистатин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М также не действует на проводимость фосфолипидных мембран с холестерином, когда находится с одной стороны мембранны. Добавление нистатина в той же концентрации с другой стороны мембранны приводит к быстрому нарастанию проводимости. Аналогичный эффект возникает и в том случае, когда по обе стороны мембранны вводятся разные антибиотики (амфотерицин В – нистатин; микогептин – нистатин; амфотерицин В – микогептин; нистатин – филипин) [Касумов, Либерман, 1972; Самедова, 1984]. Эти данные свидетельствуют о том, что ионная проницаемость, индуцируемая неароматическими антибиотиками, по всей вероятности, обусловлена взаимодействием двух многомолекулярных комплексов, собирающихся по разные стороны мембранны из молекул антибиотиков и холестерина [Касумов, 1971 а, б; Касумов, Либерман, 1972; Kasumov, Liberman, 1972].

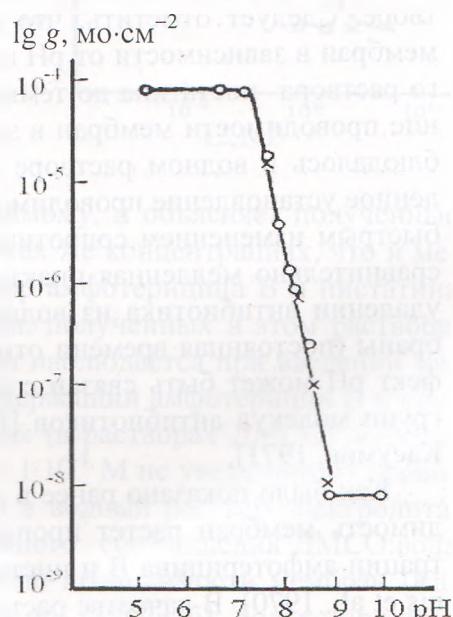
Проводимость, индуцированная ПА, достигает своего стационарного уровня за время от десятков минут до 2-3 ч. Впервые кинетика проводимости в присутствии амфотерицина В была изучена Кассом и соавт. [Cass et al., 1970]. Они показали, что рост проводимости происходит по экспоненте, $g(t)=g_s(I-e^{-kT})$. При удалении антибиотика из примембранного раствора е-кратное убывание проводимости

составляет более 2-х ч. Эта величина уменьшается в 10 раз при изменении температуры на 10°C .

Нистатин и амфотерицин В увеличивают проницаемость мембран не только для ионов, но и для нейтролитов [Ross, 1959; Ghosh, Chatterjee, 1961, 1963 a; Andreoli et al., 1969].

Эффект ПА весьма чувствителен к pH и температуре. Величина pH существенно влияет на проводимость мембран модифицированных нистатином, амфотерицином В и микогептином. При сдвиге pH растворов, содержащих антибиотики, от нейтральных значений в щелочную область (pH 10,0) сопротивление мембраны возрастает и становится сравнимым с сопротивлением мембран без модификатора [Cass et al., 1970; Касумов, 1971; Касумов, 1972]. Сдвиг pH в нейтральную сторону возвращал проводимость мембранны на прежний уровень (рис. 4.3.2). Изменение проводимости мембраны происходило в диапазоне pH от 7,0 до 9,0. Каждому значению pH соответствовало одно и то же значение проводимости мембранны, независимо от того

Рис. 4.3.2. Зависимость проводимости бимолекулярных фосфолипидных мембран от pH при постоянной концентрации $8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ нистатина в водном растворе 10 mM KCl и $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ три-CH₃COOH, 22°C . Мембранны формировались из раствора, содержащего холестерин:фосфолипид-0,06 [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 a].



в какую сторону сдвигался pH. При сдвиге pH только с одной стороны мембранны от значения 6,5 до 10,2 проводимость мембранны также уменьшалась. Изменение pH до 6,5 восстанавливало проводимость мембранны [Касумов, Либерман, 1972]. Этот эффект полностью обратим. Эффект температурной инактивации также полностью обратим. Касс и соавторы считают, что при повышении температуры

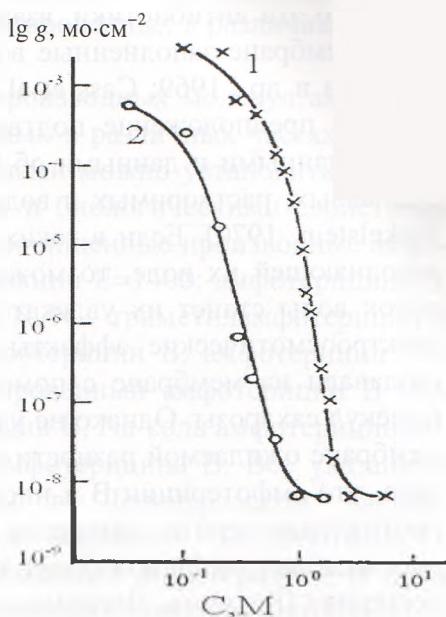
происходит «плавление» проводящих структур [Cass et al., 1970]. Однако Деннисом и др. было показано, что эффект pH связан с обратимым изменением заряда его полярных групп [Dennis et al., 1970].

Если мембрану приготавляли в щелочном растворе при pH 9-10, то ее проводимость была очень низкой и не менялась при сдвиге pH с одной стороны до значения pH 6.5. Повышение pH с одной стороны приблизительно так же увеличивает сопротивление мембраны, как и его повышение с двух сторон. Наличие градиента pH на мембране не приводит к возникновению заметной разности потенциалов (не более 5 мВ). По-видимому, это связано с наличием в растворе достаточно большой концентрации KCl. Эффект pH полностью обратим. Обратимость изменения сопротивления мембраны с изменением pH показывает, что рост сопротивления не связан с разложением антибиотиков в растворах. Обратимый эффект pH связан, по-видимому, с потерей заряда на аминных и карбоксильных группах антибиотиков. Эффект pH не может быть объяснен ни обратимым отщеплением антибиотика от мембраны, ни его инактивацией в растворе. Следует отметить, что обратимое изменение проводимости мембран в зависимости от pH наблюдалось и при нагревании водного раствора нистатина до температуры 37-40°C. Обратимое изменение проводимости мембран в зависимости от pH и температуры наблюдалось в водном растворе амфотерицина В и нистатина. Медленное установление проводимости мембран (~2-3 ч) по сравнению с быстрым изменением сопротивления мембран при изменении pH и сравнительно медленная инактивация проводимости мембраны при удалении антибиотика из водного раствора с одной стороны мембранны (постоянная времени отмычки ~ 90 мин) показывает, что эффект pH может быть связан с потерей одного из зарядов полярных групп молекул антибиотиков [Dennis et al., 1969; Cass et al., 1970; Касумов, 1971].

Как было показано ранее в работах Андреоли и Денниса, проводимость мембран растет пропорционально 4-5-ой степени концентрации амфотерицина В и нистатина [Andreoli, Monahan, 1968; Dennis et al., 1970]. В качестве растворителя амфотерицина В и нистатина авторы использовали раствор метанола. Сравнение величин проводимостей мембран показало, что проводимость мембран в этих экспериментах приблизительно на два порядка ниже, чем в наших. С целью выяснения расхождения данных изучено влияние добавок метанола в водную фазу, содержащую амфотерицин В и нистатин, на проводимость мембран. Увеличение концентрации метанола в рас-

тврое снижает эффективное действие амфотерицина В и нистатина на проводимость мембран и повышает ее сопротивление вплоть до величины сопротивления немодифицированных мембран (рис. 4.3.3).

Рис. 4.3.3. Зависимость проводимости мембран и окисленного холестерина от концентрации метанола в присутствии $1.3 \cdot 10^{-6}$ М нистатина, (кривая 1) и $1 \cdot 10^{-7}$ М амфотерицина В (кривая 2). Водный раствор содержит 10 мМ KCl, pH 6.5, 22°C [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 а].



Такой эффект метанола, по-видимому, и объясняет полученные расхождения. Добавление ДМСО в тех же концентрациях, что и метанола (по объему) в водный раствор амфотерицина В и нистатина не влияло на проводимость мембран, полученных в этом растворе. Инактивация проводимости мембран наблюдается при введении метанола (1 мМ) в водный раствор, содержащий амфотерицин В и нистатин. Однако, в неводных растворах (в растворах ДМСО) амфотерицин В и нистатин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М не увеличивают проводимость мембран. Введение ДМСО в водный раствор электролита, содержащего 100 мМ KCl, до объемного соотношения ДМСО:вода 10:1 также не приводит к увеличению проводимости мембран [Касумов, Шишлов, 1974; Ибрагимова и др., 2002 а, б]. Только при объемном соотношении ДМСО: вода (1:1) проводимость мембран резко увеличивается [Касумов, Шишлов, 1974; Ибрагимова и др., 2002 а, б]. Полученные результаты приводят к предположению о том, что мембранныя активность ПА связана с образованием ими в водных растворах комплексов (мицелл), состоящих из нескольких молекул антибиотика. Эти комплексы затем включаются в липидный бислой,

образуя проводящие структуры [Kirschbaum, Kahn, 1967; Schaffner, Mechlinski, 1972; Касумов, Шишлов, 1974].

Резкая зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В и нистатина привела многих авторов к предположению, что эти антибиотики, взаимодействуя с холестерином, образуют в мембране заполненные водой поры [Andreoli, Monahan, 1968; Касумов и др., 1969; Cass et al., 1970; Dennis et al., 1970]. Кажется, что это предположение подтверждается электронномикроскопическими данными и данными об увеличении проницаемости мембран для малых, растворимых в воде молекул [Kinsky et al., 1966; Holz, Finkelstein, 1970]. Если в таких порах анионы движутся свободно в заполняющей их воде, то можно было ожидать, что осмотический поток воды станет их увлекать и на мемbrane будут наблюдаться электроосмотические эффекты. Градиент осмотического давления создавали на мембране с помощью практически не проникающих молекул сахарозы. Однако не удалось обнаружить возникновения на мембране ожидаемой разности потенциалов. Более того, было показано, что амфотерицин В и нистатин резко понижают не только сопротивление черных липидных мембран, но и сопротивление цветных мембран толщиной более 1000 Å с высокой концентрацией холестерина [Касумов, Либерман, 1972]. Этот факт очень трудно объяснить исходя из гипотезы о формировании в мембране заполненных водой пор.

Исследовано взаимодействие нистатина с мембранами из окисленного холестерина и определена стехиометрия молекул антибиотиков в порах [Moreno-Bello et al., 1988]. Показано образование нистатиновых пор с различным числом молекул нистатина в проводящем комплексе, равное 4, 6, 9 и 12 молекулам в поре. Формирование пор показано также и в присутствии других ПА. Так, изучая взаимодействие люцензомицина (этрускомицина) с холестерином в мембранах, был сделан вывод о возможности самоассоциации люцензомицина в бислоях и о формировании им водных пор в комплексе с холестерином [Caruozzo, Bolard., 1985].

4.4. Исследование взаимодействия производных амфотерицина В с БЛМ

Амфотерицин В по своему химическому строению является макроциклическим лактоном, принадлежащим к подгруппе неароматических гептаенов [Шемякин, 1961]. Сопряженная система двойных

связей, лактон, гидрофильная цепь, кислотные и основные функциональные группы являются важными элементами, определяющими биологическую активность антибиотиков. Большую информацию о функциях этих элементов можно получить, исследуя интегральные характеристики липидных мембран в присутствии природных ПА и их производных, химически модифицированных в различных частях молекулы.

Исследуя действие различных производных молекул амфотерицина В, химически модифицированных в различных частях лактонного кольца, с бислойными мембранами можно установить взаимосвязь между химическим строением и биологическими свойствами молекул ПА. Использовались высокоочищенные производные амфотерицина В с коэффициентом экстинкции $E=1400$: амфотерицина В, метилированный амфотерицин В, N, N, N, - триметиламфотерицин В (метамфоцин), метиловый эфир амфотерицина В, амфотерицин В с разрывом лактонного кольца, гидрированный амфотерицин В (без двойных связей), N-ацетиламфотерицин В, Na-соль амфотерицина В, а также алкильные производные амфотерицина В. Все указанные антибиотики были синтезированы в Ленинградском научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов. Индивидуальность производных амфотерицина В была доказана методами УФ и ИК спектроскопии, потенциометрического титрования, противоточного распределения в ряде систем растворителей при 100, 200, 600 переносах, элементарным анализом и изучением растворимости препаратов [Этингов и др., 1972; Филиппова, Шенин, 1974; Вайнштейн и др., 1982].

Биологическая активность антибиотиков изучалась методами диффузии в агар и серийных разведений с тест микробом – *Torula utilis*. Все производные, кроме водорастворимого Na-соли амфотерицина В, растворялись в ДМСО, а затем добавлялись в водный раствор электролита.

Производные амфотерицина В, как и исходный амфотерицин, специфичны к холестерину. Они практически не увеличивают проводимость липидных мембран, полученных из яичного лецитина, фосфатидилсерина и общих фосфолипидов бычьего мозга, очищенных от холестерина. Антибиотики эффективны только на тех мембранах, в составе которых содержится холестерин. Антибиотики также эффективны на мембранах из чистого холестерина, окисленного холестерина и в смеси фосфолипидов с эргостерином, когда вводятся в водные солевые растворы с обеих сторон мембранны.

Бимолекулярные мембранные, полученные из окисленного холестерина, имеют низкую проводимость в отсутствие антибиотиков. Введение антибиотиков в водный раствор с обеих сторон мембранные приводит к резкому увеличению проводимости в 10^6 - 10^7 раз, рис. 4.4.1. Проводимость мембран растет пропорционально 5-10-ой степени концентрации антибиотиков и холестерина. Угол наклона кривых не зависит от концентрации холестерина и вида фосфолипидов. Из этих данных следует, что ионная проницаемость, индуцируемая производными, обусловлена образованием в мембране мультимолекулярных комплексов, состоящих из нескольких молекул антибиотика и холестерина [Касумов и др., 1974; Ибрагимова и др., 2002 б].

В присутствии производных амфотерицина В мембранные избирательно проницаются для моновалентных анионов. Потенциал на десятикратный градиент KCl в присутствии производных амфотерицина В равнялся 42-44 мВ. Потенциал нулевого тока на градиент KCl (2 М-0,735 М) составляет величину $E_0=18\pm2$ мВ и не отличается от исходного амфотерицина В. Знак потенциала соответствует лучшей проницаемости для ионов Cl^- , чем для ионов K^+ [Касумов, 1972, 1980]

Как видно из рис. 4.4.1 производные амфотерицина В по-разному эффективны в увеличении проводимости мембранных. Метиловый эфир амфотерицина В, амфотерицин В с раскрытым лактоном, гидрированный (без двойных связей) амфотерицин В и N-ацетил амфотерицин В увеличивают проводимость мембранных при концентрациях в 10-100 раз больших, чем исходный амфотерицин В. Нельзя считать, что это отличие связано с примесью амфотерицина В в составе полученных производных, так как эти производные дают другую зависимость проводимости мембранных от концентрации антибиотиков, pH водного раствора и действия метанола. Как видно из рис. 4.4.1 при постепенном увеличении концентрации антибиотика в водном растворе проводимость мембранных из окисленного холестерина растет пропорционально 10-ой степени концентрации N-ацетиламфотерицина В – кривая 6 и 15-ой степени гидрированного (без двойных связей) амфотерицина В, кривая 5. Ряд производных амфотерицина В дает рост проводимости мембранных, пропорциональный 7-8-ой степени их концентрации, как и для исходного амфотерицина В - кривые 1,2,3,7. Следует обратить внимание на то, что наклон кривых зависит не только от вида антибиотика, но и от растворителя. Это хорошо видно на примере Na-соли амфотерицина В. Если сравнить кривые 3

и 4 на рис. 4.4.1, то обнаружится, что непосредственное введение в раствор водорастворимой Na-соли амфотерицина В дает зависимость проводимости, пропорциональную 5-ой степени его концентрации – кривая 4, по сравнению с Na-солью амфотерицина В, введенной в ДМСО – кривая 3. По-видимому, вид растворителя во многом определяет характер зависимости проводимости мембран от концентрации антибиотиков [Касумов и др., 1973].

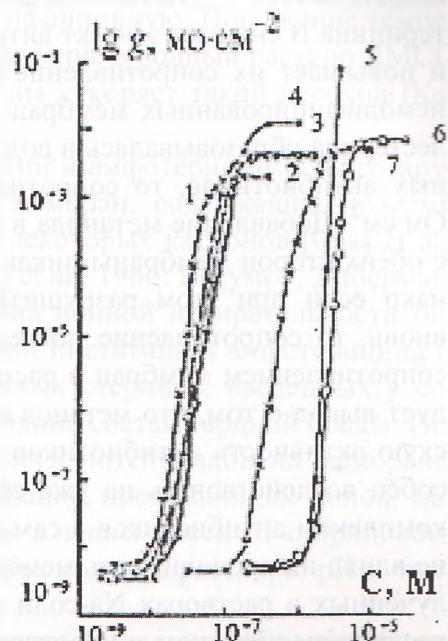


Рис. 4.4.1. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран из окисленного холестерина от концентрации амфотерицина В и его производных в растворе 10 мМ KCl при pH 6,5, 22⁰C. 1-амфотерицин В, 2 - метилированный амфотерицин В, 3- Na-соль амфотерицина В, растворенная в ДМСО, 4 - водорастворимая Na-соль амфотерицина В, 5 - гидрированный (без двойных связей) амфотерицин В, 6 – N-ацетил амфотерицин В, 7 – амфотерицин В с разрывом лактонного кольца [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 а].

При увеличении pH водного раствора, содержащего производные амфотерицина В, сопротивление мембраны возрастало до значения, примерно соответствующего раствору без антибиотика. Сдвиг pH в нейтральную сторону возвращал сопротивление на прежний уровень. Изменение сопротивления мембраны происходило в сравнительно узком диапазоне pH. Каждому значению pH соответствовало одно и то же значение сопротивления мембран независимо от того, в какую сторону сдвигался pH. Обратимость изменения сопротивления мембран с изменением pH доказывает, что рост сопротивления не связан с разложением антибиотика в растворе, другими словами, с потерей его биологической активности. Этот рост, по-видимому, объясняется потерей положительного заряда аминогруппы в молекулах антибиотиков [Cass et al., 1970; Касумов, Либерман, 1972;

Касумов и др., 1973]. Действительно, только производное амфотерицина В - метамфоцин эффективно понижает сопротивление мембран в любом диапазоне pH от 4.0 до 11.0. Метамфоцин сохраняет положительный заряд на аминогруппе сахара при высоких значениях pH. Эти эффекты будут объяснены при описании свойств ионных каналов в присутствии производных амфотерицина В.

Увеличение концентрации метанола до 2 M в водных растворах амфотерицина В, N-ацетиламфотерицина В и гидрированного амфотерицина В снижает эффект антибиотиков на проводимость мембран и повышает их сопротивление вплоть до величины сопротивления немодифицированных мембран. Если мембрана из окисленного холестерина образовывалась в водном растворе одного из вышеуказанных антибиотиков, то сопротивление ее было очень низким $2 \cdot 10^3$ Ом·см². Добавление метанола в концентрации 2 M в водный раствор с обеих сторон мембранны никак не влияло на ее сопротивление. Однако если при этом разрушить мембрану, а затем образовать ее вновь, то сопротивление последующих мембран будет сравнимо с сопротивлением мембран в растворах без антибиотика. Отсюда следует вывод о том, что метанол способен инактивировать биологическую активность антибиотиков только в водном растворе и не способен воздействовать на уже сформировавшиеся проводящие ионы комплексы антибиотиков в самой мембране. В то же время метанол не влиял на проводимость мембран из окисленного холестерина, полученных в растворах Na-соли амфотерицина В, амфотерицина В с раскрытым лактоном и производного амфотерицина В-метамфоцина [Касумов, Либерман, 1972].

Резюмируя полученные выше данные, можно сказать, что исследованные антибиотики по разному эффективны в увеличении проводимости мембран. Разрыв двойных связей, разрыв лактонного кольца и потеря положительного заряда в молекулах антибиотиков резко снижает их эффект. В увеличении проводимости бислойных мембран антибиотики можно расположить в следующий ряд в порядке уменьшения их мембранный активности: амфотерицин В > Na-соль амфотерицина В (в растворе ДМСО) > водорастворимая Na-соль амфотерицина В > метамфоцин > амфотерицин В с раскрытым лактоном > гидрированный амфотерицин В > N-ацетиламфотерицин В. В такой же ряд располагаются антибиотики и по своей биологической активности [Касумов, 1986 а].

4.5. Исследование катионной избирательности бимолекулярных мембран с эргостерином и 7-дегидрохолестерином в присутствии нистатина, амфотерицина В и его производных, Na-соли микогептина

Липидные мембранные, содержащие в своем составе эргостерин или 7-дегидрохолестерин, оказались избирательно проницаемы для катионов щелочных металлов в водных растворах нистатина и амфотерицина В. Избирательность мембран спонтанно в течение десятков минут меняется с катионной на анионную. Понижение температуры, увеличение pH среды или введение в водный раствор ДМСО тормозит, а добавление ионов кальция ускоряет такой переход [Касумов и др., 1975 а].

Выше было показано, что нистатин и амфотерицин В индуцируют избирательную проницаемость мембран, содержащих холестерин, для одновалентных анионов и некоторых катионов [Cass et al., 1970; Dennis et al., 1970; Van Zutphen et al., 1966; Касумов, Либерман, 1972]. С целью выяснения механизма ионной избирательности бимолекулярных мембран в присутствии нистатина и амфотерицина В важно было изучить эффект различных стеринов, введенных в состав фосфолипидных мембран, и влияние состава водной среды. Исследования величины и знака разности потенциалов на мемbrane, обусловленной градиентом концентрации проникающих ионов, показали, что эти параметры меняются в зависимости от стеринового компонента мембран, солевого состава водного раствора, pH и температуры среды.

Если при нейтральном или щелочном значении pH раствора, содержащий KCl и PA, создать 10-кратный градиент концентрации проникающего иона, то на мембранах, сформированных из фосфолипидов мозга с эргостерином или 7-дегидрохолестерином, сразу возникает разность потенциалов величиной ~ 50 мВ, знак которой соответствует избирательной проницаемости для ионов K^+ , рис.4.5.1, кривые 2 и 3. Возникшая разность потенциалов медленно, в течение ~ 10-20 мин, уменьшается и меняет знак на противоположный (25-30 мВ), рис. 4.5.1, кривая 2. Если же мембрану, после ее образования, выдержать 10-20 мин, а затем создать градиент KCl, то сразу возникает анионный потенциал, рис. 4.5.1, кривая 1.

В кислых растворах (pH 3.0) сразу возникает анионный потенциал. Аналогичное явление наблюдается в растворах хлоридов других щелочных металлов (Li^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+). Сопротивление мембран в

растворе KCl при фиксированном значении ПА в кислой области pH монотонно падает со временем, рис. 4.5.2, кривая 1, а в нейтральной и щелочной pH – сначала падает, а затем растет в 1.5-2.0 раза, рис. 4.5.2, кривые 2 и 3.

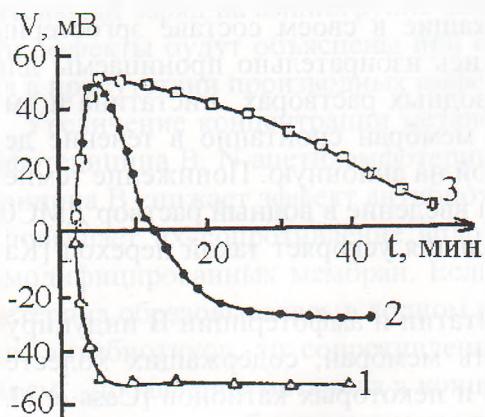


Рис. 4.5.1. Кинетика изменения мембранный потенциала при различных значениях pH. Мембранный раствор содержит 25 мг фосфолипидов мозга и 2.5 мг эргостерина в 1 мл декана. Состав водного раствора: $5 \cdot 10^{-8}$ М амфотерицина В, $5 \cdot 10^{-4}$ М K_2HPO_4 , $t=23^\circ C$. Градиент создавали с помощью KCl: 100 мМ:10 мМ. Кривая 1 получена при pH 3.0, кривая 2 при pH 6.0, кривая 3 при pH 9.0. Положительное значение потенциала соответствует катионной избирательности [Касумов, Либерман, 1975; Касумов, 1986 а].

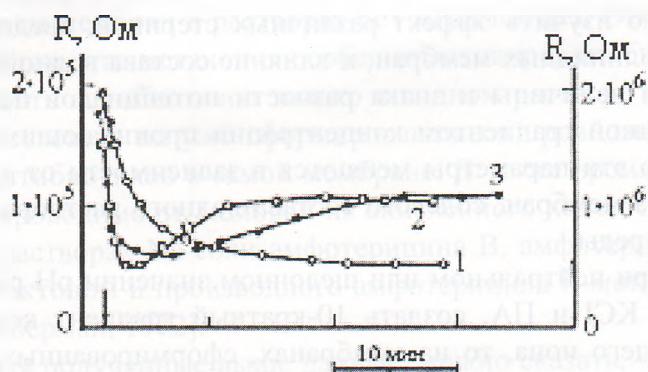
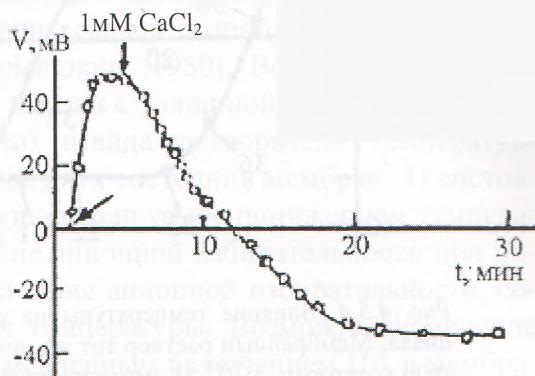


Рис. 4.5.2. Кинетика изменения сопротивления мембран. Левая шкала – мембранный раствор тот же, что и на рис. 4.5.1. Водный раствор содержит $5 \cdot 10^{-8}$ М амфотерицина В, 10 мМ KCl, $t=22^\circ C$. Кривая 1 получена при pH 3.0, кривая 2 при pH 7.0. Правая шкала - мембранный раствор содержит 25 мг лецитина и 2.5 мг эргостерина в 1 мл декана. Кривая 3 получена в водном растворе $5 \cdot 10^{-7}$ М амфотерицина В, 10 мМ $Na_2B_4O_7$, $t=22^\circ C$, pH 8.5. Стрелкой обозначен момент образования мембран [Касумов, Либерман, 1975; Касумов, 1986 а].

Увеличение pH и введение поливалентных анионов (SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , $B_4O_7^{2-}$, BO_3^{3-}) замедляет, а добавление $CaCl_2$ ускоряет изменение сопротивления мембраны.

нение знака потенциала (рис. 4.5.3). Мембранны с холестерином анионоизбирательны во всем диапазоне pH в растворах одновалентных анионов. Если в среде присутствуют только поливалентные анионы, то мембранны катионоизбирательны с любыми стеринами.

Рис. 4.5.3. Влияние ионов кальция на кинетику мембранных потенциалов. Мембранный раствор тот же, что и на рис. 4.5.1. Водный раствор содержит $5 \cdot 10^{-8}$ М амфотерицина В, pH 9.0, t=22°C. Градиент создавали с помощью KCl – 100 mM:10 mM. Стрелка внизу обозначает момент создания градиента по проникающему иону. Стрелка вверху – момент добавления CaCl₂ [Касумов, Либерман, 1975; Касумов, 1986 а].



Устойчивость величины катионного потенциала больше на медленно чернеющих мембранных и мембранных, в составе которых содержится растворитель с большим молекулярным весом: гептан < декан < додекан < гексадекан, но слабо зависит от вида фосфолипидов в мемbrane и концентрации ПА в водном растворе. Появление катионного потенциала наблюдается и в отсутствие фосфолипидов на мембранных из смеси окисленного холестерина и эргостерина.

Понижение температуры среды замедляет процесс реверсии знака разности потенциалов. На мемbrane, образованной при 9°C, возникает устойчивый катионный потенциал, который сохраняется при повышении температуры до 20°C, а при 25-30°C снижается и меняет знак на противоположный. На мемbrane, полученной при 33°C, устанавливается анионный потенциал и сохраняется при понижении температуры до 9°C без тенденции к падению (рис. 4.5.4).

Увеличение концентрации ДМСО в водном растворе до 2% по объему и выше стабилизирует катионный потенциал при нейтральных и щелочных pH, а также при добавлении 1 mM CaCl₂ (рис. 4.5.5), однако при малых значениях pH сохраняется анионная избирательность мембранны. В отсутствие ДМСО (в растворе Na-соли амфотерицина В) также наблюдается появление катионного потенциала с последующей реверсией знака потенциала. При добавлении ДМСО с установленнымся анионным потенциалом наблюдается изменение знака потенциала (рис. 4.5.5, кривая 1) [Касумов и др., 1975 а].

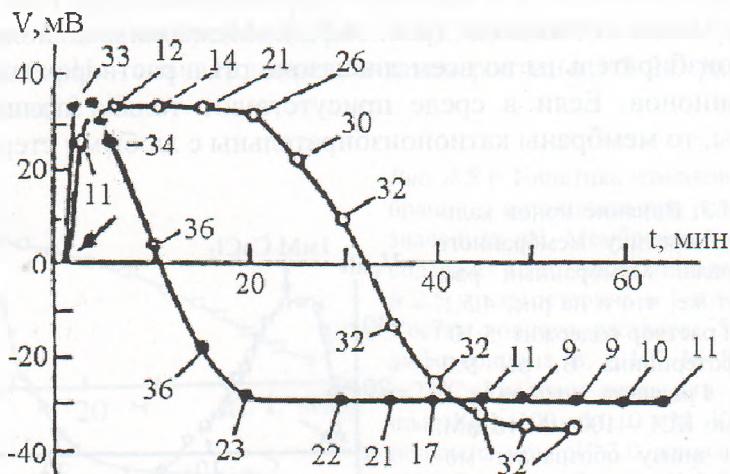


Рис. 4.5.4. Влияние температуры на кинетику мембранныго потенциала. Мембранный раствор тот же, что и на рис. 4.5.1. Водный раствор содержит $3 \cdot 10^{-8}$ М амфотерицина В, $2 \cdot 10^{-3}$ М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9.0. Градиент создавали с помощью KCl: 100 мМ:10 мМ. Стрелкой обозначен момент образования мембран. Значениям температуры раствора соответствуют цифры на кривых [Касумов, Либерман, 1975; Касумов, 1986 а].

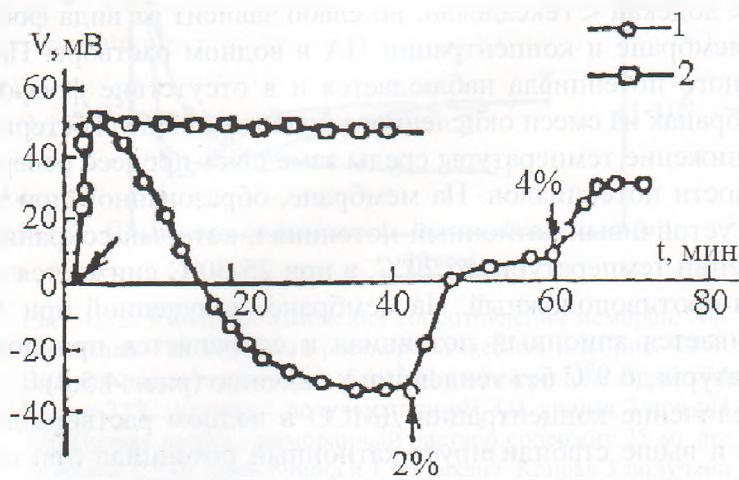


Рис. 4.5.5. Влияние ДМСО на кинетику мембранныго потенциала. Мембранный раствор тот же, что и на рис. 4.5.1. Кривая 1 получена в растворе 100 мМ KCl. Кривая 2 получена в том же растворе, но с добавлением 1 мМ CaCl_2 , pH 7.5, $t=22^\circ\text{C}$. Стрелками обозначен момент образования мембран и момент добавки ДМСО [Касумов, Либерман, 1975; Касумов, 1986 а].

Можно предположить, что влияние pH и CaCl_2 на кинетику мембранныго потенциала связано с изменением поверхностного заряда мембран. Однако повышение pH раствора до 12 и удаление Ca^{2+} из раствора не позволили получить устойчивого катионного потенциала. Изменение проницаемости мембран для ионов нельзя также объяснить изменением граничного скачка потенциала мембран, так как введение в водный раствор жирорастворимых анионов (тетрафенилбората и пикрата), уменьшающих скачок потенциала, не влияло на избирательность мембран [Ермишkin, 1980]. Возможно, устойчивость катионного потенциала связана с толщиной мембран (цветные участки мембран - микролинзы) и вида растворителя. Температурные опыты показывают наличие двух состояний мембран: 1) состояние катионной избирательности, фиксируемое понижением температуры и переходящее в состояние анионной избирательности при повышении температуры; 2) состояние анионной избирательности, сохраняющееся при изменениях температуры. Возможно, изменение избирательности объясняется медленным включением ПА в мембрану. Судя по кинетике падения сопротивления мембран (рис. 4.5.2), включение ПА в мембрану происходит в течение 10-20 мин, что вполне согласуется с изменением величины и знака потенциала. Возможно, что за это время происходит перестройка ионного канала по мере внедрения ПА в мембрану, а канал в цветной мембране соответствует незавершенному включению. Сравнение кинетики сопротивления мембран в растворах KCl и $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ при разных значениях pH (рис. 4.5.2) показывает, что переключение избирательности мембран, по-видимому, обусловлено падением проницаемости для катионов на фоне монотонного роста анионной проницаемости. Малый эффект вида фосфолипидов на избирательность мембран в растворах ПА говорит скорее в пользу образования каналов исключительно молекулами ПА и стеринов.

В дальнейшем было исследовано действие метилового эфира амфотерицина В, метилированного амфотерицина В по полярным группам (метамфоцин) и Na-соли микогептина на ионную избирательность липидных мембран, содержащих различные стерины. Показано, что увеличение концентрации антибиотиков от 10^{-8} М до 10^{-7} М в водном растворе 10 mM KCl приводит к росту проводимости мембран из окисленного холестерина в 10^5 - 10^6 раз. Потенциал на десятикратный градиент KCl при нейтральных и щелочных pH в присутствии $2 \cdot 10^{-6}$ М метилового эфира амфотерицина В или метам-

фоцина составляет 52-54 мВ, знак которого соответствует избирательной проницаемости мембран для ионов СІ⁻.

Однако натриевая соль микогептина в концентрациях от 10^{-8} М до 10^{-7} М и при нейтральных значениях рН водного раствора в ответ на десятикратное изменение концентрации КСІ с одной стороны мембранны не приводит к заметной избирательности. Это означает, что ионы К⁺ и СІ⁻ одинаково проникают через мембрану. В области щелочных рН на градиент концентрации КСІ на мембране возникает разность потенциалов (48-50 мВ), знак которой соответствует избирательной проницаемости мембран для ионов К⁺. Величина этой разности потенциалов в течение 5 мин падает и меняет знак на противоположный. Это означает, что мембрана становится избирательно проницаемой для ионов хлора [Касумов и др., 1975 а].

Липидный состав мембран существенным образом влияет на избирательную проницаемость мембран для ионов. Если на мембранах из фосфолипидов сои (азолектин) с холестерином в весовом соотношении 2:1 и в присутствии $2 \cdot 10^{-6}$ М метилового эфира амфотерицина В при нейтральных и щелочных рН создать десятикратный градиент концентрации КСІ (100 мМ:10 мМ), то на мембране возникает разность потенциалов величиной 50 мВ, знак которой соответствует избирательной проницаемости для ионов К⁺. Эта величина разности потенциалов в течении 2-3 мин падает и меняет свой знак на обратный. Подобная реверсия мембранныго потенциала наблюдается в тех же условиях и в присутствии натриевой соли микогептина [Касумов и др., 1975 а].

Мембранны из азолектина с эргостерином в весовом соотношении 10:1 в растворах метилового эфира амфотерицина В в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М при нейтральных рН избирательно проницаемы для ионов К⁺. Градиент концентрации КСІ на мембране приводит к возникновению разности потенциалов +50 мВ, величина которой в течение 20-25 мин падает и меняется на обратный. При щелочных значениях рН наблюдается аналогичная картина, но скорость изменения потенциала на мембране уменьшается. При концентрациях $2 \cdot 10^{-6}$ М в нейтральных рН Na-соль микогептина вызывает у мембран с эргостерином избирательную проницаемость для ионов К⁺. Величина потенциала на мембране, возникающая в момент изменения концентрации КСІ с одной стороны мембраны, составляет 55-57 мВ. Возникший мембранный потенциал на градиент концентрации КСІ не меняется во времени в течение всего опыта (около 2 ч). Избирательная проницаемость мембран для ионов К⁺ в этом случае не зависит от измене-

ния pH, температуры и концентрации CaCl_2 в водном растворе [Касумов и др., 1975 а].

В случае метилированного амфотерицина В в тех же концентрациях, как было отмечено выше, при нейтральных и щелочных pH, на мембране с исследованными стеринами возникает разность потенциалов в ответ на изменение концентрации проникающего иона с одной стороны, знак которой соответствует избирательной проницаемости мембран для ионов Cl^- [Касумов и др., 1975 а].

Из полученных данных следует, что, изменения стериновый состав мембран и химическую структуру модификатора, можно влиять на ионную избирательность мембран.

ГЛАВА 5. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ ПА С АРОМАТИЧЕСКОЙ ГРУППИРОВКОЙ: ЛЕВОРИН A₂, ТРИХОМИЦИН, КАНДИЦИДИН

5.1. Зависимость проводимости мембран от концентрации ароматических антибиотиков

Выше было показано, что мембранны в присутствии нистатина, амфотерицина В и микогептина избирательно проницаемы для одновалентных анионов. Однако, при исследовании ароматических антибиотиков было обнаружено, что леворин A₂, трихомицин и кандидин, которые также содержат аминосахар, вызывают избирательную проницаемость не для анионов, а для катионов щелочных металлов. Эти антибиотики отличаются от нистатина, амфотерицина В и микогептина наличием в молекулах дополнительной ароматической группировке— ρ -аминоацетофенона, в которой содержится положительно заряженный азот [Кашкин и др., 1970; Касумов, Либерман, 1973]. Поэтому трудно думать, что избирательная проницаемость для катионов связана с образованием в мембранах, содержащих холестерин, отрицательно заряженных пор. Скорее, перенос катионов через границу мембранны осуществляется с помощью комплекса “ион-антибиотик-холестерин” [Касумов, Либерман, 1973].

На рис. 5.1.1 приведены зависимости проводимости мембран от концентрации леворина, трихомицина и кандидина при введении антибиотиков в водные солевые растворы по обе стороны мембранны. Так же, как амфотерицин В и нистатин, ПА с ароматической группировкой оказались практически не эффективными на мембранных, лишенных холестерина. Они увеличивают проводимость только тех мембранны, в составе которых содержатся стерины определенной структуры. Увеличение концентрации холестерина в мембране повышает эффективность леворина, трихомицина и кандидина в увеличении проводимости мембран для ионов так же, как это наблюдалось для неароматических антибиотиков. Как в случае нистатина и амфотерицина В, увеличение концентрации холестерина в мембранном растворе сдвигает кривую влево, т.е. в сторону более эффективных концентраций антибиотиков [Касумов, Либерман, 1973], как показано на рис. 5.1.1, кривые 1 и 2. Кривая 1 на рис. 5.1.1 получена на мембранных из фосфолипидов мозга, содержащих малую концентрацию холестерина, тогда как кривая 2 получена на мембра-

нах из окисленного холестерина. Леворин еще более эффективен, если опыт проводится на одной и той же мембране, рис. 5.1.1 , кри- вая 3. Кривые 4 и 5 на рис. 5.1.1 были также получены на одной мембране, но в присутствии трихомицина и кандинцидина. При сня- тии кривых антибиотики добавлялись в непрерывно перемешивае- мые растворы по обе стороны мембранны. Как показано на рис. 5.1.1 при увеличении концентрации антибиотиков проводимость мембран растет пропорционально 2-5-ой степени концентрации кандинцидина, трихомицина и леворина [Касумов, Либерман, 1973].

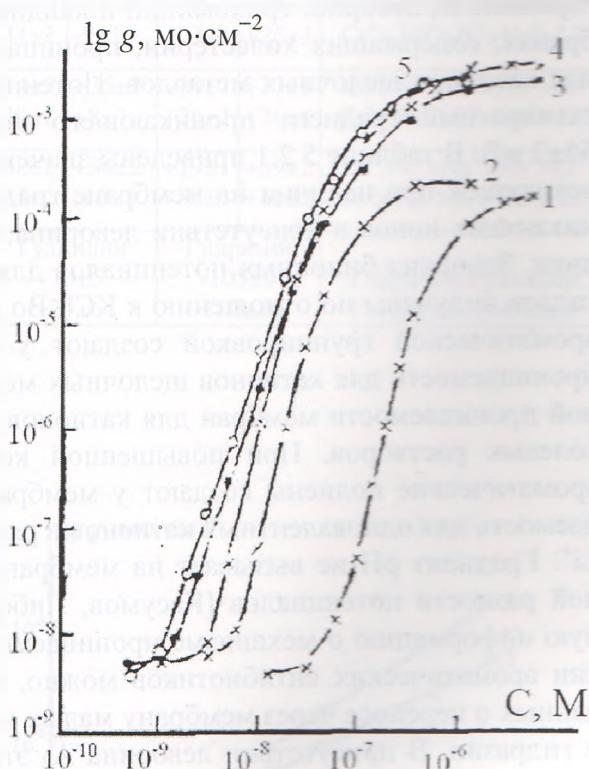


Рис. 5.1.1. Зависимость про- водимости бимолекулярных мембран от концентрации леворина A_2 - кривые 1,2,4, трихомицина – 3 и кандинци- дина – 5 в растворах 10 mM KCl, pH 6.5, 22°C. Кривая 1 получена на мембранах из фосфолипидов мозга с холе- стерином в весовом соот- ношении 5:1. Кривые 2-5 полу- чены на мембранах из окисленного холестерина в декане. Точки на кривых 3-5 полу- чены на одной мембра-не [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 а].

По пороговым или начальным концентрациям, при которых на- блюдается увеличение проводимости мембран, ПА можно расположить в следующий ряд с возрастающей эффективностью: нистатин < микогептаптин < амфотерицин В < леворин A_2 < трихомицин \leq кандинцидин. В такой же ряд располагаются антибиотики по способности лизировать клетки [Lampen, 1966; Lampen, 1969]. Это соответствует последовательности изменения угла наклона кривых по отношению

к оси ординат. Исследования зависимости проводимости мембран от концентрации ароматических антибиотиков и холестерина привели к предположению о наличии в мембранах многомолекулярных комплексов антибиотик-холестерин, индуцирующих ионную проницаемость [Касумов, Либерман, 1973].

5.2. Избирательная проницаемость мембран в присутствии ароматических антибиотиков

В отличие от неароматических антибиотиков нистатина и амфотерицина В, леворин, трихомицин и кандинцидин индуцируют в мембранах, содержащих холестерин, проницаемость не для анионов, а для катионов щелочных металлов. Потенциал нулевого тока на десятикратный градиент проникающего иона составляет величину 54 ± 2 мВ. В таблице 5.2.1 приведены значения разности потенциалов, возникшей при наличии на мемbrane градиента концентрации проникающих ионов в присутствии леворина, трихомицина и кандинцидина. Значения биоионных потенциалов для хлоридов щелочных металлов получены по отношению к KCl. Во всех экспериментах ПА с ароматической группировкой создают у мембран избирательную проницаемость для катионов щелочных металлов. Ряды избирательной проницаемости мембран для катионов зависят от концентрации солевых растворов. При повышенной концентрации электролита ароматические полиены создают у мембран избирательную проницаемость для одновалентных катионов в ряду: $\text{Ca}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$. Градиент pH не вызывает на мемbrane возникновения протонной разности потенциалов [Касумов, Либерман, 1973]. Существенную информацию о механизме проницаемости мембран в присутствии ароматических антибиотиков можно, по-видимому, извлечь из данных о переносе через мембрану малых ионов, таких как гуанидин и гидразин. В присутствии леворина A₂ эти ионы проникают через мембрану значительно лучше, чем K⁺ и Na⁺ (см. таб. 5.2.1).

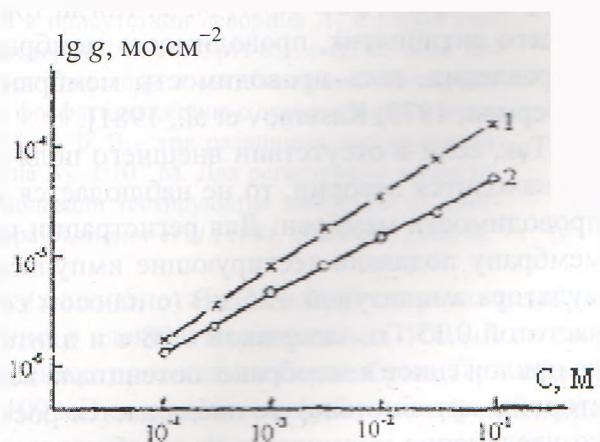
На рис.5.2.1 приведена зависимость проводимости мембран от концентрации KCl при наличии в растворе постоянной концентрации леворина и трихомицина. Проводимость мембран уже высока при наличии в растворе очень низкой концентрации солей. С чем связана такая проводимость не ясно. Сдвиг pH в одном растворе не вызывает возникновения на мемbrane разности потенциалов даже в тех случаях, когда концентрация соли была меньше 10^{-4} М.

Таблица 5.2.1.

Бионы потенциалы на мембранах из окисленного холестерина в присутствии ароматических антибиотиков в растворах хлоридов щелочных металлов (бионы потенциалы получены по отношению к KCl)
 [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 a].

Антибиотик	Концентрация иона, М	Ионы щелочных металлов					Ряды проницаемости
		K ⁺	Cs ⁺	Rb ⁺	Na ⁺	Li ⁺	
Кандицидин 1·10 ⁻⁷ М	1·10 ⁻²	0	-36±2	+25±1	+20±1	+30±1	Cs ⁺ >K ⁺ >Na ⁺ >Rb ⁺ >Li ⁺
	1·10 ⁻¹	0	-41±2	-9±1	+23±1	+26±1	Cs ⁺ > Rb ⁺ >K ⁺ >Na ⁺ >Li ⁺
Трихомицин 1·10 ⁻⁷ М	1·10 ⁻²	0	-34±2	+35±2	+30±1	+37±1	Cs ⁺ >K ⁺ >Na ⁺ >Rb ⁺ >Li ⁺
	1·10 ⁻¹	0	-29±2	+8±1	+26±1	+36±1	Cs ⁺ > Rb ⁺ >K ⁺ >Na ⁺ > Li ⁺
Леворин A ₂ 2·10 ⁻⁷ М	1·10 ⁻²	0	-38±2	+34±2	+19±1	+39±2	Cs ⁺ >K ⁺ >Na ⁺ >Rb ⁺ >Li ⁺
	1·10 ⁻¹	0	-33±2	-16±2	+30±1	+36±2	Cs ⁺ > Rb ⁺ >K ⁺ >Na ⁺ > Li ⁺
Леворин A ₂ 5·10 ⁻⁷ М	1·10 ⁻²	0	Гуанидин -70±5		Гидразин -105±9		Гидразин>гуанидин
	1·10 ⁻¹	0	-75±6		-110±10		Гидразин>гуанидин

Рис. 5.2.1. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации ионов калия в растворе при pH 6.5 в присутствии фиксированной концентрации трихомицина 2·10⁻⁸ М (кривая 1) и леворина A₂ 1·10⁻⁸ М (кривая 2). Мембранны получали из раствора окисленного холестерина в декане. Точки на кривых 1 и 2 получены на одной мембране [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 a].



5.3. Особенности изменения проводимости мембран ароматическими антибиотиками

Было обнаружено, что леворин, трихомицин и кандинцидин в отличие от неароматических антибиотиков резко понижают сопротивление мембран из фосфолипидов мозга в том случае, если они вводятся в водный раствор с одной стороны мембранны [Касумов, Либерман, 1973]. Проводимость при этом только в 50-100 раз ниже, чем в случае, когда антибиотики в одинаковых концентрациях находятся с обеих сторон мембранны. Предполагалось, что такое отличие от неароматических антибиотиков нистатина и амфотерицина В было связано с менее крутой зависимостью проводимости от концентрации антибиотиков с ароматической группой и с лучшей проницаемостью мембран для этих антибиотиков. Однако с помощью метода двух мембран не удалось обнаружить проход сквозь мембранны ни одного из ПА в течение 40 мин [Либерман, Ненашев, 1970]. В случае же разобщителя окислительного фосфорилирования декахлорбарена и антибиотика нактина, проход регистрировался за время менее 0,5 с [Касумов и др., 1971 а].

Ароматические антибиотики обладают важным свойством – включение антибиотиков в мембранны зависит от величины и направления внешнего электрического поля. Когда антибиотик находится с одной стороны мембранны, проводимость зависит от знака потенциала на мембрани, рис. 5.3.1, 5.3.2. Когда ток идет из раствора, содержащего антибиотик, проводимость мембранны растет. При обратном направлении тока проводимость мембран уменьшается [Касумов, Либерман, 1973; Kasumov et al., 1981].

Так, если в отсутствии внешнего поля с одной стороны мембранны находится леворин, то не наблюдается увеличение интегральной проводимости мембранны. Для регистрации проводимости мембранны на мембранны подавали тестирующие импульсы от электрического стимулятора амплитудой +25 мВ (с плюсом со стороны антибиотика) с частотой 0,15 Гц, задержкой 0,08 с и длительностью 0,16 с. В ответ на приложенное к мембрани потенциала величиной +50 мВ (плюс со стороны антибиотика) не наблюдается роста проводимости. И только увеличение потенциала на мембрани до +75 мВ приводит к слабому нарастанию проводимости. Скорость нарастания проводимости зависит от величины приложенного к мембрани электрического потенциала (см. рис. 5.3.1).

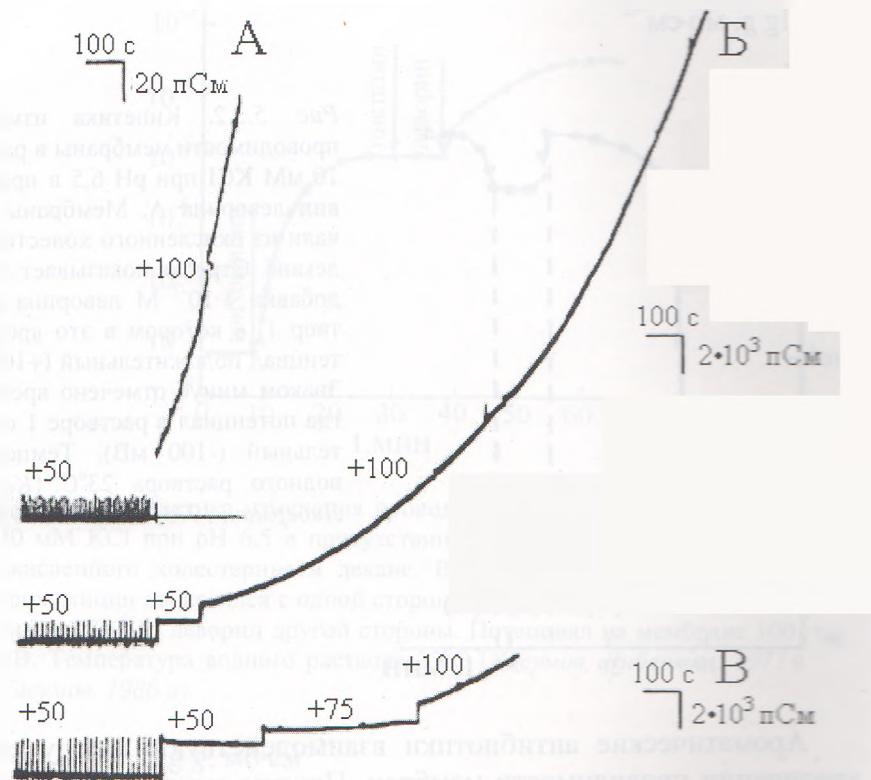


Рис. 5.3.1. Изменение проводимости мембраны в зависимости от величины потенциала в присутствии леворина A_2 с одной стороны мембранны в растворах 2 М KCl, pH 6.5, $t=22^\circ\text{C}$. Знак потенциала соответствует раствору с антибиотиком. Мембранны получали из раствора фосфатидилсерина с эргостерином в весовом соотношении 20:1. А, Б, В – три различных эксперимента. Концентрация леворина A_2 – $1 \cdot 10^{-6}$ М. Для регистрации проводимости на мембрану подавали тестирующие импульсы от электрического стимулятора [Kasumov et al., 1981; Касумов, 1986 а].

Введение ароматических антибиотиков с одной стороны мембранны в присутствии постоянного электрического поля (-100 мВ со стороны антибиотика) не изменяет проводимости мембран. При обратном направлении поля (+100 мВ со стороны антибиотиков) наблюдается резкое увеличение проводимости. Наличие в молекулах ароматических гептаенов дополнительной положительно заряженной группировкой приводит к потенциалзависимому образованию проводящих единиц [Касумов, Либерман, 1973; Kasumov et al., 1981].

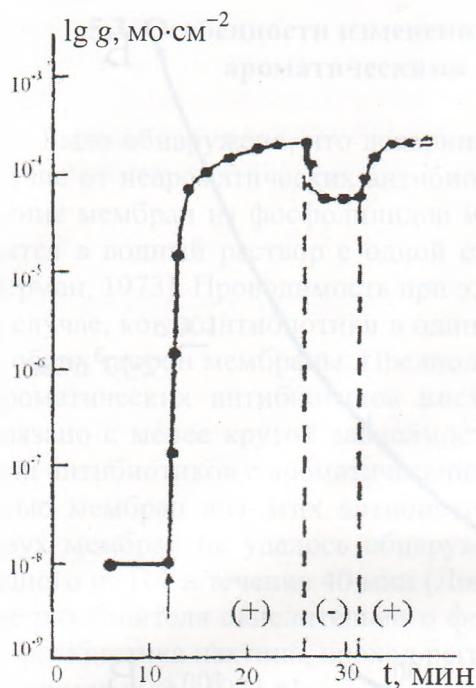


Рис. 5.3.2. Кинетика изменения проводимости мембраны в растворе 10 мМ KCl при pH 6,5 в присутствии леворина А. Мембранны получали из окисленного холестерина в декане. Стрелка показывает момент добавки $1 \cdot 10^{-7}$ М леворина в раствор 1, в котором в это время потенциал положительный (+100 мВ). Знаком минус отмечено время, когда потенциал в растворе 1 отрицательный (-100 мВ). Температура водного раствора 23°C [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 а].

Ароматические антибиотики взаимодействуют между собой в увеличении проводимости мембран. Причем взаимодействуют между собой только те антибиотики, которые увеличивают проницаемость мембран для ионов одного знака. Антибиотики, увеличивающие проводимость мембран для ионов разного знака, не взаимодействуют друг с другом. На рис. 5.3.3 и 5.3.4 показаны эффекты взаимодействия разных ПА на мембранах из окисленного холестерина. Если с одной стороны мембранны находится трихомицин, а с другой нистатин, то не наблюдается взаимодействия этих двух антибиотиков. Однако добавка леворина А₂ с той стороны мембранны, где находится нистатин, приводит к увеличению проводимости мембран (рис. 5.3.3).

Если с одной стороны мембранны находится нистатин, то проводимость мембраны не изменяется. Если на ту же сторону дан леворин, то проводимость меняется так же, как и в растворе без нистатина, рис. 5.3.4.

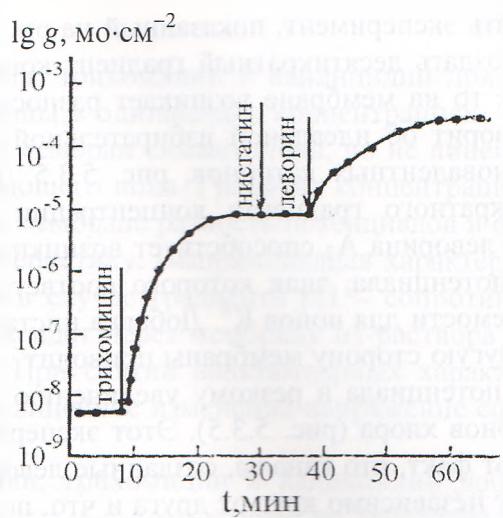


Рис. 5.3.3. Кинетика изменения проводимости мембраны в растворе 10 mM KCl при pH 6,5 в присутствии ПА. Мембранны получали из окисленного холестерина в декане. Взаимодействие ПА: $2 \cdot 10^{-8}$ M трихомицин добавлялся с одной стороны мембраны, а $3 \cdot 10^{-6}$ M нистатин и $4 \cdot 10^{-8}$ M леворин другой стороны. Потенциал на мемbrane 100 мВ. Температура водного раствора 23°C [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 a].

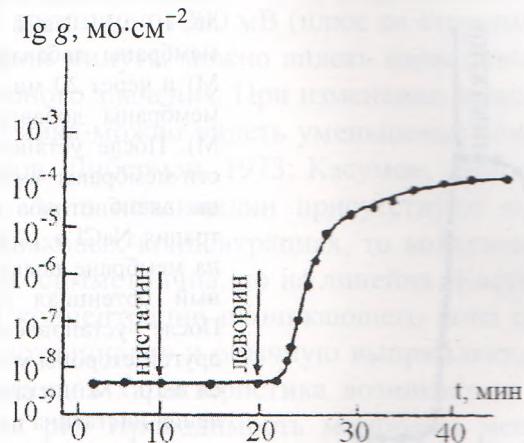


Рис. 5.3.4. Кинетика изменения проводимости мембраны в растворе 10 mM KCl при pH 6,5 в присутствии нистатина ($5 \cdot 10^{-6}$ M) и леворина ($1 \cdot 10^{-6}$ M). Антибиотики добавлялись на одну и ту же сторону мембраны. Мембранны получали из фосфолипидов мозга с холестерином в гептане в весовом соотношении 10:1. Потенциал на мемbrane +100 мВ со стороны антибиотиков. Температура водного раствора 23°C . [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 a].

Если повторить эксперимент, показанный на рис. 5.3.4 и со стороны леворина создать десятикратный градиент концентрации проникающего иона, то на мембране возникает разность потенциалов, знак которой говорит об идеальной избирательной проницаемости мембран для одновалентных катионов, рис. 5.3.5. Таким образом, создание десятикратного градиента концентрации проникающего иона со стороны леворина A_2 способствует возникновению на мембране разности потенциала, знак которого соответствует избирательной проницаемости для ионов K^+ . Добавка нистатина или амфотерицина В на другую сторону мембранны приводит к быстрому спаду мембранныго потенциала и резкому увеличению проницаемости мембраны для ионов хлора (рис. 5.3.5). Этот эксперимент наглядно демонстрирует тот факт, что каналы, созданные леворином и нистатином, действуют независимо друг от друга и что, по-видимому, ненароматические и ароматические полиены образуют в мембране независимые проводящие структуры для катионов и анионов [Касумов, Либерман, 1973; Kasumov et al., 1981].

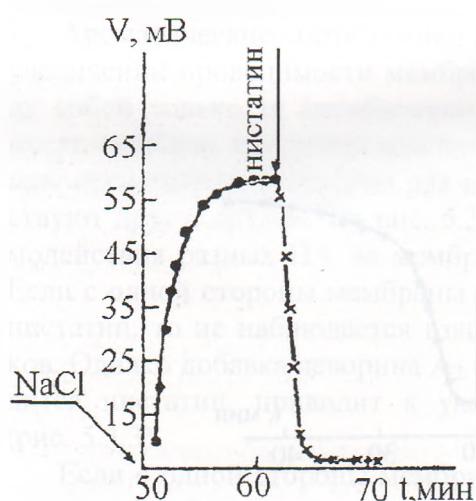


Рис. 5.3.5. Кинетика изменения потенциала мембраны. В начальный момент с обеих сторон мембранны было 10 мМ NaCl. На одну сторону мембранны добавлен нистатин ($5 \cdot 10^{-6}$ М) и через 20 мин с той же стороны мембранны добавлен леворин ($1 \cdot 10^{-6}$ М). После установления проводимости мембранны через 50 мин со стороны антибиотиков увеличена концентрация NaCl в 10 раз. В этот момент на мембранные появляется положительный потенциал (указано точками). После установления потенциала с другой стороны мембранны добавляется $5 \cdot 10^{-6}$ М нистатин (момент добавления нистатина показан стрелкой). В этот момент происходит реверсия потенциала, крестики. Потенциал на мембранны +100 мВ со стороны леворина. Температура водного раствора 23°C. Фосфолипид: холестерин 2:1 [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 a].

Если леворин, трихомицин и кандинцидин присутствуют по обе стороны мембранны в одинаковых концентрациях, то вольтамперная характеристика мембран симметрична, но не линейна, если нет градиента проникающего иона. Градиент концентрации проникающего иона создает на мембране разность потенциалов и обычную выпрямляющую характеристику. Выпрямляющая характеристика возникает на мембране и в случае градиента pH – сопротивление мембраны растет, если ток идет через мембрану из раствора с более высоким значением pH. При снятии вольтамперных характеристик на мембрану подается линейное изменение напряжение со скоростью 0.125 В/с.

Если леворин, трихомицин и кандинцидин добавлены только с одной стороны, то и в этом случае на мембране наблюдается выпрямляющая вольтамперная характеристика [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 а; Ибрагимова и др., 2006 а, б]. Сопротивление мембраны меньше, если ток идет через мембрану из раствора, содержащего антибиотик. Вольтамперная характеристика, полученная при добавлении кандинцидина с одной стороны мембраны при фиксированном потенциале -200 мВ (минус со стороны антибиотика), не симметрична и не линейна. Если со стороны антибиотика дается фиксированный потенциал +200 мВ (плюс со стороны антибиотика), то в течении одной минуты можно видеть нарастание тока до некоторого стационарного значения. При изменении знака потенциала со стороны антибиотика можно видеть уменьшение тока до исходного значения [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 а]. Если трихомицин, леворин A₂ и кандинцидин присутствуют по обе стороны мембранны в одинаковых концентрациях, то вольтамперная характеристика мембран симметрична, но не линейна [Касумов, Либерман, 1973]. Градиент концентрации проникающего иона создает на мембране разность потенциалов и обычную выпрямляющую характеристику. Выпрямляющая характеристика возникает на мембране и в случае градиента pH. Проводимость мембраны меньше, если ток идет через мембрану из раствора с более высоким pH. Если кандинцидин, леворин A₂ и трихомицин добавлены только с одной стороны, то и в этом случае на мембране наблюдается выпрямляющая вольтамперная характеристика, которая зависит от времени. Проводимость мембраны больше, если ток идет через мембрану из раствора, содержащего антибиотик. При линейном изменении напряжения на мембране со скоростью 0.125 В/с вольтамперная характеристика асимметрична и имеет вид выпрямляющей кривой. Если вслед за

этим на мемbrane фиксировать напряжение (+200 мВ) со стороны антибиотика, то можно видеть нарастание тока до некоторого стационарного значения. Если после этого изменить полярность со стороны антибиотика (-200 мВ) то ток уменьшается и релаксирует до своего исходного значения.

Так же, как и в случае нистатина и амфотерицина В, при сдвиге pH в щелочную сторону сопротивление мембраны в присутствии леворина, трихомицина и кандинцидина резко нарастает, приближаясь к сопротивлению немодифицированных мембран. Эффект pH полностью обратим. На рис. 5.3.6 показана зависимость проводимости мембран из окисленного холестерина от pH при постоянной концентрации леворина A в водном растворе. Как видно из рис. 5.3.6 изменение сопротивления мембран происходит в диапазоне pH от 8.0 до 11.0. Рост сопротивления мембран при высоких pH, возможно, связан с рекомбинацией аминогрупп антибиотиков.

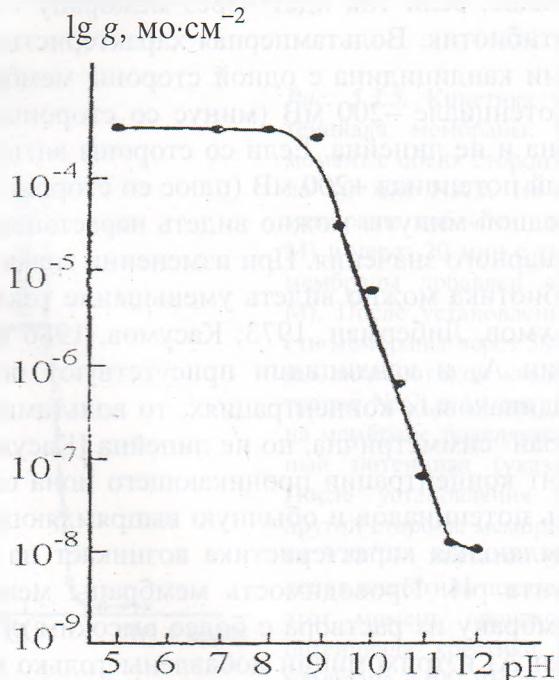


Рис. 5.3.6. Зависимость проводимости мембран от pH в присутствии постоянной концентрации леворина $A_2 - 2 \cdot 10^{-7}$ М. Водный раствор: 10 mM KCl, 1 mM трис-HCl, $t=22^\circ\text{C}$. Мембранны получали из раствора окисленного холестерина в де-кане [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 а].

При добавлении метанола в водный солевой раствор, содержащий леворин, сопротивление мембранны резко возрастало до величины сопротивления мембран как в растворе без антибиотика. Аналогичный эффект наблюдался и с этиловым спиртом, но при больших его концентрациях. Введение ДМСО в тех же концентрациях, что и метанола (по объему) в водный раствор антибиотика не влияло на сопротивление мембран, полученных в этом растворе.

Так же, как и в случае нистатина, ПА с ароматической группировкой увеличивают проводимость не только бислойных мембран с толщиной менее 100 Å, но и цветных мембран, толщина которых составляет несколько тысяч ангстрем [Касумов, либерман, 1973].

Трудно представить себе, что в цветных мембранах формируют-ся такие же поры, какие могли бы формироваться в черных мембра-нах. Поэтому можно думать, что механизм проницаемости иной. В пользу такого представления говорят осмоэлектрические опыты. Так же, как и в случае нистатина, амфотерицина В и микогептина, не удалось обнаружить возникновения на мемbrane разности потенциа-лов при наличии градиента осмоэлектрического давления. Такая разность потенциалов, как уже указывалось, должна была бы воз-никнуть, если бы катионы в порах, образованные леворином, трихо-мицином и кандидицином, увлекались бы осмотическим потоком воды.

На основании изложенных результатов механизм ионной прони-цаемости, создаваемой у мембран с холестерином в присутствии ПА, нельзя считать до конца выясненным. Приведенные выше данные о повышении проводимости цветных мембран и об отсутствии осмо-электрического эффекта говорят, скорее всего, против гипотезы о формировании комплексом антибиотик-холестерин заполненных во-дой заряженных пор, в которых свободно движутся ионы противо-положного знака. Можно предположить, что ионы переходят через границу мембранны в комплексе с антибиотиком, а внутри мембранны передаются от одного комплекса к другому. С другой стороны необ-ходимо рассмотреть и другой альтернативный вариант, что возмож-но в цветных мембранах имеются невидимые локальные участки черных мембран с собранными каналами, которые и обеспечивают высокую проводимость мембран для ионов в присутствии ПА. Су-щественную информацию о механизме проводимости можно будет, по-видимому, извлечь из данных о высокой проницаемости мембран для ионов гидразина и гуанидина.

5.4. Исследование зависимости проводимости бимолекулярных мембран от липидного состава при постоянной концентрации ПА

Выше было показано, что ПА увеличивают проводимость мембран, содержащие в своем составе холестерин. Взаимодействие антибиотиков с молекулами холестерина приводит к избирательной проницаемости мембран, как для одновалентных анионов, так и для катионов щелочных металлов. Для изучения механизма действия ПА необходимо, прежде всего, выяснить, какие группы в молекулах холестерина ответственны за увеличение проводимости мембран для ионов. В экспериментах были использованы четыре типа мембранных растворов: 1) раствор фосфолипидов мозга быка в хлороформе с метанолом с исходной концентрацией 50 мг/мл; 2) раствор окисленного холестерина в декане с исходной концентрацией 50 мг/мл; 3) раствор яичного лецитина в хлороформе с метанолом с исходной концентрацией 50 мг/мл; 4) раствор холестерина и его производных - Δ^4 – холестенон-3, Δ^5 – холестенон-3, капронат холестерина в гептане с исходной концентрацией 10 мг/мл. Для приготовления мембран использовались смеси мембранных растворов: фосфолипидов мозга с холестерином и окисленным холестерином, яичного лецитина с холестерином и окисленным холестерином, смесь производных холестерина с фосфолипидами мозга при различных весовых соотношениях. Исходные мембранные смеси в растворе хлороформа с метанолом путем испарения переводились в раствор декана, из которого затем получались БЛМ. Нистатин и леворин растворяли в ДМСО. Из маточного раствора антибиотики затем добавлялись в водный солевой раствор. Использовались хлоросеребряные электроды на насыщенном KCl и мостики, заполненные агаром на 200 mM K₂SO₄ в растворах нистатина и 1 M холинхлорида в растворах леворина. Исследуя действие антибиотиков на проводимость мембран, содержащих в своем составе стерины определенной структуры, можно установить связь между химическим строением и функцией молекул стерина в комплексе с полиенами. Исследование зависимости проводимости мембран от концентрации холестерина в мембранном растворе при фиксированной концентрации леворина A₂ показало, что увеличение концентрации холестерина выше некоторого предела (весовое соотношение холестерин:фосфолипид равное 0.6:1) не приводит к дальнейшему увеличению проводимости мембран, рис. 5.4.1. Эффект холестерина зависит от состава липидного раствора. Так,

например, холестерин в смеси с фосфолипидами мозга более эффективен в увеличении проводимости мембран (рис. 5.4.1, кривая 2), чем в смеси с лецитином (рис. 5.4.1, кривая 1). Холестерин в смеси с фосфолипидами мозга делает мембрану более чувствительной к ПА, чем в смеси с лецитином, рис. 5.4.1. В обоих случаях насыщение проводимости мембран наступает при одинаковом соотношении холестерина: фосфолипид, равном 0.6:1. Независимо от состава фосфолипидов при этом сохраняется угол наклона кривых зависимости проводимости мембран от концентрации холестерина в липидном растворе. Можно сделать два предположения, объясняющие существование плато на рис. 5.4.1. Возможно, плато соответствует насыщению мембранных холестерином, либо плато – результат поглощения мембраной всех молекул антибиотиков, увеличивающих проводимость мембран [Касумов и др., 1971 а, б; Касумов, Либерман, 1974]. По-видимому, ближе к истине первое предположение, так как против второго говорит повторяемость результатов при многократной смене мембран. Если бы комплексы антибиотиков заметно поглощались мембраной, то сопротивление каждой последующей мембраны было бы выше, чем предыдущей.

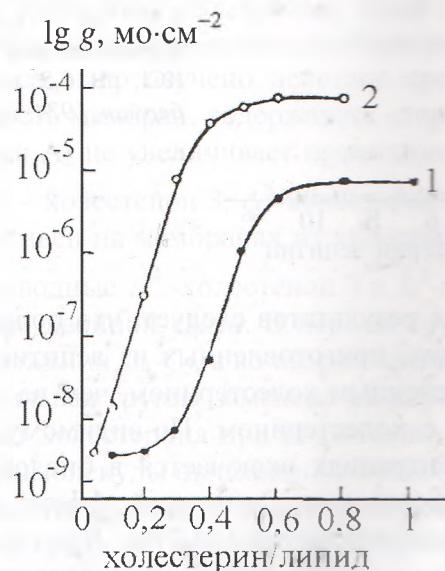


Рис. 5.4.1. Зависимость проводимости БЛМ от концентрации холестерина в растворах лецитина, кривая 1 и фосфолипидов мозга – кривая 2. Мембранны получались из смеси фосфолипидов с холестерином в декане. Водный раствор содержит 10 мМ KCl, pH 6,5, t=22°C. Кривые 1 и 2 были получены при постоянной концентрации леворина $A_2 2 \cdot 10^{-7}$ М в водном растворе [Касумов, Либерман, 1974; Касумов, 1986 а].

Проводимость мембран из окисленного холестерина в присутствии ПА высока даже при отсутствии в мембранах лецитина, рис. 5.4.2. Постепенное увеличение концентрации яичного лецитина в растворе окисленного холестерина приводит к инактивации проводимости мембран в присутствии ПА. При увеличении концентрации яичного лецитина в растворе окисленного холестерина до весового соотношения 1:1 сопротивление мембран (при фиксированной концентрации нистатина и леворина в водном растворе) резко растет и доходит до величины сопротивления немодифицированных мембран (рис. 5.4.2, кривые 1 и 2).

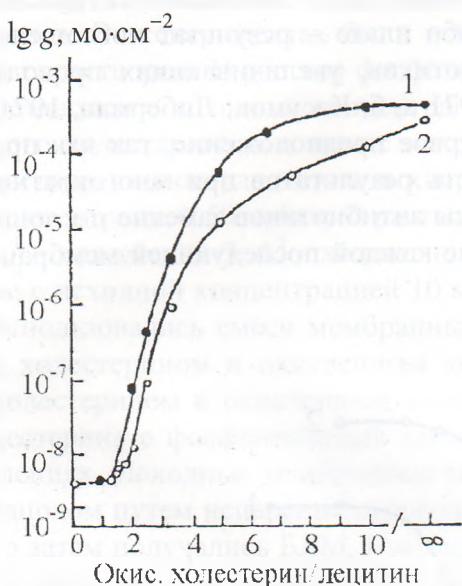


Рис. 5.4.2. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации лецитина в растворе окисленного холестерина при постоянных концентрациях леворина $A_2 5 \cdot 10^{-7} M$ – кривая 1 и нистатина $1 \cdot 10^{-6} M$ – кривая 2. Мембранны формировались в растворе 10 mM KCl, pH 6,5, $t=22^\circ C$ [Касумов, Либерман, 1974; Касумов, 1986 а].

Из полученных результатов следует, что полиены менее эффективны на мембранах, приготовленных из лецитина в смеси с холестерином или окисленным холестерином, чем на мембранах из фосфолипидов мозга с холестерином. По-видимому, холестерин не в одинаковых концентрациях включается в бислой, приготовленных из различных фосфолипидов. Различный эффект лецитина и фосфолипидов мозга на сопротивление мембран, приготовленных из смеси этих липидов с холестерином, можно объяснить инактивацией молекул холестерина молекулами лецитина. Однако возможно и другое объяснение. Как известно из коллоидной химии, на границе раздела фаз вода-углеводород из двух растворенных веществ, преимущественно адсорбируется то вещество, которое сильнее понижает меж-

фазное натяжение [Кройт, 1955]. Экспериментальные данные показывают, что межфазное натяжение бимолекулярных мембран, приготовленных из различных компонентов, меняется в соответствии с составом мембран следующим образом: холестерин < лецитин < окисленный холестерин < фосфолипиды мозга [Tien, Diana, 1967]. Следовательно, если приготовить мембранные растворы из смеси холестерин и лецитин, фосфолипиды мозга и холестерин, окисленный холестерин и лецитин то в первом и во втором случае в мембрану будет преимущественно включаться холестерин, а в третьем – лецитин. Это хорошо объясняет полученные экспериментальные данные.

В работах Денниса с соавторами изучалось действие нистатина и амфотерицина В на проводимость мембран, содержащие в своем составе стерины различной структуры [Dennis et al., 1970]. Было показано, что для увеличения проводимости мембран в присутствии неароматических антибиотиков требуется наличие в молекуле стерина 3β -ОН группы. Замена гидроксильной группы на карбоксильную или переход оксигруппы из 3β положения в положение 3α приводит к потере взаимодействия антибиотиков со стеринами. Важно было установить, насколько специфична такая структура стерина для неароматических и ароматических антибиотиков. С целью выяснения этого вопроса было изучено действие ароматических полиенов на проводимость мембран, содержащих стерины определенной структуры. Леворин А₂ не увеличивает проводимость мембран, приготовленных из Δ^4 –холестенон 3, Δ^5 -холестенон 3 и капронат холестерина, но эффективен на мембранах из холестерина и эргостерина (табл. 5.4.1). Производные Δ^4 -холестенон 3 и Δ^5 -холестенон 3 отличаются положением двойной связи. В первом случае двойная связь находится при положении C₄-C₅, а во втором при C₅-C₆. В обеих производных гидроксильная группа заменена на карбонильную. У производного капронат холестерина при положении C₃ имеется группа C₆H₁₁O₂. Структура молекулы окисленного холестерина точно не установлена. Но имеются данные о том, что окисленный холестерин представляет собой смесь нескольких компонентов: в основном холестерина и небольшие примеси 7 α и 7 β -гидрооксихолестерина и 7 α -кетонхолестерина, которые, по-видимому, и делают мембрану устойчивой [Pant, Rosenberg, 1971].

Таблица 5.4.1

Проводимость бимолекулярных мембран, полученных из производных холестерина в присутствии леворина А₂
 [Касумов, Либерман, 1974; Касумов, 1986 а].

Мембранный раствор	Леворин А ₂ , М	g _m , мо·см ⁻²	Число мембран
Вид холестерина			
холестерин	0	5±1·10 ⁻⁹	6
холестерин	5·10 ⁻⁷	1±0,5·10 ⁻⁷	8
Окисленный холестерин	0	4±1·10 ⁻⁹	5
Окисленный холестерин	5·10 ⁻⁷	2±1·10 ⁻⁴	5
Δ ⁵ -холестенон 3	0	8±1·10 ⁻⁹	4
Δ ⁵ -холестенон 3	5·10 ⁻⁷	2±1·10 ⁻⁸	6
Δ ⁴ -холестенон 3	0	7±0,5·10 ⁻⁸	6
Δ ⁴ -холестенон 3	5·10 ⁻⁷	1,5±0,5·10 ⁻⁸	7
Капронат холестерина	0	6±1·10 ⁻⁹	5
Капронат холестерина	5·10 ⁻⁷	1±0,5·10 ⁻⁸	8

К таблице: мембранные получались из смеси фосфолипидов мозга со стеринами в одинаковых весовых соотношениях 20:5. Во всех опытах состав водного раствора был одинаковый и содержал 10 мМ KCl, pH 6,5; g_m-проводимость мембран.

Дальнейшие исследования показали, что разрыв связи в молекулах эргостерина и 7-дегидрохолестерина при положении C₉-C₁₀ делает мембранные нечувствительной к действию ПА. Полиены не увеличивают проводимости мембран, содержащие жирорастворимые витамины D₂ и D₃, провитамины которых являются соответственно эргостерин и 7-дегидрохолестерин. Проводимость мембран в растворах ПА высока, когда они содержат эргостерин или 7-дегидрохолестерин. Под действием УФ света провитамины превращаются в витамины D₂ и D₃ [Feiser, Feiser, 1964]. При этом происходит разрыв стеринового кольца по связи C₉-C₁₀. Этот процесс был смоделирован на бимолекулярных мембранах. В водных растворах нистатина проводимость мембран с эргостерином или 7-дегидрохолестерином под действием УФ света уменьшается [Касумов и др., 1975 б; Касумов, 1986 а].

Таким образом, мембранные, в составе которых имеются молекулы стерина с 3β-OH группой и неповрежденным циклопентанфенантреновым кольцом, обладают высокой чувствительностью к ароматическим и неароматическим антибиотикам [Касумов, 1977, 1981].

ГЛАВА 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СУЩЕСТВОВАНИЯ ОДИНОЧНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ И ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

6.1. Гипотеза водных пор. Гипотетическая молекулярная модель канала, образуемого ПА в комплексе с холестерином

Одной из основных предпосылок, позволившей приблизиться к пониманию молекулярного механизма действия полиенов на бислой, было обнаружение повышения проницаемости БЛМ в присутствии амфотерицина В и нистатина для воды и неэлектролитов [Andreoli et al., 1969; Holz, Finkelstein, 1970; Васягин и др., 1972; Holz, 1974; Зенин, 1979]. Оказалось, что проницаемость БЛМ для воды и неэлектролитов возрастает пропорционально электрической проводимости мембран, независимо от крутизны зависимости проводимости от концентрации антибиотиков. Это позволило предположить, что ионы и неэлектролиты проходят через одни и те же участки в присутствии амфотерицина В и нистатина. Проницаемость для неэлектролитов (мочевины, этиленгликоля, глицерина, глюкозы) уменьшалась с размером проникающей молекулы. Глицерин проникает примерно в 100 раз хуже, чем вода. Глюкоза с размером молекулы около 0,8 нм проникает слабее. На основании этих данных можно сделать вывод, что амфотерицин В и нистатин образуют в липидной мембране с холестерином поры, проницаемые для одновалентных ионов, воды и неэлектролитов, у которых размер поры меньше 0,8 нм.

Исследование проницаемости мембран в присутствии нистатина и амфотерицина В для различных неэлектролитов показало, что коэффициент проницаемости уменьшается с увеличением эффективного гидродинамического радиуса неэлектролита. как это показано в табл. 6.1.1. Как видно из этой таблицы, мембранны, модифицированные амфотерицином, практически не проницаемы для сахараозы. Аналогичный ряд был получен и с нистатином [Andreoli et al., 1969; Holz, Finkelstein, 1970].

Было выдвинуто предположение, что транспорт воды, ионов и неэлектролитов осуществляется через одни и те же места в мембране [Andreoli et al., 1969; Holz, Finkelstein, 1970]. Наличие разного типа мест проницаемости маловероятно, поскольку трудно представить, что число таких мест сложно зависит от концентрации антибиотиков.

Таблица 6.1.1.

Проницаемость мембран для воды и неэлектролитов в присутствии амфотерицина В.

P_d – коэффициент проницаемости; r_i – эффективный гидродинамический радиус [Schulz, Solomon, 1961; Soll, 1967; Andreoli et al., 1969].

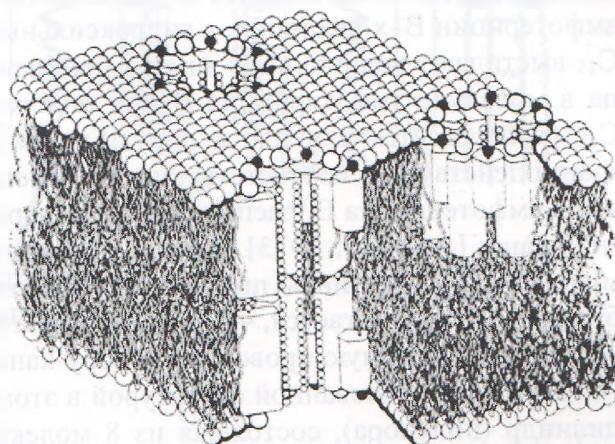
Неэлектролиты	r_i	Амфотерицин В (M)=0		Амфотерицин В (M)= 10^{-6}	
		Число мембран	P_d , $\text{см} \cdot \text{с}^{-1} \cdot 10^4$	Число мембран	P_d , $\text{см} \cdot \text{с}^{-1} \cdot 10^4$
H ₂ O	1,2	7	$10,8 \pm 2,4$	11	$18,1 \pm 2,4$
мочевина	1,8	4	0,05	4	$10,4 \pm 0,9$
ацетамид	2,5	5	$0,83 \pm 0,17$	4	$5,48 \pm 1,42$
глицерин	3,1	2	0,05	5	$3,28 \pm 1,12$
рибоза	3,6	-	-	5	$0,61 \pm 0,16$
арabinоза	3,8	2	0,05	4	$0,53 \pm 0,15$
глюкоза	4,2	3	0,05	8	$0,14 \pm 0,02$
сахароза	5,2	3	0,05	13	0,09

Вышеприведенные данные, а также данные о действии амфотерицина В и нистатина с одной и с двух сторон мембран позволили Кассу и Финкельштейну, а позже Касумову и Либерману, выдвинуть предположение о том, что эти антибиотики, взаимодействуя с холестерином, образуют на обеих сторонах мембранные полупоры определенного размера [Cass et al., 1970; Касумов и др., 1971 а; Касумов, Либерман, 1972]. Две полупоры, располагаясь вдоль их общей оси поперек мембранны, могут образовывать водную пору (трубу), которая пронизывает мембрану насквозь. Такая пора может индуцировать в мембранных проницаемость для воды, ионов и неэлектролитов. Уменьшение проницаемости для неэлектролитов с возрастающим размером молекул и резкое уменьшение проницаемости для сахарозы, по-видимому, говорит о том, что эффективный радиус водной поры составляет $\sim 4\text{\AA}$. Поры, образованные в мембране полиенами, обладают определенной стабильностью во времени. На это указывает тот факт, что при отмыкке антибиотика из раствора, окружающего мембрану, ее проводимость уменьшается в два раза за 2 ч для амфотерицина В и за 20 мин для нистатина при 25°C. Время полуспада проводимости резко уменьшается при увеличении температуры в присутствии нистатина [Cass et al., 1970]. Данные по проницаемости

для неэлектролитов, полученные на бимолекулярных мембранах, очень хорошо согласуются с результатами, полученными на клетках *Acholeplasma laidlawii* и липосомах при исследовании проницаемости мембран для неэлектролитов [De Kruyff et al., 1974 a, b; De Kruyff, Demel, 1974].

Основываясь на экспериментальных данных, Андреоли, Финкельштейн, Хольц и Де Круйфф независимо друг от друга разработали гипотетическую молекулярную модель такой поры-канала, которая образуется в бимолекулярной мембране в результате взаимодействия ПА с холестерином [Andreoli, 1973, 1974; Finkelstein, Holz, 1973; Holz, 1974; De Kruyff, Demel, 1974]. Модель такой поры-канала показана на рис. 6.1.1.

Рис. 6.1.1. Гипотетическая молекулярная модель комплекса амфотерицина В – холестерин [De Kruyff, Demel, 1974].



Молекулы амфотерицина В и фосфолипида имеют приблизительно одинаковую длину (около 24 Å). В молекуле амфотерицина В содержится длинная жесткая полиеновая цепь С₂₀-С₃₃ и гидрофильтная цепочка С₁-С₁₅, состоящая из нескольких гидроксильных групп. Гидрофобная и гидрофильтная цепи располагаются параллельно друг другу. Кроме того, в молекуле амфотерицина В имеется карбоксильная группа при С₁₆, аминосахар, содержащий положительно заряженный азот, и гидроксильную группу при С₃₅ в гидрофобной части молекулы. Общая длина молекулы холестерина составляет 19 Å. Циклогексановые кольца А, В и С жестко связаны друг с другом и имеют форму «кресла» [Fieser, Fieser, 1959; Mislow, 1965]. Гидроксильная группа в 3β-положении находится на поверхности мембраны и обращена в воду. Гидроксильная группа в 3β-положении очень важна для взаимодействия антибиотиков со стерином. Гидрофобное

стериоидное ядро может располагаться параллельно остаткам жирных кислот фосфолипидов в мембране. Молекулы амфотерицина В, взаимодействуя со стеринами, также могут располагаться параллельно жирным хвостам липидов.

На рис. 6.1.2 изображена схематическая модель полупоры. Предполагается, что для образования полупоры необходимо взаимодействие равных количеств молекул амфотерицина В и холестерина (стехиометрия такова, что одна молекула амфотерицина В может взаимодействовать с одной молекулой холестерина) [Celman, 1971].

Заряженные аминная и карбоксильная группы в молекулах амфотерицина В располагаются на мембрano-водной поверхности. Из предложенной модели следует, что гидрофобная сторона молекулы амфотерицина В связывается с холестерином и образует комплекс амфотерицин В-холестерин, а гидроксильные группы в сегменте C₁-C₁₅ выстилают водную пору внутри мембраны. Гидроксильная группа в молекуле амфотерицина В при положении углеродного атома C₁₅ располагается у входа в пору. Гидроксильная группа при C₃₅ взаимодействует с соответствующей гидроксильной группой молекулы амфотерицина В, расположенного с противоположной стороны мембраны [Andreoli, 1973]. Поскольку амфотерицин В, нистатин и микогептин эффективны при наличии их только с двух сторон мембраны, то предполагается, что такие симметричные структуры могут образовывать полную проводящую пору-канал в мембране.

Наиболее упакованной структурой в этом случае является полый цилиндр (полупора), состоящая из 8 молекул амфотерицина В и 8 молекул холестерина, объемная модель которого показана на рис. 6.1.1. Из рис. 6.1.1 видно, что молекула холестерина связывается с двумя молекулами антибиотика. Радиальный угол сегмента амфотерицин В-холестерин составляет 23°, а радиальный угол между двумя молекулами амфотерицина В (амфотерицин В-холестерин амфотерицин В) составляет 45°. Полупора с каждой стороны мембраны образуется из восьми молекул амфотерицина В и восьми молекул холестерина. Образование поры-канала в такой стехиометрии приводит к тому, что все гидрофильные стороны молекул амфотерицина В располагаются внутри поры [Andreoli, 1973; Finkelstein, Holz, 1973; De Kruyff, Demel, 1974]. Данная структура имеет внутренний диаметр 8 Å. Две такие полупоры собираются по разные стороны мембраны. Гидроксильные группы при C₃₅ одной полупоры образуют водородные связи с соответствующими группами другой полупоры, формируя полную проводящую пору через всю гидрофобную часть

мембранны. Предполагается, что такая проводящая структура пора-канал может индуцировать в мембранах проницаемость для воды, ионов и неэлектролитов. Аналогичная пора может быть сконструирована и для других ПА: нистатина, микогептина, этрускомицина, филипина, леворина A₂.

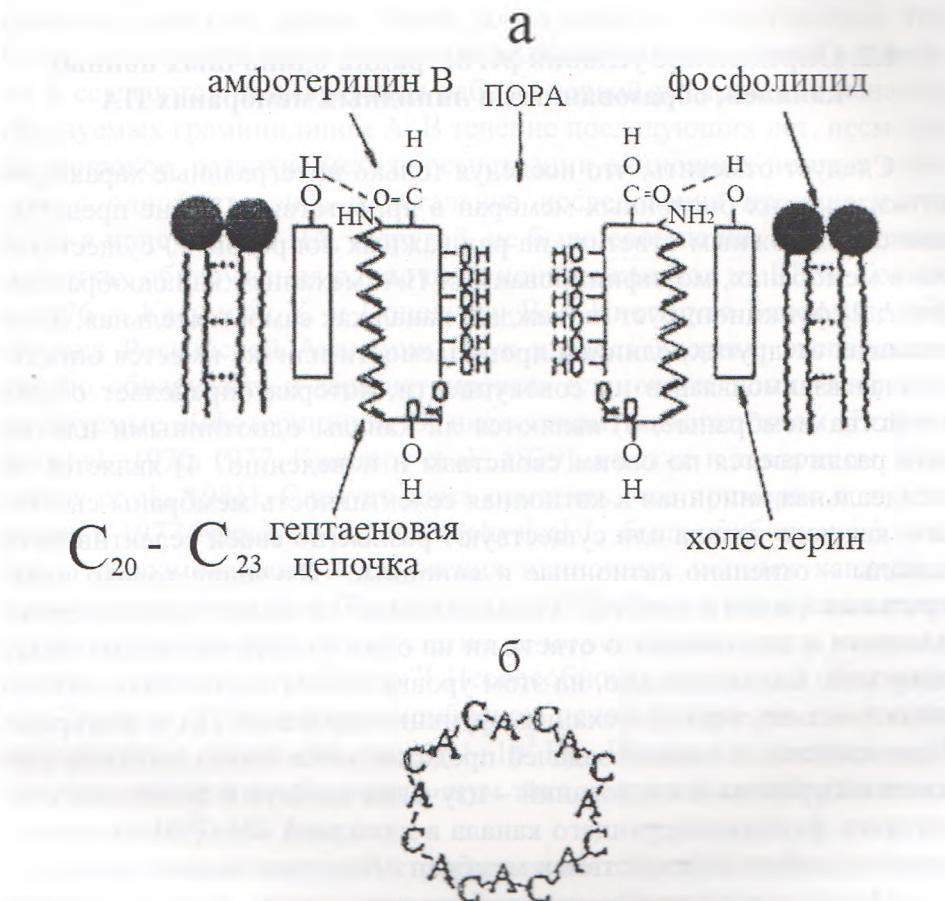


Рис. 6.1.2. Схематическая модель полупоры. а – поперечный срез комплекса (полупоры) амфотерицин В - холестерин [Andreoli, 1973, 1974]. б – стехиометрия и расположение молекул амфотерицина В с холестерином в комплексе. А – антибиотик; С – стерин [De Kruyff, Demel, 1974].

В рамках предложенной модели не было возможности рассмотреть механизм функционирования такого канала, ввиду отсутствия экспериментальных данных, подтверждающих и непосредственно отражающих работу одиночных каналов в липидных мембранах.

Экспериментально подтвердить существование таких структур в мембранах долгое время никому не удавалось, хотя в этом отношении и велся интенсивный поиск. Исследование свойств единичной проводящей структуры дало бы несравненно большую информацию о молекулярных механизмах функционирования ПА в липидных мембранах.

6.2. Определение условий регистрации одиночных ионных каналов, образованных в липидных мембранах ПА

Следует отметить, что исследуя только интегральные характеристики плоских бислойных мембран в присутствии ПА, не представляется возможным ответить на ряд важных вопросов: 1) существует ли в мембранах, модифицированных ПА, механизм каналаобразования?; 2) функционирует ли каждый канал как самостоятельная, независящая от других, единица проницаемости или же имеется определенная взаимосвязь в их совокупности, которая определяет общие свойства мембранны?; 3) являются ли каналы однотипными или же они различаются по своим свойствам и поведению? 4) является ли неидеальная анионная и катионная селективность мембранны свойством каждого канала или существуют разные по своей селективности каналы – отдельно катионные и анионные? Изучение только интегральных свойств мембран принципиально не может дать исчерпывающего и однозначного ответа ни на один из перечисленных выше вопросов. Следовательно, на этом уровне нельзя достаточно глубоко понять молекулярный механизм функционирования ПА в мембране. Принципиально важной задачей представляется выход на более адекватный уровень исследований – изучение свойств и поведения единичного функционирующего канала в липидной мембране и сравнения его свойств со свойствами мембран с большим числом каналов.

Молекулярная модель канала была предложена, исходя из структуры молекулы и данных по проницаемости и интегральной проводимости мембран в присутствии ПА. Возможность исследования одиночных ионных каналов в присутствии ПА может дать новую, более подробную информацию о работе и структуре полиеновых каналов. В этом направлении многими исследователями предпринимались интенсивные попытки обнаружить работу одиночно функционирующей поры в присутствии ПА. Именно здесь при попытках обнаружения и записи полиеновых каналов зарубежных исследователей постигает неудача. Хладки и Хейдон в 1970 году пытались заре-

гистрировать одиночную пору на мембране с нистатином [Hladky, Haydon, 1970]. Однако попытка оказалась безуспешной. Из Англии Хладки и Хейдон сообщают в 1970 г., что им никак не удается обнаружить работу одиночных ионных каналов при нарастании интегральной проводимости, индуцируемой нистатином [Hladky, Haydon, 1970]. Авторы в то время предполагали, что канал проводит ток слишком короткое время. Такой довод кажется убедительным, тем более, что авторы резко увеличили чувствительность своей установки и ссылаются на результаты работы первой регистрации каналов, образуемых грамицидином А. В течение последующих лет, несмотря на широкое развитие метода регистрации одиночных ионных каналов, с одной стороны, и детальное исследование проницаемости БЛМ в присутствии ПА, с другой, не было сообщений об успешных попытках обнаружения одиночных ионных каналов на БЛМ. Только в 1976 г. Касумову Х. и Поцелуеву В. в Институте Биологической Физики Российской Академии Наук удалось впервые экспериментально обнаружить и зарегистрировать одиночные ионные каналы, образуемые амфотерицином В, нистатином, микогептином [Ermishkin et.al., 1976, 1977; Kasumov et al., 1979], а позже и леворином [Kasumov et al., 1981]. Следует здесь отметить, что примерно в это же время в 1977 году в журнале Biophysical J. была опубликована статья о невозможности обнаружения одиночных ионных каналов в присутствии нистатина [Romine et al., 1977]. Статья так и называлась “Доказательство того, что нистатин не может образовывать каналы в тонких липидных мембранах”! Неспособность нистатина образовывать каналы в бислойных мембранах основывалась на измерении шумов тока в диапазоне частот $1 \div 10^3$ Гц. Исходя из свойств одиночного нистатинового канала, шум тока должен был наблюдаться в диапазоне $10^{-3} \div 10^{-2}$ Гц.

Одиночные каналы регистрировали методом фиксации мембранныго потенциала, регистрируя ток через мембрану, с помощью электрометрического усилителя Keithley-301 (США) с очень большим входным сопротивлением. На рис. 6.2.1 приведена схема измерения тока и напряжения на мемbrane.

Входной ток усилителя не превышал 10^{-14} ампера (А). Ток, протекающий через один ионный канал имеет величину $10^{-13} \div 10^{-12}$ А в 2 М KCl. Напряжение шума на выходе усилителя при коэффициенте усиления 1 было не более $1,5 \cdot 10^{-5}$ В. Ток от мембраны отводился с помощью Ag-AgCl электродов с агаровыми мостиками, заполненными 3 М KCl. Регистрация тока на выходе усилителя осуществля-

лась ХУ-самописцем типа "Endim" (ГДР). Временное разрешение самописца по обеим координатам 30 мс на 1 см шкалы. Для расширения полосы пропускания сигнала электрометрическим усилителем использовался режим не 100% обратной связи. Коэффициент

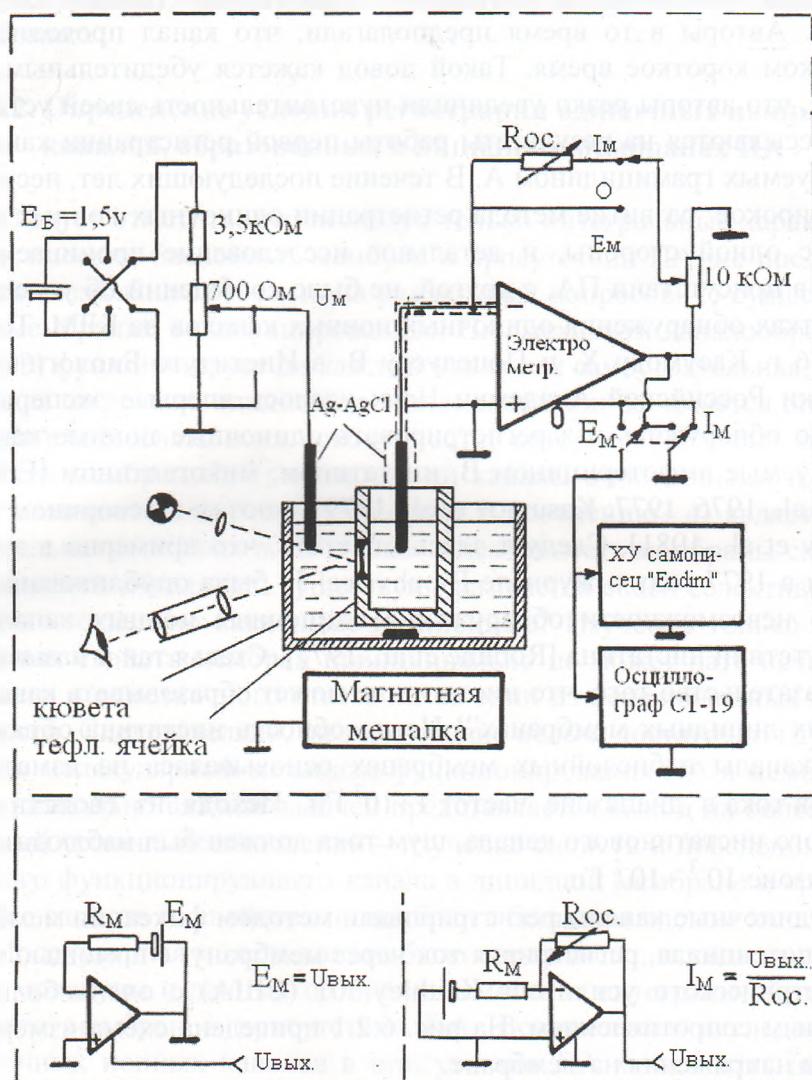


Рис. 6.2.1. Принципиальная комбинированная схема измерения электрических характеристик липидных мембран в режиме фиксации тока и напряжения мембранны. Внизу изображены варианты подключения мембранны к измерительному электрометрическому усилителю. Слева – режим измерения потенциала мембранны (E_M), справа – измерения тока (I_M) мембранны в режиме фиксации напряжения [Поцелуев, 1978; Касумов, 1986 а].

передачи обратной связи изменяли в пределах $\beta=1\pm0,1$. Это позволило уменьшить величину сопротивления обратной связи, которое определяет постоянную времени усилителя. При сопротивлении обратной связи 10^9 Ом и $\beta=0,1$ чувствительность усилителя по току составляла 10^{-13} А на 1 мВ выходного сигнала. Постоянная времени усилителя (τ_y) при этих значениях для мембранны емкостью 10^{-10} Ф и при сопротивлении обратной связи 10^8 Ом была не хуже 10^{-1} с.

Одним из способов расширения полосы пропускания полезного измеряемого сигнала является уменьшение площади мембранны, а, следовательно, ее емкости. Величина емкости мембранны прямо пропорциональна площади мембранны и обратно пропорциональна толщине:

$$C = C_{уд} \cdot S_m / R$$

Так как эта емкость подключена параллельно проводимости ионного канала, то она выступает в роли паразитного элемента, который уменьшает полосу пропускания полезного измеряемого сигнала. В экспериментах удается получить устойчивые (по размеру) черные мембранны маленькой площади, но не менее $3 \cdot 10^{-2}$ мм² ($d_m=0,1$ мм). Невозможность получения черных мембранны меньшей площади связана с тем, что они затекают липидами, которые имеются в избытке на краях отверстия.

На качество регистрируемого процесса сильно влияет величина шума липидной мембранны. Мембрана без модификатора должна иметь минимально возможный уровень шума ее собственной проводимости. Этот параметр, прежде всего, зависит от состояния липидов (качества их выделения, очистки, времени хранения и т.д.). Мембранны, образованные из некачественно выделенных или окислившихся липидов, имеют высокий уровень проводимости и к тому же они могут быть нестабильными и быстро разрушаться. Отдельные эксперименты необходимо проводить на одной и той же мембрани в течение длительного времени и поэтому вопрос об устойчивости мембранны является достаточно серьезным.

БЛМ получали из общих фосфолипидов, выделенных из белого вещества бычьего мозга [Kates, 1972] путем нанесения капли фосфолипидов на отверстие в тефлоновой ячейке. Общие фосфолипиды очищали от нейтральных липидов ацетоновой промывкой и хранили

при 0°C в хлороформ-метанольном растворе в объемном соотношении (2:1). Концентрация фосфолипидов в хлороформ-метанольном растворе была 20 мг/мл. Затем к этим липидам добавляли необходимое количество перекристаллизованного холестерина или других стеринов в соответствующих концентрациях. В работе были использованы ПА и их производные, синтез которых был проведен на Рижском заводе медицинских препаратов и в Санкт-Петербургском научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов. Модификация ПА производилась в различных частях лактонного кольца. Электрические характеристики БЛМ измеряли с помощью метода фиксации мембранныго потенциала и тока, используя электрометрический усилитель постоянного тока Keithley-301 (США) и двухкоординатный самописец "Endim" (Германия).

Мембраноформирующие растворы готовились из разных соотношений фосфолипидов с холестерином и эргостерином. В работе использовался перекристаллизованный холестерин фирмы Sigma, Saint Louis, США и эргостерин фирмы "Merck" (Германия). Для стабилизации pH водных растворов использовали буферные системы в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М. Проводимость немодифицированной мембраны составляла величину 2-3 пСм в 2 М KCl. Кинетику интегральной проводимости мембран регистрировали методом фиксации тока [Mueller et al., 1963].

Исходные ПА практически в воде нерастворимы. Основным растворителем ПА является ДМСО с брутто формулой C_2H_6SO . В работе были использованы амфотерицин В, нистатин, леворин и их алкильные производные, модифицированные по аминной и карбоксильной группам, как показано на рис.6.2.2 на примере амфотерицина В, где R соответствует лактонному кольцу: R= CH₃: метамфоцин ($\epsilon = 1375$); R = C₂H₅ : этамфоцин ($\epsilon = 1440$); R= C₃H₇ : пропамфоцин ($\epsilon = 1400$); R= C₄H₉: бутамфоцин ($\epsilon = 1375$). В скобках указан коэффициент экстинкции для каждого производного. В работе также были использованы водорастворимые формы антибиотиков: Na – соль леворина и полностью *транс* изомерная форма леворина – изолеворидон. Синтез производных ПА был осуществлен доктором химических наук, профессором Вайнштейном В.А. в Санкт-Петербургском научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов. Все ПА в индивидуальном порядке растворялись в ДМСО из расчета 1 мг/мл, что являлось основным маточным раствором.

ром, из которых затем с помощью микрошприца антибиотики вводились в водные растворы. Маточный раствор антибиотика хранили в течение недели.

Важно отметить, что для модификаторов, характеризующихся резкой зависимостью проводимости мембраны от их концентрации, необходимо очень тщательно подбирать величину концентрации антибиотика. В противном случае, при недостаточной концентрации модификатора можно вообще не получить изменений мембранныго тока, а при его избытке может сразу образоваться много каналов, что не позволяет наблюдать работу одного из них. Увеличение концентрации амфотерицина В всего в два раза приводит к резкому увеличению проводимости мембраны (примерно в 64 раза – 8 степень).

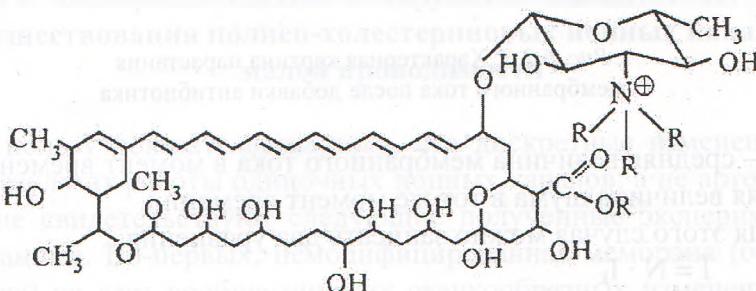


Рис. 6.2.2. Структура амфотерицина В. Буквой R обозначено место, где производилось алкилирование полярной аминной и карбоксильной группы молекулы амфотерицина В [Вайнштейн и др., 1982].

В первых экспериментах при стандартных условиях (100 мМ KCl, pH 6,0) не удалось зарегистрировать минимального скачкообразного изменения мембранный проводимости. Кинетика нарастания проводимости мембранны с момента добавки антибиотика была плавной и не выходила на плато в течение длительного времени (>1 ч). При внимательном рассмотрении начального участка измеряемого мембранны тока обнаружилось, что нарастание сопровождается характерным низкочастотным шумом на фоне увеличивающейся во времени постоянной составляющей тока. При этом амплитуда шума была приблизительно пропорциональна корню квадратному из абсолютной величины мембранны тока. Предположив, что наличие шума связано с дискретной работой слабопроводящих единиц, ориентировочно была подсчитана проводимость одной единицы, рис. 6.2.3.

Пример расчета:

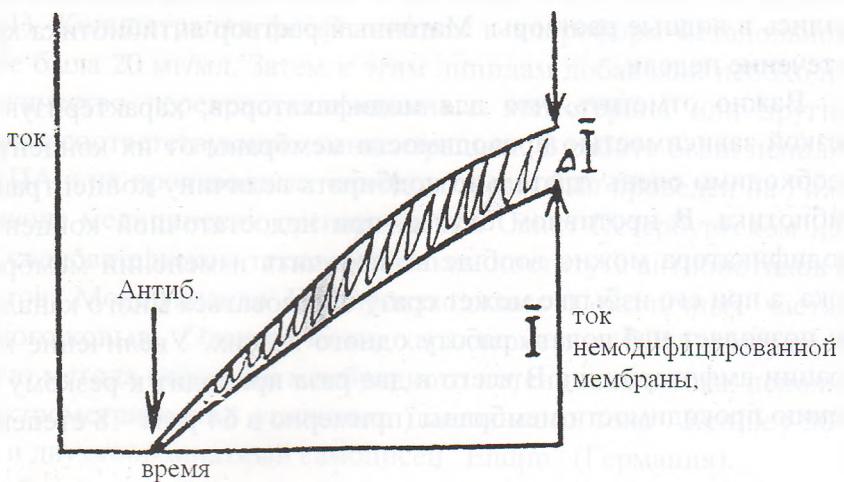


Рис. 6.2.3. Характерная картина нарастания мембранных токов после добавки антибиотика

где: \bar{I} – средняя величина мембранных токов в момент времени t , ΔI – средняя величина шума в тот же момент времени t .

Для этого случая можно записать два уравнения:

$$\bar{I} = N \cdot I_k \quad (6.2.1)$$

$$\Delta I = \sqrt{N} \cdot I_k, \quad (6.2.2)$$

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

Возведем обе части уравнений в квадрат и, поделив уравнение (6.2.1) на уравнение (6.2.2), получим число проводящих единиц в любой точке кривой нарастания мембранных токов:

$$N = \bar{I}^2 / \Delta I^2 \quad (6.2.3)$$

Поставив значение N из (6.2.3) в уравнение (6.2.1), получим:

$$I_k = \Delta I^2 / \bar{I} \quad (6.2.4)$$

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

$$g_k = \Delta g^2 / g, \quad (6.2.5)$$

где g_k – проводимость одной дискретной единицы.

Приближенный расчет для этого случая показал, что проводимость одиночного канала составляет 0,3 пСм в растворе электролита 100 мМ KCl. Проводимость же немодифицированной мембраны с площадью $s_m = 3 \cdot 10^{-2}$ мм² составляет 5 пСм. Это означает, что качественное и количественное изучение функционирующего одиночно-

го канала сильно затруднено в связи с тем, что вклад проводимости канала в общую проводимость мембранных составляют меньше 10 %. Казалось, что увеличить этот вклад можно за счет уменьшения площади мембранных ($g_{\text{мембр.}} = g_{\text{удельн.}} \cdot S_{\text{мембр.}}$), однако работать с мембранными, площадь которых меньше 10^{-3} мм^2 , практически невозможно. Такие по площади маленькие мембранные затекают липидами с краев отверстия (там они находятся в избытке) и становятся уже небислойными. С целью увеличения полезного сигнала (ионного тока через одну проводящую единицу) необходимо повысить концентрацию примембранного электролита от 100 мМ KCl до 2 М KCl. Только в этих условиях удалось обнаружить дискретные изменения мембранных токов в присутствии амфотерицина В.

6.3. Экспериментальное обнаружение и доказательство существования полиен-холестериновых ионных каналов малой проводимости

В пользу доказательства того, что дискретные изменения тока есть результат работы одиночных ионных каналов, а не артефактное явление свидетельствуют следующие полученные экспериментальные данные. Во-первых, немодифицированная мембрана (без антибиотика) не дает вообще никаких скачкообразных изменений тока. Во-вторых, введение антибиотиков в концентрации ниже определенного порога также не приводит к изменению тока и только при достижении удельной пороговой концентрации наблюдается хорошо воспроизведимые скачки мембранных токов. В-третьих, вероятность появления дискретных уровней тока резко зависит как от концентрации антибиотиков в примембранном растворе, так и от концентрации холестерина в мембране. В первых экспериментах при стандартных условиях (100 мМ KCl, pH 6,0) не удалось зарегистрировать минимального скачкообразного изменения мембранный проводимости. Кинетика нарастания проводимости мембранных с момента добавки антибиотика была плавной и не выходила на плато в течение длительного времени ($> 1 \text{ ч}$).

При особенно тщательном подборе концентрации антибиотика и хорошем разрешении по оси времени удалось получить воспроизведимые изменения мембранных токов. На рис. 6.3.1 показаны дискретные изменения мембранных токов в присутствии амфотерицина В, нистатина, микогептина и леворина A₂. После введения в водные растворы низких концентраций ПА происходит скачок проводимо-

сти, рис. 6.3.1 - 6.3.7 [Kasumov et al., 1979, 1981]. Предполагается, что каналы находятся в единственном проводящем состоянии несколько минут и за это время совершают множество попыток перейти в непроводящее состояние. Среднее время жизни канала в проводящем состоянии вычислялось из общего времени нахождения канала в проводящем состоянии деленное на число кратковременных переходов в непроводящее состояние. На записи каналов видны кратковременные отключения с верхнего проводящего уровня на уровень ($I=0$), либо на предыдущий уровень. Через некоторое время после включения канала можно видеть переход такой дискретнопроводящей единицы на более продолжительный непроводящий уровень. Это, по-видимому, означает, что на промежуточных стадиях формирования канала в мембране образуются непроводящие структуры. Проводимость каналов, образуемых амфотерицином В, примерно на порядок ниже проводимости грамицидиновых каналов при той же концентрации электролита [Ермишкин, Зильберштейн, 1982].



Рис. 6.3.1. Одиночные ионные каналы в липидных мембранных, образованных в присутствии четырех ПА: амфотерицин В ($2 \cdot 10^{-8}$ M), нистатин ($1 \cdot 10^{-7}$ M), микогентин ($2 \cdot 10^{-8}$ M) и леворин А₂ ($5 \cdot 10^{-9}$ M). Мембранные образованы из раствора фосфолипидов мозга с холестерином и эргостерином (леворин А₂) в весовом соотношении 20:1 в гептане. Водные растворы содержат 2 M KCl, pH 7,0, t=22°C. Напряжение на мемbrane 200 мВ [Борисова и др., 1978; Kasumov et al., 1979, 1981].

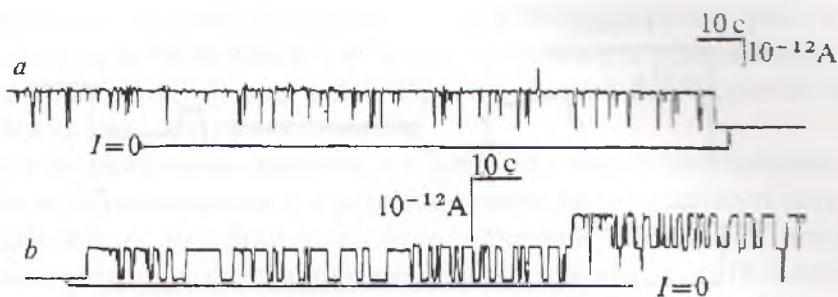


Рис. 6.3.2. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии амфотерицина В $3 \cdot 10^{-8}$ М в растворе 2 М KCl (а) и $1 \cdot 10^{-7}$ М амфотерицина В в растворе 2 М KNO₃ (б). Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембранны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор: pH 7,0, t=23°C [Ermishkin et al., 1976].



Рис. 6.3.3. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии амфотерицина В $2 \cdot 10^{-8}$ М. Мембранный потенциал равен 100 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембранны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 5 М CsCl, pH 7,0, t=23°C [Ermishkin et al., 1976].

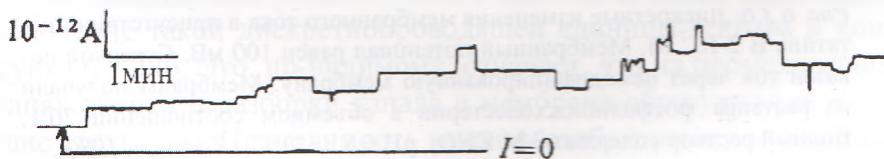


Рис. 6.3.4. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина В $1 \cdot 10^{-7}$ М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембранны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 3 М KCl, pH 7,0, t=23°C. [Ermishkin et al., 1976; Касумов, 1980].

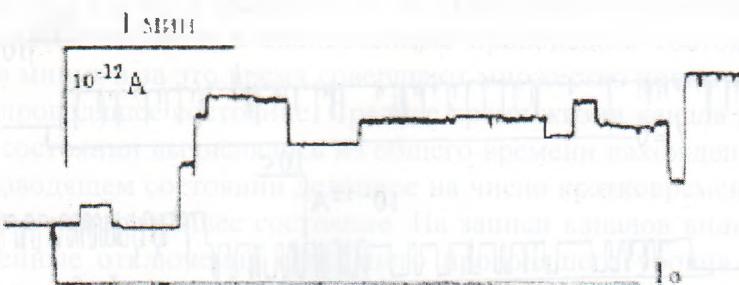


Рис. 6.3.5. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина $1 \cdot 10^{-7}$ М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембранны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 2 М KCl, pH 7,0, t=23°C [Касумов, 1980].

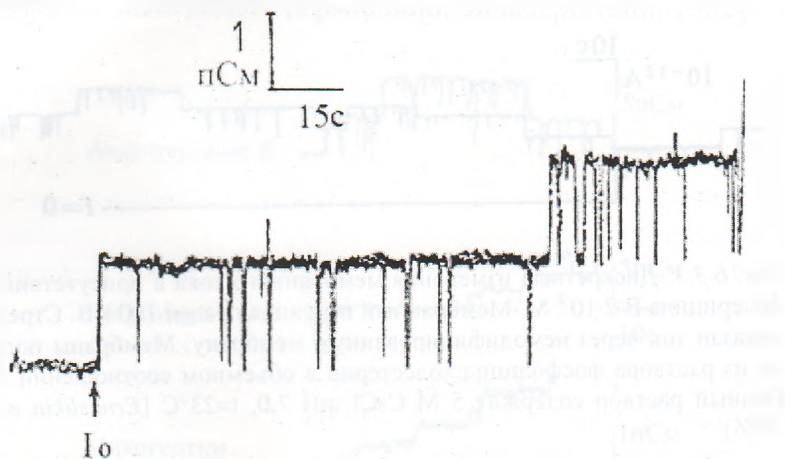


Рис. 6.3.6. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии нистатина В $2 \cdot 10^{-7}$ М. Мембранный потенциал равен 100 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембранны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 3 М KNO₃, pH 6,5, t=23°C. [Касумов, 1980].

Амфотерициновый канал имеет наибольшую проводимость (3,5 пСм) и совершают частые переходы из открытого состояния в закрытое состояние. Нистатиновый канал имеет меньшую проводимость (1,4 пСм). Переключения нистатинового канала зависят от вида электролита. В растворах KCl практически не наблюдается переключений (рис. 6.3.5), однако в растворах KNO₃ видны короткие пере-

ключения из проводящего состояния в непроводящее, рис. 6.3.6. Минимальная проводимость у микогептинового и леворинового каналов (0,2-0,3 пСм), рис. 6.3.1. Практически не наблюдается переключения микогептинового канала.

Ни формирование каналов, ни переходы между состояниями каналов не чувствительны к изменению напряжения в присутствии ненароматических антибиотиков. Ароматический антибиотик леворин A₂ чувствителен к колебаниям мембранныго потенциала [Kasumov et al., 1981]. Свойства каналов, образуемых амфотерицином В, сильно зависят от вида и концентрации электролита в водных растворах. Следует отметить, что от вида электролита зависят не только свойства канала в проводящем состоянии, но и формирование каналов, и время переключения канала между состояниями.

Селективность амфотерициновых одиночных каналов ~~такая же, как и у мембран с большим числом каналов (см. раздел 6.4)~~. Вольт-амперная характеристика канала имеет такую же форму, как и мембранны с большим числом каналов (см. раздел 6.5). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что при высоких концентрациях антибиотика мембрана ведет себя как ансамбль из большого числа независимых каналов. Это утверждение подтверждается измерениями спектров шума мембран с амфотерициновыми каналами [Матзфиэз и др., 1991].

Число амфотерициновых каналов не зависит от величины приложенного к мемbrane потенциала [Kasumov et al., 1979], т.е. сборка амфотерициновых каналов не является потенциал зависимой и, поэтому, измерения электрических характеристик мембран проводились как при 100, так и при 200 мВ. На рис. 6.3.1, 6.3.2, 6.3.3 видны кратковременные отклонения с верхнего уровня на ~~уровень (I=0)~~, либо на предыдущий уровень. Через некоторое время наблюдается выключение такой дискретнопроводящей единицы (справа в конце рисунка 6.3.2 а). Это, по-видимому, означает, что на промежуточных стадиях сборки и разборки канала в мембране образуются непроводящие структуры. Проводимость каналов слабо зависит от величины приложенного к мемbrane потенциала.

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

* Термины – проводящая структура, пора, канал – используются в данном случае для обозначения комплекса, состоящего из нескольких молекул антибиотика и стерина.

1. Дискретные изменения проводимости такого рода есть результат работы только одного ионного канала, для которого характерно наличие двух его состояний (открытого – $g=6.5$ пСм при 200 мВ и закрытого $g=0$), а также вполне определенной частоты кратковременных отключений (см. рис. 6.3.2);

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

Для доказательства этих двух положений было сделано следующее: повышая концентрацию антибиотика в растворе электролита окружающего мембрану, можно наблюдать ступенчатые изменения проводимости, связанные с включением и выключением одиночных проводящих единиц. На одной из таких записей, сделанной в растворе электролита 2 М C_sCl , наблюдалось в течение длительного времени от двух до семи уровней проводимости, кратных одной и той же величине, рис. 6.3.7. Статистическая обработка таких записей показала, что частота кратковременных отключений со второго, третьего и так далее уровней на предыдущий уровень были равны соответственно, 0.76; 1.65; 1.9; 2.3; 3.3 $сек^{-1}$. Легко видеть, что эти частоты примерно пропорциональны номерам уровней. Такое поведение должно наблюдаться, если в мембрану встроены одинаковые, независимо работающие каналы с двумя состояниями [Ермишкин, Зильберштейн, 1982].

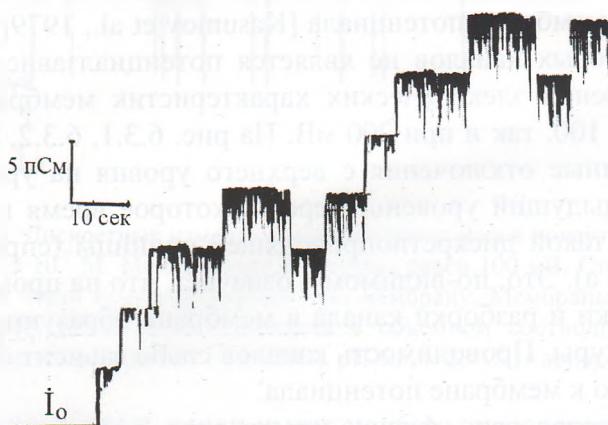


Рис. 6.3.7. Дискретные изменения мембранных токов в присутствии амфотерицина В $3 \cdot 10^{-8}$ М. Мембранный потенциал равен 200 мВ. Стрелкой показан ток через немодифицированную мембрану. Мембранны получали из раствора фосфолипид:холестерин в объемном соотношении 20:1. Водный раствор содержит 2 М C_sCl , pH 6,5, t=23°C [Поцелуев, 1978; Касумов, 1980].

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

$$g_{\text{общ.шума}} = g_{\text{удельн.шума}} \cdot s_{\text{мембр.}} \quad (6.3.1)$$

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

Общее количество каналов в мембране описывается формулой:

$$N_{\text{общ.}} = N_{\text{удельн.}} \cdot s_{\text{мембр.}} \quad (6.3.2)$$

где $N_{\text{удельн.}}$ - количество каналов на единицу площади; $s_{\text{мембр.}}$ - площадь мембранны.

Показано, что удельная проводимость мембранны ($g_{\text{удельн. мембр.}}$) пропорциональна степенной функции концентрации антибиотика в растворе электролита (C_A) с показателем степени n для амфотерицина В, равным 7-10 [Finkelstein, Cass, 1968; Касумов и др., 1969; Касумов, Либерман, 1972]:

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

Подставив последнее выражение в формулу (6.3.2), получим

$$N_{\text{общ.}} \sim (C_A)^n \cdot s_{\text{мембр.}} \quad (6.3.3)$$

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

Таким образом, из всего сказанного выше следует, что площадь бислойной мембранны является важной при изучении одиночных полиеновых каналов, так как с ее помощью можно в определенных

пределах регулировать емкость мембранные, величину проводимости шума мембранные, а также число одновременно работающих каналов. Все эти параметры прямо пропорциональны величине площади мембранные.

6.4. Основные свойства одиночных каналов

Анализируя записи работы амфотерициновых одиночных ионных каналов можно видеть, что в основном наблюдаются дискретные скачки величиной 6.4 пСм в 2 М КCl, однако реже можно наблюдать скачки проводимости другой величины. При анализе большого числа записей одиночных каналов было обнаружено, что ионный канал не всегда имеет одинаковую величину проводимости при постоянных условиях эксперимента. При изучении проводящих свойств открытого канала было видно, что изредка наблюдаются скачки проводимости разной величины. Чтобы исключить ошибки измерений за счет наличия флуктуаций, проводились усреднения проводимости для каждого отдельного эксперимента не менее, чем по 10 одиночным каналам. Набрав большое количество записей работы одиночных каналов, и проведя статистический анализ, была построена гистограмма распределения частоты проводимости одиночных амфотерициновых каналов при постоянных условиях эксперимента. Результаты проведенных экспериментов показали, что в основном образуются каналы с проводимостью в 6,5 пСм в 2 М KCl. Однако с меньшей вероятностью образуются каналы почти с любой другой меньшей проводимостью. Функция распределения проводимости амфотерициновых каналов показана на рис. 6.4.1. Из функции распределения проводимости каналов видно, что существует резкий максимум в области 6 – 6.5 пСм, но возможны и скачки любой другой меньшей величины.

Статистический анализ поведения нескольких, одновременно работающих в мембране каналов, показал, что они функционируют независимо друг от друга. Кроме того, подавляющее большинство каналов характеризуются одинаковой величиной проводимости. Поведение канала во времени более сложно, чем можно судить по записи, приведенной на рис. 6.3.2 и 6.3.3. Кроме быстрых переключений, существует другой, более медленный процесс с характеристическим временем в несколько минут. Определение времени жизни по записям одиночных каналов дает величину ~ 280 с (среднее по 30 каналам). Концентрация антибиотика, необходимая для получения

одного канала (за 10-30 мин наблюдения), сильно зависит от концентрации стерина в мембраноформирующем растворе. С увеличением концентрации холестерина вдвое необходимо уменьшить примерно вдвое концентрацию антибиотика. Это наблюдение подтверждает предположение о том, что образуется канал из молекул стерина и амфотерицина В, взятых в стехиометрическом соотношении 1:1 [Касумов, 1977; Ermishkin et al, 1977].

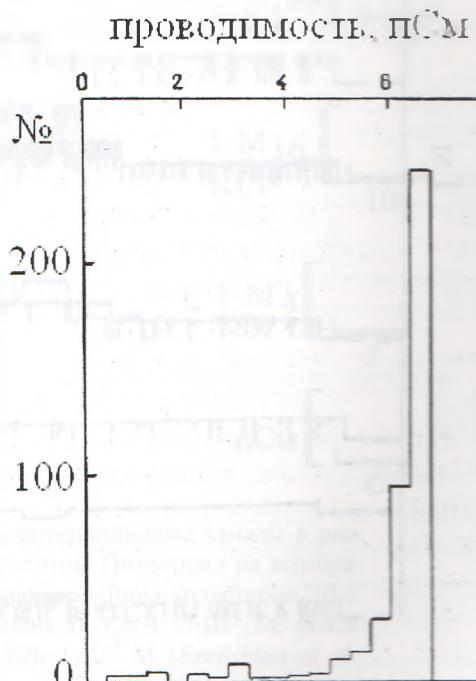


Рис. 6.4.1. Гистограмма распределения проводимости одиночных амфотерициновых каналов. Потенциал на мемbrane 200 мВ, 2 М KCl, pH 6,5; 23°C, фосфолипид: холестерин 20:1. По оси абсцисс отложена проводимость, по оси ординат – число наблюдаемых каналов с определенной проводимостью. Отмечались амплитуды первых 2-3-х каналов, полученных каждый раз на новой мемbrane [Ermishkin et al., 1977; Касумов, 1980].

По-видимому, для открытого ионного канала характерно наличие наиболее вероятного его физико-химического состояния (например, число молекул антибиотика, составляющего канал, определенное расположение его структурно-активных групп и т.д.), которое определяет его проводимость. Величина проводимости канала не зависит от концентрации холестерина и от концентрации антибиотика. Эти данные подтверждают постоянство стехиометрии полиен-холестеринового комплекса. Одиночные каналы в присутствии неароматических антибиотиков могут образовываться в растворах различных электролитов. Для иллюстрации на рис. 6.4.2 и 6.4.3 показана экспериментальная запись таких каналов.

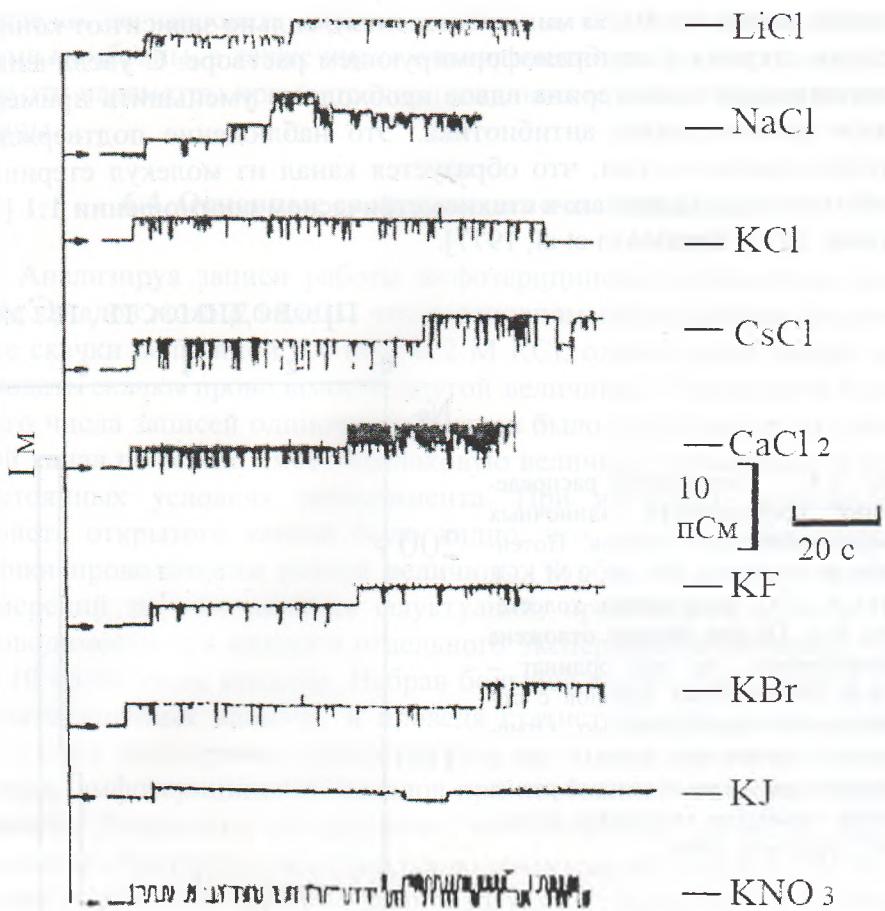


Рис. 6.4.2. Изменение проводимости мембраны в присутствии амфотерицина В в 2 М растворах различных электролитов. Потенциал на мемbrane 200 мВ, pH 6,5; 23°С, фосфолипид:холестерин 20:1. Концентрация амфотерицина В: LiCl- $2\cdot10^{-7}$ М; NaCl- $1\cdot10^{-7}$ М; KCl- $3\cdot10^{-8}$ М; CsCl- $5\cdot10^{-8}$ М; CaCl₂- $1\cdot10^{-7}$ М; KF- $1\cdot10^{-8}$ М; KBr- $1\cdot10^{-7}$ М; KI- $5\cdot10^{-7}$ М; KNO₃- $2\cdot10^{-7}$ М [Ermishkin et al., 1977; Касумов, 1980].

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

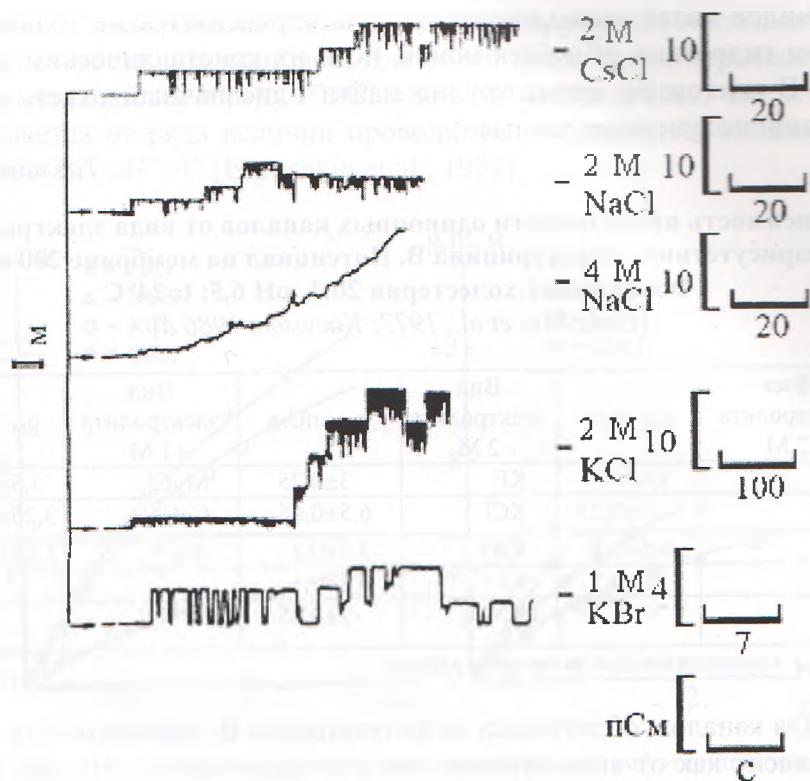


Рис. 6.4.3. Одиночные амфотерициновые каналы в растворах различных электролитов. Потенциал на мемbrane 200 мВ, pH 6,5; 23°C, фосфолипид:холестерин 20:1. Концентрация амфотерицина В: CsCl - $5\cdot10^{-8}$ М; NaCl- $1\cdot10^{-7}$ М; KCl- $3\cdot10^{-8}$ М; KBr- $1\cdot10^{-7}$ М [Ermishkin et al., 1977; Касумов, 1980].

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

Для наглядной иллюстрации в таблице 6.4.1 приведена величина проводимости каналов, полученных в растворах разных солей.

Проводимость каналов в растворах различных электролитов несколько отличается друг от друга. В растворах хлоридов щелочных металлов при одинаковой активности этих солей проводимость канала увеличивается в ряду: Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , а в растворах галогенидов калия в ряду: Γ , F^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- . Проводимость канала возрастает с увеличением кристаллического радиуса катиона. Однако для га-

логенидов калия проводимость канала определяется не только размером гидратных оболочек ионов, но и их кристаллическим радиусом. В настоящее время трудно найти однозначный ответ, объясняющий полученные данные.

Таблица 6.4.1.

Зависимость проводимости одиночных каналов от вида электролита в присутствии амфотерицина В. Потенциал на мемbrane 200 мВ.

Фосфолипид:холестерин 20:1, pH 6,5; t=24°C

[*Ermishkin et al., 1977; Касумов, 1986 a*]

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

g_M – проводимость одиночного канала.

Для каналов, образуемых амфотерицином В, проводимость канала зависит как от вида катиона, так и от вида аниона. На рис. 6.4.4. показано соотношение между проводимостью одиночных каналов и активностью некоторых солей. Каждая точка получена на отдельной мембране в результате усреднения 10-15 скачков тока.

Все кривые стремятся к насыщению при больших активностях электролита. Величина предельной проводимости зависит от вида и аниона, и катиона. Проводимость канала в растворах хлоридов щелочных металлов возрастает с ростом кристаллического радиуса катиона. В растворах галогенидов калия максимальная проводимость при любой активности соли наблюдается для хлорида. Заметим, что, несмотря на большой диаметр поры, канал довольно хорошо различает сходные ионы – галогениды. Так, отношение величин проводимостей канала в растворах KCl и KF достигает ~3, а в растворах KCl и KI >10, рис. 6.4.5.

Данные рис. 6.4.5 позволяют другим способом сравнить селективность амфотерициновых каналов - по изменению потенциала на мембране при уменьшении активности соли по одну сторону мембраны. Селективность оценивали по наклону кривых на начальном участке. Знак потенциала выбран так, что анионной избирательности соответствует положительное значение потенциала. Для всех иссле-

дованных электролитов проницаемость для анионов оказалась выше проницаемости для катионов. Для солей калия числа переноса анионов уменьшаются в ряду $F^- > Cl^- = Br^- > NO_3^-$. Интересно, что этот ряд отличается от ряда величин проводимости одиночных каналов: $Cl^- > NO_3^- > Br^- > F^- > I^-$ [Ermishkin et al., 1977].

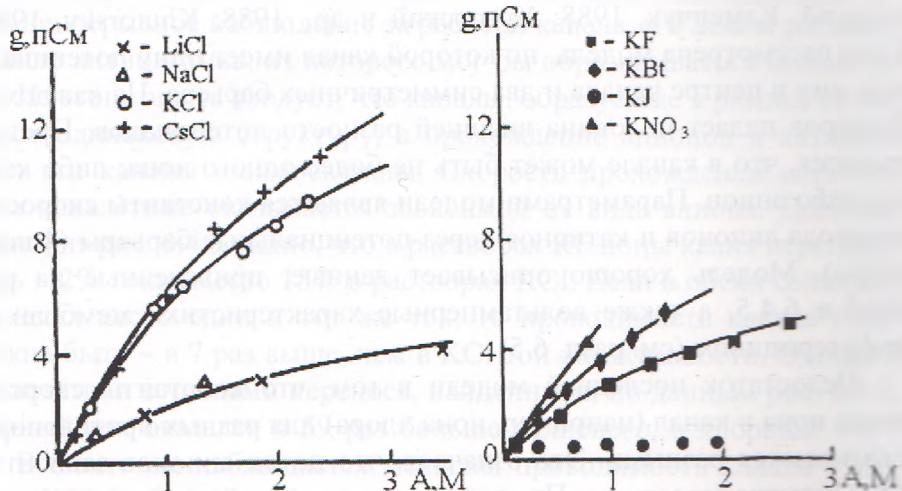
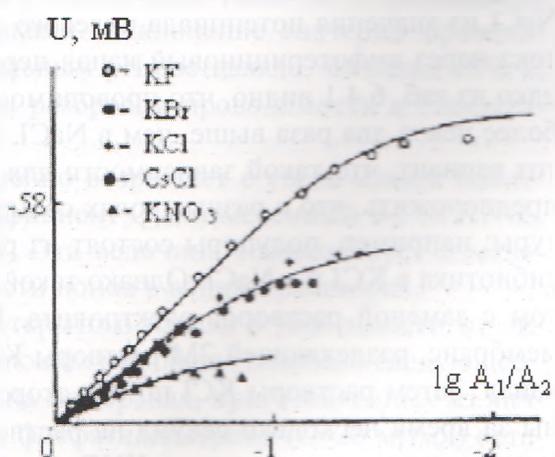


Рис. 6.4.4. Зависимость проводимости одиночных амфотерициновых каналов от активности электролита в растворах различных солей [Ermishkin et al., 1977].

Рис. 6.4.5. Зависимость потенциала нулевого тока на мемbrane с амфотерициновыми каналами от логарифма отношения активностей солей в двух растворах. Постоянная активность электролита с одной стороны мембраны A_1 равна: \circ 3M KF, \blacksquare 1.5 M KBr, $+$ 3M KCl, \bullet CsCl, \blacktriangle 2M KNO₃ [Ermishkin et al., 1977].



Природа селективности амфотерициновых каналов до сих пор не выяснена. Анализ селективности осложняется двумя факторами. Во-первых, через канал проходят и катионы, и анионы. Во-вторых, про-

ходящие ионы взаимодействуют в канале. На это указывает несовпадение рядов селективности, полученных из значений проводимостей каналов в разных солях, и из величин потенциала нулевого тока [Ермишин, 1980]. Формальное описание проницаемости амфотерициновых каналов было проведено Ермишкиным и Хоторским [Ермишин, 1980; Ермишин, Зильберштейн, 1982; Borisova et al., 1986; Хоторский, Каменчук, 1988; Хоторский и др., 1988; Khutorsky, 1996]. Была рассмотрена модель, по которой канал имеет одну потенциальную яму в центре канала и два симметричных барьера. На каждом из барьеров падает половина внешней разности потенциалов. Предполагается, что в канале может быть не более одного иона: либо катион, либо анион. Параметрами модели являются константы скоростей перехода анионов и катионов через потенциальные барьера (4 параметра). Модель хорошо описывает данные, приведенные на рис. 6.4.4 и 6.4.5, а также вольтамперные характеристики мембранны с амфотерицином (см. разд. 6.5).

Недостаток последней модели в том, что константы скорости входа иона в канал (например, иона хлора) для разных противоионов оказываются разными. Это означает, что поток анионов зависит от типа катиона в растворе. По-видимому, взаимодействие ионов в поре не ограничивается лишь конкуренцией за одну потенциальную яму, и необходимо учитывать какие-то взаимодействия более сложного характера. Вывод о взаимодействии ионов в канале можно сделать и не используя формальное описание. И в растворе KCl, и в растворе NaCl из значения потенциала нулевого тока следует, что более 80% тока через амфотерициновый канал переносится ионами хлора. Однако из таб. 6.4.1 видно, что проводимость одиночного канала в KCl более чем в два раза выше, чем в NaCl. Нельзя исключить заранее и тот вариант, что такой зависимости для каждого канала нет. Можно предположить, что в разных солях собираются каналы разной структуры: например, полупоры состоят из разного числа мономеров антибиотика в KCl и в NaCl. Однако такой вариант опровергается опытом с заменой растворов электролита. В одном из таких опытов в мембране, разделяющей 2M растворы KCl, был получен одиночный канал. Затем растворы KCl по обе стороны мембранны были заменены за время несколько секунд на растворы 2M KNO₃. Для быстрой смены электролита в раствор KNO₃ без антибиотика была добавлена 10% сахара. Из-за большой вязкости этого раствора он не смешивается с исходным раствором KCl. Этот вязкий раствор вводили с помощью двухканального перистальтического насоса в нижние час-

ти отсеков по обе стороны мембранны и одновременно отсасывали раствор KCl из верхних частей отсеков. Поднимающаяся граница раздела двух растворов была отчетливо видна. В момент прохождения этой границы около мембранны канал резко менял проводимость и переключающую систему на те, которые характерны для канала, образованного в KNO₃. Этот опыт был повторен несколько раз, велись непрерывное наблюдение за работой канала, и в новом растворе не было антибиотика, из которого мог бы образовываться новый канал. Из этого опыта следует, что каналы, образуемые в разных солях, имеют одинаковую структуру, а прохождение анионов и катионов через эти каналы взаимосвязаны. Скорость прохождения катионов через канал тоже оказывается зависимой от вида аниона. Действительно, из рис. 6.4.5 видно, что в растворах KF ионы калия переносят лишь ~ 2% тока вместо 15% в растворах KCl. Если в обеих солях ионы калия несут один и тот же ток, то проводимость канала в KF должна быть ~ в 7 раз выше, чем в KCl той же активности. Однако в соответствии с числами переноса, найденными по данным рис. 6.4.5, фторный ток оказался в 59 раз больше калиевого, а хлорный ~ в 7 раз. В опыте же наблюдается меньшая проводимость канала в KF, чем в KCl (таб. 6.4.1) [Ермишкин, 1980; Ермишкин, Зильберштейн, 1982].

При сдвиге pH примембранных водных растворов электролитов в диапазоне 3-10 в 2 M KCl и 2M KNO₃ не наблюдалось значительного изменения проводимости одиночных каналов, образованных неароматическими антибиотиками. Отклонение значений проводимости по сравнению с нейтральным pH составляло не более 10% и, возможно, связано с обычным разбросом проводимости в стандартных условиях.

Проводимость канала линейно возрастает с увеличением температуры. Температурный коэффициент Q_{10} , измеренный в 2 M KNO₃, равен 1,3 в диапазоне 6-23°C. Эта величина соответствует изменению коэффициента подвижности ионов в водных растворах.

Изучение проводимости открытого канала в зависимости от липидных компонентов, составляющих мембрану, показало следующее:

1. Проводимость канала на мембранных, приготовленных из яичного лецитина ($C=20$ мг/мл) и фосфатидилсерина ($C=20$ мг/мл) оставалась такой же, как и на фосфолипидах мозга.

2. Проводимость канала не изменяется в широком диапазоне концентраций липидного компонента мембранны (фосфатидилхолина 5-40 мг/мл в гептане).

3. Проводимость канала остается постоянной при различных соотношениях липид: холестерин в мембране (от 20:1 до 20:10 мг/мл).

В растворах хлоридов щелочных металлов и галогенидов калия наблюдались одиночные каналы в широком диапазоне концентраций электролита. Результаты экспериментов представлены в таблице 6.4.2.

Таблица 6.4.2.

Концентрация амфотерицина В, необходимая для получения одиночного канала в растворах электролитов с различной концентрацией при мембранным потенциале 200 мв.

Фосфолипид : холестерин 20 : 1, pH 6,5, t=20⁰C [Касумов, 1980].

Вид электролита	Концентрация электролита, М								
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5
KF		$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.25 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$	-	-
KCl	$1 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$1.5 \cdot 10^{-8}$	$1.25 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-8}$	-
CsCl		$7 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8}$	-	-	-	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-8}$
KBr	$2 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.25 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	-	$8 \cdot 10^{-8}$	-	-	-

Концентрация антибиотиков, необходимая для получения одиночного канала, зависит от вида и концентрации электролита. По-видимому, скорость сборки ионных каналов может зависеть от вида и концентрации соли. Как было показано в работе Барсукова с соавторами, имеет место адсорбция аниона на липидный бислой, который зависит от его природы [Барсуков и др., 1977]. Анионы, в различной степени сорбируясь на липидный бислой, изменяют его свойства, в частности, поверхностное натяжение. Исходя из этих данных, можно предположить, что скорость сборки каналов и, соответственно, концентрация для получения одного канала в различных солях может меняться. Скорость сборки каналов растет с увеличением концентрации антибиотика в водных растворах и с увеличением концентрации стерина в мембране. На скорость сборки каналов влияет также и липидный состав мембран.

Введение ароматических антибиотиков в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М с обеих сторон мембраны, приготовленных из фосфатидилсерина с холестерином, приводит к хаотическому нарастанию мембранныго тока, флюктуирующего относительно среднего значения. На рис. 6.4.6 показаны дискретные изменения проводимости мембран в присутствии леворина A₂. Флюктуация тока связана с дискретной рабо-

той отдельных проводящих единиц – каналов. Анализ флюктуации тока в присутствии ароматических антибиотиков показывает, что проводимость каналов лежит в интервале 0,2-0,5 пСм в растворах 2 М KCl при мембранном потенциале 200 мВ. В присутствии леворина A₂ в концентрации $5 \cdot 10^{-9}$ М с обеих сторон мембранны, образованных из раствора фосфатидилсерина с эргостерином, впервые наблюдали дискретные скачки проводимости. Проводимость канала составляет величину 0,4-0,5 пСм. Проводимость каналов, образуемых леворином A₂, примерно на порядок меньше проводимости амфотерициновых каналов и в 100 раз меньше проводимости грамицидиновых каналов при той же концентрации электролита. Обнаружение одиночных каналов в присутствии леворина подтвердили предположение о наличии в мембранах комплексов, инициирующих катионную проницаемость. Левориновые каналы совершают частые переходы между двумя состояниями: открытым и закрытым. В таблице 6.4.3 представлены времена жизни каналов в открытом и закрытом состояниях. Дискретные изменения проводимости мембран с леворином наблюдаются также на мембранах со стигмастерином. Характерной особенностью левориновых каналов является то, что в отличие от неароматических антибиотиков рост проводимости мембран зависит от величины и направления электрического поля [Kasumov et al., 1981; Ибрагимова и др., 2006 а].

В асимметричных условиях электролита 2М KCl:0,2 М KCl потенциал нулевого тока равен $+54 \pm 4$ мВ на мембранах с большим числом каналов. Знак потенциала говорит об избирательной проницаемости мембран для ионов K⁺. Ионная селективность канала не зависит от полиеновой цепи и полярных групп в молекулах полиеновых антибиотиков. По всей видимости, система, ответственная за селективность ионного канала, локализована на гидрофильной стороне молекулы полиена [Kasumov et al., 1981].

Таким образом, изучая селективные свойства мембранны с большим числом полиеновых каналов, можно однозначно определить избирательность одиночного канала. Такой экспериментальный подход обусловлен тем, что систематическое изучение селективности непосредственно одиночного канала методически достаточно сложно ввиду ее малой проводимости. Записи каналов показывают нарастание дискретными скачками тока через мембрану в растворе с небольшой концентрацией амфотерицина В. При низких концентрациях антибиотика можно наблюдать в течение длительного времени лишь один уровень проводимости и работу одиночного ионного канала.

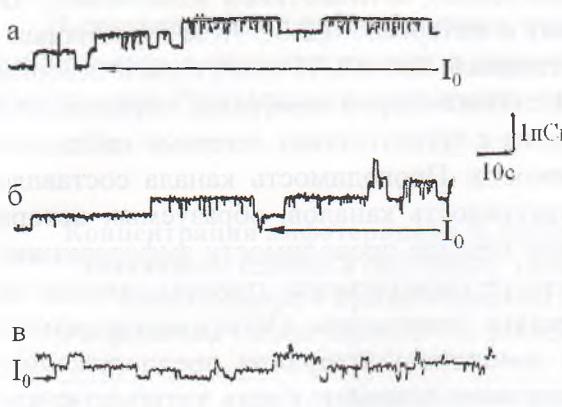


Рис. 6.4.6. Дискретные изменения проводимости мембран в присутствии леворина А₂ при потенциале 200 мВ, pH 6,5; 22°C. а - концентрация антибиотика в растворах 2 М KCl - 5·10⁻⁹ М; в - 2 М KBr - 5·10⁻⁸ М. Мембранны получали из смеси фосфатидилсерина с эргостерином в соотношении 20:1; с - 5·10⁻⁹ М в растворе 2М KBr на мембранных из смеси фосфатидилсерин:стигмастерин в соотношении 2:1 [Kasumov et al., 1981].

Таблица 6.4.3.

Параметры ионного канала в присутствии леворина А₂ в растворах KCl и KBr [Kasumov et al., 1981].

	2 М KCl	2 М KBr
g _m (ом ⁻¹ ·10 ¹²)	0,4±0,1	0,5±0,1
леворин А ₂ (М·10 ⁻⁹)	5	10
T _o , с	2,5±0,3	5,2±0,4
T ₃ , с	3,5±0,2	0,86±0,05

g_m – проводимость одиночного канала при мембранном потенциале 200 мВ; леворин А₂ – концентрация, необходимая для получения одиночных каналов (в течение 15 мин.); T_o – время жизни канала в открытом состоянии; T₃ – время жизни канала в закрытом состоянии.

6.5. Вольтамперные характеристики и избирательность одиночного канала

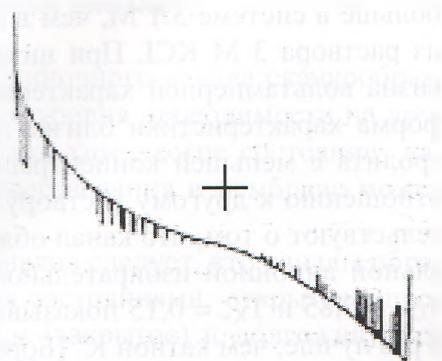
Как уже отмечалось выше, мембрана, модифицированная амфотерицином В, нистатином и микогентаном, неидеально проницаема для анионов. Неидеальная избирательность могла быть результатом образования в мембранах двух типов каналов: катионизбирательных и анионизбирательных, функционирующие независимо друг от друга. С целью исследования выдвинутого предположения были исследованы вольтамперные характеристики и избирательность одиночного канала.

Для одиночных каналов, образованных амфотерицином В, нистатином и микогептином, форма вольтамперных характеристик в симметричных растворах электролита нелинейна и совпадает с формой вольтамперных характеристик многих каналов.

Вольтамперная характеристика канала имеет такую же форму, как и у мембранны с большой проводимостью. По форме вольтамперной характеристики одиночного канала можно сказать, какая стадия, граничная или внутренняя, определяют перенос ионов через канал. Предполагается, что внешний электрический потенциал практически весь падает на внутренней части мембранны, а падение внешнего потенциала на границе незначительно [Levitt, 1978]. Увеличение приложенного внешнего потенциала приводит к росту скорости переноса ионов через середину канала. Если ток через канал определяется переносом ионов через энергетический барьер (или барьеры) в середине канала, это приведет к росту проводимости с ростом напряжения на мембране – вольтамперная характеристика будет наклоняться к оси токов. Если ток определяется скоростью входа ионов в канал, то при больших напряжениях на мембране все ионы, входящие в канал, будут переноситься через него – ток будет стремиться к насыщению [Ермишкін, Зильберштейн, 1982]. Вольтамперная характеристика одиночного амфотерицинового канала приведена на рис. 6.5.1.

В симметричных растворах электролита вольтамперная характеристика наклоняется при высоких концентрациях к оси тока. Сплошная кривая представляет собой функцию $sh(FV/4RT)$. При исследовании вольтамперной характеристики одиночного канала в градиенте концентраций электролита по обе стороны мембранны (1 М и 3 М KCl) оказалось, что нулевой ток канала наблюдается при потенциале $E_0=17,0\pm2,0$ мВ, рис. 6.5.2.

Рис. 6.5.1. Вольтамперная характеристика одиночного амфотерицинового канала на мембране из фосфолипидов с холестерином 20:1. Водный раствор содержит $2 \cdot 10^{-8}$ М амфотерицина В, 2 М KCl, pH 6,5; 22°C. [Ермишкін *et al.*, 1977; Касумов, 1980].



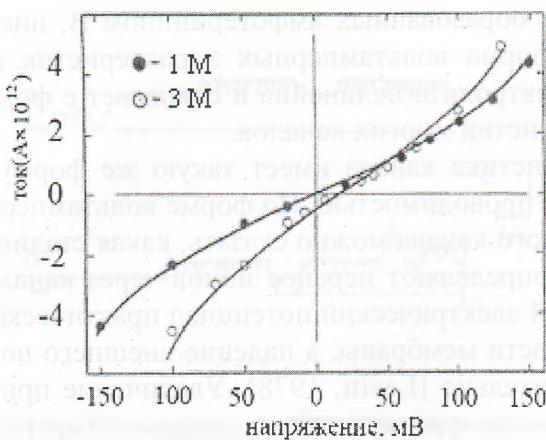


Рис. 6.5.2. Вольтамперные характеристики одиночных амфотерициновых ($2 \cdot 10^{-8}$ М) каналов в растворах KCl, pH 6,5; 23°C. Весовое соотношение фосфолипид: холестерин 20:1. Концентрация KCl во внешнем растворе 1 М. Во внутреннем растворе концентрации KCl равны 1 М (●); 3 М KCl (○). По оси абсцисс указан потенциал внутреннего раствора по отношению к внешнему [Ermishkin et al., 1977].

При этом раствор электролита с меньшей концентрацией был более отрицательно заряжен по отношению к другому раствору. Знак и величина потенциала свидетельствуют о том, что канал обладает преимущественной, но не идеальной анионной избирательностью. Это означает, что через канал проходит как катион, так и анион и именно это свойство определяет неидеальную анионную избирательность мембраны в целом. По-видимому, избирательность определяется природой молекулярных групп, выстилающих внутренность канала.

Интересная особенность вольтамперных характеристик на рис. 6.5.2 – их пересечение в области положительных потенциалов. В этой области потенциалов анион идет через оба канала из раствора 1М. Несмотря на то, что движущая сила, действующая на анион, больше в системе 1:1 М, ток больше в асимметричной системе. По-видимому, это есть результат вклада катионов в ток. Действительно, поток катионов при положительных потенциалах должен быть больше в системе 3:1 М, чем в системе 1:1 М, так как катионы идут из раствора 3 М KCl. При низких концентрациях электролита кривизна вольтамперной характеристики уменьшается. При 0.2 М KCl форма характеристики близка к линейной. При этом раствор электролита с меньшей концентрацией заряжен более отрицательно по отношению к другому раствору. Знак и величина потенциала свидетельствуют о том, что канал обладает преимущественной, но не идеальной анионной избирательностью. Значение транспортных чисел $T_{Cl^-} = 0,85$ и $T_{K^+} = 0,15$ показывает, что анион Cl^- идет через канал в 6 раз лучше, чем катион K^+ [Борисова и др., 1978].

Транспортные числа определялись из соотношений:

$$T_K + T_{Cl} = I, \quad E_o = T_K \cdot E_K + T_{Cl} \cdot E_{Cl}, \quad (6.5.1)$$

где $E_K = -E_{Cl}$

Селективность одиночных каналов такая же, как и у мембранных с высокой проводимостью в присутствии высокой концентрации амфотерицина В. На мемbrane с большим числом каналов, разделяющей растворы 1 М и 3 М KCl, потенциал нулевого тока оказался равным $18,5 \pm 0,5$ мВ. Эта величина совпадает в пределах ошибки с величиной потенциала нулевого тока для одиночного канала. Вольт-амперные характеристики одиночного канала и мембранных с большим числом каналов хорошо совпадают между собой как в симметричных условиях (1 М:1 М KCl), так и в градиенте соли (1 М:3 М KCl) [Касумов, 1980].

Совпадение данных одиночного канала и мембранных с большим числом каналов по селективности и по форме вольтамперных характеристик свидетельствуют в пользу того, что при больших концентрациях антибиотика мембрана ведет себя как ансамбль из большого числа независимых каналов. Это утверждение подтверждается изменениями спектров шума мембранных с большим числом амфотерициновых каналов [Безруков и др., 1979]. Таким образом, одиночные каналы являются самостоятельными единицами проницаемости мембранных, модифицированных ПА, и что через каналы проходят как катионы, так и анионы и именно это свойство определяет неидеальную анионную избирательность мембранных в целом.

6.6. Функционирование одиночных каналов во времени. Типы состояний полиеновых каналов. Переходы между открытым и закрытым состояниями в амфотерициновом канале

Наблюдаемые за время работы одиночного канала скачкообразные переходы с одного стационарного уровня проводимости на другой свидетельствуют о том, что физико-химическое состояние канального комплекса за время его существования в мембране может обратимо изменяться.

Из записей работы одиночных каналов следует, что каналы образованные ПА, характеризуются тремя состояниями: открытым (проводящим); короткоживущим закрытым (закрытое) и долгоживущим закрытым (неактивное или запертое). Полиеновые каналы имеют со-

ответствующие характеристические обозначения средних времен жизни: T_0 – среднее время жизни в открытом состоянии, T_3 – среднее время жизни в закрытом состоянии, $T_A = T_0 + T_3$ – среднее время жизни в активном состоянии, T_N – среднее время жизни в неактивном состоянии. Совокупность последовательных переходов между открытым (T_0) и закрытым (T_3) можно обозначить как активное состояние канала (T_A). Эти параметры важны при сравнительном изучении поведения каналов, образованных антибиотиками различной структуры. Условные обозначения состояний канала приведены на рис. 6.6.1. Среднее время жизни полиеновых каналов подсчитывалось как общее время пребывания канала в данном состоянии, деленное на число переключений ($n \sim 100$), что дает ошибку в определении средних времен около 10%. Такая точность достаточна, так как случайные вариации параметров каналов во времени сравнительно невелики. Это было проверено по длительной записи переходов (более 1000 переходов) одного канала в 2 М KCl. Среднее время жизни канала в открытом состоянии, подсчитанное из разных участков этой записи по 100 переходам, отличается в 1,5 раз. Для каналов, полученных в 2 М KCl, это время соответствует ($T_0 = 3-4$ с). Среднее время жизни канала в закрытом состоянии (T_3) остается постоянной для всех ПА и их производных ($T_3 = 0,13$ с) [Касумов, 1980].

Кроме проводящего состояния, амфотерициновый канал имеет два непроводящих состояния, которые называют “закрытым” и “запертым”. Эти состояния отличаются друг от друга временем жизни канала. Переходы между открытым и закрытым состояниями не зависят от мембранныго потенциала и от концентрации стерина в мембране. Эти переходы, как оказалось, зависят от типа и концентрации электролита (см. рис. 6.4.2 и 6.4.3) [Ermishkin et al., 1977].

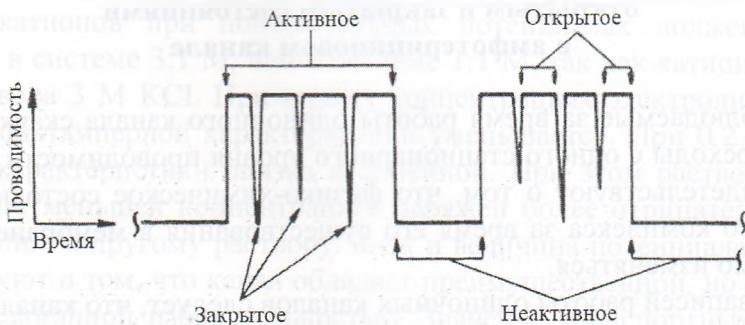
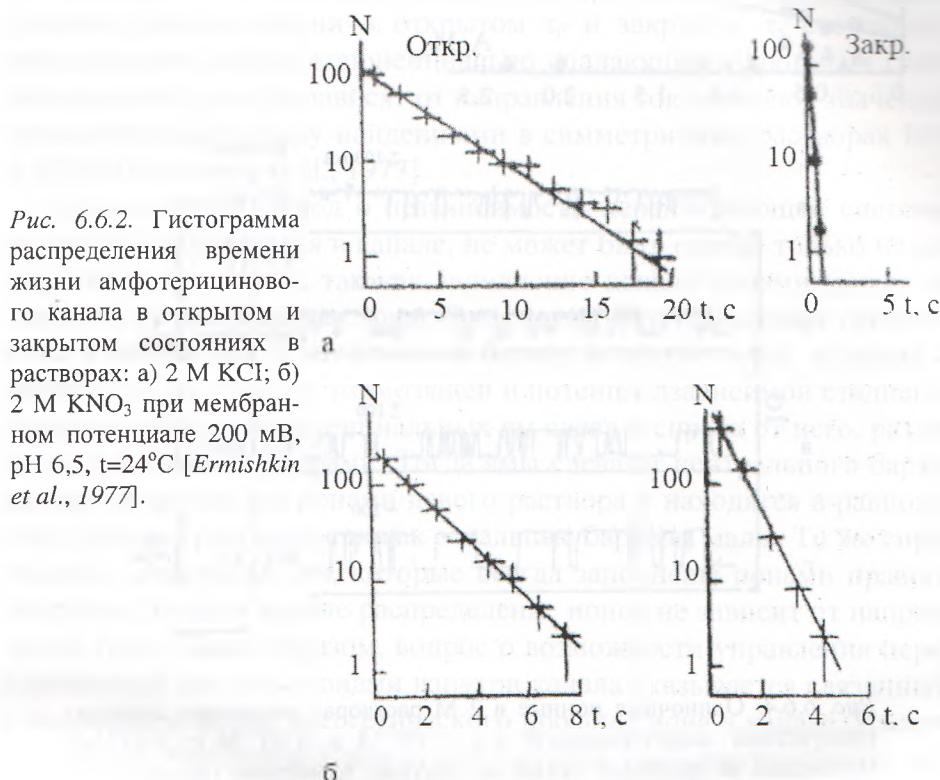


Рис. 6.6.1. Условные обозначения состояний ионного канала.
[Поцелуев, 1978; Касумов, 1980].

Было обнаружено, что как тип катиона, так и тип аниона влияют на времена жизни канала в открытом и закрытом состояниях. Функции распределения этих времен жизни для растворов KCl и KNO₃, показаны на рис. 6.6.2. Все распределения одноэкспоненциальные. Средние значения, полученные для этих функций, сильно различаются для KCl и KNO₃, причем в случае KCl, время жизни в непроводящем состоянии меньше, а в проводящем больше, чем в KNO₃.



На рис. 6.6.3 показаны зависимости времени жизни в открытом (τ_0) и закрытом (τ_3) состояниях от концентрации соли. Время жизни канала в закрытом состоянии (τ_3) не зависит от концентрации соли, а время жизни канала в открытом состоянии (τ_0) примерно линейно возрастает с ростом концентрации соли.

Время жизни канала в открытом состоянии зависит не только от концентрации соли, но и от вида самого электролита, как в симметричных, так и в асимметричных растворах соли. На рис. 6.6.4 показана запись одиночных каналов в растворах разных электролитов.

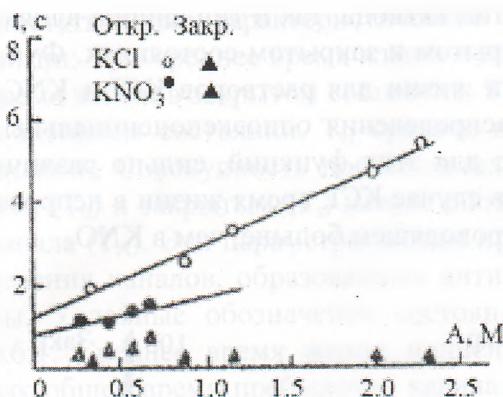


Рис. 6.6.3. Зависимость времени жизни канала в открытом (t_0) и закрытом (t_3) состояниях от активности электролита в растворах KCl и KNO₃ [Поцелуев, 1978].

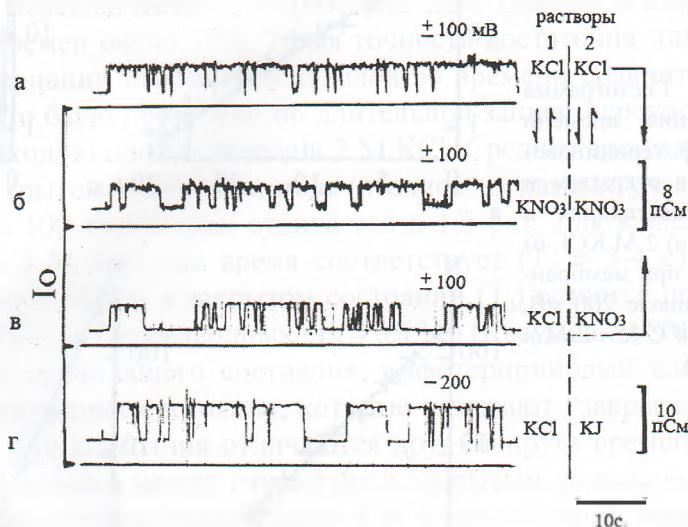


Рис. 6.6.4. Одиночные ионные в 2 М растворах различных солей в присутствии амфотерицина В: а, б - $2 \cdot 10^{-8}$ М; в - $1 \cdot 10^{-7}$ М; г - $5 \cdot 10^{-7}$ М Потенциал на мемbrane указан на рисунке. Мембранны получали из смеси фосфатидиллипидов с холестерином в весовом соотношении 20:1 при pH 6,5, t=22°C [Поцелуев, 1978; Касумов, 1980].

Можно предположить несколько причин солезависимости работы полиеновых каналов. Чрезвычайно привлекательной кажется гипотеза о том, что переключающая система управляет ионом, находящимся внутри канала. Например, ион в канале может индуцировать дипольный момент у канала, благодаря наличию поляризуемой системы двойных связей, а также влиять на расположение гидрофильных групп внутри канала, с которыми он непосредственно реагирует. Эти влияния могут привести к небольшим солезависимым

изменениям расположения групп и распределения зарядов в канальном комплексе, существенным для работы переключающей системы. Если амфотерициновый канал находится в мембране, разделяющей растворы разных солей, то можно ожидать, что при разном направлении электрического поля канал будет заполняться разными ионами. Если эта гипотеза верна, то переходы между состояниями канала будут зависеть от направления поля. Если с одной стороны мембранны находится KCl, а с другой стороны мембранны KNO₃, то гистограммы времени жизни в открытом τ_0 и закрытом τ_3 состояниях представляют собой экспоненциально спадающие функции, и средние времена τ_0 и τ_3 не зависят от направления тока и имеют значения, промежуточные между найденными в симметричных растворах KCl и KNO₃ [Ermishkin et al., 1977].

Однозначный вывод о независимости переключающей системы от ионов, находящихся в канале, не может быть сделан только на основании этого опыта, так как заполнение канала ионами может не зависеть от направления тока. Представим потенциальный профиль иона в канале как один большой барьер в центре поры, который и является единственной тормозящей и потенциалзависимой стадией и имеются несколько потенциальных ям слева и справа от него, разделенных малыми барьерами. Тогда ямы слева от центрального барьера всегда заполнены ионами левого раствора и находятся в равновесии с ионами раствора, так как остальные барьеры малы. То же справедливо для правых ям, которые всегда заполнены ионами правого раствора. В таком канале распределение ионов не зависит от направления тока. Таким образом, вопрос о возможности управления переключающей системы ионами изнутри канала оказывается связанным с вопросом о форме энергетического профиля иона в канале. Из этого следует, что переход между состояниями оказывается одним элементарным процессом со скоростью, промежуточной между скоростями перехода канала в симметричных условиях. Это означает, что переход между состояниями не связан с изменениями в отдельных полупорах канала, а является результатом перестроек канала как единого целого [Ермишкин, Зильберштейн, 1982].

Солезависимость переходов может быть результатом специфического взаимодействия ионов с заряженными группами антибиотиков, повернутыми в воду. Оказалось, что каналы, образованные производными амфотерицина В с нейтрализованным положительным (N-ацетиламфотерицин В) или отрицательным (метиловый эфир) зарядами, имеют такую же солезависимую переключающую систему,

как и амфотерицин В. Времена жизни состояний канала могут зависеть от поверхностного потенциала липидных мембран, который определяется концентрацией электролита, а, возможно, и видом электролита из-за специфической адсорбции ионов на заряженных группах фосфолипидов. В частности, было показано, что степень адсорбции хлорида и нитрата существенно отличаются [Барсуков и др., 1977]. Однако поверхностный потенциал бислоя в растворах солей высокой концентрации, в которых наблюдаются одиночные каналы, уж очень мал. Даже добавление 10 mM CaCl_2 к растворам не изменяло переключающей системы. Изменение pH растворов от 4.0 до 8.0 также не изменяет τ_0 и τ_3 . Свойства каналов, образуемых амфотерицином В в мембранах из отрицательно заряженного фосфатидилсерина, так же зависят от типа соли, как и в мембранах из общих фосфолипидов мозга [Поцелуев, 1978].

Можно ожидать, что солезависимость переходов амфотерициновых каналов является результатом изменения поверхностного натяжения липидных мембран под действием соли. Страгих доказательств этого предположения нет, но в пользу его говорят следующие наблюдения:

1. Если канал возникает в мемbrane сразу после ее образования, то со временем частота переходов уменьшается и через 5-10 мин устанавливается. Если канал возникает через 10 мин после образования мембранны, то частота его переходов постоянна. Этот результат показывает, что переходы в канале зависят от свойств мембранны. По данным Ивкова и Берестовского поверхностное натяжение мембранны падает в течение нескольких минут после ее образования [Ивков, Берестовский, 1981, 1982].

2. В мембранных из чистого холестерина переходы между состояниями происходят быстрее, чем в фосфолипидных мембранных. Поверхностное натяжение у холестериновых мембранны выше [Поцелуев, 1978].

3. Добавление детергента тритона X-100 в концентрации 0.003% увеличивает поверхностное натяжение БЛМ. С другой стороны, это приводит к увеличению скоростей перехода между состояниями [Поцелуев, 1978].

4. С увеличением концентрации соли уменьшается поверхностное натяжение БЛМ и уменьшается скорость переходов (растет время жизни в обоих состояниях) [Ermishkin et al., 1977].

Таким образом, высока вероятность того, что переходы между состояниями в амфотерициновом канале связаны с совершением ра-

боты силами поверхностного натяжения, то есть с перестройками, вызывающими изменение геометрии мембранны.

Временные параметры канала в открытом и закрытом состояниях, проводимость самого канала, а также концентрация антибиотика, необходимая для получения одиночного канала, оказались зависимы от концентрации электролита в водном растворе. В таб. 6.6.1 показаны изменения этих параметров от концентрации KCl.

Таблица 6.6.1.

Зависимость параметров амфотерицинового канала от концентрации KCl [Ermishkin et al., 1977; Касумов, 1986 a]

KCl (M)	0,5	1,0	1,5	2,5	3,5
g, пСм	2,0±0,4	3,75±0,5	5,5±0,5	6,9±0,5	8,4±0,8
Амфотерицин $1 \cdot 10^{-8}$ М	10	6,5	5	3	2
τ_o (сек)	1,9±0,2	-	2,5±0,6	-	4,3±0,5
τ_z (сек)	0,14±0,01	-	0,12±0,02	-	0,13±0,02

g – проводимость одиночного канала, измеренная при потенциале на мемbrane 200 мВ; $1 \cdot 10^{-8}$ М – концентрация, необходимая для получения и стационарной записи нескольких каналов в течение 10 мин.; τ_o (с) - среднее время жизни канала в открытом состоянии; τ_z (с) - среднее время жизни канала в закрытом состоянии.

Переходы между состояниями зависят от структуры молекул антибиотика. Как будет отмечено позже, амфотерицин В с модифицированными полярными группами имеет такие же скорости переходов между открытым и закрытым состояниями, как и исходный амфотерицин В. Другой антибиотик – нистатин- отличается от амфотерицина В структурой лактонного кольца. Каналы, образуемые нистатином, принципиально отличаются от амфотерициновых тем, что они не совершают практически переходов в закрытое состояние. Именно поэтому на мембранах с большим числом нистатиновых каналов не удается наблюдать шум тока, связанный с переходами в канале [Romine et al., 1977]. На мембранах с амфотерициновыми каналами такой шум хорошо виден [Безруков и др., 1979; Безруков, Сибелев, 1980; Малафриев и др., 1991]. Каналы, образованные амфотерицином В, нистатином, микогептином и леворином в диапазоне pH 4,5-8 характеризуются большими временами жизни в активном состоянии ($T_A \sim 240$ с). Время T_A остается постоянным для исходных антибиотиков, но резко уменьшается в присутствии их производных. Функциональное значение запертого состояния канала будет обсуждаться в главе 6.8.

6.7. Сборка полиеновых каналов и проницаемость мембран для антибиотиков

Как было отмечено выше, для сборки полиеновых каналов основным условием является наличие стерина в мембране, как рецептора ПА. Процесс сборки каналов в присутствии амфотерицина В, нистатина, микогептина, леворина и их производных очень медленный. Время установления проводимости мембран с указанными антибиотиками для мембран из общих фосфолипидов мозга порядка 40-80 мин. Столь же медленно происходит разборка каналов, образуемых этими ПА. Скорость сборки каналов растет с увеличением концентрации антибиотика в водных растворах и с увеличением концентрации стерина в мембране. На скорость сборки влияет также липидный состав мембран и концентрация электролита в водных растворах [Ermishkin et al., 1977; Касумов, Либерман, 1972, 1973; Finkelstein, Holz, 1973]. Данные по зависимости проводимости мембран от молярной концентрации антибиотиков в водных растворах у разных авторов сильно различаются. В настоящее время нет достаточно достоверных количественных данных о механизме сборки полиеновых каналов. Четко не установлено ни соотношение между количеством молекул антибиотика и стерина в канале, ни количество молекул в канальном комплексе. Тем не менее олигомерная модель амфотерицинового канала, описанная выше, хотя строго и не доказана, однако четко объясняет полученные экспериментальные данные.

Проводимость липидных мембран в присутствии больших концентраций каналаобразующих антибиотиков определяется числом каналов в мембране N , долей времени, которую канал проводит ток p и проводимостью одного канала $g_1:g = N \cdot p \cdot g_1$. Сравнение свойств одиночных каналов с интегральными свойствами мембранны с большим числом каналов позволяет описать независимо сборку каналов (N), управление ими (p) и свойства открытого проводящего канала (g_1) [Ермишкин, Зильберштейн, 1982].

После введения антибиотика в один или оба водных раствора, омывающих мембрану, наблюдается рост во времени проводимости мембранны, что связывают с увеличением числа каналов. Это – видимый, конечный эффект. А что происходит с антибиотиком? В каких процессах он участвует? Чтобы ответить на эти вопросы необходимо последовательно рассмотреть возможные процессы: 1 – диффузия антибиотика к мембране; 2 – сорбция на мембрану; 3 – перенос мо-

лекул антибиотика через мемрану; 4 – агрегация с образованием каналов. У всех исследованных ПА ярко выражены амфи菲尔ные свойства: они плохо растворимы в воде и в н-алканах, зато обладают поверхностно-активными свойствами. Таким образом, первым этапом в сборке канала является сорбция антибиотика на границе мембрана-водный раствор.

Для количественной оценки распределения антибиотика между границей мембранны и водными растворами пользуются безразмерным коэффициентом распределения К: $K=\sigma/0.5\cdot\delta\cdot C_b$, где σ – поверхностная концентрация мономеров антибиотика (моль/см²), 0.5δ – половина толщины мембранны (около 2.5 нм), C_b – концентрация антибиотика в водном растворе (моль/см³). Коэффициент распределения в большей степени характеризует эффективность антибиотика. Оценим, как быстро может устанавливаться равновесие между мономерами на поверхности мембранны и водным раствором. Будем считать, что адсорбция достаточно быстрая и единственное ограничение в доставке антибиотика на мемрану – диффузия его через неперемешиваемый примембранный слой электролита [Шишлов и др., 1975]. Тогда изменение концентрации антибиотика на поверхности мембранны будет определяться уравнением: $\sigma=D(C_b-C_m/K)/l$, где D – коэффициент диффузии антибиотика в воде ($D \sim 2-5 \cdot 10^{-6}$ см²/с); l – толщина неперемешиваемого слоя ($l \sim 0.02$ см); C_b – концентрация антибиотика в водном растворе в непосредственной близости от мембранны. Отсюда следует, что концентрация мономеров антибиотика в мемbrane будет нарастать во времени экспоненциально с постоянной времени $\tau = \delta \cdot l / 2D$, τ определяет время увеличения концентрации мономеров в мемbrane в 2.7 раза. Для $K=20\ 000$ получим оценку $\tau \sim 30$ с. Постоянная времени сорбции антибиотика τ будет определять и скорость выхода мономеров из мембранны после удаления антибиотика из водных растворов. Предположение о диффузионном ограничении скорости сорбции антибиотика может быть проверено: при очень интенсивном перемешивании водных растворов можно уменьшить толщину неперемешиваемого слоя и, тем самым, скорость сорбции должна увеличиться [Ермишкин, Зильберштейн, 1982].

Точно измерить коэффициент распределения ПА между БЛМ и водным раствором пока не удалось. Однако можно оценить коэффициент распределения по величине константы связывания амфотерицина В с холестерином в водном растворе. Из данных, полученных по спектрам возбуждения флуоресценции амфотерицина В, следует, что константа диссоциации комплекса амфотерицин-холестерин

равна 0.5-12 мкм, т.е. коэффициент распределения амфотерицина В между холестерином и водным раствором равен $5\div0.2\cdot10^6$ [Bittman, Fischkoff, 1972]. Отсюда следует, что коэффициент распределения между БЛМ и раствором должен зависеть от концентрации холестерина в мембране и для мембран с соотношением липид-холестерин 20:1 можно ожидать, что эта величина порядка $10^4\text{-}10^5$. Измерения по поглощению липосомами амфотерицина В показывают, что коэффициент распределения не менее 5000 [Ермишкин, Зильберштейн, 1982].

Каналы, образуемые ПА, в отличие от аламетициновых или грамицидиновых каналов живут в мембранах очень долго. Время спада проводимости после удаления антибиотика из водных растворов (20 мин для нистатина и 1.5 ч для амфотерицина В) отражает кинетику распада каналов, а не кинетику десорбции антибиотика. Это было показано следующим образом. Финкельштейн и Хольц ранее показали, что молекулы амфотерицина В, не связанные в пору, отмываются из мембраны быстро, менее чем за 3 мин [Finkelstein, Holz, 1973]. Опыт состоял в следующем: мембрана долго (40 мин) выдерживалась с антибиотиком лишь в одном растворе. За это время полупоры успевают собраться, так как в опытах с двухстороннем действии при той же концентрации антибиотика за 40 мин появляется большая проводимость. Затем антибиотик был убран из раствора быстрой сменой раствора (за 3 мин) и сразу добавлен антибиотик в другой раствор. Если полупоры на первой стороне мембранны не успели отмыться, должно наблюдаться нарастание проводимости. Авторы не обнаружили никакого нарастания проводимости. Это означает, что антибиотик, не собранный в поры в любом виде (и мономеры, и полупоры) отмываются достаточно быстро. Чтобы убедиться, что на мембранах из фосфолипидов мозга с низким содержанием холестерина наблюдаются те же явления, были повторены опыты с отмыvkой за время 1 мин. И тоже после добавления амфотерицина В с другой стороны мембранны не имели измеримой проводимости [Ермишкин, 1980]. Таким образом, судя по скорости отмыvки антибиотика из мембранны, коэффициент распределения для амфотерицина В не выше 50 000. Иная картина наблюдается на мембранных с высоким содержанием холестерина (фосфолипид:холестерин 2:1). При тех же экспериментальных условиях, указанных выше, на мембране успевает сорбироваться достаточная концентрация полупор, которые слабо отмываются из мембранны [Ибрагимова и др., 2003]. Это приводит к резкому увеличению коэффициента распределения антибиотика ме-

жду мембраной и водой. Следует отметить, что увеличение коэффициента распределения антибиотика (увеличение его эффективности) с точки зрения фармакологии не всегда выгодно. Для ПА возникает проблема выведения антибиотика из организма, ввиду их относительной токсичности. Данная проблема может быть решена путем увеличения степени растворимости антибиотика в воде. Это может уменьшить коэффициент распределения антибиотика между мембраной и водой за счет модификации молекул ПА водорастворимыми полярными группами (этот вопрос будет подробно обсужден в конце монографии).

Исследование проницаемости липидных мембран для ПА имеет фундаментальное значение. Ранее было показано, что амфотерицин В и нистатин эффективны на БЛМ, только когда они вводятся с двух сторон мембранны. При введении антибиотиков с одной стороны мембранны при концентрациях в 10^2 - 10^4 раз больших, чем с двух сторон мембранны, наблюдается слабое увеличение проводимости. Это при условии, что проводимость растет как 4-12 степень концентрации антибиотика. Отсюда ясно, что проницаемость для ПА не очень высока [Алекберли, Топалы, 1980]. ПА эффективны, когда вводятся с одной стороны клеточных мембранны. Если ПА не проникают через мембранны, то действие их на биологические мембранны не имеет ничего общего с действием на БЛМ, когда антибиотик добавлен по обе стороны мембранны. Проницаемость БЛМ для нистатина была изменена прямо по изменению концентрации антибиотика с другой стороны мембранны [Алекберли, Топалы, 1980]. Для увеличения чувствительности метода объем раствора, в который переходил антибиотик, был всего 0.05 мл. Концентрация антибиотика в нем измерялась по сопротивлению БЛМ. Предварительно была построена калиброчная кривая зависимости сопротивления БЛМ от концентрации нистатина с одной стороны мембранны при постоянной концентрации нистатина с другой стороны. Оказалось, что концентрация антибиотика в малом объеме растет линейно со временем и за несколько часов проводимость БЛМ сильно падает. Этого не наблюдается, если объемы растворов по обе стороны мембранны большие. Коэффициент проницаемости для БЛМ из общих фосфолипидов мозга оказался равным 10^{-8} - 10^{-11} см/с. При концентрациях антибиотика, используемых в опытах с микроорганизмами, такой проницаемости вполне достаточно, чтобы за время инкубации внутри микроорганизмов накопился антибиотик в количестве, требуемого для симметричного действия антибиотиков. Ранние эксперименты по изучению прони-

цаемости липидных мембран для ПА показали, что методом двух мембран не удалось обнаружить проход сквозь мембрану ни одного из ПА в течение 40 мин [Касумов и др., 1971]. Также не был обнаружен проход сквозь мембрану амфотерицина В и леворина меченные тритием [Касумов, 1986 а].

6.8. Свойства ионных каналов в присутствии производных амфотерицина В, модифицированных по полярным группам. “Запертое” состояние амфотерицинового канала

Структура исследованных антибиотиков приведена на рис. 6.8.1, на котором показаны структурные отличия производных амфотерицина В. Макролидное кольцо молекулы (R) оставалось неизменным, а аминная и карбоксильная группа, расположенные при C₁₆ и C₁₉, была модифицирована соответствующим образом, как показано на рис. 6.8.1.

В таблице 6.8.1 показаны структурные отличия в молекулах производных амфотерицина В и других ПА.

На всех производных амфотерицина В были обнаружены одиночные ионные каналы с проводимостью 5-7 пСм. Модификация полярной части молекул амфотерицина В сильно изменяет временные характеристики ионного канала. На рис. 6.8.2 приведены записи тока через ионные каналы, образованные амфотерицином В (строка 1) и

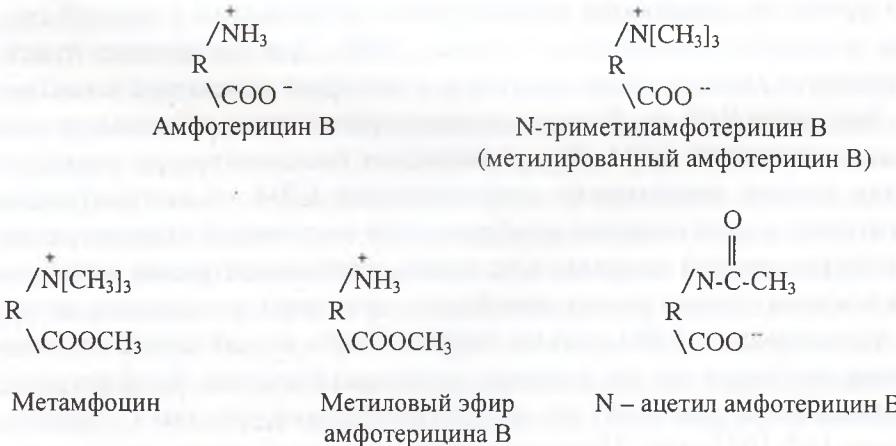


Рис. 6.8.1. Структурные отличия производных амфотерицина В. R – радикал соответствует лактонному кольцу молекул антибиотиков. Карбоксильная и аминная группы расположены при C₁₆ и C₁₉, соответственно.

Таблица 6.8.1.

**Структурные отличия молекул аналогов амфотерицина В*
и других ПА [Kasumov et al., 1981; Ермишик, Зильберштейн, 1982]**

Антибиотик	Радикал										
	C ₅	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₆	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₅	C ₂₉
Амфотерицин В	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-COOH	-H	-NH ₂	=	=	=
Метилированный амфотерицин								-N(CH ₃) ₃ ⁺			
Метиловый эфир амфотерицина						-COOCH ₃					
N-ацетил амфотерицин								-NCOCH ₃			
Метамфоцин						-COOCH ₃		-N(CH ₃) ₃ ⁺			
Нистатин		-OH	-H	-H	-OH	-COOH	-H	-NH ₂	=	-H	-H
Кандидин	=O										
Микогептин	=O	-OH	-H	-H	-OH		-H	-NH ₂	=	=	=
Леворин A ₂	-H	=O	-H	-OH	-H	-OH	COOH	-OH	NH ₂	=	=

*В верхней строке указаны радикалы молекулы амфотерицина В. Для других антибиотиков указаны только отличия от структуры молекулы амфотерицина В.

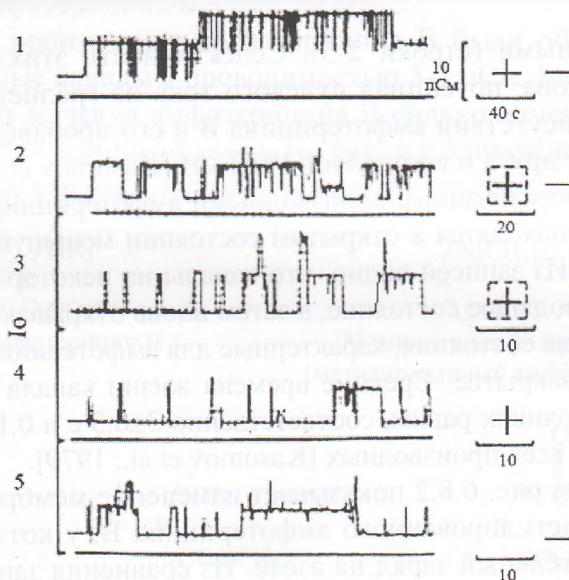
его производными (строки 2-5). Селективность этих каналов примерно одинакова: потенциал нулевого тока на градиент KCl (2 М – 0,735 М) в присутствии амфотерицина В и его производных не отличается друг от друга и составляет 19±2 мВ [Kasumov et al., 1979].

Каналы, образованные производными амфотерицина В, в отличие от исходного, находятся в открытом состоянии меньшую долю времени, рис. 6.8.2. Из записей видно, что каналы на некоторое время переходят в непроводящее состояние, а затем вновь открываются. При этом сохраняются два состояния, характерные для амфотерицинового канала – открытое и закрытое. Средние времена жизни канала в открытом и закрытом состояниях равны, соответственно 3±0,5 с и 0,13±0,05 с и сохраняются для всех производных [Kasumov et al., 1979].

Запись 2 на рис. 6.8.2 показывает изменение мембранныго тока в присутствии метилированного амфотерицина В, у которого экранирован положительный заряд на азоте. Из сравнения записей 1 и 2 на рис. 6.8.2 видно, что среднее время в активном состоянии канала (T_A), образованного метилированным амфотерицином В, значительно меньше, чем у амфотерицинового канала (6±1 с и 260 с соответственно, табл. 6.8.2). Можно доказать, что запись 2 на рис. 6.8.2 отражает поведение одного и того же канала. Допустим, что каждое включение активного состояния есть результат работы нового канала. Время жизни канала в активном состоянии больше, чем время

жизни канала в неактивном состоянии, и, поэтому, велика вероятность одновременного включения двух и более каналов. Однако, в опыте при длительной записи тока наблюдается один уровень проводимости. Это и доказывает, что работает только один канал [Kasumov et al., 1979].

В присутствии метамфоцина, у которого не только экранирован положительный заряд на азоте, но и полностью нейтрализован отрицательный заряд карбоксильной группы, среднее время жизни в активном состоянии становится еще меньше – $1,6 \pm 0,2$ с (запись 3 на рис. 6.8.2). Трудно сказать, работает в этом случае один или несколько каналов. Поэтому определить время жизни канала в неактивном состоянии невозможно. Метамфоцин сохраняет положительный заряд на азоте в диапазоне pH от 3 до 11. Во всем этом диапазоне pH Т_A каналов не изменяется. Для метилового эфира амфотерицина В, у которого нейтрализован только отрицательный заряд на карбоксиле, наблюдаются такие же короткие времена жизни канала в активном состоянии, как и в случае метамфоцина (запись 4 на рис. 6.8.2).



Rис. 6.8.2. Дискретные изменения проводимости мембран в присутствии амфотерицина В и его производных. Потенциал на мемbrane 200 мВ, 2 M KCl, pH 7,0; t=23°C. фосфолипид:холестерин 20:1. 1 – амфотерицина В - $2 \cdot 10^{-8}$ M; 2 - метилированный амфотерицин В - $5 \cdot 10^{-8}$ M; 3 – метамфоцин - $7 \cdot 10^{-6}$ M; 4 – метиловый эфир амфотерицина В - $1 \cdot 10^{-6}$ M; 5 –N-ацетил амфотерицин В - $3 \cdot 10^{-7}$ M. Справа обозначено наличие зарядов на аминной и карбоксильной группах молекул антибиотиков. Пунктирной линией обозначены заряды, экранированные метильными группами [Kasumov et al., 1979].

Изредка канал попадает в активное состояние на более продолжительное время. Среднее время в активном состоянии – $2,5 \pm 0,3$ с [Kasumov et al., 1979].

Производное амфотерицина В – N-ацетил амфотерицин В, у которого нейтрализован только положительный заряд на азоте, дает аналогичную картину поведения канала. Более продолжительные включения на этом производном встречаются чаще (запись 5 на рис. 6.8.2, $T_A = 3,0 \pm 0,3$ с). В кислых pH N-ацетил амфотерицин В теряет отрицательный заряд на карбоксиле и становится нейтральным полиеном. Потеря второго заряда приводит к еще большему уменьшению T_A .

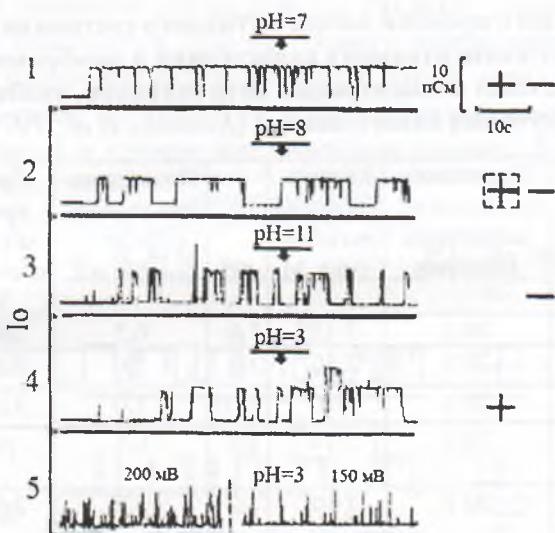
Таблица 6.8.2.

Значение среднего времени жизни активного состояния каналов (T_A) при различных концентрациях холестерина в мембранным растворе.

В таблице указаны концентрации антибиотиков, необходимые для получения одного канала [Kasumov et al., 1979]

Название антибиотика	Отношение фосфолипид: холестерин мг/мг/мл	Концентрация антибиотика, М	pH	Проводимость канала, пСм $E_M = 200$ мВ	Среднее время в активном состоянии, T_A , с	Наличие зарядов
Амфотерицин В	20:1	$2 \cdot 10^{-8}$	7,0	6,5	260 ± 40	+ –
Амфотерицин В	20:1	$2 \cdot 10^{-8}$	3,0	5,0	$2,2 \pm 0,4$	+ –
Амфотерицин В	20:1	$7 \cdot 10^{-8}$	11,0	5,0	$3,0 \pm 0,6$	0 –
Метилированный амфотерицин В	20:1	$5 \cdot 10^{-8}$	7,0	6,5	6 ± 1	+ –
Метиловый эфир амфотерицина В	20:1	$1 \cdot 10^{-6}$	7,0	6,5	$2,5 \pm 0,3$	+ 0
Метиловый эфир амфотерицина В	20:1	$1 \cdot 10^{-5}$	11,0	6,0	$1,8 \pm 0,2$	0 0
Метиловый эфир амфотерицина В	20:10	$1 \cdot 10^{-7}$	11,0	6,0	14 ± 4	0 0
N-ацетил амфотерицин В	20:1	$3 \cdot 10^{-7}$	7,0	5,0	$3,0 \pm 0,3$	0 –
N-ацетил амфотерицин В	20:1	$3 \cdot 10^{-7}$	3,0	6,0	$0,3 \pm 0,06$	0 0
N-ацетил амфотерицин В	20:10	$2 \cdot 10^{-8}$	3,0	6,0	$9,2 \pm 3$	0 0
Метамфоцин	20:1	$7 \cdot 10^{-8}$	7,0	7,0	$1,6 \pm 0,2$	+ 0
Метамфоцин	20:2	$4 \cdot 10^{-8}$	7,0	7,0	75 ± 20	+ –
Нистатин	20:1	$1 \cdot 10^{-7}$	7,0	1,8	220 ± 25	+ 0
Нистатин	20:1	$5 \cdot 10^{-7}$	10,0	1,8	$7,0 \pm 0,7$	0 +
Микогептин	20:1	$2 \cdot 10^{-8}$	7,0	0,25	–	+ –

Исходный амфотерицин В относится к амфотерным полиенам, и поэтому проявляет как кислотные, так и основные свойства [Этингов и др., 1972; Кашкин и др., 1970; Hamilton-Mueller, 1973]. Изменяя pH водных растворов от нейтральных значений в кислую, либо щелочную сторону за pK_1 аминной или pK_2 карбоксильной группы ($pK_1=4-5$, $pK_2=9-10$) [Этингов и др., 1972], можно нейтрализовать один из зарядов молекулы амфотерицина В. Ождалось, что это приведет к эффектам аналогичным тем, которые наблюдались на производных амфотерицина В. Действительно, оказалось, что при pH 3,0 и pH 11,0 среднее время жизни активного состояния канала (T_A) становилось существенно меньше, по сравнению с нейтральным pH, как показано на рис. 6.8.3 [Kasumov et al., 1979].



Rис. 6.8.3. Дискретные изменения проводимости мембран в присутствии амфотерицина В (1-4) и N-ацетил амфотерицина В (5) в водных растворах 2 М KCl при различных pH. Потенциал на мембране 200 мВ; 23°C, фосфолипид:холестерин 20:1. 1-4 – амфотерицин В - $2 \cdot 10^{-8}$ М; 5- N-ацетил амфотерицин В - $3 \cdot 10^{-7}$ М. Внизу приведены записи включения каналов при двух значениях мембранныго потенциала [Kasumov et al., 1979].

Метамфоцин – единственное производное, у которого нейтрализован отрицательный заряд на карбоксиле и сохранен положительный заряд на азоте в диапазоне pH от 3,0 до 11,0. Значение T_A канала в этих pH не отличается друг от друга. Напротив, N-ацетил амфотерицин В в кислых pH теряет отрицательный заряд и становится нейтральным полиеном. Потеря второго заряда приводит к еще более

коротким временам жизни активного состояния канала, рис. 6.8.3. В присутствии N-ацетил амфотерицина В в кислой среде при pH 3,0 обнаружено потенциалзависимое включение и выключение каналов. Как видно из рис. 6.8.3 (запись 5), изменение потенциала на мембране (от 200 до 150 мВ) приводит к уменьшению частоты включений каналов в два раза, причем этот эффект обратим [Kasumov et al., 1979].

В присутствии производного амфотерицина В гликозил-амфотерицина В наблюдается аналогичный эффект уменьшения времени жизни канала в открытом состоянии в кислых pH по сравнению с нейтральным pH, рис. 6.8.4 [Поцелуев, 1978].

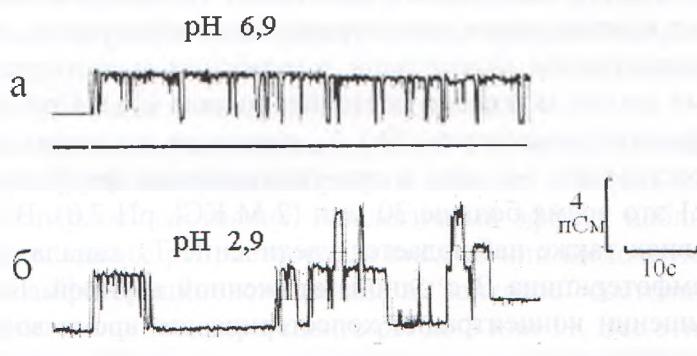


Рис. 6.8.4. Запись одиночных ионных каналов, образованных гликозил-амфотерицином В при различных значениях pH. а – $1,2 \cdot 10^{-7}$ М, 2 М KCl, $t=18,5^{\circ}\text{C}$; б – $9 \cdot 10^{-8}$ М, 2 М KCl; 22°C . Потенциал на мембране 200 мВ, фосфолипид:холестерин 20:1 [Поцелуев, 1978].

Анализ полученных данных показывает, что наличие в молекулах амфотерицина В одновременно зарядов двух знаков (+ и -) обеспечивает длительное пребывание канала в активном состоянии. потеря одного из зарядов полярных групп приводит к уменьшению времени жизни канала в этом состоянии. Можно предположить, что стабильность (длительность) активного состояния канала связана с электростатическим взаимодействием аминогруппы одной молекулы антибиотика с карбоксильной группой соседней молекулы в канальном комплексе. Экранирование одного из зарядов приводит к резкому уменьшению времени активного состояния канала. Так, для метилированного амфотерицина В это время уменьшается в 40 раз по отношению к исходному амфотерицину В. Нейтрализация одновременно двух зарядов (метиловый эфир амфотерицина В при pH 11,0 и

N -ацетил амфотерицин В при pH 3,0) приводит к еще большему укорочению времени активного состояния канала в 240-800 раз по отношению к исходному амфотерицину В, табл. 6.8.2. Эффект уменьшения времени активного состояния канала, наблюдаемый на производных амфотерицина В и при изменении значений pH водных растворов, содержащих исходный амфотерицин В, имеет одну и ту же природу и связан с нарушением электростатического взаимодействия полярных групп молекул антибиотиков, составляющих канал. Отсюда можно сделать вывод, что функция полярных групп состоит в стабилизации канального комплекса в активном состоянии [Kasumov et al., 1979].

При изучении зависимости временных параметров полиеновых каналов от концентрации холестерина было обнаружено, что повышение концентрации холестерина в мембранном растворе увеличивает время жизни активного состояния канала (T_A). При соотношении фосфолипид:холестерин 20:1 T_A канала на исходном амфотерицине В составляет 3-4 мин, а при соотношении фосфолипид:холестерин 2:1 это время больше 30 мин (2 М KCl, pH 7,0). В аналогичных условиях также наблюдается увеличение T_A канала для производных амфотерицина В с одной заряженной группой. Более того, при повышении концентрации холестерина это время возрастает и для тех антибиотиков, у которых заблокированы оба заряда. Однако средние времена жизни канала в открытом и закрытом состояниях не зависят от концентрации холестерина в мембране. Время жизни активного состояния канала для исходного амфотерицина В и его производных в зависимости от концентрации холестерина в мембране приведены в табл. 6.8.2. Этот эффект можно объяснить, если предположить, что переход канала из активного состояния в неактивное связан с выходом молекул холестерина из комплекса. Повышение концентрации последнего в мембране уменьшает вероятность отсутствия одновременно нескольких молекул холестерина в комплексе и тем самым увеличивает вероятность пребывания канала в активном состоянии. Из соотношений T_A при разных концентрациях холестерина можно видеть (см. табл. 6.8.2), что одновременное отсутствие только нескольких молекул холестерина в комплексе обеспечивает переход канала в неактивное состояние. Этот переход обратим.

Таким образом, канальный комплекс, состоящий из нескольких молекул ПА и холестерина, модель которого была предложена ранее [De Kruyff, Demel, 1974], представляет собой не статическую структуру, а динамическую (подвижную) структуру. Устойчивость ком-

плекса определяется электростатическим взаимодействием полярных молекул антибиотиков в канальном комплексе [Kasumov et al., 1979].

Увеличение времени жизни проводящего комплекса при повышении концентрации холестерина в мембране показывает, что холестерин, находящийся в канале играет немаловажную роль в стабилизации всего комплекса в мембране, так же как и полярные группы молекул ПА [Kasumov et al., 1979].

“Запертое” состояние амфотерицинового канала проявляется в виде редких длительных переходов канала в непроводящее состояние. Переходы в “запертое” состояние и обратно сильно зависят от модификации полярных групп (амино- и карбоксильной групп) молекулы амфотерицина В. N-триметиламфотерицин В образует каналы, которые гораздо чаще переходят в “запертое” состояние, чем каналы, образуемые исходным амфотерицином В.

Другие производные амфотерицина В с модифицированными заряженными группами также образуют каналы, которые чаще переходят в “запертое” состояние. Аналогичный эффект наблюдается и при сильном сдвиге pH растворов в кислую или щелочную область. Переходы амфотерицинового канала в “запертое” состояние происходят значительно чаще при сдвиге pH до 3 или 11. Все эти эффекты можно объяснить, предположив, что две соседние молекулы амфотерицина В связаны в канале электрическим взаимодействием разноименно заряженных групп. Тогда экранирование заряда аминосахара метильными группами в молекуле метилированного амфотерицина В ослабляет это взаимодействие, и, как следствие, возрастаёт вероятность нарушения структуры канала и его перехода в “запертое” состояние. Полное удаление заряда при ацетилировании аминной группы или при образовании эфирной связи на карбоксильной группе приводит к еще большему расслаблению структуры канала, вплоть до его полного распада. При сдвиге pH электростатическое взаимодействие между молекулами нарушается за счет протонирования или депротонирования заряженной группы. Увеличение концентрации холестерина в мембраноформирующем растворе уменьшает вероятность перехода канала в “запертое” состояние и, соответственно, к повышению средних времен жизни канала в активном состоянии. При соотношении фосфолипид:холестерин 20:1 среднее время до перехода канала в “запертое” состояние было 4 мин, а при увеличении отношения фосфолипид:холестерин до 2:1 это время больше 30 мин. Такая же картина наблюдается при исследовании

каналов, образуемые производными амфотерицина В. Наиболее вероятной причиной перехода канала в запертое состояние кажется выход нескольких молекул холестерина из канального комплекса. Уменьшение концентрации холестерина в мембране увеличивает вероятность одновременного отсутствия нескольких молекул холестерина в комплексе. Молекулы стерина, как и полярные группы антибиотиков, участвуют в стабилизации функционирования канального комплекса в мембране. Из соотношений времени жизни канала в активном состоянии T_A (см. таб. 6.8.2) при разной концентрации холестерина в мембране можно определить число молекул холестерина, выходящих из комплекса и достаточных для перехода канала из активного состояния в неактивное. Расчеты показывают, что для производных амфотерицина В это число больше двух. Переход канала из активного состояния в неактивное обусловлен, по-видимому, только лишь выходом молекул холестерина из комплекса [Kasumov et al., 1979].

Электростатическое взаимодействие гидроксильной группы молекулы холестерина с карбоксильной группой молекулы антибиотика играет важную роль в стабилизации канала в проводящем состоянии. Производные амфотерицина В, модифицированные по заряженным аминной и карбоксильной группам молекулы антибиотика, не только имеют высокую вероятность непроводящего “закрытого” состояния, но и хуже образуют каналы. Для получения одиночного канала необходима концентрация метилированного амфотерицина В в три раза больше, чем исходного амфотерицина В. Для получения одиночного канала в присутствии других производных необходима еще большая концентрация антибиотика. Можно сделать предположение, что “запертое” состояние – это одно из промежуточных состояний в сборке канала от мономеров к проводящему канальному комплексу [Kasumov et al., 1979; Малафриев, 1985; Ibragimova et al., 2006].

6.9. Свойства амфотерициновых каналов в зависимости от структуры стерина

Исходя из молекулярной модели полиенового канала, необходимо было выяснить функциональную роль молекул стерина в канальном комплексе, а именно, как изменение структуры стерина отражается на свойствах ионных каналов: временах жизни, проводимости и избирательности [Borisova et al., 1978; Kasumov, 1986 a].

На рис. 6.9.1 изображены структурные формулы исследовавшихся стеринов, которые расположены в порядке увеличения числа двойных связей в стериновом кольце и боковой цепи. На всех стеринах в комплексе с амфотерицином В были обнаружены одиночные ионные каналы, запись которых показана на рис. 6.9.2. Изменения стеринового компонента мембран не изменяет анионную селективность амфотерицинового канала (табл. 6.9.1).

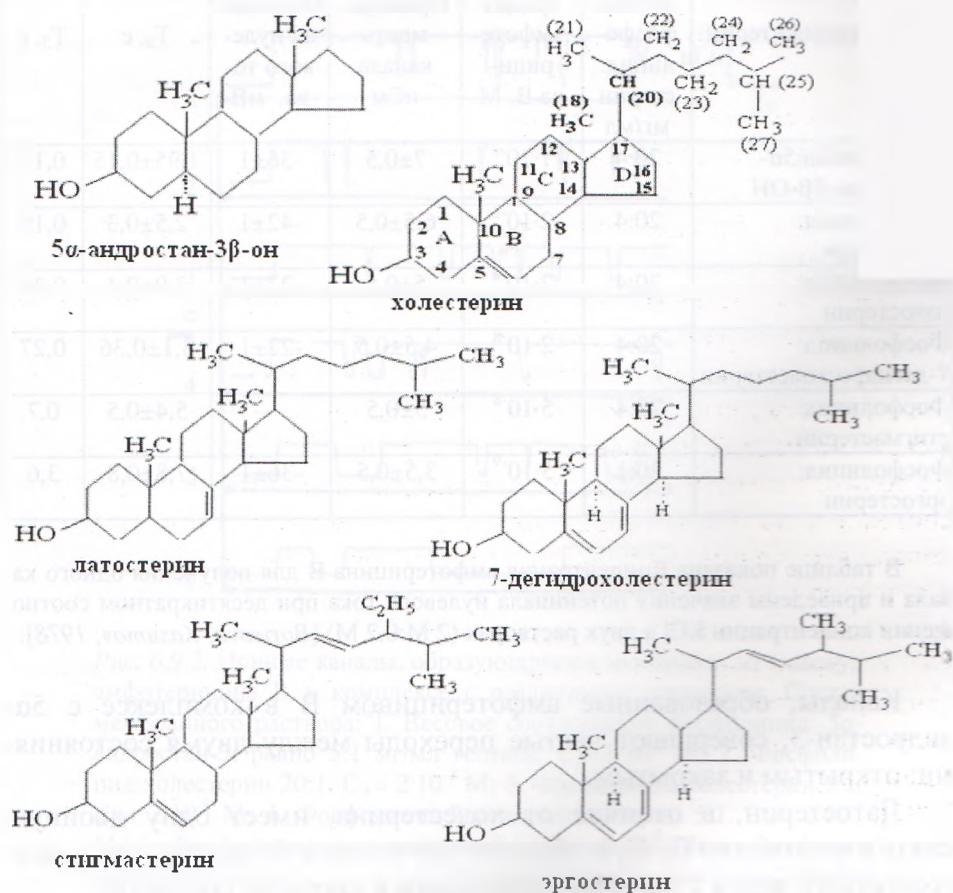


Рис. 6.9.1. Структурные формулы некоторых стеринов, включенных в состав бимолекулярных мембран для исследования свойств одиночных ионных каналов в комплексе с амфотерицином В.

Проводимость каналов незначительно отличается друг от друга. Эргостерин является самым эффективным из всех исследованных стеринов. Концентрация антибиотика, необходимая для получения

одного канала, почти в 10 раз меньше, чем на мембранах, содержащих холестерин [Касумов, 1986 а].

Таблица 6.9.1.

Значения среднего времени жизни каналов, образующихся из молекул амфотерицина В с различными стеринами, в открытом и закрытом состояниях

Фосфолипид:стерин	Соотношение фосфолипид:стерин мг/мл	Концентрация Амфотерицина В, М	Проводимость канала пСм	Потенциал нулевого тока, мВ	T ₀ , с	T ₃ , с
Фосфолипид:5 α -андростан-3 β -ОН	20:4	1 \cdot 10 ⁻⁷	7 \pm 0,5	-36 \pm 1	1,95 \pm 0,15	0,13
Фосфолипид:холестерин	20:4	2 \cdot 10 ⁻⁸	6,5 \pm 0,5	-42 \pm 1	2,5 \pm 0,3	0,15
Фосфолипид:латостерин	20:4	2 \cdot 10 ⁻⁸	5 \pm 0,5	-27 \pm 1	3,9 \pm 0,4	0,36
Фосфолипид:7-дегидро-холестерин	20:4	2 \cdot 10 ⁻⁸	4,5 \pm 0,5	-22 \pm 1	3,1 \pm 0,36	0,27
Фосфолипид:стигмастерин	20:4	5 \cdot 10 ⁻⁸	5 \pm 0,5	-	5,4 \pm 0,5	0,7
Фосфолипид:эргостерин	20:1	5 \cdot 10 ⁻⁹	3,5 \pm 0,5	-36 \pm 1	7,8 \pm 0,8	3,6

В таблице показана Концентрация амфотерицина В для получения одного канала и приведены значения потенциала нулевого тока при десятикратном соотношении концентрации KCl в двух растворах (2 М:0,2 М) [Borisova, Kasumov, 1978].

Каналы, образованные амфотерицином В в комплексе с 5 α -андростан-3, совершают частые переходы между двумя состояниями: открытым и закрытым.

Латостерин, в отличие от холестерина, имеет одну двойную связь в положении C₇-C₈ и образует также как и 5 α -андростан-3, долгоживущий канал с частыми переходами в закрытое состояние.

7-дегидрохолестерин содержит две двойные связи в кольце «В», при положении углеродных атомов C₅-C₆, C₇-C₈ и отличается от холестерина наличием одной дополнительной двойной связи. Время нахождения канала в закрытом состоянии несколько увеличивается по сравнению с холестерином.

Характер работы амфотерицинового канала изменяется, если канал образуется в комплексе амфотерицина В со стигмастерином или

эргостерином. Стигмастерин, в отличие от холестерина, содержит две двойные связи: одну в кольце «В» при C₅-C₆, а вторую в боковой цепи при C₂₂-C₂₃ и дополнительную этильную группу. В отличие от холестерина, в молекуле эргостерина имеется дополнительная метильная группа в боковой цепи и две двойные связи: в кольце «В» при C₇-C₈ и гидрофобной цепи при C₂₂-C₂₃. В присутствии стигмастерина и эргостерина наблюдаются переходы канала из открытого состояния в более продолжительное закрытое состояние.

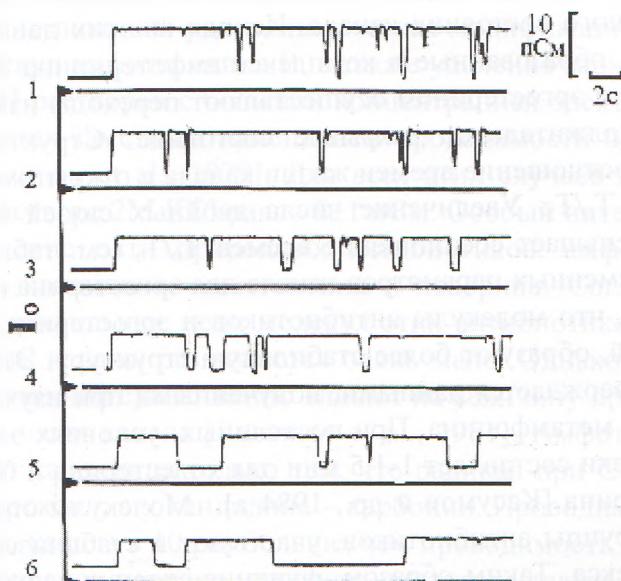


Рис. 6.9.2. Ионные каналы, образующиеся в мембранах из молекул амфотерицина В в комплексе с различными стеринами. Состав мембранныго раствора: 1. Весовое соотношение фосфолипид: 5α-андростан-3, равно 5:1 мг/мл гептана. C_A=1·10⁻⁷ M; 2. Фосфолипид:холестерин 20:1. C_A=2·10⁻⁸ M; 3. Фосфолипид:холестерин 5:1. C_A=2·10⁻⁸ M; 4. Фосфолипид:7дегидрохолестерин 5:1. C_A=2·10⁻⁸ M; 5. Фосфолипид:стигмастерин 5:1. C_A=5·10⁻⁸ M; 6. Фосфолипид:эргостерин 20:1. C_A=5·10⁻⁹ M; Потенциал на мемbrane 200 мВ, 2 M KCl, pH 7,0; t=22°C. [Borisova, Kasutov, 1978; Kasumov, 1980].

Свойства ионных каналов в зависимости от структуры стеринов приведены в табл. 6.9.1, в которой указаны средние времена жизни каналов в открытом и закрытом состояниях. Значения T₀ и T₃ для 7-дегидрохолестерина и латостерина в 2 раза выше, чем для холестерина и 5α-андростан-3. Появление сопряженной связи в гидрофобной части молекулы стигмастерина и эргостерина приводит к еще

большему увеличению средних времен T_0 и T_3 . Важно было выяснить и дать ответ на вопрос: “В какое из непроводящих состояний осуществляется переход канала - в закрытое или в неактивное”??. Как было показано выше увеличение концентрации холестерина влияет лишь на время жизни канала в активном состоянии, однако среднее время жизни канала в T_0 и T_3 практически не отличаются друг от друга. При сравнении средних времен жизни канала при разных концентрациях стигмастерина и эргостерина оказалось, что увеличение концентрации последних в мембране не изменяет среднего времени активного состояния канала. Исходя из этих данных следует, что каналы, образованные в комплексе амфотерицина В со стигмастерином или эргостерином осуществляют переходы из открытого в более продолжительное закрытое состояние. Структура стерина влияет на соотношение времен жизни канала в открытом и закрытом состояниях T_0/T_3 . Увеличение числа двойных связей в молекулах стерина уменьшает соотношение времен T_0/T_3 (см. табл. 6.9.1). Изменение временных параметров канала для эргостерина обусловлено видимо тем, что молекулы антибиотиков и эргостерина, связываясь между собой, образуют более стабильную структуру. Это предположение подтверждается данными, полученными при изучении времени отмыки метамфоцина. При постоянных условиях эксперимента время отмыки составляет 1-1,5 мин для холестерина и более 35 мин для эргостерина [Касумов и др., 1984 а]. Молекулы стерина, как и полярные группы антибиотиков, участвуют в стабилизации канального комплекса. Таким образом, функция стерина состоит в связывании молекул ПА в канальном комплексе. Наличие в мембранных молекул стерина приводит к резкому повышению скорости сборки полиеновых каналов и времени нахождения канального комплекса в проводящем состоянии. Разброс концентраций амфотерицина В для получения одиночных каналов в комплексе с различными стеринами связан, по-видимому, с различными константами скорости связывания молекул полиенов с мембранами.

Исследования производных амфотерицина В и стеринов с различной структурой дали большую информацию о функционировании ионных каналов в мембране и привели к следующим важным выводам: 1) обнаружено третье состояние ионного канала; 2) существует электростатическое взаимодействие между молекулами антибиотиков в канале; 3) показано, что обратимые переходы канала из активного состояния в неактивное связаны с обратимыми изменениями числа молекул холестерина в комплексе; 4) увеличение нена-

сыщенных связей в молекуле стерина уменьшает соотношение времени T_0/T_3 [Borisova, Kasumov, 1978]. Эти данные свидетельствуют о том, что при функционировании канала за время жизни в мембране происходит структурная перестройка составляющих молекул в канальном комплексе [Касумов, 1986 а; Ibragimova et al., 2006].

6.10. Свойства ионных каналов в зависимости от структуры лактонного кольца молекул ПА. Гибридные каналы

Как было показано ранее, химическая модификация заряженных групп молекул амфотерицина В, а также удаление заряда этих групп сдвигом pH растворов с большой концентрацией электролита не сопровождаются заметным изменением проводимости одиночных каналов [Kasumov et al., 1979]. Для всех этих случаев проводимость канала в растворе 2М KCl равна 6 ± 1 пСм. Особый интерес представляет сравнение пяти природных антибиотиков: амфотерицина В, нистатина, кандидина, микогептина и леворина. Согласно модели канала, гидрофильные цепи молекул этих антибиотиков, выстилающие полость канала, различаются очень мало. Однако даже эти небольшие различия существенно влияют на величину проводимости и избирательности канала [Kasumov et al., 1981]. Амфотерицин В отличается от кандидина только тем, что радикал при C₅ у амфотерицина – гидроксил, а у кандидина – карбонил. Проводимость амфотерицинового канала в 10 раз больше, чем проводимость кандидинового. Гидрофильная цепочка молекулы нистатина также отличается от цепочки молекулы микогептина заменой OH-группы на =O при C₅. И в этом случае проводимость канала при такой замене уменьшается в 10 раз. Молекулы кандидина и микогептина отличаются только перестановкой гидроксильных радикалов (при C₈ и C₉ у кандидина и при C₇ и C₁₀ у микогептина). Также различаются и гидрофильные цепочки молекул амфотерицина В и нистатина. Проводимость амфотерицинового канала вдвое больше проводимости нистатинового, а проводимость кандидинового канала примерно вдвое больше, чем проводимость микогептинового. Кроме различий в гидрофильной цепочке, молекула нистатина отличается от молекул четырех остальных антибиотиков отсутствием двойной связи между C₂₈ и C₂₉. Судя по результатам, отсутствие двойной связи несколько уменьшает величину проводимости канала по сравнению с амфотерицином В.

Для анализа свойств ионных каналов в зависимости от структуры лактонного кольца молекул полиенов сравним свойства каналов,

образованных амфотерицином В, нистатином и микогептином в бислое из фосфолипидов мозга с холестерином. Молекулы этих антибиотиков отличаются лишь структурой лактонного кольца (см. рис. 1.1.1). Полиеновая цепь одинакова у амфотерицина В и микогептина (гептаены), в молекуле нистатина одна двойная связь в середине полиеновой цепи гидрирована (тетраен). Гидрофильные цепочки лактонного кольца различны у всех трех антибиотиков: у нистатина и амфотерицина В набор гидрофильных групп одинаков, отличается лишь их расположение. У микогептина, кроме того, одна гидроксильная группа заменена на карбонильную. Амфотерициновый канал имеет наибольшую проводимость (6,5 пСм). Нистатиновый канал имеет меньшую проводимость (2 пСм). У микогептинового канала наблюдается минимальная проводимость (0,5 пСм). Еще меньше проводимость леворинового канала (0,2-0,3 пСм) [Kasumov et al., 1981].

Измерение анион-карионной селективности каналов, образуемых этими антибиотиками, показало, что анионная селективность, как и проводимость каналов, уменьшается в ряду амфотерицин В – нистатин – микогептин – леворин (таб. 6.10.1). В табл. 6.10.1 приведены значения разности потенциалов в системе 2 М:0,2 М KCl. В присутствии леворина наблюдается практически идеальная катионная селективность.

Таблица 6.10.1.

Параметры каналов, образуемых антибиотиками с известной структурой молекул [Ермишкин, Зильберштейн, 1982; Касумов, 1986 a]

Параметры каналов	Амфотерицин В	Нистатин	Амфотерицин: микогептин	Микогептин	Леворин	Леворин: амфотерицин
Число С-OH групп на канал	112	112	84	56	24	80
Число С=O групп на канал	32	32	28	24	20	52
Проводимость в 1 М KCl, пСм	3,0	1,5	0,5	0,15	0,1	2-3
Селективность, мВ	-45	-40	-35	-22	+56	-23
Диаметр поры, нм	0,7	0,85	0,65	0,6	0,8	0,75

В табл. 6.10.2 приведены значения потенциалов нулевого тока, полученные на мембране с большим числом каналов, при отношении концентрации соли в двух водных растворах 10:1. Потенциал 58 мВ соответствует идеальной анионной селективности. Видно, что через мембрану с амфотерициновыми каналами анионы проходят лучше,

чем катионы. Анионная селективность мембранны с микогептином значительно хуже. В нитрате калия наблюдается даже положительный потенциал, т.е. анион нитрата проходит через каналы хуже, чем ион калия.

Таблица 6.10.2

Значения потенциалов нулевого тока, полученные на мемbrane с большим числом полиеновых каналов

Антибиотик	Электролит					
	LiCl	KCl	CsCl	KF	KBr	KNO ₃
Амфотерицин В	-	-42,5	-39	-57	-43	-21,5
Нистатин	-50*	-45*	-	-	-	+2
Микогептин	-25,5	-21,5	-30	-44	-43,5	+43

* Звездочкой отмечены данные, взятые из работы [Cass *et al.*, 1970] для десятикратной концентрации соли 100:10 мМ. Остальные значения получены при концентрациях электролитов 2 М и 0,74 М и приведены к 10-кратному отношению концентраций соли [Борисова *и др.*, 1978].

Таким образом, замена гидроксильной группы молекулы антибиотика на карбонильную приводит к значительному уменьшению проницаемости канала для анионов. Этот эффект связывают с дипольным моментом карбонильной группы, повернутой отрицательным зарядом к середине канала. Таким образом, в середине канала возникает дополнительный электростатический барьер для проникающих анионов [Kasumov *et al.*, 1979, 1981].

Сборка амфотерициновых каналов происходит при меньших концентрациях, чем нистатиновых. Для наблюдения амфотерициновых одиночных каналов необходимо $2 \cdot 10^{-8}$ М антибиотиков, а нистатиновых - $1 \cdot 10^{-7}$ М (при соотношении фосфолипид:холестерин 20:1). Это, видимо, связано с разрывом одной двойной связи в полиеновой цепи нистатина. Амфотерицин В с полностью гидрированной полиновой цепочкой образует каналы в концентрации 10^{-5} М.

Амфотерицин В, нистатин и микогептин, добавленные только с одной стороны мембранны в концентрации 10^{-5} М, не увеличивали проводимости мембранны, а при добавлении любого из указанных антибиотиков в концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ М с другой стороны мембранны образуются комбинированные каналы. Проводимость таких комбинированных каналов зависит от знака потенциала и лежит между значениями проводимости обоих «чистых» каналов. Комбинированные каналы образуются любой парой из трех антибиотиков, создающих в

мембранах анионную селективность. Комбинированные каналы могут образовываться из двух разных по структуре и избирательной проницаемости ПА: амфотерицина В и леворина А₂. При введении с одной стороны мембранны анион-специфичных молекул амфотерицина В, а с другой стороны мембранны катион-специфичных молекул леворина А₂ наблюдается их взаимодействие и образование комбинированных каналов, селективность которых определяется молекулами амфотерицина В [Касумов и др., 1984]. Проводимость комбинированных каналов составляет величину 2-3 пСм, что вдвое меньше проводимости индивидуальных амфотерициновых каналов и в 6 раз больше проводимости индивидуальных левориновых каналов. Предполагается, что при взаимодействии разных по селективности двух полупор происходит изменение электрического потенциала внутри канала в области зоны контакта двух полупор [Гаджи-заде, 1983; Гаджи-заде, Зильберштейн, 1983 а, 1983 б, 1984]. Образование комбинированных каналов подтверждает гипотезу о том, что полиеновая пора состоит из двух полупор, которые собираются на двух сторонах мембранны [Cass et al., 1970].

Сравнивая проводимость и селективность каналов, образованных амфотерицином В, нистатином и микогептином, можно отметить, что разрыв двойной связи в полиеновой цепи и перестановка групп в полярной цепи лактонного кольца, меньше влияют на свойства канала, чем появление еще одной карбонильной группы (вместо гидроксильной) в полярной цепи молекул полиенов. Появление дополнительной карбонильной группы приводит к уменьшению анионной селективности и резкому (в 10 раз) уменьшению проводимости канала. Можно предположить, что анионная селективность канала связана с наличием положительного потенциала в поре, индуцированного ОН-диполями молекул антибиотиков. Отсюда легко понять, что замена ОН-группы на карбонильную =O, имеющую обратный знак диполя, приведет к уменьшению положительного потенциала в поре. Это, в свою очередь, уменьшит сродство аниона к поре. Для подтверждения данного предположения, в качестве примера, можно привести структуру леворина А₂. В молекуле леворина А₂ содержатся три полярные группы: две аминные и одна карбоксильная. В целом, молекула антибиотика заряжена положительно за счет дополнительной ароматической группировки, которая расположена на гидрофобном конце молекулы. Несмотря на общий положительный заряд, леворин А₂ создает у мембран избирательную проницаемость не для анионов, а для моновалентных катионов. Отсюда следует, что

система, ответственная за избирательность ионного канала, расположена на гидрофильной стороне молекулы полиэна и поэтому селективность ионного канала может определяться структурой гидрофильной цепи молекул антибиотиков [Kasumov et al., 1981].

Сравним гидрофильные цепи четырех молекул полиеновых антибиотиков: амфотерицина В, нистатина, микогептина и леворина А₂ (табл. 6.10.3).

Таблица 6.10.3

Структура гидрофильных цепей четырех ПА [Kasumov et al., 1981].

№ атома	Амфотерицин В $E_o = -45 \pm 3$ мВ	Нистатин $E_o = -40 \pm 3$ мВ	Микогептин $E_o = -13 \pm 1$ мВ	Леворин А ₂ $E_o = +56 \pm 2$ мВ
1	=O	=O	=O	=O
2				
3	-OH	-OH	-OH	=O
4				
5	-OH	-OH	=O	-OH
6				
7	-H	-OH	-OH	=O
8	-OH	-H	-H	-H
9	-OH	-H	-H	-OH
10	-H	-OH	-OH	-H
11	-OH	-OH	-OH	-OH
12				
13	=O	=O	=O	-OH
14				
15	-OH	-OH	-OH	=O
16	-COOH	-COOH	-COOH	-H
17	-OH	-OH	-OH	-OH
18	-H	-H	-H	-COOH
19	Микозамин	Микозамин	Микозамин	-H
20	-H	-H	-H	Микозамин

В таб. 6.10.3 приведены значения разности потенциалов в системе 2 М:0,2 М KCl. Из таблицы 6.10.3 видно, что амфотерицина В и нистатин имеют одинаковый набор гидрофильных групп и одинаковую избирательность. У микогептина одна гидроксильная группа заменена на карбонильную. Анионная селективность микогептинового канала намного хуже, чем у нистатинового и амфотерицинового. У леворина А₂ в гидрофильной цепи отсутствуют две гидроксильные группы. Канал за счет дополнительных карбонильных групп заряжается более отрицательно и, по-видимому, это приводит к избирательной проницаемости для ионов калия. Селективность ионных каналов меняется в зависимости от числа гидроксильных групп в гидрофильной цепи лактонного кольца в ряду: амфотерицин В – ниста-

тин – микогептин – леворин А₂. С уменьшением числа гидроксильных групп в гидрофильной цепи молекул ПА избирательность меняется с анионной на катионную. Однако пример четырех ПА еще не дает основания полностью утверждать, что система проницаемости локализована на гидрофильной стороне молекул ПА. Для подтверждения этого положения требуется поиск новых природных ПА и синтез их производных с соответствующим набором гидроксильных и карбонильных групп в гидрофильной цепи молекул полиенов.

Ранее было показано, что неароматические антибиотики, добавленные только с одной стороны мембранны, не вызывали увеличение проводимости мембранны даже в концентрации 10^{-4} М. Неароматические антибиотики образуют гибридные каналы [Борисова, 1979; Ермишкин, 1980]. Поскольку неароматические антибиотики эффективно снижают сопротивление БЛМ только при введении по обе стороны мембранны [Касумов, Либерман, 1972], введение разных антибиотиков по разные стороны мембранны приводило к образованию только гибридных каналов. Для получения одного канала брали такие же концентрации антибиотиков, как для получения индивидуальных каналов. Если добавить в один раствор 10^{-7} М нистатина, а в другой $2 \cdot 10^{-8}$ М амфотерицина В, то образуются гибридные каналы. Проводимость таких комбинированных каналов зависит от знака потенциала и лежит между значениями проводимости обоих “чистых” каналов. На рис. 6.10.1 показаны гистограммы проводимостей индивидуальных амфотерициновых и нистатиновых каналов, а также гибридных амфотерицин-нистатиновых каналов. Проводимость комбинированного канала – 2,3 пСм при +100 мВ и 2,0 пСм при -100 мВ (положительный знак заряда в растворе с нистатином). Комбинированные каналы образуются любой парой из ПА. Проводимость амфотерицин-микогептинового канала 1,4 пСм при +100 мВ и 0,6 пСм при -100 мВ (положительный знак заряда в растворе с микогептином).

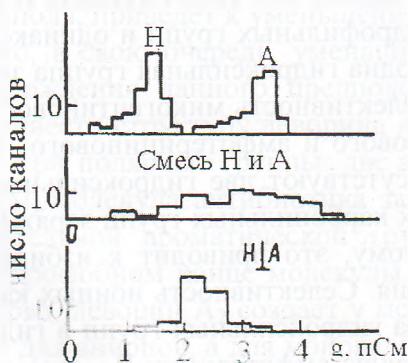


Рис. 6.10.1. Гистограммы проводимостей каналов, образуемых нистатином (Н), амфотерицином В (А), смесью этих антибиотиков Н и А, а также гибридных каналов, образуемых нистатином и амфотерицином В [Борисова, 1979].

Видно, что проводимость гибридного канала имеет величину, промежуточную между величинами проводимостей индивидуальных каналов. Смесь двух антибиотиков по обе стороны мембранны дает очень широкий спектр значений проводимости одиночного канала.

Вольтамперная характеристика гибридных каналов, образуемых ПА, асимметрична. Так, в растворе 2 М KCl при напряжении на мемbrane ± 150 мВ проводимость амфотерицинового канала составляет величину $4,5 \pm 0,25$ пСм, а микогептинового – $0,30 \pm 0,05$ пСм. Гибридный канал, образованный из амфотерициновой и микогептиновой полупор, имеет ярко выраженную асимметрию вольтамперной характеристики: при $+150$ мВ в растворе с амфотерицином В его проводимость 0,8 пСм, а при -150 мВ – 1,8 пСм [Борисова, 1979]. Асимметрию вольтамперной характеристики гибридного канала, образованного из двух полупор с разными гидрофильными группами, выстилающими полость поры, можно объяснить асимметрией профиля потенциальной энергии иона в поре [Ермишкин, Зильберштейн, 1982]. Так, в модели канала с двумя потенциальными барьерами при большой разности потенциалов на мемbrane ток определяется потоком анионов в одном направлении. Величина этого потока определяется тем энергетическим барьером, который ион проходит по направлению электрического поля. Гибридные каналы из амфотерицина В и грамицидина O³ не образуются [Ермишкин, Зильберштейн, 1982].

Образование комбинированных каналов подтверждает гипотезу о том, что полиеновая пора состоит из двух полупор, которые собираются на двух сторонах мембранны [Cass et al., 1970; Касумов и др., 1971]. По этой модели полость поры выстлана гидрофильными группами лактонного кольца [De Kruyff, Demel, 1974]. Эти гидроксильные диполи создают в канале положительный потенциал, который повышает сродство аниона и уменьшает сродство катиона к каналу, что, по-видимому, и определяет преимущественную анионную проницаемость. Замена одной гидроксильной группы на карбонильную с обратным знаком диполя в молекуле микогептина уменьшает положительный потенциал в поре и, следовательно, анион-катионную селективность. Эта карбонильная группа несколько уменьшает и проводимость, создавая дополнительный барьер для прохождения аниона. Однако этого недостаточно, чтобы объяснить меньшую, по сравнению с амфотерицином В, проводимость микогептинового и леворинового канала. Действительно, отношение чисел переноса для хлора и калия у амфотерициновых и нистатиновых каналов – около

6:1, у микогептиновых каналов – 2:1, а проводимость микогептинового канала в 10 раз меньше амфотерицинового, т.е. и калиевая проводимость ниже. Таким образом, меньшая проводимость микогептинового канала обусловлена в основном его более узким, чем у амфотерицинового и нистатинового каналов, сечением, что и было показано в опытах по тестированию каналов блокаторами разного размера [Борисова и др., 1978; Ермишкин, Зильберштейн, 1982; Касумов, Каракозов, 1985; Касумов, Самедова, 1991].

Гибридные каналы образуются при взаимодействии неароматических и ароматических антибиотиков. Для наглядной иллюстрации на рис. 6.10.2 приведены записи одиночных каналов как при симметричном и одностороннем действии амфотерицина В, а также одностороннем действии леворина А₂ и формируемые им при взаимодействии с амфотерицином В комбинированные каналы [Касумов и др., 1984 в].

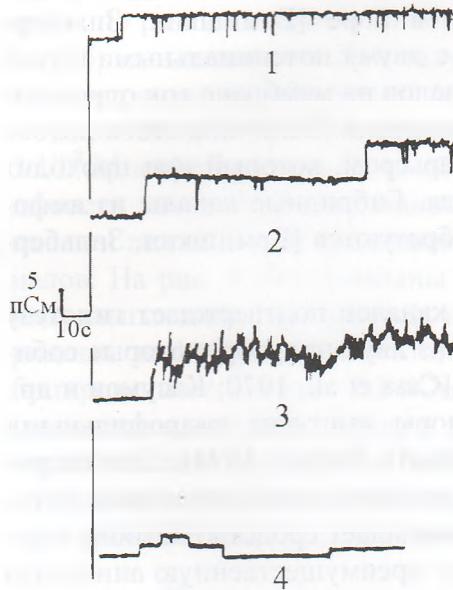


Рис. 6.10.2. Дискретные изменения проводимости липидных мембран с холестерином (20:1 по весу) в присутствии амфотерицина В и леворина. 1- амфотерицин В в симметричных условиях ($2 \cdot 10^{-8}$ М); 2 – амфотерицин В с одной стороны мембранны ($2 \cdot 10^{-8}$ М) при pH 3,0; 3 – леворин с одной стороны мембранны ($5 \cdot 10^{-8}$ М); 4 – комбинированные каналы: с одной стороны мембранны леворин А₂ ($2 \cdot 10^{-8}$ М), а с другой амфотерицин В ($5 \cdot 10^{-9}$ М). Состав водного раствора: 2М KCl, pH 7,0 (кроме записи 2); t=25°C. Потенциал на мемbrane 200 мВ [Касумов и др., 1987].

Трудно понять в рамках модели двух полупор тот факт, что концентрация амфотерицина В, необходимая для получения одиночных каналов, не зависит от концентрации холестерина в мембраноформирующем растворе, но сам эффект одностороннего действия амфотерицина зависит от доли фосфолипидов в мембране [Касумов, Каракозов, 1985; Касумов, Самедова, 1991]. По-видимому, молекулы холестерина не формируют проводящие каналы в комплексе с антибиотиком, а создают необходимые условия для сборки каналов из нескольких молекул амфотерицина В. В этой связи особый интерес

представляют данные о том, что ПА могут формировать каналы в комплексе с фосфолипидами, даже в отсутствие стеринов [Yosikawa et al., 1988]. Однако на данном этапе исследований модель двух полупор хорошо согласуется с экспериментальными результатами исследования ПА как модификаторов ионной проницаемости мембран.

Отличительная особенность антибиотиков с ароматической группировкой, в частности леворина, в отличие от антибиотиков с неароматической группировкой, состоит в том, что в химической структуре леворина содержатся две положительно заряженные аминные группировки. Несмотря на наличие двух положительно заряженных группировок ароматические полиены создают как в бислоях, так и в клеточных мембранах почти идеальную избирательную проницаемость для катионов щелочных металлов [Kasumov et al., 1981; Касумов и др., 1982 а; Shvinka, 2001; Курбанов, Касумов, 2004; Ибрагимова и др., 2006 б].

ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПРОВОДИМОСТИ БИСЛОЙНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ ЛЕВОРИНА А₂ И ЕГО АЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ, И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕВОРИНА А

7.1. Методические требования к исследованию кинетики проводимости и канального шума мембран, модифицированных леворином и его алкильными производными

Среди ПА особый интерес представляет леворин А₂, индуцирующий в БЛМ идеальную проницаемость для ионов K⁺. Изучение механизма действия леворина А и его производных открывает путь для выяснения молекулярного механизма ионной избирательности мембран. Основным продуцентом леворина является штамм *Actinomyces levoris*. Полученные в процессе селекции штаммы, продуцирующие леворин, отличаются не только по интенсивности антибиотикообразования, но и другими физиологическими особенностями [Кашкин и др., 1970].

В данном разделе монографии исследуются электрические характеристики БЛМ в присутствии леворина А₂ и его алкильных производных с известной структурой молекул. Впервые в присутствии этих антибиотиков обнаружена немонотонная кинетика проводимости и было выявлено, что тип кинетики проводимости мембран в присутствии леворина А₂ зависит от липидного состава мембраны и концентрации антибиотика. Обнаружена также стерин-фосфолипиды солезависимая инактивация леворин индуцированной проводимости мембран. Флуктуационная спектроскопия позволяет анализировать шум, порождаемый ионами при прохождении через каналы, образуемые различными модификаторами ионной проницаемости [Conti et al., 1975]. По результатам исследования спектров флуктуаций проводимости БЛМ, модифицированных леворином А₂, был сделан вывод о том, что падение проводимости мембран в присутствии антибиотика происходит в результате изменения числа проводящих каналов в процессе инактивации. На основании совокупности полученных данных высказано предположение о решающем значении липидного состава мембран, влияющего на работу ионных каналов.

Дискретные флуктуации проводимости мембран регистрировали в режиме фиксации напряжения с помощью экспериментальной установки, схематически изображенной на рис. 7.1.1. Эксперименты

выполнялись в Ленинградском институте ядерной физики им. Б.П. Константинова. Спектр снимали в частотном диапазоне 0,09-300 Гц. Электрическая схема собрана на основе малошумящего операционного усилителя, устройство и характеристики которого изложены в статье Безрукова и Сибилева [Безруков и др., 1979; Безруков, Сибильев, 1980; Bezrukov et al., 1987]. В отрицательной обратной связи включено сопротивление 10^9 Ом параллельно с емкостью 1,5 пФ. Разность потенциалов на мемbrane задавали с помощью батареи и поддерживали посредством пары хлорсеребряных электродов около $0,5 \text{ см}^2$ каждый. В экспериментах электроды погружали непосредственно в растворы электролитов. Электрическое сопротивление проводников, электродов и растворов солей не превышало 1 кОм. За процессом формирования мембранны следили с помощью осциллографа, когда на мембрану подавали пилообразное напряжение ± 12 мВ от генератора сигналов специальной формы (Hewlett Packard 3310A). Для уменьшения наводок от электромагнитных полей измерительную ячейку и операционный усилитель экранировали. Снижение влияния вибраций достигалось помещением экранированной измерительной ячейки подвеской ее на пружинах к перекрытию здания. Такие меры предосторожности достаточно эффективно устранили влияние вибраций в изучаемом диапазоне частот.

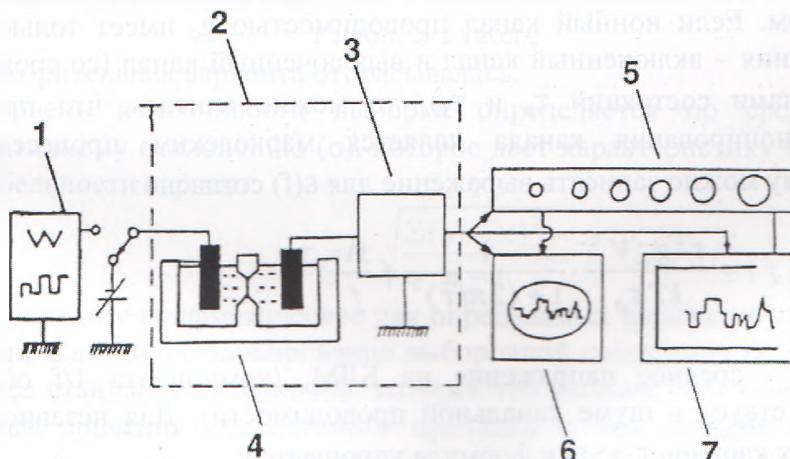


Рис. 7.1.1. Схема экспериментальной установки для наблюдения дискретной флуктуации проводимости модифицированных БЛМ. 1 – генератор сигналов специальной формы, 2 – экран, 3 – операционный усилитель, 4 – тefлоновая камера, 5 – регистратор переходных процессов, 6 – осциллограф, 7 – временной самописец [Безруков и др., 1979; Микашова, 1990].

Дискретные изменения тока записывали непосредственно на двухкоординатном самописце 621.01 Endim (ГДР). Одновременно проводили запись сигнала на магнитофон в частотной модуляции. Для спектрального анализа на более низких частотах записанный на магнитофон сигнал затем воспроизводили на большой скорости, т.е. использовали процедуру временного сжатия. Время накопления сигнала при прямом анализе составляло 1 мин, а при записи частотно-модулированного сигнала на магнитофон – 10 мин. Измерения начинали через 30-40 мин после формирования мембранны. Были исследованы спектры на участках, отвечающих различным направлениям изменения проводимости мембран. Характерное время кинетики $\sim 10^2$ с, а характерное время переходов между открытым и закрытым состояниями, которые в основном определяют шум в исследуемом частотном диапазоне $\sim 0,1$ с. Условия измерения спектров при стационарной проводимости практически такие же, как и до ее достижения. Измеряли шум, избыточный над равновесным, в единицах равновесного шума (ε). Для этого дополнительно записывали спектр при нулевом напряжении на мемbrane. Измерение безразмерной величины E целесообразно потому, что она не зависит от площади мембранны и концентрации каналообразующего вещества, а также позволяет судить о надежности отделения неравновесного шума от равновесного. Обработку спектров выполняли следующим образом. Если ионный канал проводимостью g_c имеет только два состояния – включенный канал и выключенный канал (со средними временами состояний τ_0 и τ_3), то можно считать, что процесс функционирования канала является марковским процессом и поэтому можно записать выражение для $\varepsilon(f)$ согласно:

$$\varepsilon(f) = \frac{\tau^2 g_c V^2}{kT \tau_0} \cdot \frac{1}{1 + (2\pi f \tau)^2} + \frac{A}{f} \quad (7.1.1)$$

где V – среднее напряжение на БЛМ, (компоненты 1/f обычно присутствуют в шуме канальной проводимости). Для независимых ионных каналов $\tau_3 \gg \tau_0$ и формула упрощается:

$$\varepsilon(f) = \frac{\tau_0 g_c V^2}{kT} \cdot \frac{1}{1 + (2\pi f \tau_0)^2} + \frac{A}{f} \quad (7.1.2)$$

где τ_0 – среднее время жизни канала в открытом состоянии (нами

взято $\tau_0 = 0,1$ с). Теоретические лоренцианы, проводимые на графиках сплошной линией, построены в соответствии с первым членом формулы (7.1.2) [Микаилова, 1990].

При статистической обработке результатов по кинетике проводимости мембран в присутствии ПА леворина А₂ и его алкильных производных предполагалось, что скорость кинетических процессов и время протекания этих процессов имеют нормальное распределение. Определяли: а) принадлежность отдельного значения к выборке (т.е. варианты к генеральной совокупности); б) уровень изменчивости выборки; в) значения доверительных интервалов; г) сравнение выборок по свободным показателям.

Для оценки отдельного значения в выборке используются непараметрические критерии, основанные по оценке отклонения данной варианты от ближайшей к ней в ранжированном ряду по отношению к размаху изменчивости:

$$\tau_1 = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x} \quad \text{для минимальной,}$$

$$\tau_1 = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x} \quad \text{для максимальной,}$$

наблюдения сравнивали с таблицой для принятого доверительного уровня и, если вычисленное

$$\tau \text{ набл.} > \tau \text{ табл.,}$$

то подозрительная варианта отбрасывалась.

Уровень изменчивости выборки определяется по среднему квадратичному отклонению (σ), которое дает характеристику общей вариабельности вариант:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

где \bar{x} – среднее арифметическое для определяемых вариантов; n – число вариантов. Случайное варьирование выборочной совокупности измеряется ее стандартной ошибкой, которая тем больше, чем более изменчивы значения исследуемого признака и чем меньше объем выборки. В данной работе определялась стандартная ошибка: $S_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

Границы доверительного интервала определяли по формуле: $\pm U_\alpha S_x$ где: U_α – некоторый коэффициент при $\alpha = P_0$. Для больших выборок:

$$U (\alpha = 0,05) = 1,96$$

Для оценки достоверности был принят доверительный уровень, равный 95% (как для биологических систем).

После установления доверительных интервалов для результатов каждого отдельного эксперимента строится модель, интерпретирующая полученные результаты, согласно общепринятым порядку регрессионного анализа. Соответствие теоретической и опытной кривых оценивается с помощью F – критерия (критерия Фишера), который сравнивает дисперсии двух выборок:

$$F = \frac{S^2 ad}{\sigma^2 \overline{\{x\}}} \quad (7.1.3)$$

где S дисперсия неадекватности модели, которая определяется как

$$S_{ad} = \frac{\sum (\bar{x}_i - x_i)^2}{n-2} \quad (7.1.4)$$

(x_i – значения, рассчитанные по найденному уравнению). Для применения критерия Фишера требуется допущение, что ошибка в определении S_{ad} распределена нормально с математическим ожиданием, равным 0, и дисперсией σ^2 . В каждом конкретном случае значение F – критерия сравнивается с критическим значением $F_\alpha(n)$.

В случае, когда вычисленное значение $F < 5\%$ критического значения, нулевая гипотеза не отвергается и принятая модель считается приемлемой.

Результаты кинетического эксперимента – зависимость проводимости от времени $g(t)$ изображали в «спрямляющих» координатах. Участок роста проводимости перестраивали в координатах $g(I-g/g_s)^{-1}$ или $g/g_s - gt$, что соответствует экспоненциальной или степенной зависимости: $g(t)=g_s(I-e^{-kt})$ или $g(t)=a \cdot t^h$. Участки убывания проводимости изображали в координатах $g(g/g_m)^{-1}$ что соответствует зависимости:

$$g(t)=g_m \cdot e^{-kt} \quad (7.1.5)$$

По полученным таким образом прямолинейным графикам определяли константы скорости и показатель степени, как тангенсы угла наклона прямых. Постоянные времени определяли как $t=I/k$. Температурные зависимости проводимости или константы скорости изображали в координатах Аррениуса $\lg g - I/t$. Энергию активации вычисляли как тангенс угла наклона полученной прямой [Микаилова, 1990]. Для уменьшения собственного шума и емкости мембранны работали с мембранными малой площади.

7.2. Кинетика проводимости БЛМ в присутствии леворина А₂ при варьировании состава мембраноформирующих компонентов, температуры, вида и концентрации электролитов

С целью изучения свойств левориновых каналов и механизма их функционирования было предпринято детальное исследование кинетики проводимости БЛМ, модифицированной леворином А₂ и его производными.

Известно, что малые концентрации ПА (10-100 нМ) вызывают появление дискретных уровней проводимости БЛМ, обусловленных функционированием одиночных ионных каналов. Проводимость каждого канала при прочих фиксированных условиях постоянна, а потому полная проводимость мембранны, в которой функционируют много каналов, пропорциональна их числу. Исходя из гистограммы проводимости одиночных каналов видно, что в основном появляются каналы с одной величиной проводимости – средние времена жизни каналов в проводящем состоянии примерно постоянны [Ermishkin et al., 1977]. Кинетика проводимости мембранны – это фактически кинетика накопления проводящих каналов, поэтому, изучая кинетику проводимости мембранны с большим числом каналов, можно судить о динамике функционирования каналов в мембранны. Такой экспериментальный подход важен еще и потому, что изучение непосредственно одиночного леворинового канала методически очень сложно ввиду малой его проводимости (0,5 пСм) и небольшого времени жизни в открытом состоянии (2.5 ± 0.2 с). При исследовании кинетики проводимости БЛМ, модифицированных леворином А₂ и его алкилными производными, был использован метод химической релаксации. Этот метод открывает путь для расширофки механизма сборки и функционирования ионных каналов в мембранных [Касумов, Малафриев, 1982 а, б.; Малафриев. 1985; Микаилова, 1990; Малафриев и др., 1991].

Наблюдения проводились в широком диапазоне изменяющихся условий эксперимента. Так, при исследовании кинетики проводимости варьировались такие параметры, как: а) величина весового отношения фосфолипид:холестерин; в) концентрация и вид солевого раствора, омывающего мембранны, с) вид липидов и стеринов, участвующих в формировании мембранны, д) вид структурных модификаций исходного леворина А₂.

Кинетику проводимости леворина А₂ можно условно разделить

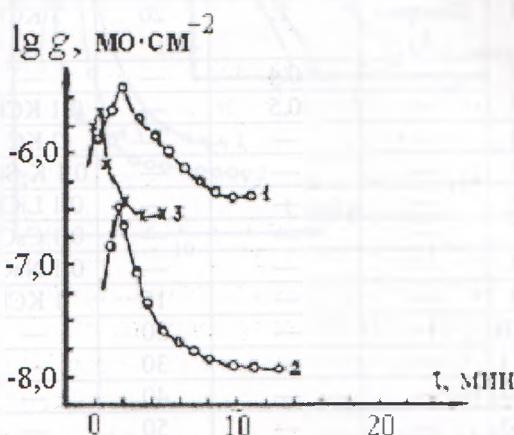
на три различных этапа. Первый этап (практически во всех случаях наблюдения) характеризуется быстрым ростом проводимости до определенного значения максимальной проводимости – этап активации. Второй, промежуточный этап – достижение наивысшей проводимости мембранны, который характеризует некоторое метастабильное состояние проводящей структуры, после чего наступает третий этап, характер которого регулируется конкретными условиями эксперимента [Касумов, Малафриев, 1984 а; Микаилова, 1990]. Так, кинетика проводимости мембранны в присутствии леворина А₂ может быть монотонной и описываться обычной экспонентой, или иметь немонотонный характер. Следует отметить, что немонотонный характер кинетики проводимости мембранны (инактивация проводимости) обнаружена на этом антибиотике впервые [Касумов, 1986 а; Микаилова, 1990].

Исследование особенностей проводимости мембранны в присутствии модификаторов ионной проницаемости позволяет получить информацию о структурных перестройках ионных каналов, об их свойствах. Изучение кинетики проводимости мембранны в присутствии каналоформирующих соединений может раскрыть механизм сборки и разборки ионных каналов. Немонотонный характер проводимости мембранны впервые был обнаружен на метамфоцине [Касумов, Малафриев, 1981; Касумов, 1986 а], а позже и на других ПА [Микаилова, 1990; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006]. Бифазный характер проводимости мембранны был обнаружен не только на ПА, но и при исследовании различных по своей химической структуре и физико-химическим свойствам веществ, как, например, грамицидине А [Schagina et al., 1989]. Это позволяет сделать предположение об общих принципах функционирования модификаторов различной природы, сделать шаг к пониманию механизма действия мембраноактивных соединений, участвующих в трансмембранным переноса ионов. Обнаруженное явление инактивации может иметь общебиологическое значение, так как, вероятно, представляет собой проявление способности мембранны устранять или, по крайней мере, уменьшать вызванное модификаторами изменение ионной проницаемости. И в этом смысле исследования инактивации проводимости представляют значительный интерес.

Главной особенностью ПА является практически их неэффективность на мембранных, не содержащих стерина. Исследования зависимости проводимости мембранны от концентрации антибиотика и содержания стерина в мембране привели к предположению о наличии в

мембранах антибиотик-стериных комплексов, образующихся в результате их взаимодействия. Были проведены эксперименты с четырьмя стеринами различной структуры: холестерином, эргостерином, 7-дегидрохолестерином и ситостерином. Варьировались массовые отношения фосфолипид:холестерин в пределах 20:10, 20:8, 10:10. Как видно из экспериментальных кривых, представленных на рис. 7.2.1, уменьшение содержания холестерина приводит к ускорению процесса инактивации и снижению уровня максимальной проводимости.

Рис. 7.2.1. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированных леворином A_2 ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в зависимости от доли холестерина в мембраноформирующем растворе. Состав мембраны: 1 – весовое отношение фосфолипид:холестерин 20:10; 2 – фосфолипид:холестерин 20:8; 3 – фосфолипид:холестерин 10:10. Условия опыта: солевой раствор 1 М KCl, pH 6,5, $t=20^{\circ}\text{C}$. Потенциал на мемbrane 100 мВ [Микаилова, 1990].



В таблице 7.2.1 приведены константы скорости инактивации и значения времени полуспада проводимости мембран, полученных при различных экспериментальных условиях в присутствии леворина A_2 и его алкильных производных.

Время полуспада – это промежуток времени, в течение которого максимальная проводимость мембраны уменьшается вдвое. Сравнение времен полуспада для отдельных кривых более корректно и информативно ввиду независимости этой величины от площади мембраны при прочих равных условиях. Как видно из таблицы 7.2.1 для кинетических кривых, представленных на рис. 7.2.1, время полуспада меняется следующим образом: от $t_{1/2}=2,9$ мин (кривая 1) при фосфолипид: холестерин = 20:10 до $t_{1/2}=0,5$ мин (кривая 3) при фосфолипид: холестерин = 1:1. Следует заметить, что с изменением доли холестерина в мембраноформирующем растворе время полуспада меняется немонотонно. По рис. 7.2.2, где представлена эта зависимость в относительных единицах, можно однозначно судить об ускорении процесса инактивации. При соотношении фосфолипид:холестерин, равном 20:1, каналы вообще не формировались, роста прово-

Таблица 7.2.1.

Константы скорости инактивации и времена полуспада проводимости мембран, модицированных леворином A₂ и его алкильных производными [Микаилова, 1990].

№	Название антибиотика	Состав мембранных: холестерин: фосфолипид	Температура, °C	Концентрация солевого раствора, М	Концентрация антибиотика, М	Константа скорости инактивации, K _{отн}	Время полуспада проводимости, t _{1/2} мин
1.	Леворин A ₂	1	20	1 KCl	1·10 ⁻⁷	1,82	0,5±0,01
2.	—	0,4	—	—	—	1,5	1,3±0,1
3.	—	0,5	—	0,1 KCl	—	0,6	1,6±0,2
4.	—	—	—	2 KCl	—	1,5	3,2±0,2
5.	—	—	—	0,1 K ₂ SO ₄	—	5,36	1,01±0,02
6.	—	—	—	0,1 LiCl	—	4,41	1,41±0,01
7.	—	—	—	0,1 CsCl	—	2,78	2,4±0,1
8.	—	—	—	0,1 NaCl	—	1,5	16,0±0,2
9.	—	—	15	1 KCl	—	1,06	5,2±0,4
10.	—	—	20	—	—	1,75	2,9±0,1
11.	—	—	30	—	—	2,59	2,02±0,02
12.	—	—	40	—	—	4,37	1,6±0,1
13.	—	—	50	—	—	8,75	0,65±0,02
14.	—	—	20	—	1·10 ⁻⁸	10,0	0,8±0,1
15.	—	—	—	—	1·10 ⁻⁷	1,75	2,8±0,1
16.	—	—	—	—	2·10 ⁻⁷	1,04	4,0±0,1
17.	Метиллеворин	—	—	—	1·10 ⁻⁸	0,44	4,2±0,1
18.	Этиллеворин	—	—	—	—	0,72	2,0±0,1
19.	Пропиллеворин	—	—	—	—	1,03	1,6±0,1
20.	Бутиллеворин	—	—	—	—	1,2	1,5±0,05
21.	Амиллеворин	—	—	—	—	1,58	1,1±0,01

димости не наблюдалось. Эксперименты показали, что тип кинетики проводимости мембран в присутствии леворина A₂ регулируется видом стерина.

На рис. 7.2.3 представлены кривые, характеризующие кинетику проводимости мембран, содержащих различные виды стеринов. Как видно из рис. 7.2.3, вид стерина влияет и на форму инактивационной

кривой (сравни кривые 1-3). Модификация мембраны, сформированной из общих фосфолипидов с эргостерином (кривая 4) приводит к монотонной кинетики проводимости.

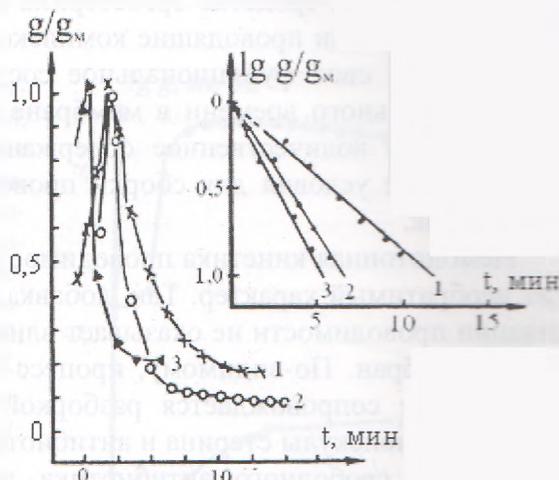


Рис. 7.2.2. Та же зависимость, что и на рис. 7.2.1., только в относительных единицах. Обозначения при этом сохраняются прежние. Вверху представлены соответствующие полулогарифмические анаморфозы [Микаилова, 1990].

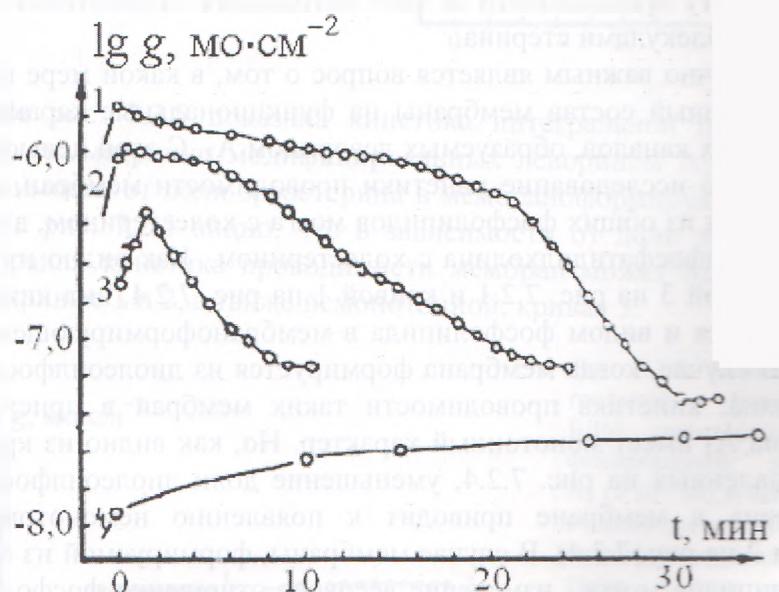


Рис. 7.2.3. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированных леворином ($1 \cdot 10^{-7} M$) в зависимости от вида стерина а мембраноформирующем растворе. Состав мембраны: 1 – ситостерин:фосфолипид = 0,15; 2 - 7 – дегидрохолестерин:фосфолипид = 0,5; 3 – холестерин:фосфолипид = 0,5; 4 – эргостерин:фосфолипид = 0,01. Условия опыта: солевой раствор 1 M KCl, pH 6,5; $t=20^{\circ}\text{C}$. Потенциал на мемbrane 100 мВ [Микаилова, 1990].

По всей вероятности, различия в эффективности стеринов связаны с различиями в их структуре, наличием функциональных групп, способных взаимодействовать с антибиотиком в образовании комплексов. Так, средство эргостерина в леворину так высоко, что образованные ими проводящие комплексы являются устойчивыми и не изменяют свое функциональное состояние в течение довольно продолжительного времени в мембране. Эти данные указывают на тот факт, то количественное содержание и вид стерина создают необходимые условия для сборки проводящих комплексов стерин-антибиотик.

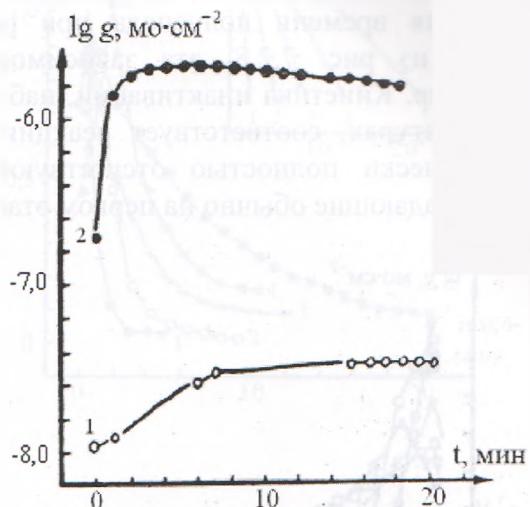
Немонотонная кинетика проводимости мембран с леворином носит необратимый характер. Так, добавка антибиотика на фоне инактивации проводимости не оказывает влияния на изменение проводимости мембран. По-видимому, процесс инактивации проводимости мембран не сопровождается разборкой канального комплекса на отдельные молекулы стерина и антибиотика, т.к. в противном случае добавление свободного антибиотика должно было бы привести вновь к росту проводимости за счет связывания антибиотика с свободными молекулами стерина.

Достаточно важным является вопрос о том, в какой мере влияет фосфолипидный состав мембраны на функциональные характеристики ионных каналов, образуемых леворином A₂. С этой целью было предпринято исследование кинетики проводимости мембран, сформированных из общих фосфолипидов мозга с холестерином, а также из диолеоилфосфатидилхолина с холестерином.. Как видно из сравнения кривой 3 на рис. 7.2.1 и кривой 1 на рис. 7.2.4, вид кинетики регулируется и видом фосфолипида в мембраноформирующем растворе. В случае, когда мембрана формируется из диолеоилфосфатидилхолина, кинетика проводимости таких мембран в присутствии леворина A₂ имеет монотонный характер. Но, как видно из кривых, представленных на рис. 7.2.4, уменьшение доли диолеоилфосфатидилхолина в мембране приводит к появлению немонотонности (кривая 2 на рис. 7.2.4). В случае мембранны, формируемой из общих фосфолипидов мозга, изменение весового отношения фосфолипид: холестерин также приводит к ускорению инактивации проводимости.

Если сравнить кривые 1 и 3 на рис. 7.2.1, то видно, что уменьшение доли холестерина в составе мембран приводит к ускорению процесса инактивации и, как следствие, к резкому уменьшению времени полуспада. По-видимому, уменьшение доли холестерина

(т.е. увеличение доли фосфолипида) в мембране приводит к определенной дестабилизации канальной структуры, которая становится неустойчивой и инактивируется, переходя в некоторое другое непроводящее состояние.

Рис. 7.2.4. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированных леворином A₂ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в зависимости от доли диолеоилфосфатидилхолина (ДОФХ) в мембраноформирующем растворе. Состав мембраны: 1—весовое отношение ДОФХ: холестерин = 20:10; 2—весовое отношение ДОФХ: холестерин = 10:10. Условия опыта: 1 М KCl, pH 6,5; t=20⁰C [Микаилова, 1990].



На рис. 7.2.5 показана кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированных леворином A₂ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в зависимости от доли эргостерина в мембраноформирующем растворе. На рис. 7.2.5 видно, что в зависимости от доли эргостерина в мембранах кинетика проводимости мембран может быть монотонной, кривые 1 и 2, а также немонотонной, кривая 3.

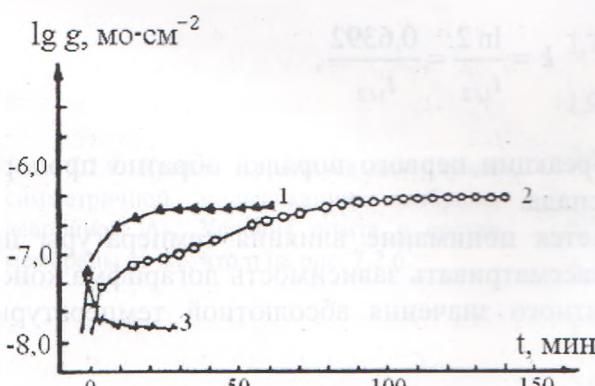


Рис. 7.2.5. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированной леворином A₂ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в зависимости от доли эргостерина в мембраноформирующем растворе. Состав мембраны: весовое отношение фосфолипид: эргостерин: 1—20:0,2; 2—20:0,4; 3—10:0,5. Условия опыта: солевой раствор 1 М KCl, pH 6,5, t=20⁰C. Потенциал на мембране 100 мВ [Микаилова, 1990].

На рис. 7.2.6 и 7.2.7 приведена кинетика проводимости мембран с леворином в зависимости от температуры. Из рисунков видно, что с увеличением температуры наблюдается тенденция к уменьшению времени инактивации и увеличению максимума проводимости. Особенно отчетливо это проявляется на рис. 7.2.8, где приведены значения времени полуспада при различных температурах. Как видно из рис. 7.2.8, эта зависимость имеет экспоненциальный характер. Кинетика инактивации, наблюдавшейся при всех указанных температурах, соответствует реакции первого порядка. При этом практически полностью отсутствуют процессы сборки каналов, преобладающие обычно на первом этапе кинетики.

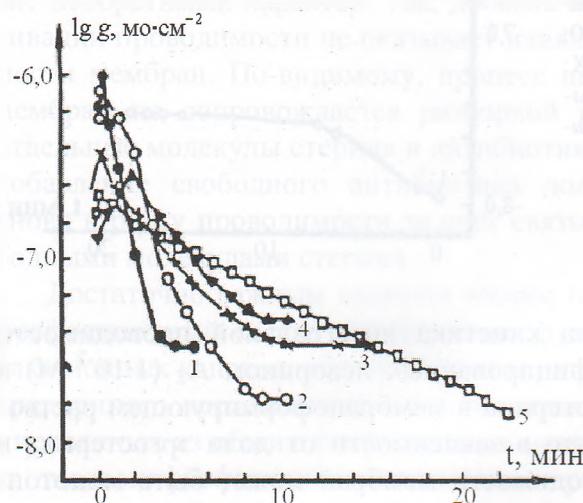


Рис. 7.2.6. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированной леворином A_2 ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в зависимости от температуры: 1 - 50°C ; 2 - 40°C ; 3 - 30°C ; 4 - 20°C ; 5 - 15°C . Условия опыта: 1М KCl, pH 6,5. Состав мембраны: холестерин:фосфолипид = 0,5 [Микаилова, 1990].

Для реакций первого порядка константа скорости будет:

$$k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} = \frac{0,6392}{t_{1/2}},$$

т.е. константа скорости реакции первого порядка обратно пропорциональна периоду полуспада.

Значительно упрощается понимание влияния температуры на скорость реакции, если рассматривать зависимость логарифма константы скорости от обратного значения абсолютной температуры (рис. 7.2.9).

Рис. 7.2.7. Та же зависимость, что и на рис. 7.2.6, только в относительных единицах. Обозначения оставлены те же. Вверху представлены соответствующие полулогарифмические анаморфозы [Микаилова, 1990].

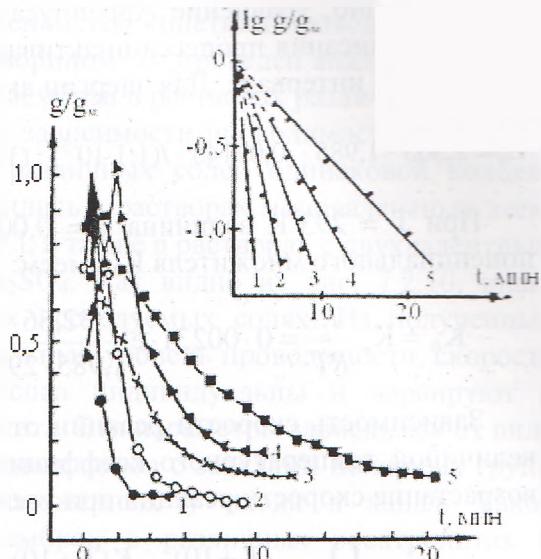


Рис. 7.2.8. Зависимость времени полуспада проводимости от температуры. Условия опыта и состав мембраны те же, что и на рис. 7.2.6 [Микаилова, 1990].

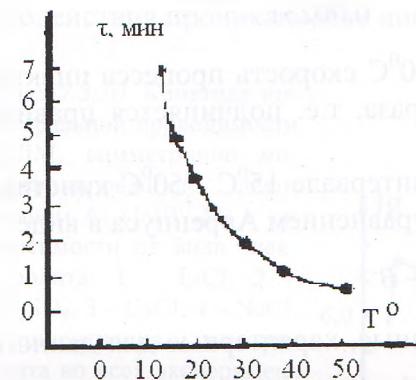
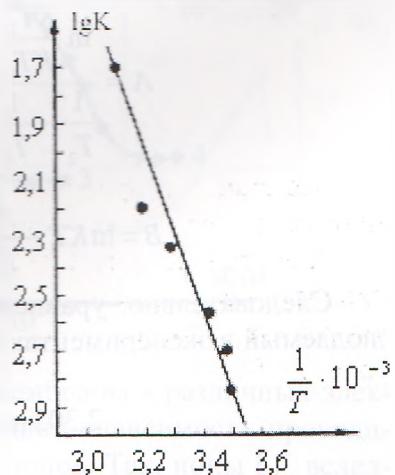


Рис. 7.2.9. Кривая Аррениуса для случая симметричной модификации мембранны леворином A_2 . Условия опыта и состав мембраны те же, что и на рис. 7.2.6.



Как видно, уравнение Аррениуса оказывается вполне приемлемым для описания процесса инактивации во всем исследуемом температурном интервале. Для энергии активации E_a находим:

$$E_a = 2,303 \cdot 1,985 \cdot 0,07145 \cdot / (1:1 \cdot 10^3) : (1:0,1) / = 0,3266 \cdot 10^2 = 32,66 \frac{\text{кал}}{\text{моль}}$$

При $T = 293^0\text{K}$ величина $k = 0,00231 \text{ c}^{-1}$. Отсюда для предэкспоненциального множителя K_0 имеем:

$$K_0 = K_e \frac{E}{RT} = 0 \cdot 00231 \cdot e \frac{32,66}{1,985 \cdot 293} = 0,00244 = 2,44 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$$

Зависимость скорости реакции от температуры характеризуется величиной температурного коэффициента Q_{10} , который определяет возрастание скорости реакции при увеличении температуры на 10^0C :

$$Q_{10} = \frac{(T+10)}{(T)} = \frac{K(T+10)}{K(T)} = \frac{0,00463}{0,00231} = 2,004$$

С повышением температуры на 10^0C скорость процесса инактивации увеличивается примерно в 2 раза, т.е. подчиняется правилу Вант-Гоффа.

Учитывая, что в температурном интервале $15^0\text{C} - 50^0\text{C}$ кинетика проводимости мембран описывается уравнением Аррениуса в виде:

$$\ln K = \frac{A}{T} + B$$

где А и В – индивидуальные постоянные, характерные для данного процесса, находим:

$$A = \frac{\ln \frac{KT_2}{KT_1}}{\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}} = \frac{0,695}{\frac{1}{293} - \frac{1}{304,5}} = 5387,6$$

$$B = \ln KT_1 - \frac{A}{T_1} = 5,3752 - 17,693 = -12,3181$$

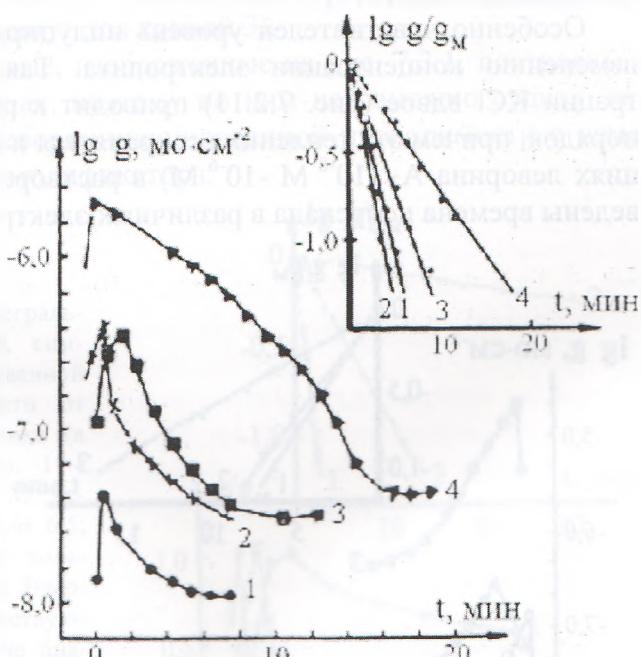
Следовательно, уравнение первого порядка, описывающее наблюдаемый в экспериментах процесс инактивации, имеет вид:

$$2,303 \ln K = \frac{5387,6}{T} - 12,3181$$

С целью выяснения особенностей кинетики проводимости мембран, модифицированных леворином А₂, проведен анализ поведения интегральной проводимости мембран в растворах различных солей.

На рис. 7.2.10 приведены зависимости проводимости мембран с леворином А₂ в растворах различных солей одинаковой концентрации. Измерения производились в растворах моновалентных электролитов KCl, NaCl, CsCl, LiCl, а также в растворах с двухвалентным непроникающим анионом K₂SO₄. Как видно из рис. 7.2.10, инактивация проявляется во всех исследуемых солях. Из полученных данных следует, что максимальный уровень проводимости, скорость инактивации и время полуспана индивидуальны и варьируют в зависимости от типа электролита. Эти параметры зависят как от вида катиона, так и от взаимодействия ионов с зарядами полярных групп молекул антибиотика, расположенных у входа в канал. Такое поведение проводимости мембран в различных электролитах в присутствии леворина А₂ может быть результатом сложного взаимодействия проникающего иона внутри леворинового канала.

Рис. 7.2.10. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированной леворином А₂ ($1 \cdot 10^{-7}$ М) в зависимости от вида электролита: 1 – LiCl; 2 – K₂SO₄; 3 – CsCl; 4 – NaCl. Концентрация электролита во всех экспериментах одинакова и равна 1 М. Условия опыта: pH 6,5; t=20⁰C. Состав мембранны: холестерин:фосфолипид = 0,5. На верхнем рисунке представлены соответствующие полулогарифмические аноморфизмы. Потенциал на мемbrane 100 мВ [Микаилова, 1990].



При сопоставлении проводимостей мембраны в различных электролитах (рис. 7.2.10) становится наглядной зависимость проводимости мембраны от степени гидратации ионов. Так, ионы Li⁺ вслед-

ствие меньшего размера (рис. 7.2.10, кривая 1) гидратируются в значительно большей степени, чем, например, ионы Cs^+ , что сильно уменьшает скорость перемещения ионов Li^+ в канале и это, в свою очередь, обуславливает почти на порядок меньшую проводимость каналов в хлористом литии по сравнению с проводимостью в хлористом цезии. Тот факт, что прохождение ионов Li^+ через левориновые каналы более затруднено, чем ионов Cs^+ позволяет предположить, что левориновые каналы представляют собой водную пору.

Следовало бы ожидать, что в растворе NaCl проводимость мембранны будет примерно равной проводимости мембран с леворином A_2 в растворах LiCl . Однако, как видно из рис. 7.2.10, в экспериментах этого не наблюдается. Проводимость мембран с леворином в растворах NaCl примерно на порядок выше проводимости мембран в CsCl . Здесь, по-видимому, имеет место более сложный характер переноса ионов через левориновые каналы, так же, как это имеет место для прохождения ионов Na^+ через амфотерициновый канал [Ermishkin, et al., 1977].

Особенно чувствителен уровень индуцируемой проводимости к изменению концентрации электролита. Так, увеличение концентрации KCl вдвое (рис. 7.2.11) приводит к росту проводимости на порядок, причем эта тенденция сохраняется и при других концентрациях леворина A_2 (10^{-8} M - 10^{-6} M) в растворе. В таблице 7.2.1 приведены времена полуспада в различных электролитах.

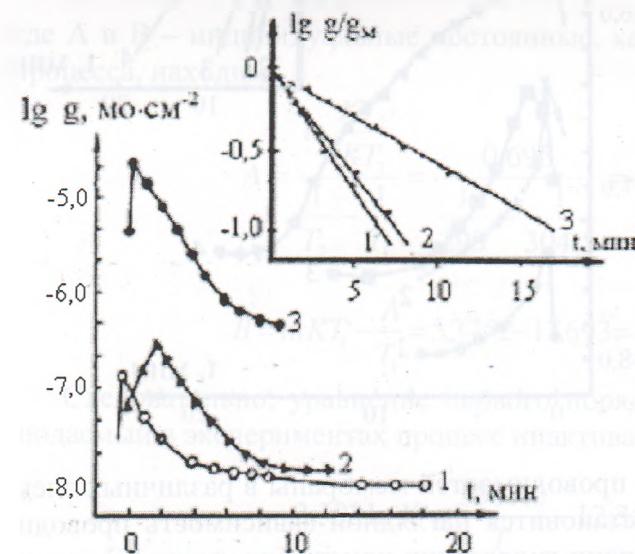


Рис. 7.2.11. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированной леворином A_2 ($1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) в зависимости от концентрации электролита: 1 – 100 mM KCl ; 2 – 1 M KCl ; 3 – 2 M KCl . Состав мембранны: холестерин:фосфолипид = 0,5. Условия опыта: $\text{pH} 6,5$; $t=20^\circ\text{C}$. Вверху представлены соответствующие полулогарифмические анаморфозы [Микаилова, 1990].

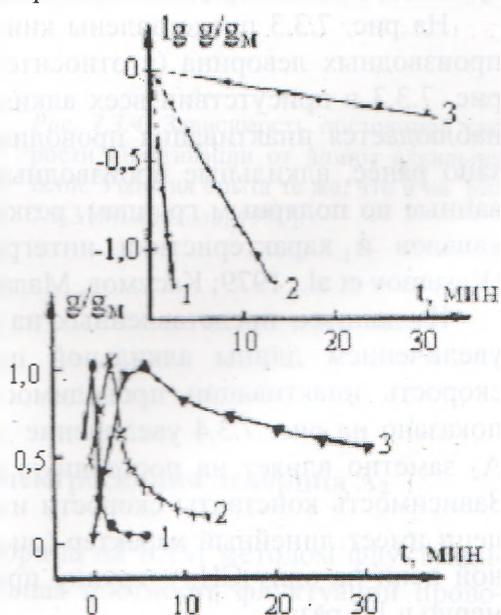
7.3. Кинетика проводимости БЛМ в зависимости от концентрации леворина A_2 и длины его алкильной цепи

При исследовании кинетики проводимости мембран, модифицированных леворином A_2 , обнаружено, что с увеличением концентрации антибиотика меняется форма, а вместе с ней и характер кинетической кривой. При малых концентрациях леворина A_2 (10^{-8} М - 10^{-7} М) наблюдается колоколообразное изменение проводимости мембран (рис. 7.3.1, кривые 1-3). На рис. 7.3.1 представлена кинетика проводимости БЛМ в присутствии леворина A_2 в зависимости от концентрации антибиотика. При повышенных концентрациях антибиотика (10^{-6} М) степень инактивации проводимости мембран существенно уменьшается (кривая 3). При этом соответственно меняются и времена полуспада проводимости мембранны: от $t_{1/2} = 0,5$ мин (кривая 1) до $t_{1/2} = 3,5$ (кривая 3).

С увеличением концентрации антибиотика увеличивается также время активации и продолжительность этапа, характеризующего метастабильное состояние (от долей секунд в случае кривой 1 до нескольких десятков минут для кривой 3).

Кинетические кривые, изображенные на рис. 7.3.1, построены в относительных единицах, поэтому по ним невозможно судить, как меняется максимум леворининдуцированной проводимости с изменением концентрации модификатора.

Рис. 7.3.1. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированной леворином, в зависимости от концентрации антибиотика (в относительных единицах). 1 - 10^{-8} М; 2 - 10^{-7} М; 3 - 10^{-6} М. Условия опыта: I M KCl, pH 6,5; $t=20^{\circ}\text{C}$. Состав мембранны: холестерин:фосфолипид = 0,5. Вверху представлены соответствующие полулогарифмические анафорозы [Микаилова, 1990].



Из рис. 7.3.2 видно, что с увеличением концентрации леворина проводимость мембран резко возрастает.

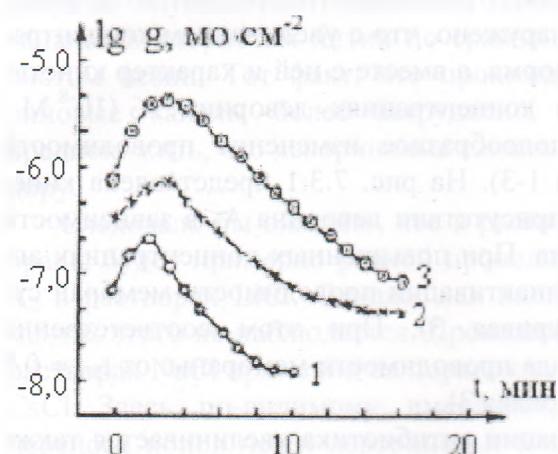


Рис. 7.3.2. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, модифицированной леворином A₂, в зависимости от концентрации антибиотика. 1 – $1 \cdot 10^{-7}$ М; 2 – $2 \cdot 10^{-7}$ М; 3 – $3 \cdot 10^{-7}$ М. Условия опыта: 1 М KCl, pH 6,5, t=20°C. Состав мембраны – холестерин:фосфолипид = 0,5 [Микаилова, 1990].

Исследование различных производных леворина A₂ позволяет установить роль отдельных химических групп в функционировании левориновых каналов.

Алкильные производные леворина A₂ представляют собой структурные модификации молекулы антибиотика по полярным группам, отличающиеся длиной алкильной цепи.

На рис. 7.3.3 представлены кинетические кривые для всех пяти производных леворина (в относительных единицах). Как видно из рис. 7.3.3 в присутствии всех алкильных производных леворина A₂ наблюдается инактивация проводимости мембран. Как было показано ранее, алкильные производные амфотериина В, модифицированные по полярным группам, резко изменяют свойства одиночных каналов и характеристики интегральной проводимости мембран [Касумов et al., 1979; Касумов, Малафриев, 1982 б].

Из данных, представленных на рис. 7.3.4, можно видеть, что с увеличением длины алкильной цепи производных леворина A₂ скорость инактивации проводимости мембран уменьшается. Как показано на рис. 7.3.4 увеличение длины алкильной цепи леворина A₂ заметно влияет на постоянную времени скорости инактивации. Зависимость константы скорости инактивации от длины алкильной цепи имеет линейный характер (рис. 7.3.4). Так, удлинение алкильной цепи на одну CH₂ – группу приводит к увеличению K_{отн} примерно в 1,5 раза.

Рис. 7.3.3. Кинетика интегральной проводимости БЛМ, симметрично модифицированной алкильными производными леворина ($1 \cdot 10^{-7}$ М): 1 – амиллеворин; 2 – бутиллеворин; 3 – пропиллеворин; 4 – этиллеворин; 5 – метиллеворин; Условия опыта: I M KCl, pH 6,5, t=20⁰C. Состав мембранны - холестерин: фосфолипид = 0,5. Вверху представлены соответствующие полулогарифмические анаморфозы [Микаилова, 1990].

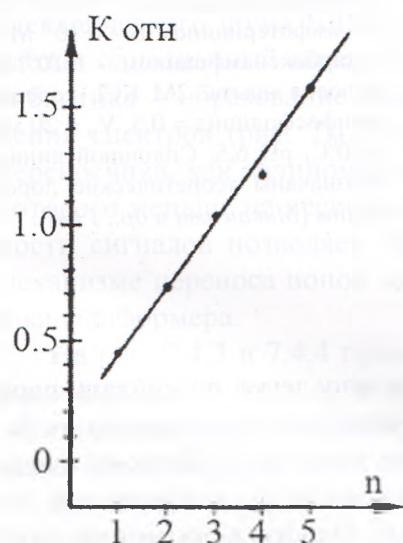
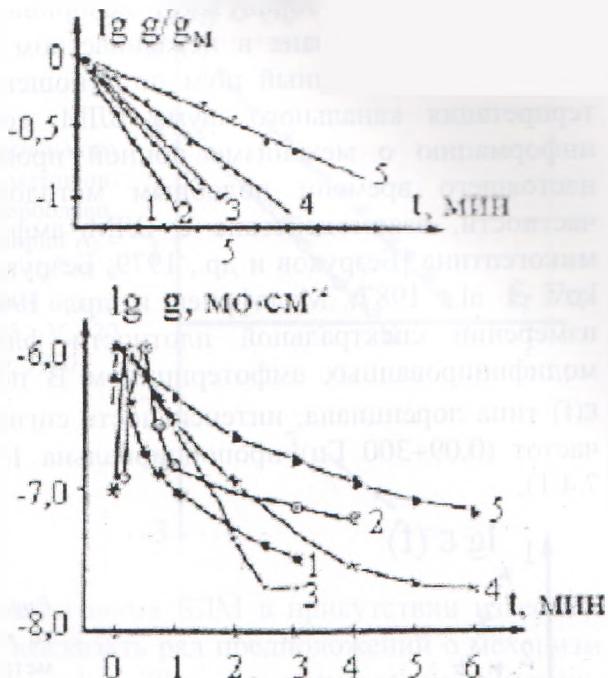


Рис. 7.3.4. Зависимость постоянной скорости инактивации от длины алкильной цепи. Условия опыта те же, что и на рис. 7.3.3 [Микаилова, 1990].

7.4. Флуктуационная спектроскопия леворина А₂

Исследовалось действие леворина на БЛМ методом флуктуационной спектроскопии. Спектральная плотность флуктуаций проводимости растет на несколько порядков в случае использования в

качестве модификаторов БЛМ леворина A_2 , а также некоторых других ПА. Мембрана в неравновесном стационарном состоянии генерирует избыточный шум по отношению к равновесному. Интерпретация канального шума БЛМ может дать определенную информацию о механизме ионной проницаемости мембран. До настоящего времени подобным методом было исследовано, в частности, взаимодействие с БЛМ амфотерицина В, нистатина, микогентина [Безруков и др., 1979; Безруков, Сибилев, 1980; Безруков et al., 1987; Малафриев и др., 1991]. Так, например, при измерении спектральной плотности флуктуаций тока в БЛМ, модифицированных амфотерицином В получен спектр мощности $\varepsilon(f)$ типа лоренциана, интенсивность сигнала которого в диапазоне частот ($0,09+300$ Гц) пропорциональна $1/f^2$, где f – частота (рис. 7.4.1).

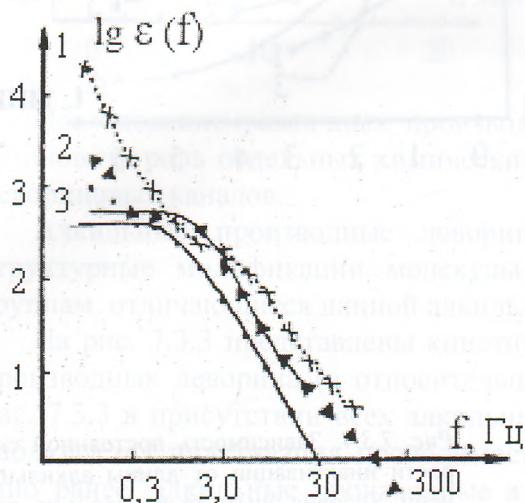
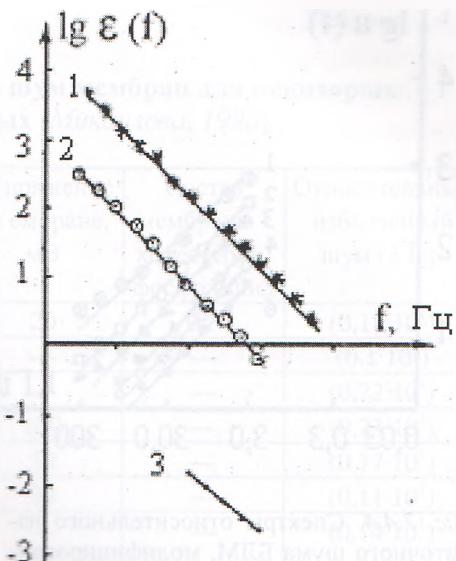


Рис. 7.4.1. Спектры относительно-го избыточного шума БЛМ, симметрично модифицированных ПА: 1 – амфотерицином В - $0,8 \cdot 10^{-7}$ М, 2 – амфотерицином В - $4 \cdot 10^{-8}$ М, 3 – карбоксиамфотерицином - $8 \cdot 10^{-8}$ М. Условия опыта: 2М KCl, холестерин:фосфолипид = 0,5, $V_m = 20$ мВ, $t=20^\circ\text{C}$, pH 6,5. Сплошной линией обозначены теоретические лорен-цианы [Микаилова и др., 1990].

Из лоренцевского спектра шума можно легко рассчитать параметры ионного канала, образованного в мембране амфотерицином В – проводимость g_c и среднее время жизни каналов τ_c . Поэтому следовало ожидать, что для леворина A_2 так же будет наблюдаться лоренцевский спектр электрического шума. Однако в экспериментах с леворином A_2 в диапазоне ($0,09+300$ Гц) был получен спектр шума, отличный от лоренциана. На рис. 7.4.2 представлен спектр шума леворина A_2 , полученный в тех же условиях, что и на рис. 7.4.1. Амфотерицин В был выбран для сравнения в качестве тестирующего антибиотика, как наиболее изученный в спектральном отношении ПА (см. разд. 8).

Рис. 7.4.2. Спектры относительного избыточного шума БЛМ, симметрично модифицированных ПА: 1 – карболеворин - $2 \cdot 10^{-5}$ М, 2М KCl; 2 – леворин A₂ - $1 \cdot 10^{-6}$ М; 3 – валиномицин - $5 \cdot 10^{-8}$ М в растворах 100 мМ KCl. Условия опыта – холестерин:фосфолипид=0,5, $V_m=20$ мВ, $t=20^\circ\text{C}$, pH 6,5 [Микаилова, 1990].



Изучение электрического шума БЛМ в присутствии известных антибиотиков позволяет высказать ряд предположений о механизме генерации шума проводимости. Так, по результатам измерения электрического шума БЛМ, модифицированных леворином A₂, был сделан однозначный вывод о механизме мембранный активности антибиотика – образование ионных каналов, что ясно видно из сравнения спектров (рис. 7.4.2) этого антибиотика и такого типичного переносчика, как валиномицин, интенсивность сигналов в спектре которого меньше на несколько порядков. Такое отличие в интенсивности сигналов позволяет судить о принципиально отличающемся механизме переноса ионов через мембраны с помощью переносчика и каналоформера.

На рис. 7.4.3 и 7.4.4 приведены спектры шума БЛМ, модифицированных леворином A₂ в различных условиях. при варьировании таких параметров, как молярность, вид солевого раствора, омывающего мембрану, весового соотношения фосфолипид:стерин.

Как видно из сравнения кривых, представленных на рис. 7.4.1-7.4.4, при изменении экспериментальных условий меняется лишь интенсивность фликкер-шума (табл. 7.4.1). Это позволяет предположить, что фликкер-шум во всех случаях порождается не структурными перестройками левориновых каналов как в случае амфотерицина В, а латеральной диффузией канала в матриксе мембраны. На рис. 7.4.3 представлены также спектры флюктуаций тока при различных нап-

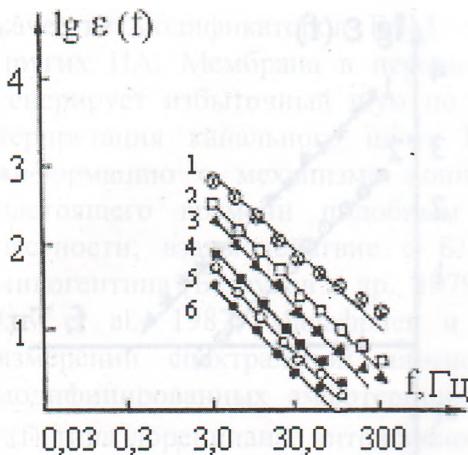
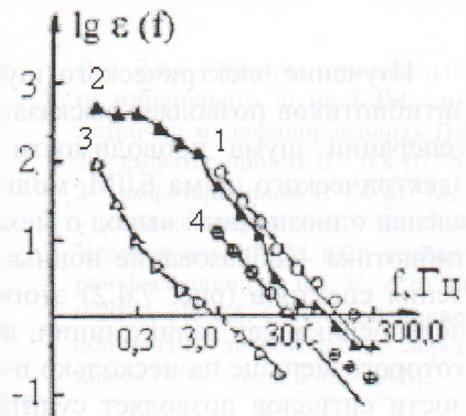


Рис. 7.4.3. Спектры относительного избыточного шума БЛМ, симметрично модифицированной леворином A_2 ($1 \cdot 10^{-6}$ М) при различных условиях эксперимента: 1 – при 200 мВ, 2 – при 150 мВ, 3 - при 100 мВ, 4 - при 50 мВ, 5 – при 25 мВ, 6 – через час после 5-го эксперимента. Условия опыта - 100 мМ KCl, $t=20^{\circ}\text{C}$, pH 6,5, фосфолипид:холестерин=0,3 [Микаилова, 1990].

Рис. 7.4.4. Спектры относительного избыточного шума БЛМ, модифицированных амфотерицином В и леворином A_2 : 1 – леворин A_2 при асимметричной модификации мембраны $3 \cdot 10^{-6}$ М, 2 – комбинированное взаимодействие амфотерицина В ($4 \cdot 10^{-8}$ М) при симметричной и леворина A_2 ($1 \cdot 10^{-6}$ М) при асимметричной модификации ими мембранны, 2 М KCl холестерин:фосфолипид = 0,5, $V_m = 20$ мВ, $t=20^{\circ}\text{C}$, pH 6,5; 3 - леворин A_2 при симметричной модификации мембраны ($5 \cdot 10^{-6}$ М), 2М NaCl, холестерин:фосфолипид=0,3, $V_m=20$ мВ, $t=20^{\circ}\text{C}$, pH 6,5; 4 – то же, что и 2 но в 100 мМ KCl [Микаилова, 1990].



ряжениях, меньших или больших порогового значения (75 мВ для леворина) подаваемых на мембрану, симметрично модифицированную леворином A_2 . Каналы, образованные леворином A_2 , функционируют при всех указанных значениях напряжения, но их спектры отличаются лишь интенсивностью фликкер-шума. Показано, что с увеличением величины подаваемого на мембрану напряжения возрастает скорость сборки проводящих каналов [Kasumov et al., 1981]. Сравнение спектральных кривых на рис. 7.4.3, полученных при симметричной и асимметричной модификации мембраны леворином A_2 , показывает, что каналы, формируемые этим антибиотиком с разных сторон мембраны, функционируют независимо друг от друга [Микаилова, 1990].

Таблица 7.4.1.

Относительный избыточный шум мембран для некоторых спектральных кривых [Микаилова, 1990].

№	Название антибиотика	Условия эксперимента	Напряжение на ембране, мВ	Состав мембранных - холестерин: фосфолипид	Относительный избыточный шум (3 Гц)
1.	Валиномицин	0,1 М KCl	20	0,5	$(0,18 \cdot 10^1)$
2.	Леворин A ₂	—	—	—	$(0,1 \cdot 10^1)$
3.	Карболеворин	2 М KCl	—	—	$(0,22 \cdot 10^1)$
4.	Леворин A ₂	0,1 М K ₂ SO ₄	100	—	$(0,23 \cdot 10^1)$
5.	—	0,1 М K ₂ SO ₄	50	—	$(0,17 \cdot 10^1)$
6.	—	2 М NaCl	20	—	$(0,11 \cdot 10^1)$
7.	—	2 М NaCl асимметр. модификация мембранны	—	—	$(0,14 \cdot 10^1)$
8.	Амфотерицин В Леворин A ₂	0,1 М KCl	—	—	$(0,07 \cdot 10^1)$
9.	Амфотерицин В Леворин A ₂	2 М KCl	—	—	$(0,17 \cdot 10^1)$
10.	Леворин A ₂	0,1 М KCl	50	0,3	$(0,174 \cdot 10^1)$
11.	—	—	— через час	—	$(0,166 \cdot 10^1)$
12.	—	—	100	0,5	$(0,25 \cdot 10^1)$
13.	—	—	200	—	$(0,28 \cdot 10^1)$
14.	Амфотерицин В	—	20	—	$(0,21 \cdot 10^1)$
15.	—	2 М KCl	—	—	$(0,3 \cdot 10^1)$
16.	Карбоксиамфоцин	—	—	—	$(0,27 \cdot 10^1)$

Процессы открывания и закрывания ионного канала могут быть обусловлены, по-видимому, двумя причинами. Первая причина, это изменение динамики структурных перестроек канала, которая может описываться сложными спектральными зависимостями, являющимися суперпозицией набора лоренцианов [Neher, Stevens, 1977]. Проведенные эксперименты на мембранах различного липидного состава, проводимость которых индуцирована каналообразующими соединениями, показывают, что в подавляющем большинстве случаев в спектре флюктуаций проводимости мембран доминирует единственная лоренцевская компонента [Kolb, Bamberg, 1977; Kolb, Boheim, 1978; Безруков и др., 1979; Neher, Stevens, 1977; Костюк и

др., 1980]. Простейшая из рассмотренных моделей для избыточных электрических флуктуаций приводит к соотношению, вид которого показан в уравнении 7.1.1. Это соотношение выполняется и в случае нераспадающегося ионного канала, процесс переключения которого является марковским процессом двух состояний (открытый и закрытый канал) [Безруков и др., 1979; Bezrukov et al., 1987].

Второй причиной является диффузионное движение канала в мембране. В результате такого движения канал может изменять свою ориентацию в мембране. Теоретическое рассмотрение ряда диффузионных моделей приводят к релаксационным процессам, некоторые параметры которых зависят от времени как $1/\sqrt{\tau}$. Соответствующая таким моделям спектральная плотность флуктуаций зависит от частоты как I/f [Neumke, 1978].

Тепловой шум и шум проводимости являются возможными источниками электрических шумов, которые связаны с транспортом ионов через биологические и искусственные мембранны. К ним необходимо отнести и так называемый фликкер шум [Безруков и др., 1979], т.е. шум со спектральным распределением мощности, приблизительно обратно пропорциональный частоте.

Спектр мощности типа I/f был получен на толстых искусственных мембранах, содержащих длинные и узкие водные поры [De Felice, Michalides, 1972; Dorset, Fishman, 1975]. Он является преобладающей компонентой в спектре флуктуаций напряжения (тока) в мембранах нервного волокна [Neumke, 1978]. Тем не менее до сих пор нет хорошо разработанной теории I/f шума, описывающей экспериментальные результаты, полученные на столь разных объектах.

Так, например, было высказано предположение, что возникновение I/f шума в биологических и бислойных мембранах, связано с неравномерностью потока ионов в открытом канале или в зоне его контакта с водным раствором [Neumke, 1978; Sauve, Bamberg, 1978]. Была также исследована возможность нахождения источника фликкер-шума биомембранны в ионном растворе вне ионных каналов [De Goede et al., 1985]. Но эксперименты показали, что флуктуации потока ионов через открытый канал достаточно малы и не вносят существенного вклада в измеряемый шум. Это позволило сделать предположение о том, что источником I/f шума является диффузионное движение ионных каналов в липидном матриксе, которое приводит к их случайным переключениям. Так, для грамицидина А это доказывается сильной зависимостью интенсивности I/f шума от вида липида, используемого для формирования БЛМ [Ирхин, 1982; Ирхин

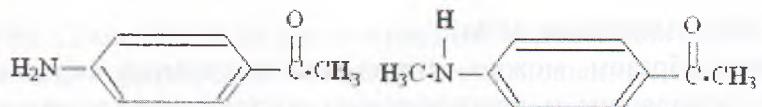
и др., 1984; Микаилова, 1990].

Таким образом, можно считать, что случайные переключения между проводящим и непроводящим состояниями, встроенного в БЛМ ионного канала могут сопровождаться изменением как его структуры, так и диффузионным перемещением в мембране.

Столь различное «шумовое» поведение леворина A_2 и амфотерицина В позволяет сделать вывод о том, что механизм функционирования леворинового канала отличается от механизма функционирования амфотерицинового канала.

Вид спектра, получаемого при измерениях электрического шума, является суммой двух компонент, отражающих эти процессы – лоренцевской компоненты и компоненты $1/f$. В некоторых случаях в используемых диапазонах частот доминирующим оказывается один из процессов, когда спектр шума хорошо описывается одной из компонент, как, например, в случае амфотерицина В, спектр которого в отличие от леворина A_2 , характеризуется малым уровнем фликкер-шума. Общим для обоих рассматриваемых ПА является относительная устойчивость структур с интервалом в 1 час. Это следует, в частности, из того, что спектр шума качественно не меняется в зависимости от условий эксперимента и структуры молекул. Даже наличие дополнительной отрицательно заряженной карбоксильной группы (CH_2COO^-) на аминогруппе молекул леворина A_2 - карболеворина и амфотерицина В - карбоксиамфоцина влияет не на характер «шумового» поведения антибиотиков, а лишь на интенсивность получаемых спектров. Отсутствие хорошо разработанной теории $1/f$ шума не дает возможности делать каких либо количественных оценок параметров ионного канала, а позволяет ограничиться лишь качественным объяснением его поведения. Возможно, подобные различия в спектрах шума леворина и амфотерицина связаны с различиями в структуре исследуемых молекул и формируемыми ими в мембранах проводящих единиц.

Как известно, общим в структуре этих антибиотиков, как и всех полиенов, является наличие макролидного кольца. По числу сопряженных двойных связей они относятся к группе гептаеновых антибиотиков. Оба они содержат аминосахар (микозамин - см. рис. 1.1.2). Но молекула леворина A_2 , в отличие от амфотерицина В, имеет кроме аминосахара, еще и дополнительную ароматическую группировку, расположенную на гидрофобном конце молекулы и снабженную функциональными группами, способными образовывать водородные связи:



р-аминоацетофенон

N-метил-р-аминоацетофенон

В рамках модели двух полупор [Andreoli, 1973; Finkelstein, Holz, 1973; De Kruyff, Demel, 1974] можно предположить, что в случае леворина A₂ участки встречных полупор при образовании канала взаимодействуют между собой, образуя множество не очень прочных водородных связей. С учетом данного предположения следовало ожидать, что это должно привести к уменьшению устойчивости канала, т.е. уменьшению времени пребывания канала в проводящем состоянии. С другой стороны за счет электростатического отталкивания положительно заряженных ароматических группировок на концах двух полупор становится чрезмерно гибкой структура леворинового канала, по сравнению с амфотерициновым каналом, и возрастает возможность деформаций (изгиба) канала без его разрушения. Это позволяет объяснить некоторые особенности функционирования левориновых каналов, отличающие их от амфотерициновых.

Так, например, проводимость левориновых каналов значительно ниже проводимости каналов, образованных амфотерицинов В (более, чем на порядок) [Касумов et al., 1981]. Повышенная деформируемость левориновых каналов приводит, по-видимому, к повышению уровня флюктуаций проводимости, обусловленных диффузионным движением самих каналов в мембране. Если в случае амфотерициновых каналов флюктуации проводимости связаны преимущественно с процессами сборки и разборки каналов, сопровождающих переход из открытого в закрытое состояние [Малафриев, 1985], то в случае леворина A₂ эти флюктуации связаны, по-видимому, с изменением ориентации канального комплекса относительно плоскости мембранны за счет латеральной диффузии. В результате подобных диффузионных переключений левориновый канал приобретает дополнительные непроводящие состояния. Возможно, по этой причине измерения проводимости одиночных каналов, образованных леворином A₂, показывают хаотическое поведение, резко отличное от четких дискретных скачков проводимости амфотерициновых каналов [Касумов, 1986 а].

Как показала обработка результатов, спектральная плотность фликкер-шума мембран в присутствии леворина A₂ во всех исследо-

ванных случаях удовлетворительно описывается соотношением:

$$\mathcal{E}(f) = \frac{\alpha \bar{V} c^2}{f \beta}$$

где \bar{V}_c - среднее напряжение на мембране, а α и β – параметры 1/f шума, найденные из регрессивного анализа спектральных кривых. Параметры фликкер шума для некоторых спектральных кривых приведены в таблице 7.4.2.

Таблица 7.4.2.

**Параметры 1/f шума для некоторых спектральных кривых
[Микаилова, 1990].**

№	Антибиотик M	Условия эксперимента	Напряжение на мембране, мВ	B^{-2}	c^{-1}	Среднеквадратичное отклонение
1.	Валиномицин ($5 \cdot 10^{-8}$)	0,1 M KCl	20	1,38	0,89	0,02
2.	Леворин A ₂ ($1 \cdot 10^{-6}$)	—	—	1,51	1,09	0,03
3.	Карболеворин ($2 \cdot 10^{-5}$)	2 M KCl	—	2,7	1,03	0,00
4.	Леворин A ₂ ($1 \cdot 10^{-6}$)	0,1 M KCl	100	2,81	1,04	0,026
5.	—	—	50	2,19	1,07	0,016
6.	—	2 M KCl	20	1,04	0,96	0,08
7.	—	— асимметричная модификация мембранны	—	1,98	1,16	0,03
8.	—	0,1 M KCl	50	2,33	1,12	0,04
9.	—	— (через час)	—	2,19	1,1	0,03
10.	—	—	100	2,86	0,94	0,017
11.	—	—	200	3,14	0,81	0,017
12.	—	1 M KCl (начало инактивации)	50	3,3	1,41	0,05
13.	—	1 M KCl (конец инактивации)	—	3,24	1,22	0,035

Комбинированное взаимодействие амфотерицина В и леворина A₂ дает в изучаемом диапазоне частот спектр шума, который описы-

вается суммой $1/f$ шума и лоренциана, причем доля лоренцевской компоненты резко убывает с уменьшением концентрации солевого раствора, омывающего мембранны. Интенсивность шума в случае мембранны, симметрично модифицированной амфотерицином В и асимметрично – леворином A_2 , ниже, чем в случае мембранны, модифицированной лишь амфотерицином, как видно из сравнения кривых 1 и 2 на рис. 7.4.2 и кривых 2 и 4 на рис. 7.4.4. Этот факт согласуется с ранее обнаруженным эффектом подавления проводимости амфотерициновых каналов леворином A_2 [Касумов, Малафриев, 1982 а]. Наличие лоренцевской компоненты в спектре шума проводимости мембранны, модифицированных комплексом антибиотиков, возможно, указывает на существование дополнительных быстрых конформационных перестроек в структуре каналов, образованных в БЛМ амфотерицинов В и леворином A_2 [Ирхин, 1982].

Как можно судить по спектрам шума проводимости, представленным на рис. 7.4.1-7.4.4, они получены при концентрации леворина A_2 ($1 \cdot 10^{-6}$ М), при которой кинетика проводимости БЛМ в присутствии этого антибиотика имеет монотонный характер. Однако при меньших концентрациях леворина A_2 ($< 10^{-6}$ М) наблюдается немонотонное изменение проводимости мембранны. Важно было исследовать спектральный состав флюктуаций проводимости левориновых каналов на различных участках инактивационной ветви. На рис. 7.4.5 представлены спектры шума, снятые вначале (кривая 1) и в конце процесса инактивации проводимости мембранны (кривая 2).

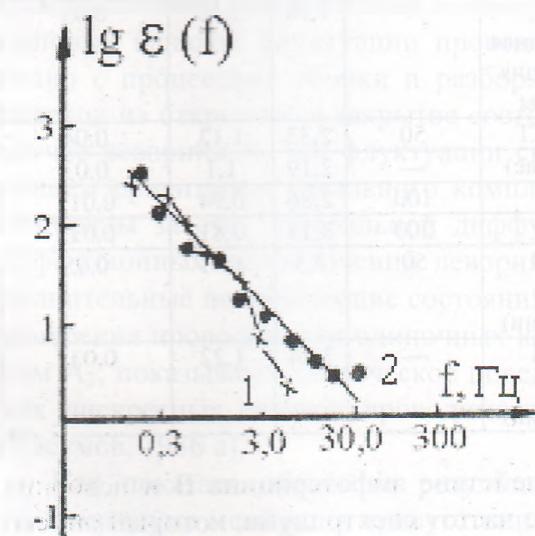


Рис. 7.4.5. Спектры относительно избыточного шума БЛМ, симметрично модифицированных леворином A_2 , снятые на различных участках изменения проводимости: 1 – в начале процесса инактивации, 2 – в конце процесса инактивации. 1 М KCl, $C=1 \cdot 10^{-7}$ М, холестерин:фосфолипид=0,5, $t=20^{\circ}\text{C}$, pH 6,5 [Микаилова, 1990].

Немонотонное изменение во времени проводимости мембран с большим числом каналов, индуцированной леворином A_2 , может быть обусловлено, по всей вероятности, несколькими причинами: 1) изменением свойств каждого отдельного проводящего канала, что может проявляться в уменьшении проводимости каждого канала на стадии инактиваций; 2) изменением времени нахождения канала в активном проводящем состоянии; 3) существованием отдельной популяции инактивирующихся каналов; 4) изменением общего числа проводящих каналов с сохранением их физико-химических свойств.

В случае изменения свойств каждого отдельного канала или какой-то группы каналов спектры, полученные на различных участках проводимости, должны различаться. Но совпадение спектров, наблюдавшееся на рис. 7.4.5 (об этом же можно судить и по близким значениям параметров соответствующих спектральных кривых, приведенных в таблице 7.4.2) указывает на то, что наблюдаемая в кинетических экспериментах инактивация проводимости мембран, модифицированных леворином A_2 , связана с изменением числа активных каналов во времени, а кинетические свойства этих каналов в исследуемом диапазоне частот в процессе инактивации проводимости не меняются.

Изменение числа активных левориновых каналов во времени может быть связано, в свою очередь, или с переходом каналов в устойчивую неактивную форму или с частичной разборкой их.

Повреждающее действие антибиотика на клетку тем больше, чем большую проницаемость (проводимость) он индуцирует. Обнаруженная при определенных экспериментальных условиях леворининдуцированная инактивация проводимости мембран является, возможно, следствием включения определенного «защитного» механизма клеток. Эффективность этого механизма может достаточно тонко регулироваться различными условиями, и, в частности, структурой стерина. Так, например, как показали эксперименты по исследованию кинетики проводимости мембран, содержащих различные стерины, леворин A_2 образует наиболее устойчивые комплексы с эргостерином, которые не распадаются в течение длительного времени. Леворин A_2 более эффективен на эргостеринсодержащих мембранах и индуцирует проводимость на 1-2 порядка выше, чем на холестеринсодержащих мембранах. Таким образом наблюдается корреляция между временем пребывания левориновых каналов в проводящем состоянии и эффективностью антибиотика при подавлении грибковых клеток [Kasumov et al., 1981].

По-видимому, клеточные мембранны определенного стеринового состава могут быть менее токсичны к действию леворина A₂. Обнаруженная зависимость кинетики проводимости мембран в присутствии леворина A₂ от структуры и доли стеринов в мембране может служить тестирующим методом для определения вида и содержания стерина в клетках.

Как было отмечено ранее, скорость инактивации, время полуспада и величина индуцируемой леворином A₂ проводимости регулируется концентрацией антибиотика. Можно подобрать такую концентрацию леворина A₂, при которой время действия леворина A₂ и величина индуцируемой им проводимости будут существенно уменьшены. И, наоборот, по характеру кинетики леворининдуцируемой проводимости мембран, по скорости инактивации и времени полуспада проводимости можно подобрать такие условия, при которых возможно целенаправленное уничтожение клеток.

Эффект изменения скорости инактивации проводимости мембранны от длины алкильной цепи молекулы леворина A₂ также может служить основой для дальнейшего синтеза новых, нетоксичных форм антибиотика. Получение менее токсичных антибиотиков можно добиться путем уменьшения их действующих концентраций при помощи сочетанного использования различных антибиотиков.

Для некоторых ПА был проведен ряд экспериментов с модификацией мембран одновременно несколькими антибиотиками. В условиях, когда мембрана модифицируется только амфотерицином В наблюдается увеличение проводимости мембран примерно в 1000 раз. Если к мембранам, содержащим амфотерицин В, добавить с одной стороны мембранны леворин A₂ ($1 \cdot 10^{-6}$ М), то наблюдается не увеличение проводимости, а ее инактивация. Такая же картина имеет место в случае комплексного взаимодействия нистатина и леворина A₂ [Касумов, Микаилова, 1988].

Таким образом, комплексное использование амфотерицина В и леворина A₂, а также нистатина и леворина A₂ резко уменьшает эффективность антибиотиков, что позволяет приостановить действие этих препаратов в необходимый момент времени.

На основании совокупности экспериментальных данных, полученных, в основном, при исследовании интегральной проводимости мембран в присутствии амфотерицина В различными авторами предложены примерно однотипные гипотетические модели функционирования ионных каналов, образованных ПА в мемbrane [Andreoli, 1973; Finkelstein, Holz, 1973; De Kruyff, Demel, 1974]. Но

позднее, при исследовании мембранотропных свойств других ПА и, в частности, леворина А₂ и его компонентов, было обнаружено, что эти антибиотики по своим свойствам значительно отличаются от амфотерицина В. Помимо этого, в литературе стали появляться работы, в которых приводились данные, которые не могли быть интерпретированы в рамках модели двух полупор для каналов, образованных ПА [Milhand et al., 1988, 1989; Касумов и др. 1985; Gary-Bobo et al., 1989; Yoshikawa et al., 1988; Kolomytkin et al., 1988, 1989].

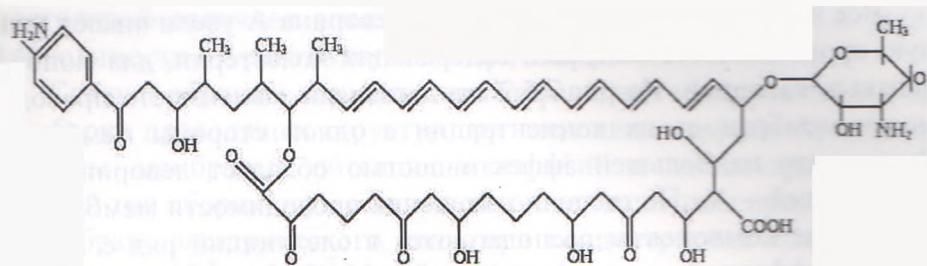
Таким образом, значительное отличие функциональных характеристик леворина А₂ от амфотерицина В, а также новые данные о влиянии липидного окружения на функционирование каналов, образованных ПА, послужило основой для продолжения исследований в данном направлении. Так, по данным рентгеноструктурного анализа, липидный бислой не является однородным, а представляет собой совокупность липидных кластеров различной величины [Ивков, Берестовский, 1982]. Особая роль стерина в мембране, модифицированной ПА, в частности леворином А₂, состоит с одной стороны в том, что он является рецептором, с которым антибиотик взаимодействует и связывается с ним, а с другой – его особая роль обусловлена влиянием на упаковку фосфолипидных молекул. Стерин оказывает «конденсирующее» действие на «жидкокристаллический» бислой, заполняя «пустоты» между углеводородными цепями и ограничивая их конформационную подвижность [Ивков, Берестовский, 1981, 1982]. По всей видимости, взаимодействие молекул антибиотика и стерина происходит до тех пор, пока все свободные рецепторы не будут связаны с молекулами антибиотика. По-видимому, вследствие «конденсирующего» эффекта молекул стерина, эти комплексы внедряются в мембрану и образуют некоторые олигомерные структуры, представляющие собой соответствующим образом организованные ассоциации из нескольких антибиотик-стерииновых комплексов. Представляет особый интерес, обнаруженный в экспериментах по исследованию кинетики леворининдуцированной проводимости мембран бифазный характер проводимости. Такое явление также обнаружено в присутствии метамфоцина, производного амфотерицина В [Касумов, Малафриев, 1982; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006]. Авторами было сделано предположение, что существование немонотонной кинетики связано с переходом метамфоцинового канала в дополнительное непроводящее состояние.

Эксперименты по исследованию зависимости параметров процесса инактивации проводимости мембран в присутствии леворина

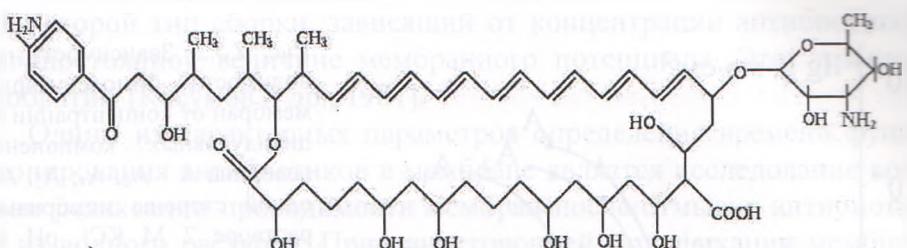
A_2 и его алкильных производных (времени полуспада, констант скорости падения проводимости) показали, что этот процесс достаточно тонко регулируется липидным составом мембраны, температурой, концентрацией антибиотика и солевого раствора. По-видимому, для того, чтобы классические статические модели функционирования каналов, образованных ПА, могли бы объяснить динамику функционирования ионных каналов во времени, они должны быть дополнены влиянием фосфолипидного и стеринового состава мембран на функциональное состояние ионных каналов. Косвенным подтверждением этого предположения могут служить исследования спектров флюктуаций леворининдцированной проводимости мембран. В этих экспериментах был получен фликкер-шум, происхождение которого объясняется диффузионным движением левориновых каналов, в результате которого меняется его ориентация в мембране. Интенсивность сигналов фликкер-шума сильно зависит от вида липида, используемого для формирования БЛМ [Ирхин, 1982], что еще раз подчеркивает важную роль влияния липидного окружения на процесс функционирования ионных каналов. Совпадение спектров шума, полученных на различных участках падения проводимости, связано, по-видимому, с изменением числа проводящих каналов во времени. Учитывая неравномерное распределение липидных кластеров, холестериновых доменов, сложное их взаимодействие, можно предположить, что левориновый канал является неустойчивым, неравновесным образованием. Инактивация проводимости мембран в присутствии леворина A_2 и его алкильных производных связана, по-видимому, переходом канала из более проводящего в менее проводящее состояние или частичной разборкой ионных каналов.

7.5. Действие индивидуальных компонентов леворина А на проводимость бислойных мембран. Эффект леворина A_2 , вводимого с одной стороны мембранны

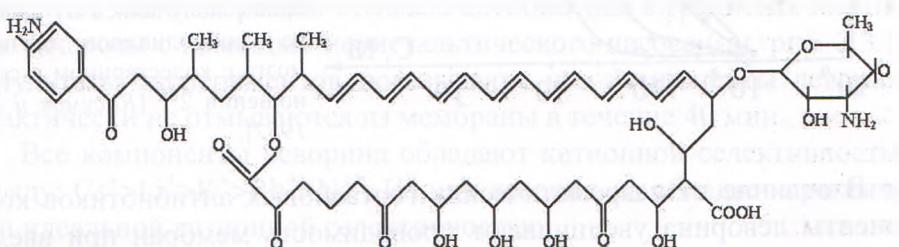
Исходный леворин А представляет собой смесь нескольких компонентов – A_0 , A_1 , A_2 , A_3 [Цыганов, 1970; Цыганов, Яковлева, 1970; Филиппова, Шенин, 1974]. Установлена структура основного компонента антибиотического комплекса – леворина A_2 [Zielinski et al., 1979 a] и частичная структура других компонентов [Zielinski et al., 1979 a, b, c]. Структурные отличия между компонентами леворина А показаны на рис. 7.5.1.



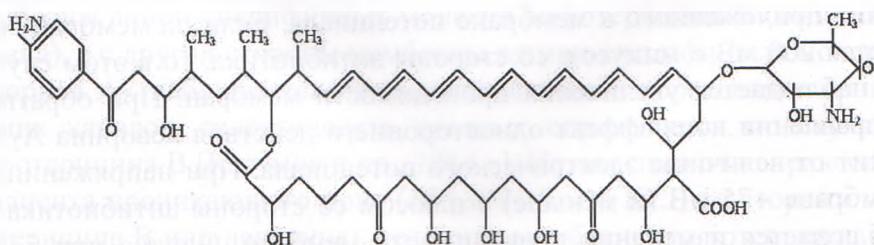
ЛЕВОРИН А₀



ЛЕВОРИН А₁



ЛЕВОРИН А₂



ЛЕВОРИН А₃

Рис. 7.5.1. Химическая структура индивидуальных компонентов леворина А.

Все индивидуальные компоненты леворина А увеличивают ионную проницаемость мембран, содержащих холестерин, для моновалентных катионов. На рис. 7.5.2 представлена зависимость проводимости мембран от их концентрации с одной стороны мембраны. Видно, что наибольшей эффективностью обладает леворин A_3 , а наименьшей – A_0 . По степени изменения проводимости мембран левориновые компоненты располагаются в следующий ряд с возрастающей эффективностью: $A_0 < A_1 < A_2 < A_3$ [Касумов и др., 1984]. В аналогичный ряд располагаются антибиотики по мере увеличения их биологической активности [Филиппова, Шенин, 1974].

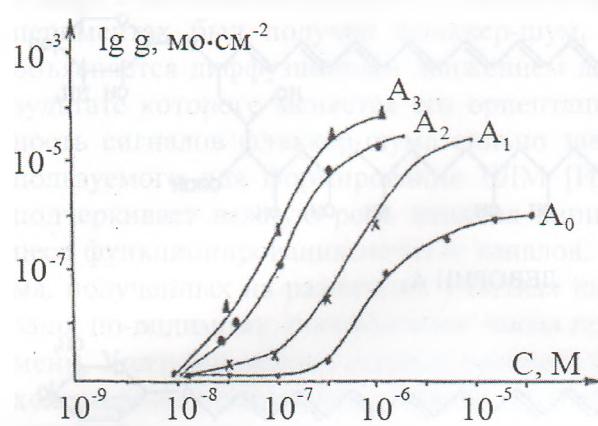


Рис. 7.5.2. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации индивидуальных компонентов леворина А - A_0 , A_1 , A_2 , A_3 с одной стороны мембраны в растворе 2 М KCl, pH 6.5, $t=25^{\circ}\text{C}$. Потенциал на мемbrane +100 мВ (плюс со стороны антибиотиков). Мембранны получались из раствора фосфолипидов бычьего мозга с холестерином в соотношении 2:1 [Касумов и др., 1987].

В отличие от неароматических гептаеновых антибиотиков компоненты леворина увеличивают проводимость мембран при введении их с одной стороны мембраны. При этом они обладают важными свойствами. Эффект антибиотиков на проводимость зависит не только от концентрации антибиотиков, но и от величины и направления приложенного к мембране потенциала. Если на мембрану подается 200 мВ с минусом со стороны антибиотика, то в этом случае не наблюдается увеличения проводимости мембран. При обратном направлении поля эффект одностороннего действия леворина A_2 зависит от величины электрического потенциала. При напряжении на мембране +75 мВ (и меньше) с плюсом со стороны антибиотика не наблюдается изменения проводимости мембран. Однако при более высоких потенциалах (более +75 мВ) наблюдается резкое нарастание проводимости мембран. Изменение потенциала вдвое (от 100 до 200 мВ) при постоянной концентрации антибиотика приводит к росту проводимости в 2^4 раз. Удвоение же концентрации антибиотика при

постоянной величине мембранныго потенциала приводит к росту проводимости в 4 раза [Касумов и др., 1987].

Следует обратить внимание на тот факт, что обнаружены два типа сборки проводящих структур при введении леворина A_2 с одной стороны мембраны: потенциалзависимый и концентрационный. Первый тип сборки осуществляется за счет величины приложенного к мемbrane электрического поля, при концентрациях компонентов леворина от 10^{-8} до $5 \cdot 10^{-7}$ М. Сборка каналов происходит и в отсутствие внешнего электрического поля и зависит от концентрации антибиотика. При концентрациях антибиотиков больше $5 \cdot 10^{-7}$ М появляется второй тип сборки, зависящий от концентрации антибиотиков при постоянной величине мембранныго потенциала. Этот процесс необратим [Касумов и др., 1987].

Одним из характерных параметров определения времени функционирования антибиотиков в мемbrane является исследование времени релаксации проводимости мембран после отмычки антибиотика из водного раствора. При односторонней модификации мембран соответствующими антибиотиками ($>2 \cdot 10^{-6}$ М) наблюдается рост проводимости и выход на стационарный уровень. После этого производится скачкообразная отмывка антибиотика в градиенте плотности сахарозы с помощью перистальтического насоса (см. рис. 3.3.1). Результаты экспериментов показывают, что компоненты леворина практически не отмываются из мембраны в течение 40 мин.

Все компоненты леворина обладают катионной селективностью в ряду: $Cs^+ > Li^+ > K^+ > Rb^+ > Na^+$. Из них леворин A_2 обладает практически идеальной катионной селективностью.

При исследовании взаимодействия двух разных по структуре и избирательной проницаемости антибиотиков амфотерицина В и леворина A_2 было обнаружено, что при введении с одной стороны мембраны анион-специфичных молекул амфотерицина В (либо нистатина), а с другой стороны мембраны катион-специфичных молекул леворина A_2 , наблюдается их взаимодействие и образование проводящих каналов, селективность которых определяется молекулами амфотерицина В [Касумов и др., 1984 в]. Независимо от направления градиента проникающего иона (100 мМ:10 мМ KCl) со стороны амфотерицина В или леворина), величина мембранныго потенциала составляет -23 мВ. Знак потенциала говорит о том, что через комбинированные каналы лучше проникают анионы. Проводимость комбинированных каналов составляет величину 2-3 пСм, что вдвое меньше проводимости индивидуальных амфотерициновых каналов, рис.

6.10.2. На рис. 6.10.2 показана запись работы одиночных ионных каналов амфотерицина В (запись 1 и 2) и леворина (запись 3), а также комбинированных каналов (запись 4).

Установлено, что при односторонней модификации липидных мембран леворином A_2 наблюдается увеличение проводимости мембран для одновалентных катионов, а также проницаемости для моносахаров и других нейтральных молекул в следующем ряду проницаемости: $H_2O > мочевина > ацетамид > глицерин > рибоза > арабиноза > глюкоза > сахароза$ [Курбанов, Касумов, 2004; Ибрагимова и др., 2006 б]. Механизм действия леворина A_2 основан на формировании с одной стороны мембранные проводящих каналов, индуцирующих проницаемость мембран для ионов и неэлектролитов. Алкильная модификация полярных групп в молекулах леворина не влияет на проводимость левориновых каналов и избирательную проницаемость мембран. При этом проводимость левориновых каналов составляет 0,3-0,5 пСм, сравнимую с величиной проводимости каналов, образованных при симметричном введении леворина A_2 . Предполагается, что избирательная проницаемость левориновых каналов определяется молекулярной структурой гидрофильной цепи, выстилающей внутреннюю полость канала. Предложена гипотетическая молекулярная модель формирования левориновых полупор при односторонней модификации липидных мембран леворином A_2 [Ибрагимова и др., 2006 б].

Исследования показали, что на мембранах с амфотерицином В избирательная проницаемость односторонних проводящих полупор совпала с избирательной проницаемостью симметричных каналов [Касумов, Каракозов, 1985; Касумов, Самедова, 1991]. Несмотря на большое количество публикаций, касающихся механизма взаимодействия ПА с БЛМ, до сих пор остается неясной связь между структурой молекул антибиотиков и свойствами образованных ими каналов. В отличие от амфотерицина В, нистатина и микогептина антибиотик леворин A_2 резко увеличивает проницаемость липидных мембран для катионов щелочных металлов, когда находится с одной стороны мембранны [Касумов, Либерман, 1973; Kasumov et al., 1981; Ибрагимова и др., 2006 б]. К настоящему времени в литературе отсутствуют данные о механизме одностороннего действия леворина A_2 на БЛМ. С этой целью изучены свойства ионных каналов при введении леворина A_2 с одной стороны мембранны, представлены данные экспериментальных исследований об избирательности при формировании односторонних проводящих каналов, изучено влия-

ние алкильной модификации полярных групп на избирательную проницаемость и величину проводимости левориновых каналов.

Проводимость мембран с леворином зависит от величины и направления внешнего электрического поля. Так, если в отсутствии внешнего поля с одной стороны мембранны находятся леворин, то не наблюдается увеличение интегральной проводимости мембран. Для регистрации проводимости на мембрану подавали тестирующие импульсы от электрического стимулятора амплитудой +25 мВ (с плюсом со стороны антибиотика) с частотой 0,15 Гц, задержкой 0,08 с и длительностью 0,16 с. В ответ на приложенное к мембране постоянное поле +50 мВ (плюс со стороны антибиотика) также не наблюдается роста проводимости. И только увеличение потенциала на мембране +75 мВ приводит к слабому нарастанию проводимости. Скорость нарастания проводимости зависит от величины приложенного к мембране электрического потенциала. Введение леворина с одной стороны мембранны в присутствии постоянного электрического поля (-100 мВ со стороны антибиотика) не изменяет проводимости мембран. При обратном направлении поля (+100 мВ со стороны антибиотика) наблюдается резкое увеличение проводимости. При фиксированном значении потенциала на мембране (+200 мВ со стороны антибиотика) можно видеть нарастание тока до некоторого стационарного значения. При обратной полярности (-200 мВ со стороны антибиотика) наблюдается уменьшение тока на мембране. Наличие в молекулах леворина A_2 дополнительной положительно заряженной группировки формирует в мембранах потенциалзависимые ионпроводящие каналы. Сборка левориновых каналов зависит от величины и направления электрического поля. Этот процесс необратим.

Введение леворина A_2 при малых концентрациях в водную среду с одной стороны бислойной мембранны приводит к появлению одиночных каналов. Работа одиночных каналов, формируемых с одной стороны мембранны леворином A_2 , показана на рис. 7.5.3.

Проводимость каждого канала составляет $\sim 0.4\text{--}0.5 \text{ пСм}$. Эта величина соответствует проводимости одиночных левориновых каналов, формируемых в мембранах при симметричном введении антибиотика [Kasumov et al., 1981]. Известно, что левориновые каналы совершают частые переходы между двумя состояниями: открытым и закрытым. Средние времена жизни односторонних левориновых каналов в открытом состоянии сравнимы со средними временами жизни каналов, формируемых леворином с обеих сторон мембранны и составляют 2.7 ± 0.2 с. С увеличением концентрации леворина A_2 с

одной стороны мембранны число формируемых каналов в мемbrane резко возрастает.



Рис. 7.5.3. Запись флюктуаций тока, протекающего через мембрану, при односторонней модификации леворином А₂ при потенциале 100 мВ (+ со стороны антибиотика). Концентрация антибиотика с одной стороны мембранны $5 \cdot 10^{-8}$ М. Водные растворы с обеих сторон мембранны содержат 2М KCl, pH 6.5, t=22°C. Мембранны получали в смеси фосфолипида с холестерином в весовом соотношении 20:1. Стрелкой обозначен уровень проводимости немодифицированной мембранны [Kasutov et al., 1981; Ибрагимова и др., 2006 б].

Мембранны, модифицированные леворином А₂ и его алкильными производными при введении их с одной стороны мембранны обладают катионной селективностью. Структура алкильных производных леворина А₂ показана на рис. 7.5.4 .

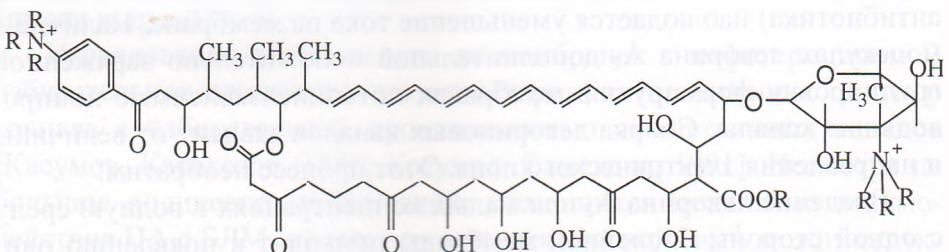
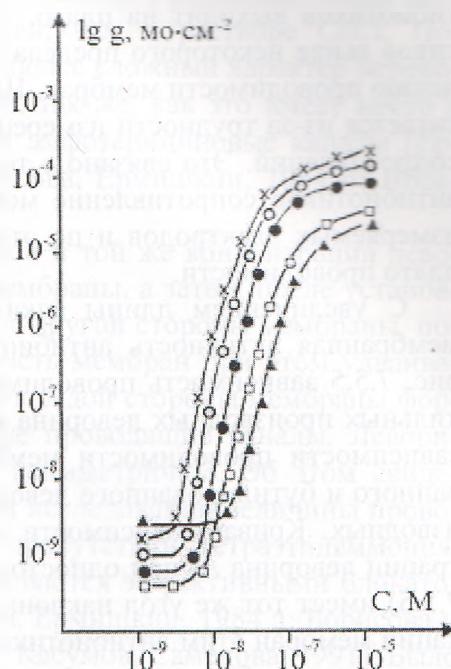


Рис. 7.5.4. Химическая структура алкильных производных леворина А₂. Буквой - R обозначено место, где проводилось алкилирование левориновой молекулы. R-CH₃: метилированный леворин А₂; R-C₂H₅: этилированный леворин А₂; R-C₃H₇: пропилированный леворин А₂; R-C₄H₉ : бутилированный леворин А₂.

Потенциал на десятикратный градиент проникающего иона 100 мМ:10 мМ (100 мМ со стороны антибиотика) составляет +54-58 мВ (знак + находится в свободном от антибиотика растворе). Это означает, что мембранны практически идеально проницаемы для катионов щелочных металлов.

На рис. 7.5.5 показана зависимость проводимости мембран от концентрации исходного леворина A_2 и его алкильных производных при односторонней модификации мембран.

Рис. 7.5.5. Зависимость проводимости липидных мембран от концентрации леворина A_2 и его алкильных производных с одной стороны мембранны. x—исходный леворин A_2 ; o—метилированный леворин A_2 ; -•- этилированный леворин A_2 ; □—пропилированный леворин A_2 ; ▲—бутилированный леворин A_2 . Мембранны формировались из смеси фосфолипид:холестерин 20:1 в водных солевых растворах, содержащих 10^{-1} М KCl при pH 6.5, $t=22^{\circ}\text{C}$. Потенциал на мемbrane 100 мВ (+ со стороны антибиотика) [Ибрагимова и др., 2006 б].



Из рис. 7.5.5 видно, что в отличие от неароматических антибиотиков амфотерицина В и нистатина, в присутствии леворина и его производных наблюдается менее крутая зависимость проводимости мембран от концентрации указанных выше антибиотиков. Алкильная модификация молекулы леворина не приводит к изменению угла наклона кривых, но определяет только время пребывания антибиотика в мембране [Касумов, 1986 а; Касумов и др., 1987; Kasumov, Kurbanov, 2003; Курбанов, Касумов, 2004; Ибрагимова и др., 2006 б]. Модифицируя мембранны алкильными производными с разной длиной углеводородной цепи можно точно контролировать время нахождения антибиотика в мембране. Проведенные эксперименты на липидных мембранах показали, что с увеличением длины алкильной цепи производных леворина время нахождения их в мембране по сравнению с исходным леворином уменьшается [Микаилова, 1990]. Время пребывания антибиотика в мембране определялось по постоянной времени релаксации проводимости мембран после отмычки

антибиотка из окружающего мембрану раствора [Микаилова, 1990; Shvinka, Caffner, 1994, 1995].

Из рис.7.5.5 видно, что с увеличением концентрации антибиотиков проводимость мембран растет и при больших концентрациях антибиотиков выходит на плато. Увеличение концентрации антибиотиков выше некоторого предела не приводит к дальнейшему увеличению проводимости мембран. На кривых рис. 7.5.5 этот предел достигается из-за трудности измерения в наших условиях очень низких сопротивлений. Это связано с тем, что при высоких концентрациях антибиотиков сопротивление мембран сравнимо с сопротивлением измеряемых электродов и по этой причине мы видим образование плато проводимости.

С увеличением длины алкильной цепи молекул леворина A_2 мембранныя активность антибиотиков уменьшается. Как видно из рис. 7.5.5 зависимость проводимости мембран от концентрации алкильных производных леворина A_2 степенная. Угол наклона кривых зависимости проводимости мембран от концентрации пропилированного и бутилированного леворина ниже, чем для других его производных. Кривая зависимости проводимости мембран от концентрации леворина A_2 при односторонней модификации мембран (рис. 7.5.5) имеет тот же угол наклона, что и при симметричной модификации мембран этим антибиотиком [Касумов, Либерман, 1973]. Проводимость мембран при этом растет пропорционально 3-4-ой степени концентрации антибиотика.

Исследования проводимости мембран при одностороннем действии леворина в растворах различных проникающих катионов показали, что проводимость мембран зависит от степени гидратации проникающих ионов, как и в случае симметричной модификации мембран леворином. Ионы лития, обладая меньшим размером кристаллического радиуса в ряду катионов щелочных металлов, гидратируются в значительно большей степени, чем, например, ионы цезия. Вследствие этого, резко уменьшается скорость перемещения ионов Li^+ в канале и это, в свою очередь, обуславливает меньшую проводимость канала в растворах хлористого лития по сравнению с проводимостью леворинового канала в растворах хлористого цезия. Полученные данные при исследовании одностороннего действия леворина показывают, что прохождение ионов Li^+ через левориновые каналы более затруднено, чем ионов Cs^+ . Это позволяет предположить, что односторонний левориновый канал представляет собой канал, заполненный водой [Ибрагимова и др., 2006 б]. Исходя из

этого предположения, следовало ожидать, что в растворе одинаковой молярной концентрацией NaCl проводимость мембран с леворином будет примерно равной проводимости мембран в растворе LiCl. Однако, проводимость мембран с леворином в растворах NaCl оказалась выше проводимости мембран, чем в растворе CsCl. По-видимому, здесь также имеет место более сложный характер переноса ионов через левориновые каналы, так же, как это имеет место в случае транспорта ионов Na^+ через амфотерициновые каналы [Ермишкин, Зильберштейн, 1982; Борисова, Ермишкин, 1984 б; Ибрагимова и др., 2006 б].

Модификация мембран при одной и той же концентрации леворина A_2 сначала с одной стороны мембранны, а затем, после установления стационарной проводимости, с другой стороны мембранны, показывает, что суммарная проводимость мембран при этом удваивается. Эти данные показывают, что с каждой стороны мембранны формируются независимые левориновые проводящие каналы. Левориновые каналы по своей структуре асимметричны. Об этом свидетельствуют данные, полученные при исследовании величины проводимости левориновых каналов в присутствии тетраэтиламмония. Тетраметил- и тетраэтиламмоний являются эффективными блокаторами полиеновых каналов [Борисова, Ермишкин, 1984 а; Борисова и др., 1978; Касумов, Каракозов, 1985; Касумов, Самедова, 1991]. Было показано, что левориновые каналы блокируются тетраэтиламмонием при концентрации $3 \cdot 10^{-3}$ М только с той стороны мембранны, где находятся полярные группы молекул леворина A_2 [Ибрагимова и др., 2006].

При односторонней модификации бислойных мембран леворином A_2 при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М и при мембранным потенциале +100 мВ (плюс со стороны антибиотика) наблюдается резкий рост проводимости с выходом спустя 15 мин на стационарный уровень. После достижения стационарной проводимости мембраны была исследована проницаемость левориновых каналов для моносахаров и других нейтральных молекул.

Транспорт неэлектролитов через левориновые каналы определялся осмотическим методом [Никольский, Трошин, 1973; Зенин, 1979]. Объем раствора во внутренней ячейке был 0,3 мл, а объем наружного раствора составлял 1 мл. С наружной стороны мембранны вводился соответствующий неэлектролит в сравнительно высокой концентрации, так, чтобы осмотическое давление (тоничность) раствора возросло по сравнению с осмотическим давлением с противово-

положной стороны мембранны. Если исследуемый неэлектролит проникает во внутренний отсек, то по мере его перехода осмотическое давление по обе стороны мембранны будет выравниваться. Вода начнет входить во внутренний отсек, выравнивая химические потенциалы воды в разных отделениях системы. По скорости выравнивания химических потенциалов воды в разных отделениях системы можно судить о скорости поступления исследуемого неэлектролита во внутренний отсек мембранны. Коэффициент проницаемости для данного вещества определялся из уравнения $P_d = D/d$, где D – коэффициент диффузии проникающего вещества, d – толщина мембранны ($\sim 50 \text{ \AA}$) [Ермишкян, Зильберштейн, 1982]. Коэффициент диффузии молекул в непрерывной водной среде отличается от значения коэффициента диффузии в мембране [Trouble, 1971]. Так, коэффициент диффузии в воде для молекул с молекулярным весом от 18 до 122 изменяется от $2 \cdot 10^{-5}$ до $8 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, а коэффициент диффузии соединений с указанным выше молекулярным весом через плазматическую мембрану составляет $2 \cdot 10^{-10}$ до $8 \cdot 10^{-11} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ [Борисова, Ермишкян, 1984 а, б].

В результате проведенных экспериментов было обнаружено увеличение проводимости мембранны для моносахаров и других нейтральных молекул. В таблице 7.5.1 приведены значения коэффициента проницаемости липидных мембранны для различных неэлектролитов в присутствии леворина А₂ с одной стороны мембранны. Из таблицы 7.5.1 следует, что проницаемость мембранны, модифицированных леворином, увеличивается для нейтральных молекул в порядке возрастания кристаллического радиуса молекул, образуя ряд проницаемости: вода > мочевина > ацетамид > глицерин > рибоза > арабиноза > глюкоза > сахароза. Исследования проницаемости мембранны для органических соединений показывают, что левориновый канал имеет эффективный радиус $\sim 4 \text{ \AA}$. Эти данные согласуются с данными по определению диаметра леворинового канала, встроенного в эритроцитарные мембранны [Ел-Суфи. 1992].

Изучение избирательной проницаемости полиеновых каналов для ионов и органических соединений является важным аспектом проводимых исследований. Некоторые авторы полагают, что система, регулирующая избирательную проницаемость мембранны, находится у входа в канал на полярной аминной и карбоксильной группе молекулы полиенов [Cybulska et al., 1995; Brajtburg, Bolard, 1996]. Другие авторы считают, что система, регулирующая избирательную проницаемость, находится внутри гидрофильной части канала

Таблица 7.5.1.

Коэффициент проницаемости (P_d) липидных мембран для неэлектролитов в зависимости от кристаллического радиуса молекул при введении леворина A_2 с одной стороны мембраны
[Ибрагимова и др., 2006 б]

Неэлектролиты	Радиус молекул, Å	Число мембран	Леворин A_2 (M)=0 $P_d, \text{см}^{-1} \cdot 10^{-4}$	Леворин A_2 (M)=1·10 ⁻⁵ $P_d, \text{см}^{-1} \cdot 10^{-4}$
H ₂ O	1,2	10	9,5±2,1	16,7±2,2
Мочевина	1,8	10	0,07	11,2±0,7
Ацетамид	2,5	11	0,96±0,14	6,64±1,34
Глицерин	3,1	12	0,08	4,36±1,03
Рибоза	3,6	10	0,08	1,42±0,12
Арабиноза	3,8	9	0,08	1,38±0,11
Глюкоза	4,2	12	0,08	1,23±0,04
Сахароза	5,2	11	0,08	0,08±0,02

[Kasumov et al., 1981; Mazerski et al., 1995]. Исходя из химической структуры леворина, в составе которой содержатся две положительно заряженные функциональные группы (по одной на обоих концах молекулы - рис. 7.5.4), можно было бы предположить, что мембранны, модифицированные леворином, должны обладать анионной селективностью. Однако, каждый раз в экспериментах наблюдалась практически идеальная проницаемость для катионов щелочных металлов. На основе результатов собственных исследований было высказано предположение, что ионная избирательность мембран в присутствии ПА зависит от структуры молекулярных групп, выстилающих внутреннюю гидрофильную полость канала. Было установлено, что с увеличением числа карбонильных групп в гидрофильной цепи полиеновых молекул проницаемость канала меняется с анионной на катионную [Kasumov et al., 1981; Ермишkin, Зильберштейн, 1982]. Идеальная катионная проницаемость мембран наблюдается в присутствии леворина A_2 . Эксперименты, проведенные с модифицированными по аминной и карбоксильной группам алкильными производными леворина A_2 , показали, что подобные модификации не влияют на избирательную проницаемость мембран. Поэтому можно предположить, что система, регулирующая избирательную проницаемость, находится в гидрофильной части молекул ПА.

Действие ПА на липидные мембранны имеет ряд особенностей. Так, амфотерицин В, нистатин и микогептин эффективно увеличи-

вают проводимость БЛМ для одновалентных анионов [Cass et al., 1970; Касумов и др., 1971 а; Касумов, Либерман, 1972; Борисова и др., 1978; Касумов, Микаилова, 1988]. Однако амфотерицин В и нистатин эффективно увеличивают проницаемость мембран эритроцитов, лимфоцитов, тимоцитов и мышечных клеток не для анионов, а для катионов щелочных металлов [Cybulska et al., 1995; Cass, Dalmark, 1987; Mazerki et al., 1986; Ел-Суфи, 1992; Швінка, Каффнер, 1989, 1991; Shvinka, Caffner, 1994, 1995; Shvinka, 2001; Henry-Toulme et al., 1989 b, c; Hartsel et al., 1994]. В отличие от амфотерицина В и нистатина, при действии леворина А₂ на липидные и клеточные мембранны в обоих случаях наблюдается усиление потока только для катионов [Cybulska et al., 1995; Ел-Суфи, 1992; Shvinka, Caffner, 1994, 1995; Shvinka, 2001]. Для расшифровки молекулярной природы селективного транспорта ионов и органических соединений через полиеновые каналы требуется синтез новых молекул с измененной химической структурой молекул. Так, например, было показано, что в присутствии положительно заряженного производного амфотерицина В 3-диметиламинопропиламида усиливается проницаемость мембранны для олигонуклеотидов [Garcia-Chaumont et al., 2000 а, б]. Биологический синтез и химическая трансформация молекул ПА - реальный путь получения новых производных ПА с новыми физико-химическими свойствами [Zotchev, 2003; Volpon, Lancelin, 2002; Aparicio et al., 2003].

Данные зависимости проводимости мембранны от концентрации леворина А₂ при односторонней и симметричной модификации мембранны показывают, что наклон кривых имеет одинаковый порядок [Касумов, Либерман, 1973; Ибрагимова и др., 2006 б]. Одинаковый наклон кривых зависимости проводимости БЛМ от концентрации леворина А₂ и одинаковая селективность мембранны при одно- и двусторонней модификации мембранны леворином показывают, что проводящей единицей является канал, асимметричный по своей структуре, который способен шунтировать мембранны. Одинаковая проводимость одиночных каналов, а также одинаковая селективность каналов, образующиеся при одно- и двухстороннем введении леворина А₂ позволяют предположить, что стехиометрия леворинового канала одинакова.

На основании этих данных и проведенных собственных исследований была построена качественная молекулярная гипотетическая модель формирования в мембране леворинового канала, приведенная на рис. 7.5.6.

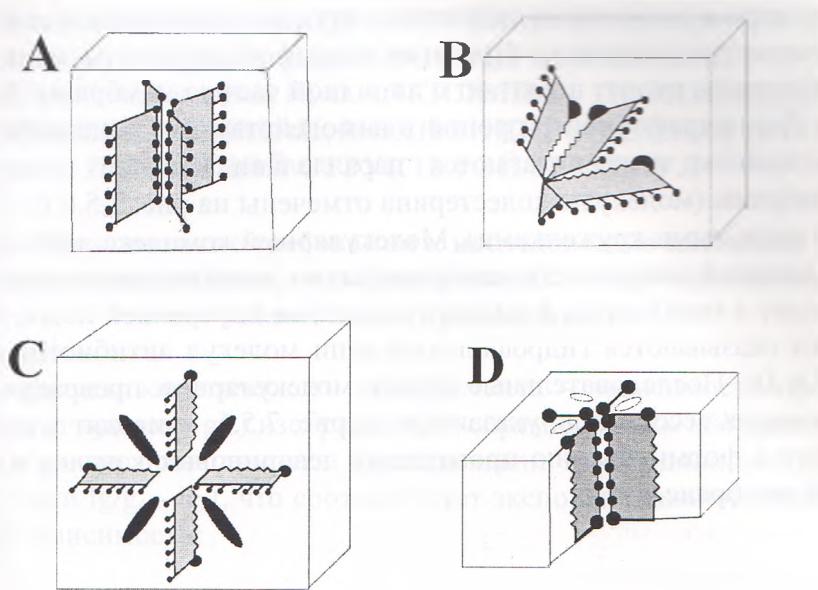


Рис. 7.5.6. Гипотетическая молекулярная модель формирования леворинового канала (пояснение в тексте) [Ибрагимова и др., 2006 б].

Как следует из рис. 7.5.6, левориновый канал представляет собой олигомерную структуру, которая состоит из нескольких, чередующихся между собой молекул антибиотика и молекул холестерина. Молекулы антибиотиков в водной фазе стремятся занять энергетически выгодное положение и, взаимодействуя гидрофобными цепями между собой, образуют комплексы с минимумом свободной энергии [Ахмедли и др., 1982, 1985]. Подобное рассуждение основано на том, что молекулы ПА в водных растворах могут существовать в ассоциированной форме и в такой форме могут встраиваться в мембрану [Legrand et al., 1992, 1996; Mazerski, Borowski, 1996; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006]. Встраивание молекулярного комплекса в мембрану может происходить только при условии “выворачивания” молекул антибиотиков по отношению к плоскости мембранны. Ассоциаты молекул антибиотиков формируются таким образом, что гидрофильные цепи антибиотиков обращаются в водную фазу, а гидрофобные цепи разворачиваются внутрь молекулярного комплекса (рис. 7.5.6 А). Собранный, согласно рис. 7.5.6 А, молекулярный комплекс из водного раствора диффундирует к мембране и при взаимодействии с ней постепенно выворачивается (рис. 7.5.6 В), стремясь занять энергетически выгодное положение. В липидной фа-

зе в термодинамически выгодной ситуации оказываются ассоциаты, вывернутые наизнанку. При этом гидрофобные хвосты молекул антибиотиков входят в контакт с липидной частью мембранны. Молекулы ПА гидрофобной стороной взаимодействуют с рецептором - холестерином и располагаются параллельно плоской поверхности мембранны (молекулы холестерина отмечены на рис. 7.5.6 С - темными овальными кружочками). Молекулярный комплекс, находящийся на плоской поверхности мембранны вновь выворачивается наизнанку, входит в мембрану и формирует канал, во внутренней полости которого оказываются гидрофильные цепи молекул антибиотиков (рис. 7.5.6 D). Последовательные стадии молекулярных превращений полиеновых ассоциатов, указанные на рис. 7.5.6, приводят в конечном итоге к формированию проводящих левориновых каналов в липидной мемbrane.

ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПРОВОДИМОСТИ БИСЛОЙНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ АМФОТЕРИЦИНА В И ЕГО АЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ. СВОЙСТВА МЕМБРАН, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПА С РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ МОЛЕКУЛ

8.1. Методические требования к исследованию кинетики проводимости мембран, модифицированных амфотерицином В и его алкильными производными.

Результаты кинетического эксперимента – зависимость проводимости от времени $g(t)$ изображали в «спрямляющих» координатах. Участок роста проводимости перестраивали в координатах $\lg(1 - g/g_s) - t$ или $\lg g_s - \lg t$, что соответствует экспоненциальной или степенной зависимости:

$$g(t) = g_s (1 - e^{-kt}) \quad (8.1.1)$$

или

$$g(t) = \alpha \cdot t^n \quad (8.1.2)$$

Участки убывания проводимости изображали в координатах $\lg g/g_m - t$, что соответствует зависимости:

$$g(t) = g_m \cdot e^{-kt} \quad (8.1.3)$$

По полученным таким образом прямолинейным графикам определяли константы скорости, показатель степени и, соответственно этому, тангенсы угла наклона прямых. Постоянные времена определяли как $\tau = 1/k$. Температурные зависимости проводимости или константы скорости изображали в координатах Аррениуса $\lg g - 1/T$. Энергию активации вычисляли как тангенс угла наклона полученной прямой.

Для повышения точности все точки в кинетических и температурных экспериментах получали на одной и той же мемbrane.

Для уменьшения собственного шума и емкости мембранны работали с мембранны малой площади. Время до первого включения канала составляет 5-20 мин. По записи одиночного канала строили эмпирическую интегральную функцию распределения его времени жизни. Для выборки объема n (число переходов канала) определяли число K классовых интервалов по правилу Старджеса и их ширину:

$$K = 1 + [3,3 \lg n] \\ \Delta = (T_{\max} - T_{\min}) / K \quad (8.1.4)$$

где T_{\max} , T_{\min} – наибольшее и наименьшее время жизни канала в данной выборке. После этого подсчитывали число переходов (n_p) канала с длительностью $T_{\min} \leq \tau \leq T_{\min} + p\Delta$ ($p=1,k$) и находили эмпирическую интегральную функцию распределения:

$$F(\tau) = \frac{n_p}{n}, \tau = T_{\min} + (p-1/2) \Delta \quad (8.1.5)$$

Обрабатывали выборки объемом 50-200, что соответствует 7-9 точкам (классовым интервалам). График $F(\tau)$ строили в координатах $\lg(1-F) - \tau$. Если время жизни данного состояния канала распределено экспоненциально, то график спрямляется. Изображенные на графиках прямые проводили по методу наименьших квадратов и вычисляли средне-квадратичное отклонение [Терентьев, Ростова, 1977]. Среднее время жизни состояния определяли как котангенс угла наклона прямой. При построении графика последние точки отбрасывали.

Спектральный анализ флюктуаций проводимости БЛМ в присутствии амфотерицина В и его алкильных производных выполняли на спектроанализаторе, созданном в Ленинградском институте ядерной физики в лаборатории, руководимой д.ф.м.н., проф. Безруковым С.М. Спектр снимали в частотном диапазоне 3-3000 Гц, время накопления сигнала 1 минута. Метод измерений подробно описан в предыдущей главе (7). Измеряли шум, избыточный над равновесным, в единицах равновесного шума (ε). Для этого дополнительно записывали спектр при нулевом напряжении на мемbrane.

Измерение безразмерной величины ε целесообразно потому, что она не зависит от площади мембранны и концентрации каналообразующего вещества, а также позволяет судить о надежности отделения неравновесного шума от равновесного.

Были исследованы спектры на различных участках кинетики проводимости. Спектр равновесного шума снимали в отдельных экспериментах, где вместо мембранны брали эквивалентное сопротивление, равное среднему сопротивлению мембранны на исследуемом участке кинетики проводимости. Характерное время кинетики равно $\sim 10^2$ с, а характерное время переходов между открытым и закрытым состояниями, которые в основном определяют шум в исследо-

дуемом частотном диапазоне, равно $\sim 0,1$ с. Это означает, что условия измерения спектров при стационарной проводимости практически такие же, как и до ее достижения. Обработку спектров выполняли следующим образом. Пусть средние времена жизни в открытом и закрытом состоянии равны соответственно τ_0 , τ_3 . Тогда:

$$\mathcal{E}(\omega) = \frac{A}{\omega} + \frac{v^2 gc}{KT} \cdot \frac{\tau^2}{\tau_0 + \tau_3} \cdot \frac{1}{1 + \omega^2 \tau^2}, \quad \tau = \frac{\tau_0 \tau_3}{\tau_0 + \tau_3} \quad (8.1.6)$$

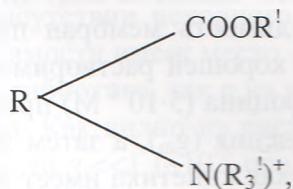
Компонента $1/\omega$ обычно присутствует в шуме канальной проводимости. Если $(\omega\tau)^2 \gg 1$, то

$$\mathcal{E}(\omega) = \frac{A}{\omega} + \frac{v^2 gc}{KT} \cdot \frac{1}{\tau_0 + \tau_3} \cdot \frac{1}{\omega^2} \quad (8.1.7)$$

Отсюда видно, что спектр шума спрямляется в координатах $\omega^2 \varepsilon - \omega$. Прямую проводили по методу наименьших квадратов и определяли сумму $\tau_0 + \tau_3$.

8.2. Исследование кинетики проводимости бислойных мембран в присутствии амфотерицина В и его алкильных производных

Как было показано в главе (7), химическая модификация молекул ПА приводит к изменению их эффекта на БЛМ. С целью дальнейшего изучения взаимосвязи структуры молекул полиенов и их функций в мембранах был исследован ряд алкильных производных амфотерицина В со следующей структурой:



где R – соответствует лактонному кольцу, а R'-алкил: CH₃ - метамфоцин, C₂H₅ - этамфоцин, C₃H₇ - пропамфоцин, C₄H₉ - бутамфоцин.

Интегральная проводимость мембран, индуцируемая ПА, пропорциональна числу проводящих каналов в данный момент времени. Кинетика проводимости мембран в присутствии исходного нистати-

на и амфотерицина В характеризуется монотонным ростом с выходом на стационарный уровень проводимости [Касумов, Либерман, 1972; Малафриев, 1985, 1986]. Время достижения стационарной проводимости в зависимости от условий эксперимента составляет от десятков минут до 2-3 ч [Cass et al., 1970; Касумов, Либерман, 1972].

Изучена кинетика проводимости липидных мембран в присутствии алкильных производных амфотерицина В, структура которых показана на рис. 8.2.1. При исследовании кинетики проводимости в присутствии алкильных производных амфотерицина В обнаружена немонотонная кинетика, рис. 8.2.2 [Касумов, Малафриев, 1982 а; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006].

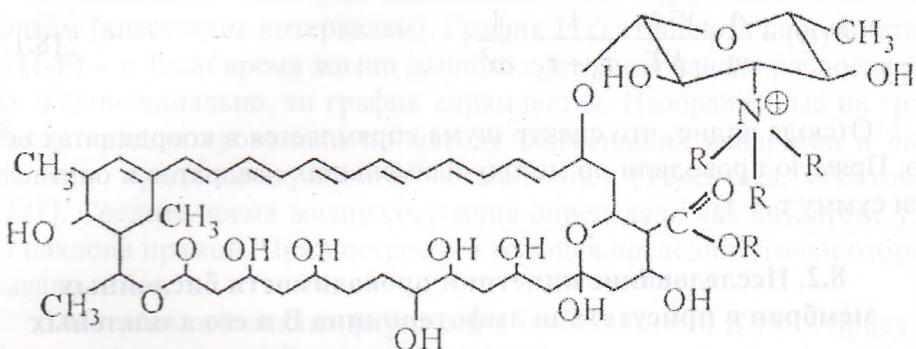
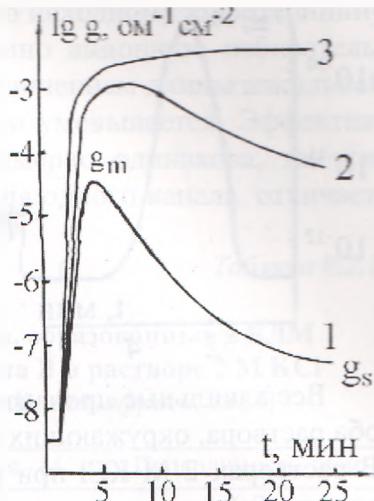


Рис. 8.2.1. Химическая структура амфотерицина В. Буквой R обозначено место, где производилось алкилирование молекулы по аминной и карбоксильной группам.

Детально изучен механизм инактивации проводимости на одном из алкильных производных амфотерицина В – метамфоцине. Метамфоцин отличается от других аналогов тем, что он способен эффективно увеличивать проводимость мембран при одностороннем введении его к мембранам и хорошей растворимостью в воде. При малых концентрациях метамфоцина ($5 \cdot 10^{-8}$ М) проводимость быстро достигает максимального значения (g_m), а затем инактивируется до стационарного уровня (g_s). Такая кинетика имеет место как в случае выдержанной мембранны с последующим введением антибиотика, так и в случае мембранны, формируемой в растворе антибиотика, рис. 8.2.2, кривые 1 и 2.

В присутствии аналога амфотерицина В, метилированного по полярным группам (метамфоцина), наблюдаются два типа кинетики проводимости: монотонный и немонотонный. Немонотонная кинетика

Рис. 8.2.2. Кинетика проводимости БЛМ в зависимости от концентрации метамфоцина. Кривая 1 получена при концентрации метамфоцина – 50 нМ; 2 – 200 нМ; 3 – 300 нМ. Мембранные формировались из смеси фосфолипида с холестерином в весовом соотношении 2:1. Состав водного раствора: 10 мМ KCl, pH 6,0; t=23°C. Потенциал на мембране 100 мВ. Обозначения: g_m – максимальная, g_s – стационарная проводимость [Касумов, Малафриев, 1982 а].



характеризуется быстрым ростом проводимости до максимума (g_m) с последующим спадом до стационарного значения (g_s) в течение десятков минут. Форма кинетической кривой проводимости характеризуется безразмерным параметром

$$\gamma_s = g_s / g_m \quad (8.2.1)$$

Чем сильнее выражен максимум, тем меньше γ_s . Повышение концентрации метамфоцина приводит при прочих фиксированных условиях к росту γ_s . Отношение $\gamma_s = g_s/g_m$ с повышением концентрации метамфоцина растет. Существует такая критическая концентрация C_k , по достижении которой выполняется равенство $\gamma_s=1$, т.е. кинетика становится монотонной, рис. 8.2.2, кривая 3. Это значит, что максимум вырождается, а кинетика проводимости становится монотонной, как в присутствии исходного амфотерицина В. Описанное поведение проводимости имеет место как на выдержанной мембране после введения антибиотика, так и на мембране, формируемой в растворе антибиотика. Как видно из рисунка 8.2.2, если концентрация антибиотика мала, то $\gamma_s < 1$ (~10⁻³ при 50 нМ). 4-5 кратное увеличение концентрации антибиотика (до 250 нМ) приводит к вырождению максимума. Значение C_k зависит от состава мембраны, концентрации соли, pH и температуры. Точно подбирая концентрацию антибиотика, можно получить стационарную проводимость на уровне одного канала, рис. 8.2.3.

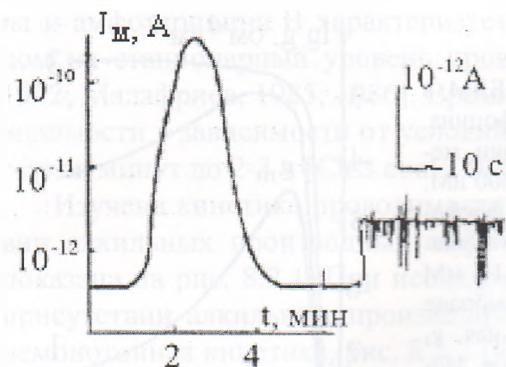


Рис. 8.2.3. Инактивация проводимости БЛМ до 1 канала. Концентрация метамфоцина в растворе 25 нМ. Напряжение на мемbrane 200 мВ. Мембранны формировались из смеси фосфолипида с холестерином в весовом соотношении 2:1. Состав водного раствора: 2 М KCl, pH 6,0; $t=23^{\circ}\text{C}$ [Малафриев, 1985].

Все алкильные производные амфотерицина В при введении их в оба раствора, окружающих мембрану, увеличивали ее проводимость. В растворах 2 М KCl при потенциале 200 мВ малые концентрации алкильных производных амфотерицина В (см. табл. 8.2.1) вызывают появление дискретных уровней проводимости БЛМ, обусловленных функционированием одиночных ионных каналов, рис. 8.2.4.

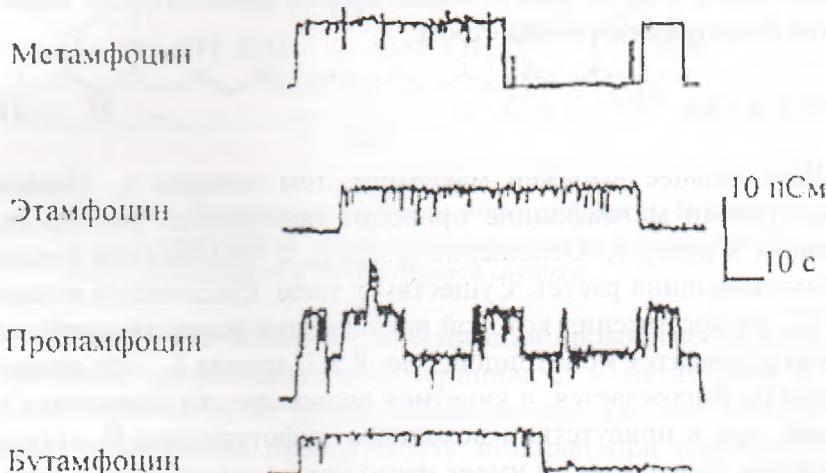


Рис. 8.2.4. Запись работы одиночных каналов, образованных алкильными аналогами амфотерицина В [Малафриев, 1985; Ibragimova et al., 2006].

Проводимость каждого канала при прочих фиксированных условиях постоянна, а потому полная проводимость мембраны, в которой функционирует много каналов, пропорциональна их числу [Ermishkin et al., 1977]. Кинетика проводимости мембран – это фактически кинетика накопления проводящих каналов.

Все изученные производные, подобно исходному амфотерицину В, создают в мембранах преимущественно анионную избирательность [Kasumov, Malafriev, 1984 b]. С увеличением длины алкильной цепи проводимость канала незначительно уменьшается. Эффективность исследованных антибиотиков примерно одинакова, так как концентрация, необходимая для получения одного канала, отличается всего лишь вдвое (табл.8.2.1).

Таблица 8.2.1.

**Некоторые свойства ионных каналов, образованных в БЛМ
алкильными аналогами амфотерицина В в растворе 2 М KCl
при мембранным потенциале 200 мВ [Малафриев, 1985]**

Антибиотик	Концентрация, М	Проводимость, пСм
Метамфоцин (C_H_3)	$2 \cdot 10^{-8}$	6-7
Этамфоцин (C_2H_5)	$2 \cdot 10^{-8}$	5
Пропамфоцин (C_3H_7)	$2 \cdot 10^{-8}$	5
Бутамфоцин (C_4H_9)	$(3-4) \cdot 10^{-8}$	4,5

Резюмируя данные, полученные на производных амфотерицина В, следует отметить, что полярные группы в молекулах полиенов влияют только на временные параметры ионного канала, но не оказывают действия на избирательность и проводимость одиночного канала.

Инактивация проводимости мембран в присутствии метамфоцина может быть обусловлена следующими причинами: 1) в момент накопления каналов в мембране может меняться стехиометрия канала, отчего его проводимость уменьшается; 2) за время увеличения проводимости мембранны могут изменяться временные параметры канала, что приводит к уменьшению вероятности его пребывания в проводящем состоянии; 3) и наконец, может уменьшаться общее число проводящих каналов в мембране.

Исследование концентрационных зависимостей максимальной g_m и стационарной g_s проводимости (рис. 8.2.5) показало, что это – степенные функции с показателем степени 10-11. При высоких концентрациях антибиотика кривые сливаются. Наиболее сильно максимум выражен при промежуточных концентрациях. Слияние кривых при малых концентрациях обусловлено исчезновением мембранныго эффекта антибиотика.

«Послеинактивационные» каналы имеют ту же проводимость, что и каналы, полученные обычным способом. Однаковый наклон концентрационных кривых g_m и g_s говорит о том, что на максимуме и

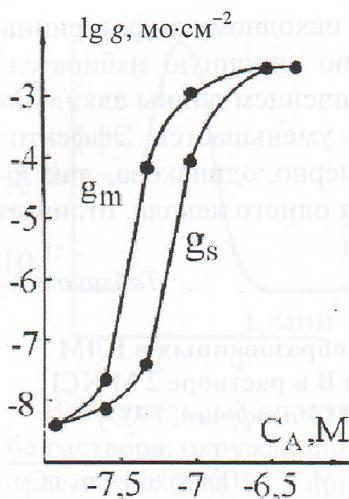
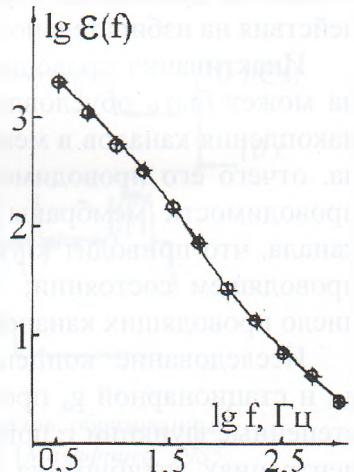


Рис. 8.2.5. Концентрационная зависимость максимальной и стационарной проводимости мембран в присутствии метамфоцина. Мембранны формировались из смеси фосфолипида с холестерином в весовом соотношении 2:1. Состав водного раствора: 10 mM KCl, pH 6,0; t=23°C. Потенциал на мемbrane 100 мВ. Обозначения: g_m - максимальная, g_s - стационарная проводимость [Малафриев, 1985].

на стационаре каналы имеют одинаковую стехиометрию. Если спад проводимости обусловлен изменением временных параметров и проводимости канала, это должно было привести к различию спектров флуктуаций проводимости на различных участках кинетики. Однако формы спектров, снятых на различных участках кинетики, с высокой точностью совпадают, как показано на рис. 8.2.6.

Рис. 8.2.6. Спектр флуктуаций проводимости БЛМ при симметричном действии метамфоцина (50 нМ). Мембранны формировались из смеси фосфолипида с холестерином в весовом соотношении 2:1. Состав водного раствора: 2M KCl, pH 3,0; t=23°C. о – участок стационарной проводимости, + – участок вблизи максимума [Малафриев, 1985].



Остается предположить, что немонотонная кинетика проводимости обусловлена уменьшением количества проводящих каналов в мембране.

Экспериментально наблюдаемый тип кинетики зависит, кроме концентрации антибиотика, от следующих дополнительных факторов:

1. Содержания холестерина в мембране. Его повышение снижает величину C_k .

2. Вида стерина. Замена в составе мембраны холестерина на эргостерин приводит к существованию только монотонной кинетики при всех концентрациях антибиотика. Эргостеринсодержащие мембранны намного чувствительнее к антибиотику, чем холестеринсодержащие (рис. 8.2.7).

3. Ионной силы солевого раствора. Ее повышение снижает величину C_k .

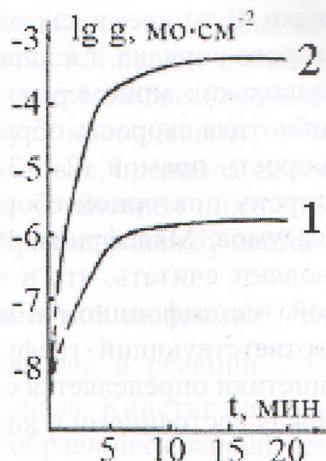


Рис. 8.2.7. Кинетика проводимости БЛМ в присутствии 300 нМ метамфоцина. Мембранны формировались из смеси фосфолипида с холестерином в весовом соотношении 20:1 (кривая 1) и из смеси фосфолипида с эргостерином в весовом соотношении 20:1 (кривая 2). Состав водного раствора: 10 мМ KCl, pH 6,0; t=23°C. Потенциал на мембране 100 мВ [Малафриев, 1985].

Описанные свойства кинетики имеют место и для других алкильных аналогов амфотерицина В.

8.3. Граф состояний ионного канала. Механизм немонотонной кинетики проводимости мембран

Немонотонная кинетика наблюдается также и на исходном амфотерицине В при повышенной температуре [Касумов, Малафриев, 1982 а, б]. Наблюдаемое в экспериментах немонотонное изменение проводимости мембран связано, по-видимому, с молекулярным превращением канального комплекса за время его существования в мембране. Нарастание проводимости обусловлено сборкой каналов до проводящего состояния, а ее инактивация распадом проводящего комплекса до непроводящих мономерных единиц антибиотиков и дефектных структур в мембране. В рамках этих предположений дефектная структура представляет собой канальный комплекс, потерявший один или несколько молекул антибиотика. Немонотонная

кинетика может быть объяснена в модели канала с тремя состояниями: одно проводящее, которое располагается между двумя непроводящими [Ермишкин, 1976; Касумов, Малафриев, 1982 а, 1984; Малафриев, 1985, 1986]. Схематическое изображение графа состояний метамфоцинового канала показано на рис. 8.3.1. Непроводящее состояние 1 предшествует уже собранным, но непроводящим полупорам. Состояние 2 соответствует проводящему каналу (когда две полупоры взаимодействуют между собой), а состояние 3 соответствует разобранному каналу (канал разбирается на мономеры и дефектные структуры). Переход канала из 2 в 3 является реакцией первого порядка. В то время как обратный переход есть реакция не менее чем второго порядка, т.к. для повторной сборки канала требуется встреча нескольких мономеров. Поэтому, с увеличением концентрации антибиотика скорость обратной реакции 3 в 2 будет расти быстрее, чем скорость прямой (2 в 3). Это приводит к смещению равновесия в сторону повторной сборки и фактическому запиранию состояния 3 [Касумов, Малафриев, 1982 а]. Изложенные выше результаты позволяют считать, что в основе немонотонной кинетики, индуцируемой метамфоцином и амфотерицином В, лежит единый механизм, соответствующий графу с тремя состояниями. Наблюдаемый тип кинетики определяется соотношением констант скоростей переходов между состояниями и концентрацией антибиотика.

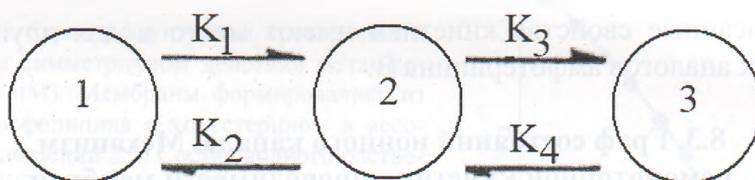


Рис. 8.3.1. Граф состояний ионного канала. 1 - предшественник канала; 2 – проводящий канал; 3 – разобранный канал. К – константы скоростей переходов между состояниями канала [Касумов, 1986 а].

Разобранное состояние можно считать новым – четвертым состоянием, свойственным широкому классу ПА (см. разд. 9.3). [Ибрагимова и др., 2003; Kasumov, Bolard, 2004; Ibragimova et al., 2006].

Взаимосвязь кинетики проводимости со свойствами ионного канала рассмотрена Ермишкиным на примере натриевого канала [Ермишкин, 1976]. Оказалось, что немонотонная кинетика может быть реализована для канала с одним проводящим состоянием, окружен-

ного двумя непроводящими. В химической кинетике известна реакция последовательного превращения вещества, для которой имеет место немонотонная зависимость концентрации промежуточного продукта от времени [Варфоломеев, Березин, 1979; Эмануэль, Кнорре, 1969].

Немонотонная кинетика проводимости мембран может быть объяснена следующим образом: после введения антибиотика к мембране на первом этапе наблюдается процесс сборки ионных каналов до проводящего состояния, а на втором этапе наблюдается переход функционирующих в мембране канальных комплексов в непроводящее состояние. Естественно считать, что экспериментально наблюдаемый тип кинетики зависит от констант скоростей переходов между состояниями канала. Непроводящее состояние 1 назовем предшественником канала. Состояние 2 соответствует проводящему, собранному каналу. Непроводящее состояние 3 – новое, предполагаемое состояние, физический смысл которого будет установлен ниже. Величины k_1, k_2, k_3, k_4 – константы скоростей переходов между состояниями канала.

Рассмотрим поведение кинетики проводимости в зависимости от констант скоростей. Если $k_4 \rightarrow \text{OO}$, то равновесие в реакции $2 \rightleftharpoons 3$ смещено в сторону проводящего состояния канала. Кинетика в этом случае монотонна. Если же $k_4 \rightarrow O$, то все собравшиеся каналы со временем перейдут в непроводящее состояние 3, стационарная проводимость равна нулю, и кинетика проводимости в этом случае будет немонотонна. В общем случае зависимость типа кинетики от констант скоростей переходов между состояниями канала может быть изучена с помощью математической модели канала, которая приводится в работах Касумова и Малафриева [Касумов, Малафриев, 1984 а; Малафриев, 1985, 1986].

Какова возможная природа непроводящего состояния 3? Согласно молекулярной модели, ионный канал состоит из двух полупор, собранных по разные стороны мембранны и сшитых между собой водородными связями [Andreoli, 1973]. В каждой полупоре молекулы антибиотика и стерина чередуются, а стабилизация полупор осуществляется за счет электростатического взаимодействия карбоксильной и аминогруппы соседних молекул антибиотика. Амфотерицин В имеет заряды разного знака на полярных группах, поэтому стабильность амфотерицинового канала велика. Это проявляется в большом времени жизни активного состояния канала. Метамфоцин имеет

только положительный заряд на аминогруппе, что снижает стабильность образованного им канала. Предполагается, что канал может терять один или несколько мономеров антибиотика. При потере мономеров канал может перейти в новое непроводящее состояние [Малафриев, 1985, 1986; Ибрагимова и др., 2003; Kasumov, Bolard, 2004; Ibragimova et al., 2006]. Назовем новое непроводящее состояние разобранным состоянием канала. В рамках такого предположения о природе состояния 3 зависимость типа кинетики от концентрации антибиотика можно легко объяснить. Действительно, скорость повторной сборки ($3 \rightarrow 2$) растет с концентрацией антибиотика быстрее, чем скорость разборки ($2 \rightarrow 3$), так как эти реакции имеют порядок не менее чем второй ($3 \rightarrow 2$) и первый ($2 \rightarrow 3$). В таком случае равновесие смещается в сторону собранного, проводящего состояния канала, и кинетика проводимости мембран становится монотонной.

Критерий максимума проводимости. Соотношение констант скоростей переходов между состояниями канала определяет тип кинетики проводимости.

Обозначим концентрацию состояний 1, 2, 3 соответственно A, B, C. Предположим, что в начальный момент имеются только предшественники канала в концентрации A_0 . Тогда условие сохранения полной концентрации состояний запишется в виде:

$$A + B + C = A_0 \quad (8.3.1)$$

Для С и В согласно графу состояний получаются дифференциальные уравнения:

$$\begin{aligned} \dot{B} &= - (k_2 + k_3) B + k_4 C + k_1 A \\ \dot{C} &= k_3 B - k_4 C \end{aligned} \quad (8.3.2)$$

Решая систему (8.3.2) с учетом условия сохранения (8.3.1), получим зависимость концентрации проводящего состояния (или проводимости) от времени

$$g(t) = g_1 e^{P_1 t} + g_2 e^{P_2 t} + g_s$$

где g_1, g_2 - постоянные интегрирования, определяемые из начальных условий, а P_1, P_2 - корни характеристического уравнения системы (8.3.2):

$$P^2 + (k_1 + k_2 + k_3 + k_4) P + k_1 k_3 + k_1 k_4 + k_2 k_4 = 0$$

g_s – стационарная концентрация:

$$g_s = \frac{k_1 k_4 A_0}{k_1 k_3 + k_1 k_4 + k_2 k_4}$$

Вычисляя постоянные интегрирования, получим:

$$g_1 = \frac{-k_1 A_0}{p_2 - p_1} (1 + P_2 T), \quad g_2 = \frac{k_1 A_0}{p_2 - p_1} (1 + P_1 T),$$

$$T = \frac{k_4}{k_1 k_3 + k_1 k_4 + k_2 k_4}$$

Наличие максимума у этой функции соответствует немонотонной кинетике. Точку максимума находим из условия обращения в 0 производной:

$$\dot{g}(t_m) = p_1 g_1 e^{p_1 t_m} + p_2 g_2 e^{p_2 t_m} = 0$$

откуда

$$t_m = \frac{1}{p_1 - p_2} \ln\left(-\frac{p_2 g_2}{p_1 g_1}\right) \quad (8.3.3)$$

Но, очевидно, t_m должно быть положительным. Тогда из уравнения 8.3.3 следует, что максимум существует при выполнении условий

$$p_1 - p_2 > 0, \quad -\frac{p_2 g_2}{p_1 g_1} > 1 \quad (8.3.4)$$

Исследование этого неравенства дает следующий критерий максимума:

$$k_1 > k_4 \quad (8.3.5)$$

При $k_4 > k_1$ максимума нет, и кинетика монотонна в согласии с качественными рассмотрениями предыдущего раздела.

Активационная ветвь кинетики проводимости. Кинетические кривые (рис. 8.2.3) содержат два участка. На первом из них, который назовем активационной ветвью кинетики, проводимость растет. На втором участке – инактивационной ветви проводимость убывает. Как предполагается, на активационной ветви происходит сборка ионных

каналов до проводящего состояния. Детали этого процесса неизвестны, но он должен включать связывание антибиотика с мембраной, образование полупор по разные стороны мембранны и их сшивку.

Являются ли стадии, предшествующие сшивке двух полупор, лимитирующими? Для ответа на этот вопрос был проделан следующий эксперимент. На участке быстрого роста проводимости освобождали от антибиотика один из примембранных растворов. При этом возможны два результата. Если связывание – это быстрая стадия, то в мембране будет создан некоторый запас антибиотика, из которого будут продолжать формироваться каналы уже после прохождения фронта отмычки и будет наблюдаться дальнейший рост проводимости. Если же связывание – это медленная, лимитирующая стадия, то в момент прохождения фронта отмычки рост проводимости немедленно прекратится. Экспериментально наблюдается первый результат. Вывод о том, что связывание представляет собой быструю стадию, подтверждается расчетом [Ермишкин, Зильберштейн, 1982]. Связывание происходит по экспоненциальному закону с постоянной времени:

$$\tau = \frac{kh\delta}{D}$$

где δ – толщина мембранны; h - толщина неперемешиваемого слоя; D – коэффициент диффузии антибиотика в воде; K – коэффициент распределения антибиотика между мембранный и водой.

Характерные значения, входящих в эту формулу параметров: $\delta = 5 \cdot 10^{-7}$ см, $h = 2 \cdot 10^{-2}$ см, $D = 2 \cdot 5 \cdot 10^{-6}$ см²/с. По данным Ермишкина и Зильберштейна, для амфотерицина В $K=5 \cdot 10^3 \text{--} 5 \cdot 10^4$ [Ермишкин, Зильберштейн, 1982]. Принимая $K=2 \cdot 10^4$, находим значение для $\tau \sim 30$ с. Как будет показано далее, это время намного меньше постоянной времени активационной ветви.

Показано, что ПА в водном растворе существуют в виде агрегатов различного размера [Legrand et al., 1992, 1996; Mazerski, Borowski, 1996]. При этом гидрофильные зоны молекул обращены в воду, а гидрофобные полиеновые цепи обращены внутрь антибиотического комплекса. Будем считать, что антибиотик сорбируется на мембранны в основном в виде агрегатов, соответствующих по размеру полупорам. Правомерность такого допущения обосновывается тем, что в условиях, когда антибиотик в растворе существует только в виде мономеров, например, в присутствии ДМСО или метанола, антибиотик не увеличивает проводимость мембранны [Касумов, Шишлов,

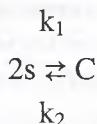
1974; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006]. Для объяснения наблюдаемой кинетики проводимости следует принять еще одно предположение, а именно, что образование каналов происходит в избытке полупор. Тогда реакция сборки каналов, имеющая второй порядок, фактически протекает как реакция первого порядка.

Предполагаемый механизм сборки канала можно описать следующим образом. Сначала происходит быстрая сорбция на мембрану антибиотика в виде агрегатов по размеру, соответствующих полупорам. Затем сорбированные агрегаты превращаются в полупоры, которые, плавая в мемbrane, сшиваются в каналы. Образование каналов происходит в избытке полупор. Далее покажем, что расчет кинетики проводимости по описанному выше механизму дает результаты, согласующиеся с экспериментом.

Концентрация полупор (s) в мемbrane растет по экспоненте:

$$s(t) = \bar{s} (1 - e^{-kt}) \quad (8.3.6)$$

где \bar{s} - стационарная концентрация полупор. Кинетической схеме образования канала (C)



соответствует дифференциальное уравнение:

$$\dot{C} = k_1 s^2 - k_2 C \quad (8.3.7)$$

Подставляя в (8.3.7) выражение (8.3.6) для $S(t)$, получим:

$$\dot{C} = -k_2 C + k_1 \bar{s}^2 (1 - e^{-kt})^2 \quad (8.3.8)$$

Введем безразмерное время $\tau = k_2 t$ и безразмерную проводимость $\gamma = c/\bar{c}$, где \bar{c} - стационарное решение (8.3.8):

$$\bar{c} = k_1 \bar{s}^2 / k_2$$

Тогда (8.3.8) принимает вид:

$$\gamma' = -\gamma + (1e^{-\alpha\tau})^2 \quad \alpha = k/k_2 \quad (8.3.9)$$

Решая (8.3.9) с начальным условием $\gamma(0)=0$, получим:

$$\gamma(\tau) = 1 - \frac{2\alpha^2 e^{-\tau}}{(1-\alpha)(1-2\alpha)} - \frac{2e^{-\alpha\tau}}{1-\alpha} + \frac{e^{-2\alpha\tau}}{1-2\alpha} \quad (8.3.10)$$

При условии $\alpha \gg 1$ для времен $\tau > 1/\alpha$ можно пренебречь двумя последними членами. Тогда получается экспоненциальная зависимость от времени:

$$1 - \gamma \sim e^{-\tau}$$

что согласуется с экспериментом. Как видно из рис. 8.3.2, экспериментальные точки хорошо ложатся на прямую, кроме начального участка кинетики.

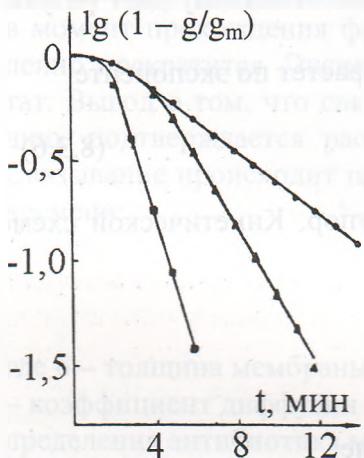


Рис. 8.3.2. Активационная ветвь кинетики. g_m – стационарная или максимальная проводимость. ● – амфотерицин В, 30 нМ в 2 М KCl; ▲ – метамфоцин, 50 нМ в 2 М KCl; ■ – метамфоцин, 500 нМ в 10 мМ KCl. Состав мембраны – фосфолипид:холестерин 2:1. Состав водного раствора: pH 6,0, $t=23^\circ\text{C}$ [Малафриев, 1985].

Для его исследования рассмотрим полное выражение для проводимости (8.3.10). Разложение в ряд Тейлора вблизи $\tau = 0$ дает первый неисчезающий член:

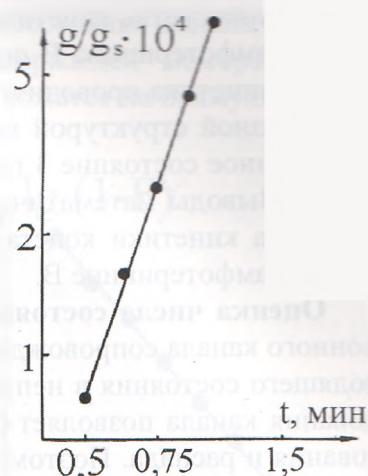
$$\gamma = \frac{1}{3} \alpha^2 \tau^3$$

или, возвращаясь к размерному времени,

$$\gamma = \frac{1}{3} k_2 k^2 t^3 \quad (8.3.11)$$

Построение начального участка кинетики в двойных логарифмических координатах дает в различных условиях прямую с угловым коэффициентом 2,5-3,1, что хорошо согласуется с уравнением (8.3.11), рис. 8.3.3.

Рис. 8.3.3. Начальный участок кинетики проводимости в двойных логарифмических координатах. Концентрация метамфоцина 300 нМ. Мембранны формировались из смеси фосфолипида с эргостерином в весовом соотношении 20:1. Состав водного раствора: 10 мМ KCl, pH 6,0; t=23°C. Потенциал на мемbrane 100 мВ [Малафриев, 1985].



Инактивационная ветвь кинетики. На инактивационной ветви кинетики проводимость убывает по экспоненте (рис. 8.3.4). Исходя из принятого графа состояний канала, это значит, что инактивация определяется только переходами $2 \rightleftharpoons 3$. Тот факт, что экспоненциальная кинетика получается для мономолекулярной реакции повторной сборки $3 \rightarrow 2$, значит, что она происходит в условиях избытка мономеров. Смена типа кинетики при повышении концентрации антибиотика объясняется тем, что высокая концентрация мономеров, определяющая скорость повторной сборки, достигается раньше, чем станет существенным процесс разборки.

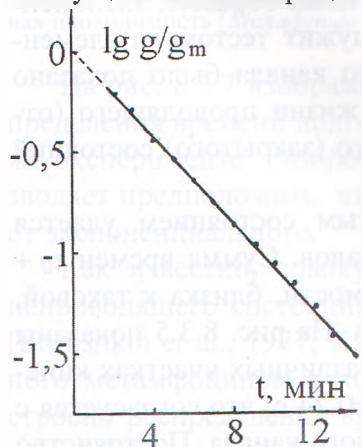


Рис. 8.3.4. Инактивационная ветвь кинетики в присутствии 100 нМ метамфоцина. Мембранны формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 10 мМ KCl, pH 6,0, t=23°C [Малафриев, 1985].

Сдвиг pH в сторону рК одной из полярных групп (т.е. частичная нейтрализация одного из зарядов) приводит к появлению немонотонной кинетики проводимости на исходном амфотерицине В. Инак-

тивационная ветвь кинетики экспоненциальна, а повышение концентрации амфотерицина В приводит к монотонной кинетике. Немонотонная кинетика проводимости наблюдается в присутствии и других ПА с разной структурой молекул. Эти результаты показывают, что разобранное состояние 3 присуще широкому классу полиеновых каналов. Выводы математической модели о возможности регулирования типа кинетики константами скоростей подтверждаются на исходном амфотерицине В.

Оценка числа состояний ионного канала. Функционирование ионного канала сопровождается его обратимыми переходами из проводящего состояния в непроводящее. Применяемая методика исследования канала позволяет регистрировать лишь процессы его образования и распада. Поэтому проводящее состояние представляет собой суперпозицию всевозможных элементарных проводящих состояний, а непроводящее – суперпозицию элементарных непроводящих состояний. В этой связи представляет интерес оценить число элементарных состояний канала. Амфотерициновый канал имеет, по крайней мере, два непроводящих состояния: короткоживущее и долгоживущее. Средние времена их жизни различаются очень сильно, поэтому они хорошо различимы на записи канала.

В общем случае число состояний канала может быть оценено по функции распределения времен их жизни. Переходы между состояниями канала образуют марковскую цепь [Ермишkin, Зильберштейн, 1982]. Но для любой марковской цепи распределение времени жизни ее состояния экспоненциально. Таким образом, экспоненциальное распределение времени жизни служит тестом на элементарность состояния. Для амфотерицинового канала было показано экспоненциальное распределение времени жизни проводящего (открытого) и короткоживущего непроводящего (закрытого) состояний [Ермишkin, Зильберштейн, 1982].

Переходы между открытым и закрытым состоянием удается идентифицировать и в системе многих каналов. Сумма времен $\tau_0 + \tau_3$, определенная из спектра шума проводимости, близка к таковой, определенной по записи одиночного канала. На рис. 8.3.5 показаны линеаризованные спектры, измеренные на различных участках кинетики проводимости. При этом $\tau_0 + \tau_3 = 1,25 \pm 0,24$ с, что согласуется с величиной $\sim 1,7$ с, полученной для одиночного канала. Постоянство $\tau_0 + \tau_3$ указывает на то, что на всех участках кинетики проводимость определяется работой одного вида каналов.

На рис. 8.3.6 приведена полулогарифмическая анаморфоза рас-

пределения времени жизни проводящего состояния канала, образованного метамфоцином в эргостеринсодержащей мембране. Как видно, экспериментальные точки хорошо ложатся на прямую линию, среднеквадратичное отклонение $\sigma = 0,028$.

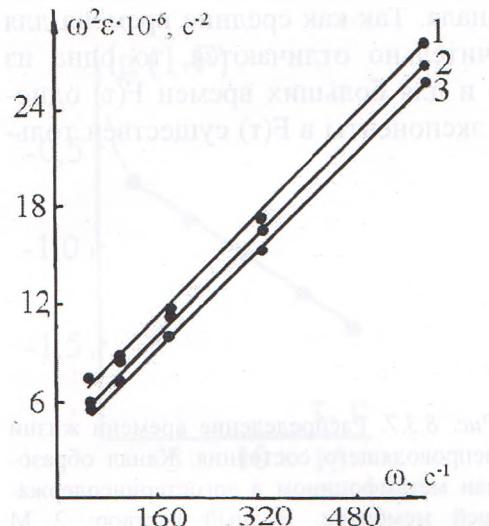


Рис. 8.3.5. Линеаризованные спектры шума проводимости в присутствии метамфоцина. Мембранны формировались из смеси яичного лецитина с холестерином в весовом соотношении 12:1 в 2 М KCl, pH 6,0, $t=23^\circ\text{C}$. Напряжение 50 мВ. Кривая 1 – активационная ветвь, 2 – область максимума, 3 – стационарная проводимость [Малафриев, 1985].

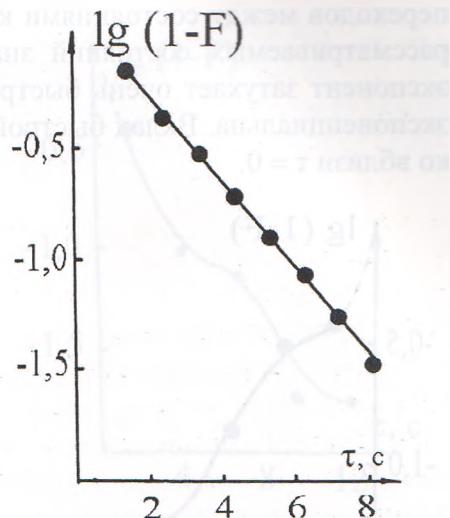


Рис. 8.3.6. Распределение времени жизни проводящего состояния. Канал образован метамфоцином в эргостеринсодержащей мембране. Водный раствор: 2 М KNO_3 , pH 6,0, $t=23^\circ\text{C}$. Прямая проведена по методу наименьших квадратов [Малафриев, 1985].

На рис. 8.3.7 изображена полулогарифмическая аноморфоза распределения времени долгоживущего непроводящего состояния в том же эксперименте. Разброс точек намного больше, $\sigma=0,155$. Это позволяет предположить, что рассматриваемое распределение отлично от экспоненциального.

Как известно, совокупность проводящего и короткоживущего непроводящего состояния называется активным состоянием канала [Ermishkin et al., 1977; Kasumov et al., 1979]. Для канала, образованного метамфоцином в холестеринсодержащей мембране, было построено распределение времени активного состояния. Как видно из рис. 8.3.8, экспериментальные точки хорошо ложатся на прямую, $\sigma=0,017$. Однако прямая не проходит через начало координат. Это связано, по-видимому, с тем, что активное состояние является наложением двух элементарных состояний. Как показывает расчет, инте-

гральная функция распределения имеет вид

$$F(\tau) = 1 - a_1 e^{p_1 \tau} - a_2 e^{p_2 \tau}$$

где параметры a_1 , a_2 , p_1 , p_2 выражаются через константы скоростей переходов между состояниями канала. Так как средние времена для рассматриваемых состояний значительно отличаются, то одна из экспонент затухает очень быстро и для больших времен $F(\tau)$ одн экспоненциальна. Вклад быстрой экспоненты в $F(\tau)$ существен только вблизи $\tau = 0$.

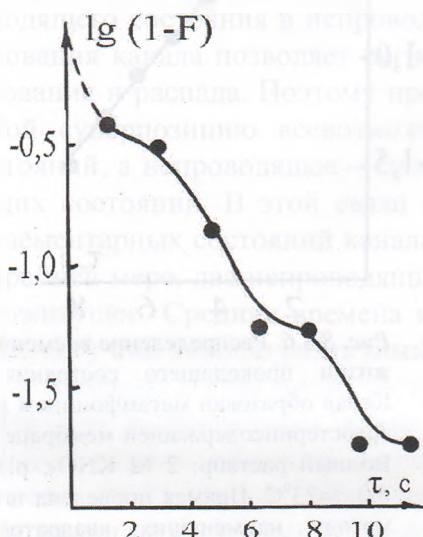


Рис. 8.3.7. Распределение времени жизни непроводящего состояния. Канал образован метамфоцином в эргостеринсодержащей мембране. Водный раствор: 2 М KNO_3 , $\text{pH} 6,0$, $t=23^\circ\text{C}$ [Малафриев, 1985].

Описанное распределение интересно сравнить с $F(\tau)$ для K^+ – канала глиальных клеток моллюска [Гелетюк, Казаченко, 1984]. Он генерирует серии коротких импульсов (пачки), разделенные более длительными межпачечными интервалами. Общее распределение времени жизни непроводящего состояния двухэкспоненциально. Быстрая экспонента соответствует распределению времени между одиночными импульсами, медленная – между пачками. Для времени непроводящего состояния в том же эксперименте получается значительный разброс точек относительно прямой, $\sigma = 0,123$. Форма кривой проведенной через экспериментальные точки (рис. 8.3.9), аналогична кривой рис. 8.3.7. Можно показать, что $F(\tau)$ для канала с $s > 1$ непроводящими состояниями содержит s экспонент. Двухэкспоненциальная кривая показана на рис. 8.3.8. Сравнивая ее с кривыми рис. 8.3.7 и 8.3.9, можно оценить число экспонент в их представлении.

Это соответствует 4-6 непроводящим состояниям. Полученный результат легко объяснить в рамках принятой модели канала. Действительно, разборка и повторная сборка могут происходить в несколько стадий. Каждой из них соответствует свое непроводящее состояние.

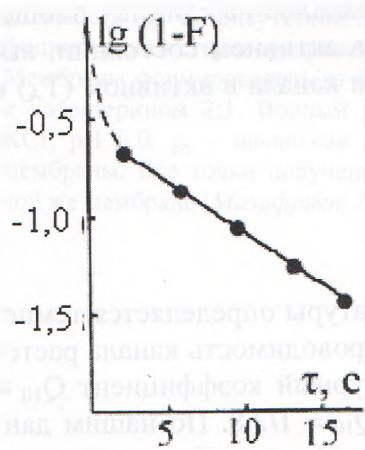


Рис. 8.3.8. Распределение времени активного состояния. Канал образован метамфоцином в холестеринодержащей мембране. Водный раствор: 2 М KCl, pH 7,0, t=34°C. Прямая проведена по методу наименьших квадратов [Малафриев, 1985].

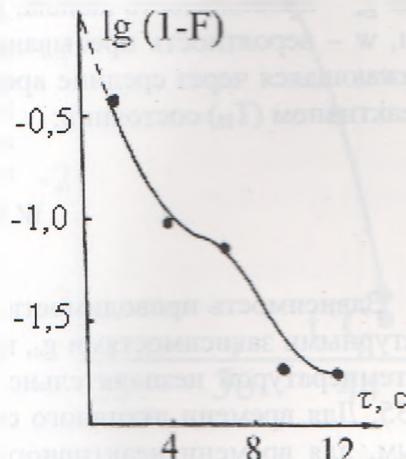


Рис. 8.3.9. Распределение времени неактивного состояния. Канал образован метамфоцином в холестеринодержащей мембране. Водный раствор: 2 М KCl, pH 7,0, t=34°C [Малафриев, 1985].

Кинетика тепловой и химической релаксации проводимости мембран. Если после достижения стационарной проводимости мембран изменить условия, проводимость релаксирует к новому стационарному уровню. Исследуя кинетику релаксации проводимости мембран, можно получить важную информацию о превращении канального комплекса в мембране. Изменение условий примембранныго раствора достигается быстрым нагревом ячейки (тепловая релаксация) или скачкообразной заменой раствора на раствор без антибиотика (химическая релаксация). Проводимость, индуцированная ПА, весьма чувствительна к температуре. Так, в интервале 26-36°C проводимость БЛМ в присутствии нистатина падает примерно в 10⁴ раз [Cass et al., 1970]. При 38-40°C почти полностью инактивируется проводимость, индуцируемая амфотерицином В [Касумов и др., 1971 а, б].

Рассмотрим причины столь сильной температурной зависимости. Удельная проводимость мембраны выражается формулой:

$$g = g_c \cdot n \cdot w$$

где g_c – проводимость канала; n – число каналов на единицу площади, w – вероятность пребывания канала в активном состоянии, выражаящаяся через средние времена жизни канала в активном (T_A) и неактивном (T_H) состояниях:

$$w = \frac{T_A}{T_A + T_H}$$

Зависимость проводимости от температуры определяется температурными зависимостями g_c , n , T_A , T_H . Проводимость канала растет с температурой незначительно. Температурный коэффициент $Q_{10} = 1.35$. Для времени активного состояния $Q_{10} = 1/2,8$. По нашим данным, для времени неактивного состояния $Q_{10} = 3$. Таким образом, величина $g_c N$ (эффективная проводимость канала) уменьшается не более чем в 10 раз на 10^0C , а значит, уменьшение проводимости обусловлено в основном уменьшением числа проводящих каналов в мембране.

Повышение температуры, как можно заключить из приведенных данных, приводит к немонотонной кинетике проводимости. Действительно, при повышенной температуре на исходном амфотерицине В наблюдалась немонотонная кинетика проводимости, сменяющаяся монотонной с ростом его концентрации [Малафриев, 1985, 1986].

Температурная зависимость стационарной проводимости имеет максимум, смещающийся вправо с ростом концентрации антибиотика (рис. 8.3.10). Падающий участок этой зависимости спрямляется в координатах Аррениуса, как показано на рис. 8.3.11. Энергия активации проводимости E_A , определенная по этим графикам, составляет 68 ккал/моль для метамфоцина и 112 ккал/моль для амфотерицина В. Какой процесс характеризует эта энергия, сказать трудно, так как она не постоянна и уменьшается с ростом концентрации антибиотика. В химической кинетике известны сложные реакции, для которых E_A – это функция отдельных стадий [Эмануэль, Кнорре, 1969]. Непостоянство E_A , по-видимому, отражает многостадийность процессов сборки-разборки ионного канала.

Рис. 8.3.10. Температурная зависимость проводимости (g) в присутствии 30 нМ метамфоцина, в холестеринсодержащей мембране. Мембранны формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 2 М KCl, pH 6.0. g_s – начальная проводимость мембранны. Все точки получены на одной и той же мембране [Малафриев, 1985].

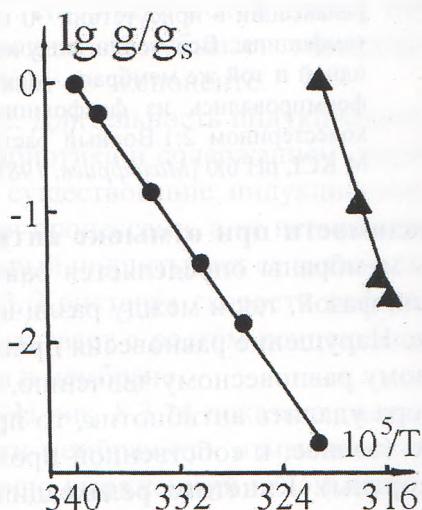
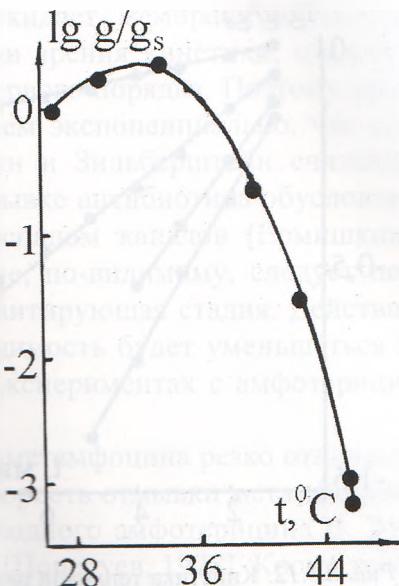


Рис. 8.3.11. Температурная зависимость проводимости (g) в координатах Аррениуса. ● – 100 нМ метамфоцина; ▲ – 30 нМ метамфоцина. Все точки получены на одной и той же мембране. Мембранны формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 2 М KCl, pH 6.0. g_s – начальная проводимость мембранны [Малафриев, 1985].

Кинетика тепловой релаксации экспоненциальна (рис. 8.3.12), а температурная зависимость ее константы скорости подчиняется уравнению Аррениуса (рис. 8.3.13). Это подтверждает ранее принятное предположение, что разборка канала – мономолекулярная реакция [Касумов, Малафриев, 1982 а; Касумов и др., 1982 б; Kasumov, Malafriv, 1981, 1984 а; Малафриев и др., 1991; Ибрагимова и др., 2003; Kasumov, Bolard, 2004; Ibragimova et al., 2006].

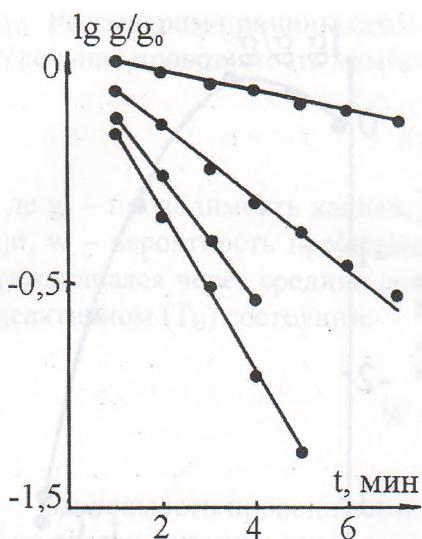


Рис. 8.3.12. Кинетика тепловой релаксации проводимости в присутствии 30 нМ метамфоцина. Все точки получены на одной и той же мембране. Мембранны формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 2 М KCl, pH 6,0 [Малафриев, 1985].

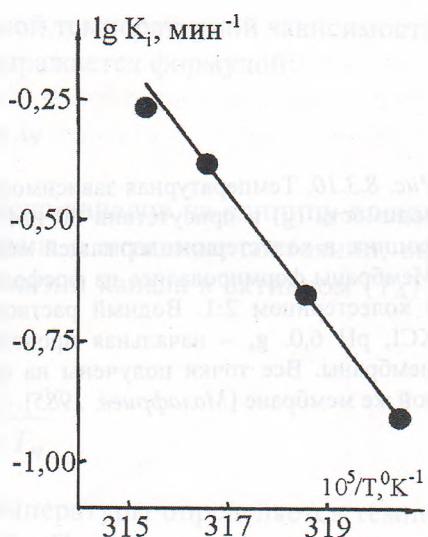


Рис. 8.3.13. Температурная зависимость константы скорости тепловой релаксации в присутствии 30 нМ метамфоцина. Все точки получены на одной и той же мембране. Мембранны формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 2 М KCl, pH 6,0 [Малафриев, 1985].

Кинетика релаксации проводимости при отмыивке антибиотика. Равновесная проводимость мембранны определяется равновесием как между водной и липидной фазой, так и между различными формами антибиотика в мембране. Нарушение равновесия приводит к релаксации проводимости к новому равновесному значению. Если из окружающего мембранны раствора удалить антибиотик, то проводимость будет стремиться к нулю (точнее, к собственной проводимости немодифицированной мембранны). Кинетика релаксации определяется как выходом антибиотика из мембранны, так и взаимодействием между его формами в мембране. Применяемая методика отмыивки в градиенте плотности позволяет вывести систему из состояния равновесия скачком, точно фиксируя этот момент. Известно, что амфотерицин В очень медленно отмывается из мембранны [Cass et al., 1970]. При нейтральных pH и 25°C постоянная времени релаксации τ_r (время e-кратного уменьшения проводимости) более 2 часов. Постоянная времени сильно зависит от температуры: при увеличении температуры на 10°C она уменьшается в 10 раз. По

мнению авторов, амфотерицин В покидает мембрану в составе крупных агрегатов – полупор. С точки зрения кинетики, отмывка путем выхода полупор есть реакция первого порядка. Поэтому проводимость должна убывать со временем экспоненциально, что согласуется с экспериментом. Ермишкин и Зильберштейн считают, что релаксация проводимости при отмывке антибиотика обусловлена не десорбцией антибиотика, а распадом каналов [Ермишкин, Зильберштейн, 1982]. Это утверждение, по-видимому, следует понимать так, что десорбция не есть лимитирующая стадия. Действительно, если десорбции нет, то проводимость будет уменьшаться и без отмычки, чего не наблюдается в экспериментах с амфотерицином В.

Кинетика релаксации при отмывке метамфоцина резко отличается от таковой для амфотерицина В. Скорость отмывки метамфоцина в общем намного больше, чем для исходного амфотерицина В. Это согласуется с результатами Пощелуева [Пощелуев, 1978]. Кроме того, были обнаружены следующие особенности кинетики:

1. На кинетической кривой имеют место два участка. На первом проводимость убывает медленно (индукционный период), затем убывает по экспоненте.

2. Длительность индукционного периода растет с концентрацией антибиотика и содержанием стерина в мембране. Последнее значит, что существование индукционного периода обусловлено мембранными процессами, а не неперемешиваемым слоем вблизи мембраны, который подпитывает ее антибиотиком.

3. Константа скорости релаксации (обратная постоянная времени) убывает с ростом концентрации антибиотика и содержания стерина в мемbrane.

На рис. 8.3.14 показана типичная кинетика релаксации проводимости мембран при отмывке метамфоцина. Как видно, имеет место хорошо выраженный излом кривой при переходе от индукционного участка к экспоненциальному.

Механизм релаксации проводимости. Изложенные выше экспериментальные результаты не объясняются в рамках механизма отмычки полупор. В самом деле, если этот механизм имеет место, то τ_r должны быть одинаковы для амфотерицина В и метамфоцина, так как структура зоны контакты двух полупор у обоих антибиотиков совпадает. В эксперименте же наблюдается значительная разница τ_r . Это заставляет искать более адекватный механизм релаксации.

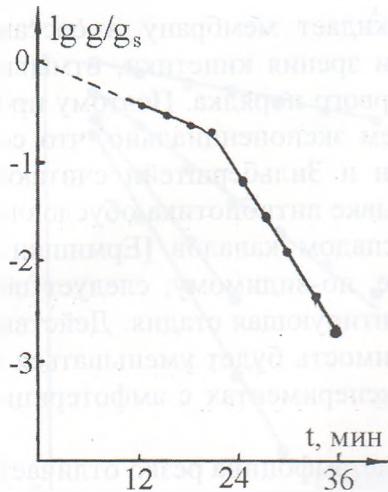


Рис. 8.3.14. Кинетика релаксации проводимости мембран при отмыкке метамфоцина. Концентрация метамфоцина 200 нМ. Мембранны формировались из фосфолипидов с эргостерином 20:1. Водный раствор: 10 мМ KCl, pH 6,0, t=23°C. Потенциал на мемbrane 100 мВ. Отмыкка производилась раствором 10 мМ KCl + 10% сахарозы [Касумов, Малафриев, 1982 а].

Сравнивая τ_r для двух указанных антибиотиков, мы видим, что большая скорость релаксации коррелирует с большей неустойчивостью ионного канала. Это значит, что вторая полупора (на неотмываемой стороне) играет роль «якоря». На основании этих данных можно предложить следующий механизм релаксации. До отмыкки в мембране существует равновесие между проводящими и непроводящими формами антибиотика. Большая концентрация последних определяет сильное смещение равновесия в сторону собранного, проводящего состояния канала. При отмыкке непроводящие формы первыми покидают мембрану. До тех пор, пока их концентрация достаточно велика, происходит слабое смещение равновесия в сторону разборки канала (индукционный период). Когда же их концентрация в мембране станет малой, реакция разборки становится обратимой (экспоненциальный участок). Зависимость $K_r(C_A)$ можно объяснить следующим образом. Две полупоры, встречаясь в мембране, взаимодействуют между собой и стабилизируют друг друга. Чем больше концентрация антибиотика на неотмываемой стороне мембранны, тем с большей вероятностью внутренняя полупора находится в собранном состоянии, а значит, уменьшается скорость разборки внешней полупоры, характеризуемая величиной K_r . Дополним качественные рассуждения расчетом.

Представим разборку внутренней полупоры следующей схемой:



где С – проводящий канал; S – внешняя полупора; S^* - внутренняя полупора (разобранная).

Так как концентрация антибиотика на неотмываемой стороне постоянна, то реакция (8.3.12) фактически имеет первый порядок с константой скорости k_2^1 , зависящей от концентрации антибиотика: $k_2^1 = k_2 A_0^n$. Распад внешней полупоры представляется следующей схемой



Реакциям (8.3.12) и (8.3.13) соответствует система дифференциальных уравнений или концентрации каналов и полупор:

$$\dot{C} = -k_1 C + k_2 A_0^n S$$

$$\dot{S} = k_1 C - (k_2 A_0^n + k_3) S$$

из которой следует, что концентрация каналов С (а значит и проводимость g) зависит от времени следующим образом:

$$g(t) = g_1 e^{p_1 t} + g_2 e^{p_2 t}$$

где g_1, g_2 – постоянные интегрирования; p_1, p_2 – корни характеристического уравнения:

$$\Delta(p) = \begin{vmatrix} -(k_1 + p) k_2 A_0^n & \\ k_1 - (k_2 A_0^n + k_3 + p) & \end{vmatrix} = 0$$

При условии

$$(k_1 + k_3 + k_2 A_0^n)^2 \gg 4 k_1 k_3 \quad (8.3.14)$$

приближенные значения корней равны

$$p_1 = -\frac{k_1 k_3}{k_1 + k_3 + k_2 A_0^n}, \quad p_2 = -(k_1 + k_3 + k_2 A_0^n) \quad (8.3.15)$$

Согласно условию (8.3.14)

$$|p_2| \gg |p_1|$$

и в выражении для $g(t)$ экспонента с p_2 затухнет и выживет экспонента с p_1 , что и наблюдается в эксперименте. Так как постоянная времени $\tau_r = -1/p_2$, то из уравнения (8.3.15) следует:

$$\tau_r = \frac{k_1 + k_3}{k_1 k_3} + \frac{k_2 A_0^n}{k_1 k_3} \quad (8.3.16)$$

Если $A_0 \rightarrow 0$, то из (8.3.16) следует, что τ_r стремится к конечному пределу. При больших концентрациях метамфоцина, полагая $n=3$, получаем степенную зависимость $\tau_r (A_0)$, соответствующую эксперименту (см. рис. 9.3.6). Величина показателя $n=3$, по-видимому, указывает на то, что в реакции повторной сборки участвует не менее двух молекул антибиотика, что находится в согласии с ранее принятым предположением.

Кинетика релаксации проводимости при отмыивке алкильных аналогов амфотерицина В. Как было показано выше, метилирование полярных групп в молекулах амфотерицина В приводит к значительному изменению характера работы ионных каналов в мембранных. В связи с этим особый интерес представляет изучение свойств алкильных аналогов амфотерицина В, различающихся длиной алкильной цепи: этильного, пропильного, бутильного, амильного. В присутствии малых концентраций аналогов амфотерицина В можно наблюдать дискретные уровни проводимости БЛМ, соответствующие работе одиночных ионных каналов. Статистический анализ работы каналов показывает, что времена жизни каналов в открытом (τ_0) и закрытом (τ_3) состояниях распределены экспоненциально (рис. 8.3.15).

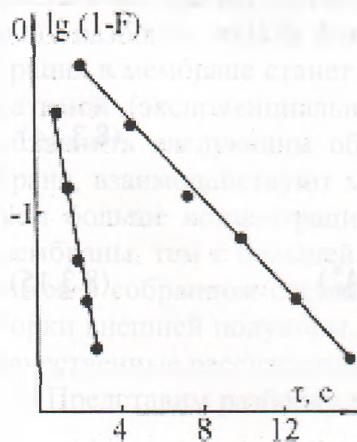
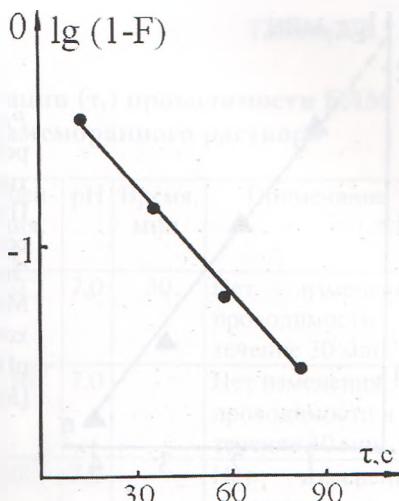


Рис. 8.3.15. Распределение времени жизни открытого (верхняя кривая) и закрытого (нижняя кривая) состояния канала, образованного амильным аналогом амфотерицина В. Мембранные формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 2 М KCl, pH 7,0, t=23°C. Потенциал на мембране 200 мВ [Малафриев, 1985].

Распределение времени активного состояния также экспоненциально при больших временах (рис. 8.3.16).

Рис. 8.3.16. Распределение времени жизни активного состояния канала, образованного бутильным аналогом амфотерицина В. Мембранны формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 2 М KCl, pH 7,0, t=23°C. Потенциал на мембране 200 мВ [Малафриев, 1985].



Каналы, полученные при одностороннем действии антибиотиков, имеют большой разброс проводимостей и времен жизни. Для них не строилась функция распределения, но подсчитывалось среднее время жизни проводящего состояния канала τ и рассчитывалась его дисперсия σ^2 . Даже при небольшом объеме выборки равенство $\tau = \sigma$, что характерно для экспоненциального распределения, выполнено с точностью 7–9%. Например, в одном из экспериментов с бутильным амфотерицином В получено $\tau = 3,75$ с и $\sigma = 3,49$ с.

При удалении антибиотика из примембранных растворов проводимость БЛМ убывает. Также как и для метамфоцина, кинетика релаксации для других алкильных производных включает индукционный и экспоненциальный участки. Постоянная времени релаксации (τ_r) также растет с концентрацией антибиотика. Была исследована зависимость постоянной времени от длины алкильной цепи молекулы антибиотика и от вида стерина. Оказалось, что при прочих равных условиях с ростом длины алкильной цепи постоянная времени уменьшается. Эта зависимость линейна в полулогарифмических координатах. Постоянная времени уменьшается примерно в 4 раза на каждую CH_2 группу (8.3.17).

Экстраполяция этой зависимости к $n = 0$, что соответствует исходному амфотерицину В, дает $\tau_r = 160$ мин. Предполагая, что изменение τ_r связано с изменением энергии активации по уравнению:

$$\tau_r \sim \exp\left(\frac{E_A}{RT}\right)$$

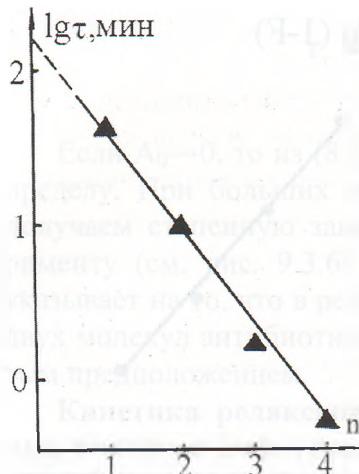


Рис. 8.3.17. Зависимость постоянной времени релаксации от длины алкильной цепи антибиотика при концентрации антибиотиков 500 нМ. Пунктирная линия – экстраполяция к $n = 0$, что соответствует исходному амфотерицину В. Экстраполированное значение $\tau_r = 160$ мин. Мембранны формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 2 М KCl, pH 7,0, $t = 23^\circ\text{C}$. Потенциал на мембране 200 мВ [Касумов, Малафриев, 1982 a].

можно вычислить ее изменение на одну CH_2 группу. Расчет по графику дает $\Delta E_A = 0,88$ ккал/моль. Замена в составе мембраны холестерина эргостерином приводит к значительному замедлению релаксации. На эргостеринсодержащих мембранных в тех же концентрациях антибиотика проводимость не менялась в течение длительного времени. Полученные данные говорят о том, что это связано с большей устойчивостью комплекса антибиотик-стерин в случае эргостерина [Касумов, 1979]. Величины τ_r для алкильных производных амфотерицина В даны в таблице 8.3.1.

Сдвиг pH в кислую сторону (pH 3,0) усиливает действие антибиотиков при введении с одной стороны мембранны. На исходном амфотерицине В (3 мкМ) изменения проводимости при отмытке не было в течение ~ 30 мин. Для метамфоцина (1 мкМ) в этих условиях $\tau_r = 10,6$ мин, т.е. намного меньше, чем в случае симметричного действия. Бутамфоцин (10 мкМ) отмывается еще быстрее: $\tau_r = 5,1$ мин (19°C) и 2,6 мин (27°C). Соответствующая энергия активации составляет 15 ккал/моль (оценка). Сдвиг pH раствора от 3 до 7 приводит к очень быстрому исчезновению проводимости.

Инактивация проводимости мембранны в присутствии алкильных производных амфотерицина В связана с переходом канала в новое непроводящее состояние, связанное с полной разборкой канального комплекса внутри мембранны. Экспериментальное доказательство существования нового - четвертого состояния полиенового канала будет приведено в 9-ой главе настоящей монографии.

Таблица 8.3.1.

Значение постоянной времени релаксации (τ_r) проводимости БЛМ при отмывке антибиотика из примембранного раствора

Антибиотик	Состав мембранны	Концентрация, М	pH	Время, мин.	Примечание
Метамфоцин	Эргостерин: фосфолипид = 0,05	$3 \cdot 10^{-7}$	7,0	30	Нет изменения проводимости в течение 30 мин.
Этамфоцин	«-----»	$1,5 \cdot 10^{-7}$	7,0	-	Нет изменения проводимости в течение 30 мин.
Пропамфоцин	«-----»	$3 \cdot 10^{-7}$	7,0	-	Нет изменения проводимости в течение 50 мин.
Бутамфоцин	«-----»	$3 \cdot 10^{-7}$	7,0	-	Нет изменения проводимости в течение 50 мин.
Амфотерицин В	Холестерин: фосфолипид = 0,5	$5 \cdot 10^{-7}$	7,0	160	Экстраполяция по кривой рис. 8.3.17
Метамфоцин	«-----»	$5 \cdot 10^{-7}$	7,0	38	
Этамфоцин	«-----»	$5 \cdot 10^{-7}$	7,0	84	
Пропамфоцин	«-----»	$5 \cdot 10^{-7}$	7,0	0,46	
Амфотерицин В*	«-----»	$3 \cdot 10^{-6}$	3,0	-	Нет изменения проводимости в течение 30 мин.
Метамфоцин *	«-----»	10^{-6}	3,0	10,6	
Бутамфоцин *	«-----»	10^{-5}	3,0	5,1	При 19^0C
Бутамфоцин *	«-----»	10^{-5}	3,0	2,6	При 27^0C

Водные растворы содержат 10 мМ KCl, $t=22^0\text{C}$. Напряжение на мемbrane 100 мВ. Отмывка производилась 10 % раствором сахарозы [Касумов и др., 1984 а].

* в этих экспериментах определяли τ_r при введении антибиотика только с одной (отмываемой) стороны мембранны, в остальных при симметричном введении.

8.4. Исследование эффекта амфотерицина В и его производного метамфоцина, вводимых с одной стороны мембранны

Нарушение функций стеринсодержащих клеток эукариотов в присутствии полиенов связано с утечкой метаболитов из цитоплазмы. Увеличение проводимости липидных мембран неароматически-

ми антибиотиками только при наличии их с обеих сторон мембранны,казалось, несколько не согласуется с односторонним биологическим действием антибиотиков. Расхождение данных, в первую очередь, связано с неадекватными условиями действия полиенов с одной стороны клеточных и липидных мембран. При введении полиенов в культуральную среду концентрация последних с внутренней стороны клеточных мембран должна сравнительно быстро приближаться к его концентрации в среде. Однако, в экспериментах на бислойных мембранах трудно добиться условий, близких к объему внутриклеточной среды. Тем не менее, исследования в этом направлении показали, что при достаточно малом объеме водного раствора с противоположной от антибиотика стороны мембранны наблюдается интегральное нарастание проводимости мембраны. По данным Алекберли и Топалы это свидетельствует о проникновении антибиотика на противоположную сторону мембраны [Алекберли, Топалы, 1979, 1980, 1984]. Эффект ПА с одной стороны мембраны подтверждается исследованиями на липосомах и на клетках [Cass, Dalmark 1973; De Kruyff, Demel, 1974]. Анионная избирательная проницаемость на бислойных мембранах [Cass et al., 1970; Касумов, Либерман, 1972], а также односторонний эффект на плазматических мембранах и только двухсторонний эффект на БЛМ, заставил многих исследователей детально изучить на бислоях механизм одностороннего действия нистатина, амфотерицина В и леворина [Ермишкян, 1981; Касумов, Каракозов, 1985; Касумов, Самедова, 1991; Brutyian, McPhee, 1996; Ибрагимова и др., 2006 б].

Попытки экспериментально обнаружить односторонний эффект нистатина были предприняты Финкельштейном с сотрудниками [Marty, Finkelstein, 1975; Kleinberg, Finkelstein, 1984]. Было показано, что нистатин в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М увеличивает проводимость бислойных мембран (в зависимости от состава липидов и длины углеводородных цепочек жирных кислот) на 1,5-2 порядка. Авторами была высказана гипотеза о том, что индукция проводимости связана с образованием в мембранах короткоживущих полупор, проницаемых для катионов. Это предположение было подтверждено данными, полученными с амфотерицином В на эргостериносодержащих мембранах [Brutyian, McPhee, 1996]. Образуемые амфотерицином В короткоживущие ионные каналы на эргостериновых мембранах имели время жизни порядка 100 мс. Однако при дальнейшем исследовании были обнаружены долгоживущие ионные каналы и высокая проводимость мембран, содержащих холестерин, при действии ам-

фотерицина В с одной стороны мембраны, в растворах с низким значением pH 3,0 [Касумов, Самедова, 1991].

Введение амфотерицина В в концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ М с одной стороны мембраны приводит к появлению на мемbrane долгоживущих ионных каналов. На рис. 8.4.1 показана запись одиночных ионных каналов, формируемых амфотерицином В с одной стороны мембраны. Среднее время жизни канала в активном состоянии $T_A=20$ с, а в открытом и закрытом состояниях соответственно равны: $T_0=2.9$ с, $T_3=0.08$ с. На рис. 8.4.2 приведена гистограмма распределения проводимости одиночных каналов. На ней видна большая дисперсия проводимости одиночных каналов - от 2 пСм до 20 пСм. С наибольшей вероятностью появляются каналы от 7 пСм до 10 пСм. Время сборки каналов не зависит от величины и направления электрического поля.

Рис. 8.4.1. Одиночные ионные каналы, формируемые с одной стороны мембраны амфотерицина В в концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ М при мембранным потенциале +200 мВ (+ со стороны антибиотика). Состав водного раствора: 2 М KCl, pH 3,0, t=22°C. Состав мембранныго раствора: 10 мг фосфолипидов и 4 мг холестерина в 1 мл гептана [Касумов, 1986 a].

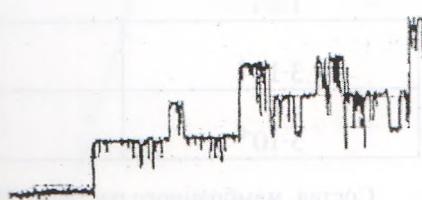
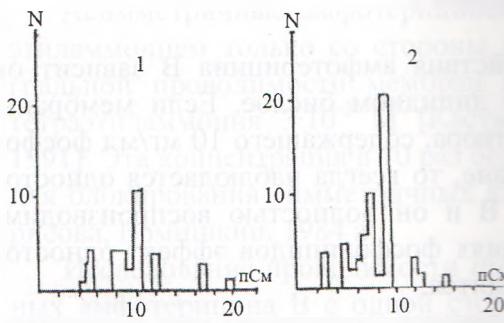


Рис. 8.4.2. Гистограмма распределения проводимости одиночных каналов при одностороннем действии амфотерицина В ($2 \cdot 10^{-8}$ М) при разных направлениях электрического тока. Одиночные каналы получены при мембранным потенциале 200 мВ. Мембранны формировали из общего липидного раствора, содержащего 10 мг фосфолипидов:10 мг холестерина в 1 мл гептана, в растворах 2 М KCl, pH 3,0, t=22°C. 1-соответствует (-) в растворе с антибиотиком. 2-соответствует (+) в растворе с антибиотиком [Касумов, 1986 a].

Избирательная проницаемость мембран при одностороннем введении амфотерицина В преимущественно анионная и не зависит от концентрации холестерина в мембране. В таблице 8.4.1 приведены

значения разности потенциалов, возникающего на мембране при создании градиента проникающего иона, как со стороны антибиотика, так и с противоположной, не содержащей антибиотика стороны. Из таб. 8.4.1 видно, что наибольшая величина потенциала достигается в том случае, когда градиент проникающего иона создается со стороны антибиотика. При обратном направлении градиента величина мембранныго потенциала вдвое меньше.

Таблица 8.4.1.

Избирательная проницаемость мембран в присутствии амфотерицина В с одной стороны мембраны [Касумов, 1986 a].

Концентрация амфотерицина В в растворе, М	Направление градиента проникающего иона	Величина мембранныго потенциала, мВ
$1 \cdot 10^{-6}$	1→2	-42±2
	1←2	-22±4
$3 \cdot 10^{-6}$	1→2	-40±2
	1←2	-22±3
$5 \cdot 10^{-6}$	1→2	-42±2
	1←2	-22±4

Состав мембранныго раствора 10 мг фосфолипидов +10 мг холестерина в 1 мл гептана. Использовали KCl в различных концентрациях. pH 3,0, t=22°C. Раствор 1 с антибиотиком, раствор 2 без антибиотика.

$$\begin{array}{ll} 1\rightarrow 2 - 2 \text{ M} \rightarrow 0,2 \text{ M}, & 0,2 \text{ M} \rightarrow 0,02 \text{ M} \\ 1\leftarrow 2 - 0,2 \text{ M} \leftarrow 2 \text{ M}, & 0,02 \text{ M} \leftarrow 0,2 \text{ M}. \end{array}$$

Концентрацию KCl изменяли в растворе 2.

Эффект одностороннего действия амфотерицина В зависит от концентрации фосфолипидов в липидном бислое. Если мембранны формируются из липидного раствора, содержащего 10 мг/мл фосфолипидов с холестерином в гептане, то всегда наблюдается односторонний эффект амфотерицина В и он полностью воспроизведим. При более высоких концентрациях фосфолипидов эффект одностороннего действия не воспроизводится.

Сборка одиночных ионных каналов происходит при концентрациях амфотерицина В сравнимых для получения симметричных каналов ($2 \cdot 10^{-8}$ М). В отличие от симметричных каналов число асимметричных каналов не зависит от концентрации холестерина в мембраноформирующем растворе в пределах 2-10 мг/мл холестерина при фиксированной концентрации амфотерицина В [Касумов, Сamedova, 1991].

На рис. 8.4.3 приведена зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В с одной стороны мембраны. Эта зависимость степенная и при разных концентрациях холестерина в мемbrane имеет одинаковый показатель степени $n=4$. Достижение стационарной проводимости при действии амфотерицина В с одной стороны мембраны происходит в интервале времени 25-35 мин. За время порядка 20 мин амфотерицин В практически не отмывается из мембраны [Касумов, Самедова, 1991; Ибрагимова и др., 2003].

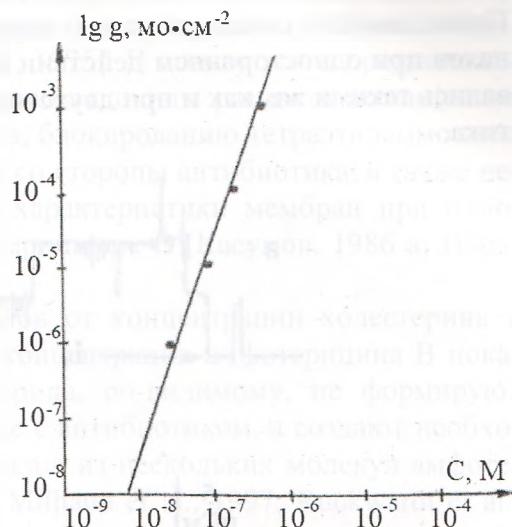


Рис. 8.4.3. Зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В с одной стороны мембраны в растворе 2 М KCl, pH 3,0, $t=22^{\circ}\text{C}$. Состав мембранныго раствора такой же, как на рис. 8.4.1. [Касумов, 1986 а].

Асимметричные амфотерициновые каналы блокируются тетраэтиламмонием только со стороны антибиотика. Уменьшение интегральной проводимости мембран наблюдается при концентрации тетраэтиламмония $3 \cdot 10^{-3}$ М [Касумов, 1986 а; Касумов, Самедова, 1991]. Эта концентрация в 10 раз больше чем та, которая необходима для блокирования симметричных каналов [Borisova et al., 1979; Борисова, Ермишкян, 1984 а].

Исследование проводимости при действии алкильных производных амфотерицина В с одной стороны мембраны показало, что на всех алкильных производных, кроме метамфоцина, в нейтральных pH не удается зарегистрировать одиночных каналов. После добавки антибиотиков в концентрации до $1 \cdot 10^{-5}$ М с одной стороны при повышенной концентрации холестерина в мемbrane (фосфолипид:холестерин 2:1) проводимость мембран не изменялась в течении 40 мин, в то время как при двустороннем введении антибиотиков в сравнительно меньших концентрациях (в 100-1000 раз), одиночные

каналы наблюдались спустя 5-10 мин [Kasumov et al., 1979]. Метиловый эфир амфотерицина В и N-ацетил амфотерицин В в соответствующих рН, когда нейтрализованы оба заряда, также не образуют одиночных каналов с одной стороны мембранны даже при концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М. Исключение составляет метамфоцин. Это единственное производное, которое вызывает дискретные изменения проводимости при введении его с одной стороны мембранны. На рис. 8.4.4 приведены сравнительные записи одиночных метамфоциновых каналов при двухсторонней и односторонней модификации мембран. Проводимость, селективность и характер поведения одиночных каналов при одностороннем действии метамфоцина на мембрану оставались такими же, как и при двухстороннем введении этого антибиотика.

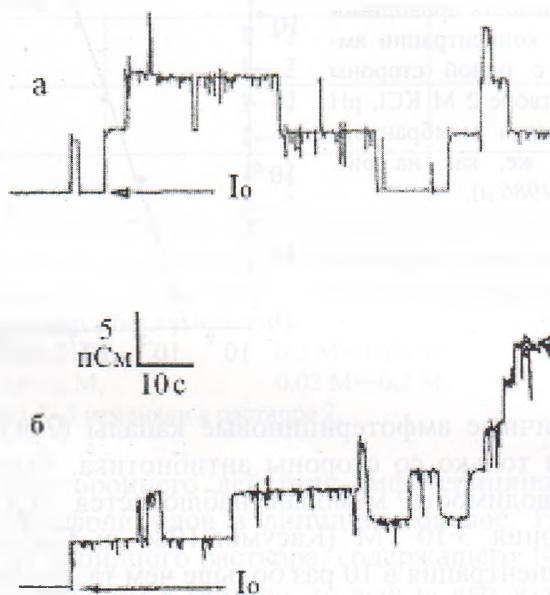


Рис. 8.4.4. Дискретные изменения мембранного тока в присутствии метамфоцина. а – метамфоцин с обеих сторон мембранны при концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ М; б – метамфоцин с одной стороны мембранны при концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М. Мембранны формировали из фосфолипидов мозга с холестерином в водном растворе 2 М KCl, рН 6,5, $t=23^{\circ}\text{C}$. Весовое соотношение фосфолипид:холестерин 20:1. Потенциал на мемbrane 200 мВ [Касумов, 1986 а].

Данные по одностороннему действию амфотерицина В и его производных показывают, что антибиотики, у которых полностью отсутствуют заряды (в соответствующих рН) на аминных и карбок-

сильных группах молекул, не образуют каналы. Вероятность образования полной поры (канала) из полупор очень невелика. Односторонний эффект метамфоцина, по-видимому, связан с повышенной проницаемостью через мембрану молекул этого производного в силу того, что полное метилирование полярных групп делает молекулу более липофильным [Касумов, 1986 а].

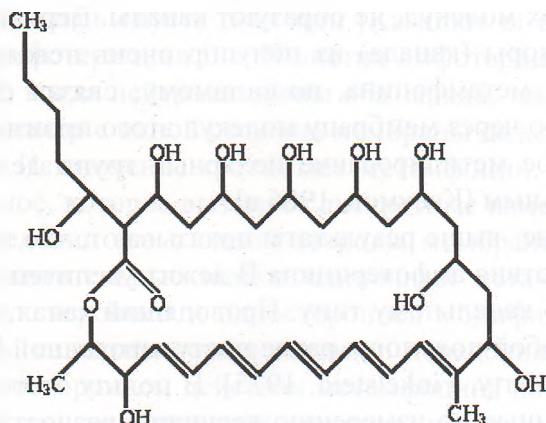
Приведенные выше результаты показывают, что в основе одностороннего действия амфотерицина В лежит увеличение проводимости мембран по канальному типу. Проводящий канал, по-видимому, представляет собой полупору, ранее постулированной Марти и Финкельштейном [Marty, Finkelstein, 1975]. В пользу этого предположения говорят данные по измерению величины разности потенциалов на градиент проникающего иона, блокированию тетраэтиламмонием асимметричных каналов только со стороны антибиотика, а также несимметричные вольтамперные характеристики мембран при односторонней модификации амфотерицином В [Касумов, 1986 а; Ибрагимова и др., 2003].

Независимость числа каналов от концентрации холестерина в мембране при фиксированной концентрации амфотерицина В показывает, что молекулы холестерина, по-видимому, не формируют проводящие каналы в комплексе с антибиотиком, а создают необходимые условия для сборки каналов из нескольких молекул амфотерицина В [Wolf, Hartsel, 1995; Milhaud et al., 1997; Ruckwardt et al., 1998].

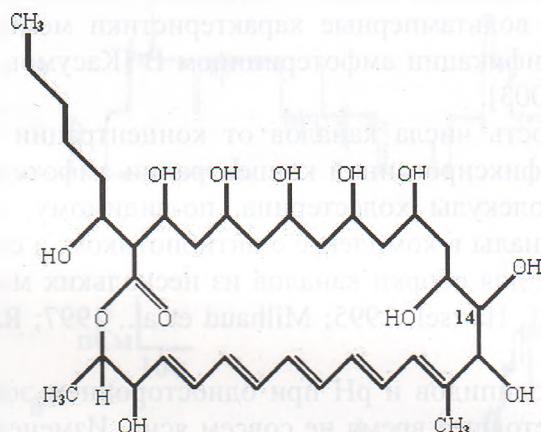
Роль фосфолипидов и рН при одностороннем эффекте амфотерицина В в настоящее время не совсем ясна. Изменение концентрации фосфолипидов и величины рН может влиять на физическое состояние липидного бислоя и тем самым на пространственную ориентацию и упаковку молекул антибиотика относительно плоскости мембранны.

8.5. Исследование интегральной проводимости и избирательности бислойных мембран, модифицированных ПА с различной структурой молекул

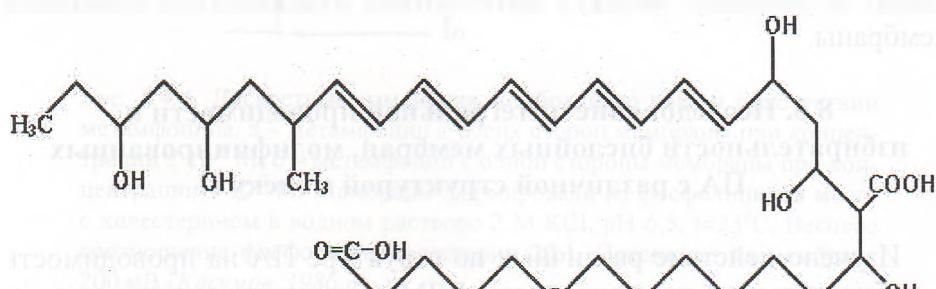
Изучено действие различных по структуре ПА на проводимость и избирательную проницаемость БЛМ. Структура исследованных антибиотиков приведена на рис. 8.5.1. Указанные на рис. 8.5.1 антибиотики оказались мембраноактивными соединениями, отличающимися по своей эффективности и избирательной проницаемости.



(C₃₅H₅₈O₁₁) ФИЛИПИН

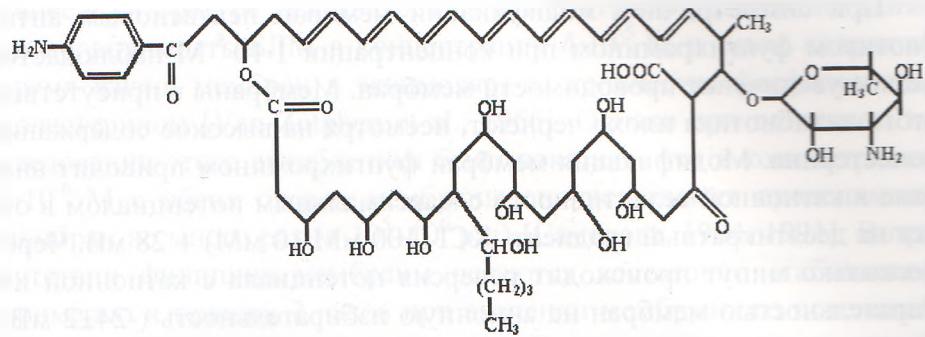


(C₃₅H₅₈O₁₂) ФУНГИХРОМИН (ЛАГОЗИН, КОГОМИЦИН)

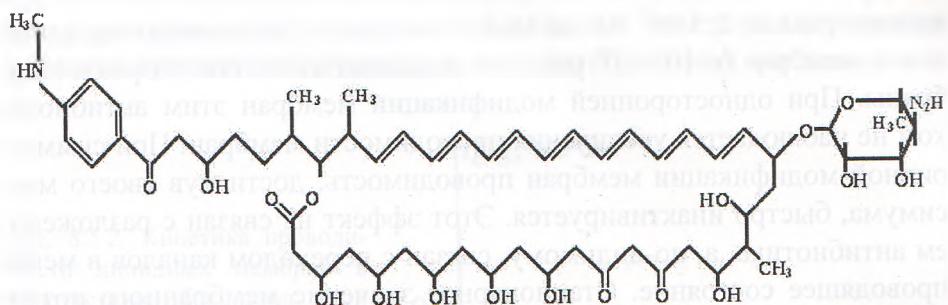


ГАНИБАЛЛИЦИН (ЛИА-0323)

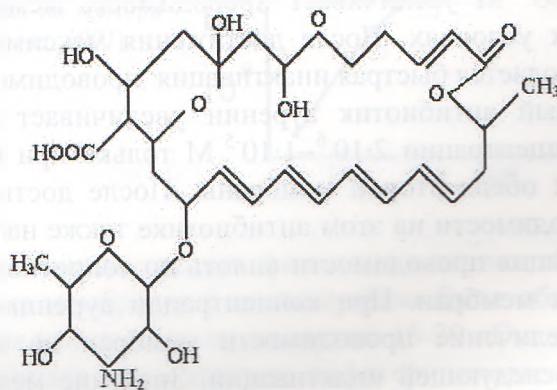
Рис. 8.5.1. Химическая структура филипина, фунгихромина,



$(C_{60}H_{91}N_2O_{19})$ ФЛАВУМИЦИН А



$(C_{59}H_{83}N_2O_{17})$ ПЕРИМИЦИН А (АНТИБИОТИК 1968, АНТИБИОТИК NC-1968, АМИНОМИЦИН, ФУНГИМИЦИН)



$(C_{33}H_{47}NO_{14})$ ПИМАРИЦИН (ТЕННЕЦИТИН)

ганибаллицина (ЛИА-0323), флавумицина А, перимицина А и пимарицина.

При симметричной модификации мембран пентаеновым антибиотиком фунгихромином при концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М наблюдается резкое увеличение проводимости мембран. Мембранны в присутствии этого антибиотика плохо чернеют, несмотря на высокое содержание холестерина. Модификация мембран фунгихромином приводит вначале к катионной селективности с максимальным потенциалом в ответ на десятикратный градиент KCl (100 мМ:10 мМ) + 28 мВ. Через несколько минут происходит реверсия потенциала с катионной избирательностью мембран на анионную избирательность (-24 ± 2 мВ). В этот момент времени мембрана становится преимущественно избирательной для анионов [Самедова, 1991; Касумов и др., 1984 б, 1985].

Другой пентаеновый антибиотик ганибаллицин (ЛИА-0323) при концентрациях $2,5 \cdot 10^{-5}$ М на много порядков увеличивает проводимость мембран (в 10^5 – 10^6 раз), когда находится по обе стороны мембранны. При односторонней модификации мембран этим антибиотиком не наблюдается увеличения проводимости мембран. При симметричной модификации мембран проводимость, достигнув своего максимума, быстро инактивируется. Этот эффект не связан с разложением антибиотика, а, по-видимому, связан с переходом каналов в менее проводящее состояние. Стационарное значение мембранныного потенциала в ответ на десятикратный градиент концентрации KCl соответствует преимущественно катионной избирательности ($+24 \pm 2$ мВ).

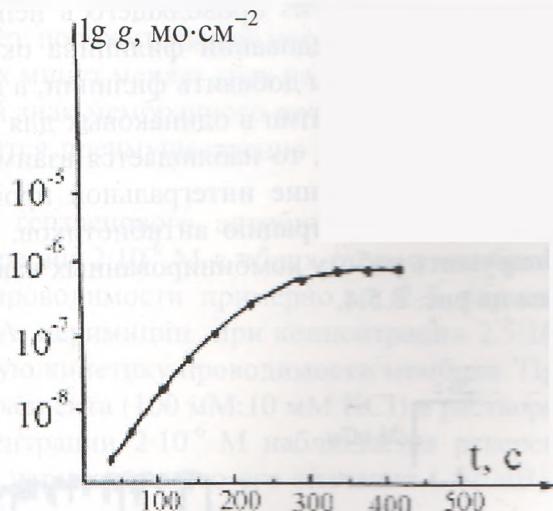
Аналогично ганибаллицину (ЛИА-0323), пентаен 0690 при концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М увеличивает проводимость мембран только в симметричных условиях. После достижения максимальной проводимости наблюдается быстрая инактивация проводимости мембран.

Пентаеновый антибиотик ауренин увеличивает проводимость мембран в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ М только при наличии этого антибиотика с обеих сторон мембранны. После достижения максимальной проводимости на этом антибиотике также наблюдается быстрая инактивация проводимости вплоть до сопротивления немодифицированных мембран. При концентрации ауренина $> 10^{-5}$ М наблюдается увеличение проводимости мембран до стационарного уровня без последующей инактивации. Значение мембранныго потенциала на десятикратный градиент проникающего иона составляет величину -17 ± 1 мВ.

Исследована кинетика проводимости и избирательная проницаемость мембран в присутствии пентаенового антибиотика филипина.

Ранее в литературе указывалось на тот факт, что филипин не влияет на проводимость БЛМ в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ М и резко сокращает время жизни мембран в эквивалентном количестве фосфолипида с холестерином [Van Zutphen et al., 1966]. Однако при детальном исследовании этого антибиотика было показано, что в концентрациях $2 \cdot 10^{-6}$ М с обеих сторон мембранны он увеличивает проводимость мембран во много раз (в 10^5 - 10^6 раз) [Самедова, 1984, 1991]. В присутствии филипина мембранны остаются достаточно стабильными примерно в течение 2 часов при значении мембранныного потенциала 200 мВ. Филипин неэффективен при введении его в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ М с одной стороны мембранны. Для филипина выявлена монотонная кинетика увеличения проводимости мембран с выходом на стационарный уровень проводимости без последующей ее инактивации [Самедова, 1991]. На рис. 8.5.2 показана типичная кинетика нарастания проводимости мембран, модифицированной филипином.

Rис. 8.5.2. Кинетика проводимости липидных мембран в присутствии филипина при концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М. Состав мембранны – фосфолипид:холестерин 2:1 в весовом соотношении. 2М KCl, pH 7,0, t=22°C. Потенциал на мемbrane 200 мВ [Самедова, 1991].



При малых концентрациях филипина в водном солевом растворе ($1 \cdot 10^{-8}$ М) на мембранных с холестерином были обнаружены одиночные ионные каналы с проводимостью 15-20 пСм, что примерно в 3-4 раза превышает проводимость амфотерициновых каналов. Экспериментальная запись одиночных филипиновых каналов приведена на рис. 8.5.3. [Самедова, 1991].

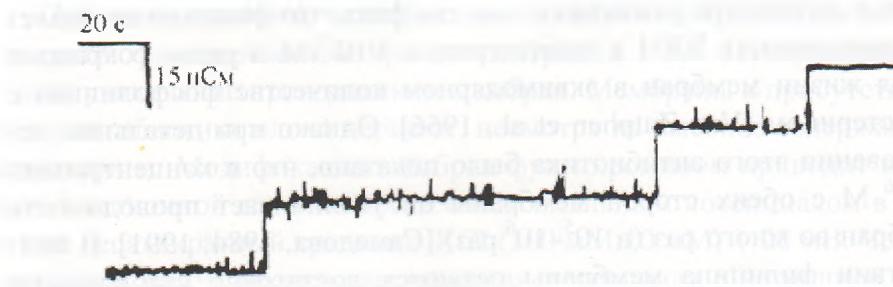


Рис. 8.5.3. Одиночные филипиновые каналы в фосфолипидных мембранах. Состав мембранны – фосфолипид:холестерин 20:1 в весовом соотношении. 2М KCl, pH 7,0, t=22°C. Потенциал на мемbrane 200 мВ. Концентрация филипина - $2 \cdot 10^{-8}$ М [Самедова, 1991].

Из рис. 8.5.3 видно, что филипиновые каналы, как и амфотерициновые, имеют два основных состояния: проводящее и непроводящее. За время жизни канала в мемbrane видны редкие кратковременные переходы из проводящего в непроводящее состояние. При дальнейшем исследовании филипина оказалось, что если с одной стороны мембранны добавить филипин, а по другую сторону амфотерицин В или нистатин в одинаковых для всех антибиотиков концентрациях ($1 \cdot 10^{-6}$ М), то наблюдается взаимодействие между антибиотиками и увеличение интегральной проводимости мембран. Резко уменьшив концентрацию антибиотиков, удалось экспериментально обнаружить работу комбинированных каналов, запись которой показана на рис. 8.5.4.

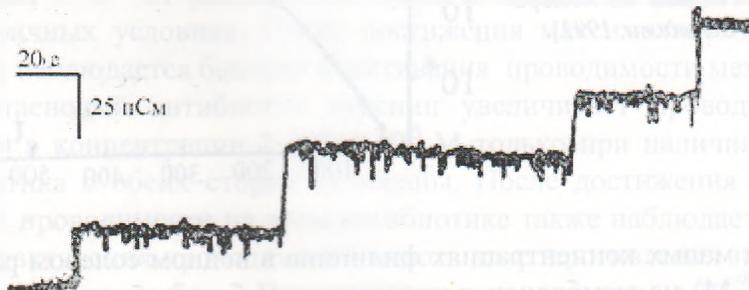


Рис. 8.5.4. Комбинированные каналы, образованные в липидных мембранны при одинаковых концентрациях филипина и амфотерицина В ($2 \cdot 10^{-8}$ М), введенные по разные стороны мембранны. Состав мембранны – фосфолипид:холестерин 20:1 в весовом соотношении. 2М KCl, pH 7,0, t=22°C. Потенциал на мемbrane 200 мВ [Самедова, 1991].

Проводимость комбинированных каналов филипина и амфотерицина В составляет 25-30 пСм, что в 1,5-2 раза выше "чистых" филипиновых каналов и, примерно, в 5 раз выше "чистых" амфотерциновых каналов. Избирательная проницаемость филипиновых каналов преимущественно катионная. В ответ на создание 10-кратного градиента KCl на мембране наблюдается разность потенциалов величиной $+18 \pm 2$ мВ. В присутствии филипина не наблюдается реверсии мембранныго потенциала.

Гептаеновые антибиотики флавумицин А и В при концентрации $2,5 \cdot 10^{-6}$ М независимо друг от друга увеличивают проводимость мембран только при наличии их с обеих сторон мембранны. После достижения максимальной проводимости мембран наблюдалась инактивация вплоть до сопротивления немодифицированных мембран. При концентрации антибиотиков В $1 \cdot 10^{-5}$ М наблюдается быстрый рост проводимости мембран на несколько порядков ($10^4 - 10^5$) без последующей ее инактивации. При стационарном значении проводимости в ответ на градиент проникающего иона (100 мМ:10 мМ KCl) на мембране возникает положительный потенциал $+30$ мВ, который в течение нескольких минут меняет знак на противоположный (-35 ± 2 мВ). Отрицательный знак мембранныго потенциала говорит о том, что мембрана становится преимущественно избирательно проницаемой для ионов Cl⁻.

Исследование другого гептаенового антибиотика перимицина показало, что при концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М с обеих сторон мембранны наблюдалась увеличение проводимости примерно на 2-3 порядка. Как и некоторые другие ПА, перимицин при концентрации $2,5 \cdot 10^{-7}$ М индуцирует немонотонную кинетику проводимости мембран. При создании десятикратного градиента (100 мМ:10 мМ KCl) в растворах с перимицином при концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М наблюдается реверсия мембранныго потенциала с отрицательного его значения (-42 мВ) к положительному ($+48 \pm 2$ мВ).

Действие индивидуальных компонентов нистатина на проводимость бислойных мембран. Изучен механизм действия индивидуальных компонентов нистатина на проводимость и избирательную проницаемость мембран с холестерином. Нистатин был впервые выделен из культуры *Streptomyces albulus* [Hazen, Broun, 1950]. Нистатин, как и другие ПА, оказался по составу многокомпонентным. Исходный нистатин представляет собой смесь нескольких компонентов – A₁, A₂, A₃ и В [Малышкина и др., 1970 а, б; Шенин и др., 1980]. A₁ является основным компонентом этой антибиотической

смеси. Боровским установлена химическая структура для некоторых компонентов нистатина (рис. 8.5.5) [Боровский и др., 1977].

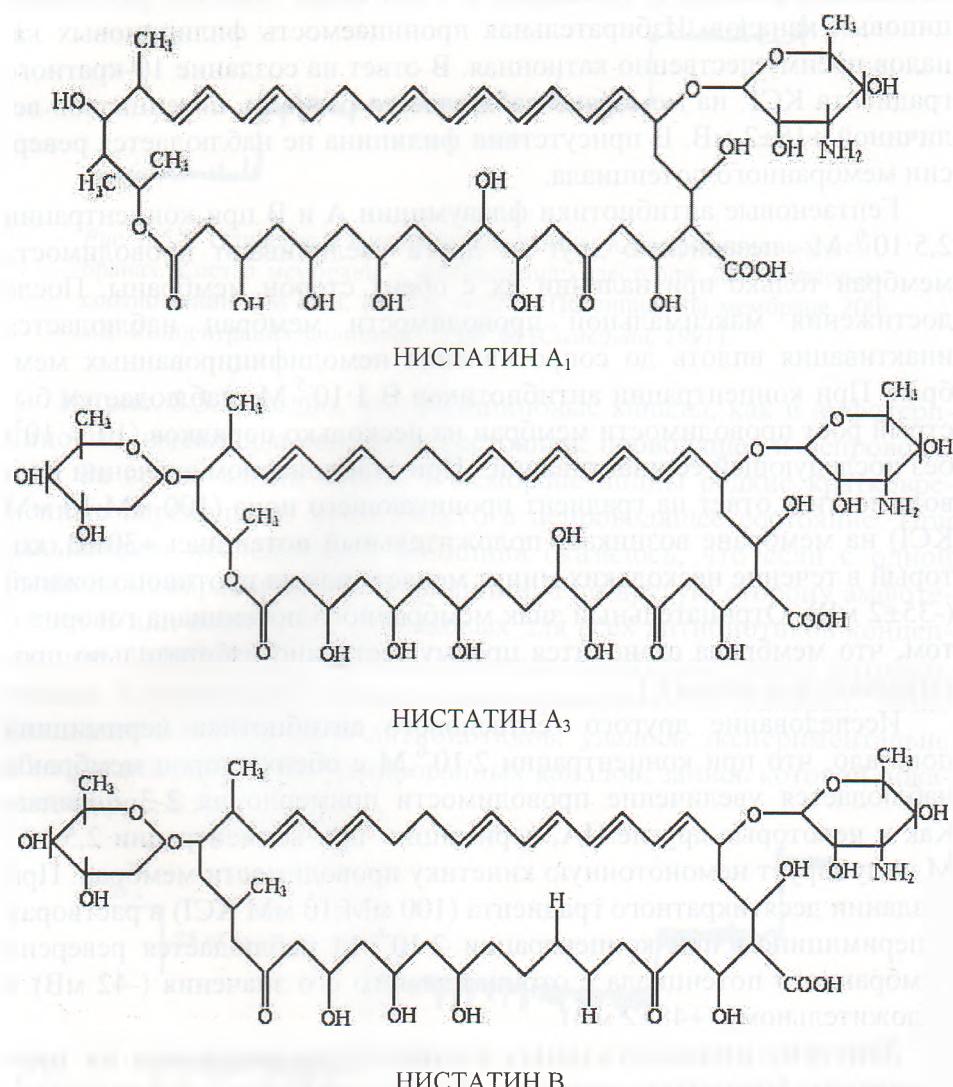


Рис. 8.5.5. Химическая структура индивидуальных компонентов нистатина.

Индивидуальные компоненты нистатина, также как и исходный нистатин, резко увеличивают проводимость мембран, которая растет пропорционально 8-10-ой степени концентрации антибиотиков [Самедова, 1984; Касумов и др., 1987]. Кинетика проводимости мембран

в присутствии индивидуальных компонентов нистатина может быть монотонной, что имеет место для нистатина A₁ и A₂, и немонотонной, что характерно для нистатина A₃ и B.

Все исследованные антибиотики оказались каналообразующими соединениями. На рис. 8.5.6 представлены характерные записи одиночных каналов в присутствии индивидуальных компонентов нистатина.

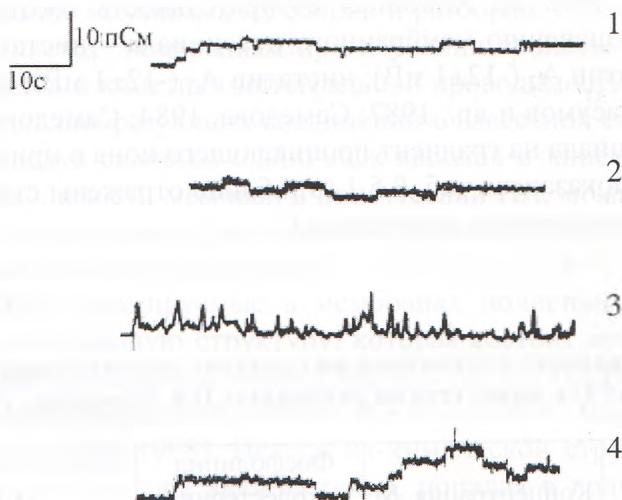


Рис. 8.5.6. Одиночные каналы индивидуальных компонентов нистатина в симметричных условиях с концентрацией $2 \cdot 10^{-8}$ М, 2М KCl, pH 6,8, t=22°С. Потенциал на мемbrane 200 мВ. Соотношение фосфолипид:холестерин 20:1. 1 – нистатин A₁; 2 – нистатин A₂; 3 – нистатин A₃; 4 - нистатин B [Касумов и др., 1987].

За время жизни канала в мембране наблюдаются обратимые переходы между проводящим и непроводящим состоянием. Для нистатина A₃ время жизни каналов в мембране намного меньше, чем для других компонентов. В данном случае для нистатина A₃ наблюдается потенциалзависимая сборка и разборка проводящих структур, т.е. в ответ на изменение мембранныго потенциала каналы могут обратимо включаться и выключаться. Несмотря на различие в структуре антибиотиков A₁ и A₃ со стороны гидрофобной части молекулы, они, находясь по разные стороны мембраны, взаимодействуют между собой, образуя проводящие ионные каналы. Одна полупора формируется из молекул A₁, а другая – из молекул A₃. Компоненты нистатина

индуцируют в мембранах преимущественно анионную селективность. Избирательная проницаемость мембран в присутствии нистатина A₂ и A₃ примерно одинакова и зависит от времени, однако величина их мембранных потенциала намного меньше, чем у нистатина A₁ и В. В момент создания десятикратного градиента по проникающему иону мембрана слабо проницаема для катионов щелочных металлов. С течением времени (~15-20 мин) на мемbrane наблюдается реверсия потенциала с катионной на анионную [Самедова, 1984; Касумов и др., 1975 а]. Анионная избирательность соответствует стационарному значению мембранных потенциала – нистатин A₁ (-31±2 мВ); нистатин A₂ (-12±1 мВ); нистатин A₃ (-12±1 мВ); нистатин В (-47±3 мВ) [Касумов и др., 1987; Самедова, 1984; Самедова, 1991]. Значения потенциала на градиент проникающего иона в присутствии различных ПА показаны в таб. 8.5.1 (в таблице отражены стационарные значения мембранных потенциала).

Таб. 8.5.1.

Значение мембранных потенциала на градиент проникающего иона (100:10 мМ KCl) в присутствии различных ПА [Самедова, 1991].

Антибиотик	Концентрация, М	Фосфолипид: холестерин (по весу)	Избирательность, мВ
Ауренин	1·10 ⁻⁵	2:1	-17±1
Флавумицин А	2·10 ⁻⁵	2:1	-35±2
Флавумицин В	3·10 ⁻⁵	2:1	-35±2
Ганибаллицин (ЛИА-0323)	2·10 ⁻⁷	2:1	+24±2
Пимарицин	2·10 ⁻⁶	2:1	-40±2
Фунгихромин	2·10 ⁻⁷	2:1	-24±2
Перимицин	1,5·10 ⁻⁶	2:1	+48±2
Нистатин A ₁	2·10 ⁻⁵	2:1	-31±2
Нистатин A ₂	1,5·10 ⁻⁵	2:1	-12±1
Нистатин A ₃	2·10 ⁻⁵	2:1	-12±1
Нистатин В	2·10 ⁻⁵	2:1	-47±3
Филиппин	2·10 ⁻⁵	2:1	+18±2

ГЛАВА 9. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА СБОРКИ И РАЗБОРКИ ПОЛИЕНОВЫХ КАНАЛОВ

9.1. Кинетическая модель сборки и разборки полиеновых каналов в липидных мембранах

Одной из фундаментальных задач при изучении функционирования ионных каналов в клеточных и модельных мембранах является исследование механизма их сборки и разборки. Решение этой задачи представляется возможным при изучении свойств одиночных ионных каналов и кинетики интегральной проводимости БЛМ в присутствии канaloобразующих соединений с известной структурой молекул. Исследуя свойства одиночных каналов и кинетику интегральной проводимости мембран в присутствии ПА, можно выяснить механизм молекулярной перестройки канального комплекса за время его существования в мембране.

Каналы, формируемые в мембранах полиенами, представляют собой молекулярную структуру, которая состоит из нескольких молекул антибиотика и стерина [Baginski et al., 1989, 1994, 1997 a,b, 2002; Bonilla-Marin et al., 1991; Fujii et al., 1997; Baginski, Borowski, 1997; Silberstein, 1998]. Исходя из химической структуры ПА, очевидно, что молекулы антибиотиков, попадая в водную фазу, стремятся занять энергетически выгодное состояние и образуют комплексы с минимумом свободной энергией. Причем эти комплексы формируются таким образом, что гидрофильные цепи молекул обращены в водную фазу, а гидрофобные цепи молекул разворачиваются внутрь молекулярного комплекса. В такой форме комплексы диффундируют к мембране и при взаимодействии с ней выворачиваются наизнанку, входят в мембрану и образуют канал, во внутренней полости которого оказываются гидрофильные цепи молекул. В то же самое время гидрофобные цепи, взаимодействуя с молекулами холестерина, обращаются в сторону липидной фазы. В мономолекулярной форме полиены не способны формировать проводящие для ионов и субстратов каналы в мембранах [Ибрагимова и др., 2003; Kasumov, Bolard, 2004; Ibragimova et al., 2006; Ибрагимова и др., 2006 б].

Ранее было показано, что в присутствии амфотерицина В и его метильного аналога метамфоцина наблюдаются два типа кинетики проводимости в липидных мембранах: монотонный и немонотонный [Kasumov, Malafriev, 1984 а; Малафриев и др., 1991; Ибрагимова и

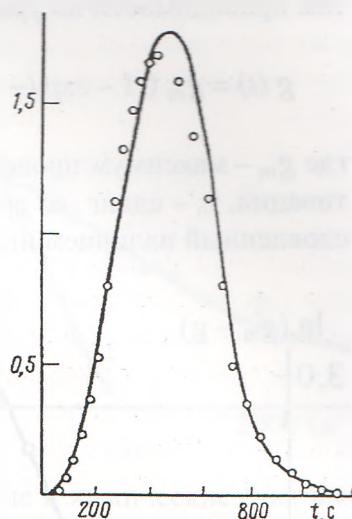
др., 2003; Ibragimova et al., 2006]. Было высказано предположение, что немонотонная кинетика связана со сборкой и последующей разборкой проводящего комплекса до непроводящих структур в мембране [Kasumov, Malafriev, 1984 а; Малафриев и др., 1991; Ибрагимова и др., 2003]. Концентрация антибиотика в мембране определяет скорость повторной сборки каналов и тип кинетики [Малафриев и др., 1991; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006]. В присутствии ароматического гептаенового антибиотика леворина также наблюдается немонотонная кинетика проводимости мембран, зависящая от концентрации антибиотика. Для объяснения немонотонной кинетики проводимости предложена качественная модель, в которой мембрана рассматривается как замкнутый реактор и предполагается, что канал имеет два непроводящих состояния, окружающих проводящее состояние [Ермишкин, 1976]. Описанная модель объясняет зависимость типа кинетики от констант скоростей и концентрации антибиотика, но количественного согласия с экспериментом не дает.

Важным этапом работы является построение динамической модели превращений полиенового ионного канала, количественно согласующейся с экспериментом. Численное моделирование и подбор параметров модели проводили на персональном компьютере. При этом использовали метод численного интегрирования жестких систем обыкновенных дифференциальных уравнений, предложенный Гиром [Gear, 1971]. Перевод системы процесса на язык дифференциальных уравнений выполнялся автоматически по разработанной программе, исходя из заданной кинетической модели. Подбор параметров производили путем минимизации суммы квадратов невязок по точкам на полулогарифмических аноморфозах расчетных и экспериментальных кривых проводимости мембран. При этом использовали несколько модифицированный метод минимизации суммы квадратов нелинейных функций Пауэлла [Powell, 1965]. Адекватность модели контролировалась проверкой гипотезы о нормальности распределения невязок по критерию согласия Романовского [Ахмедли и др., 1982, 1985].

На рис. 9.1.1 и 9.1.2 приведены типичные кинетические кривые изменения проводимости односторонне и двусторонне модифицированных мембран, соответствующие немонотонному типу кинетики. Эти кривые можно условно разделить на следующие участки:

1) индукционный период (рис. 9.1.3), характеризующийся ростом проводимости по степенному закону: $g(t) = at^3$ (9.1.1):

$$g \cdot 10^4, \text{ мо} \cdot \text{см}^{-2}$$



$$g \cdot 10^5, \text{ мо} \cdot \text{см}^{-2}$$

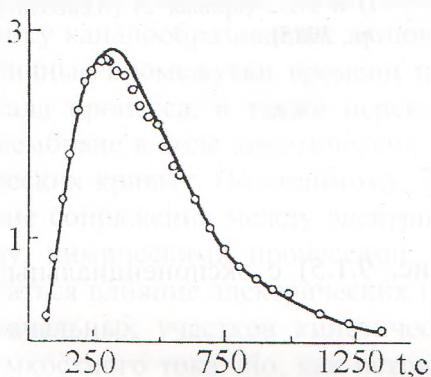


Рис. 9.1.2. Кинетика проводимости односторонне - модифицированной мембраны амфотерицином В. Концентрация антибиотика в водной фазе $3 \cdot 10^{-6}$ М, 10^{-2} М KCl, pH 3,0, $t=24^\circ\text{C}$. Фосфолипид:холестерин 2:1 (по весу). Точки – эксперимент, кривая – расчетные данные [Ахмедли и др., 1985].

$$\sqrt[3]{g}, (\text{мо} \cdot \text{см}^{-2})^{1/3}$$

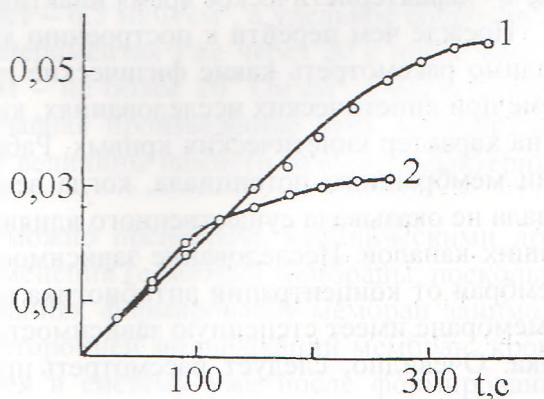


Рис. 9.1.3. Индукционные участки кинетических кривых, представленных на рис. 9.1.1 (кривая 1) и 9.1.2 (кривая 2) [Ахмедли и др., 1985].

2) активационный участок (рис. 9.1.4), характеризующийся ростом проводимости по уравнению:

$$g(t) = g_m \left(1 - \exp \left(-\frac{t - \tau_0}{\tau_a} \right) \right) \quad (9.1.2)$$

где g_m – максимум проводимости, τ_a – характеристическое время активации, τ_0 – сдвиг во времени начала активационного участка, обусловленный наличием индукционного участка;

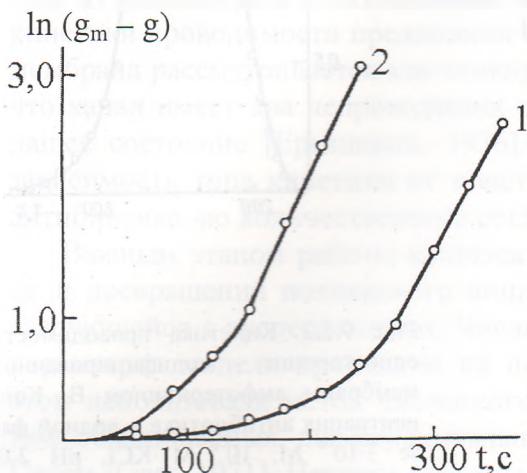


Рис. 9.1.4. Активационные участки кинетических кривых, представленных на рис. 9.1.1 (кривая 1) и 9.1.2 (кривая 2) [Ахмедли и др., 1985].

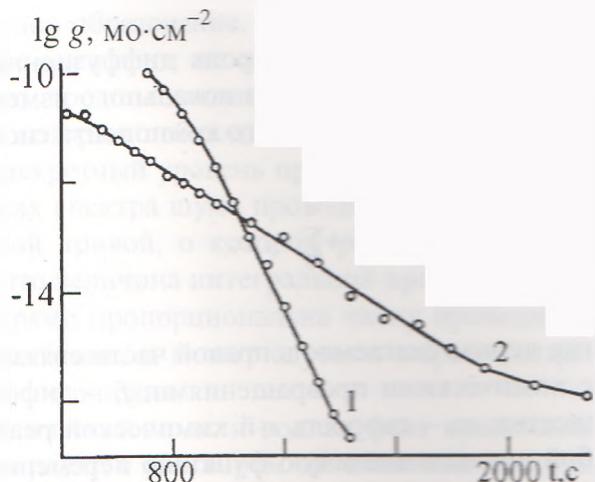
3) инактивационный участок (рис. 9.1.5) с экспоненциальным спадом проводимости:

$$g(t + \Delta t) = g(t) \exp \left(-\frac{\Delta t}{\tau_i} \right) \quad (9.1.3)$$

где τ_i – характеристическое время инактивации.

Прежде чем перейти к построению динамической модели, необходимо рассмотреть какие физические процессы происходят в системе при кинетических исследованиях, как они влияют друг на друга и на характер кинетических кривых. Работа велась в режиме фиксации мембранныго потенциала, когда величина мембранныго потенциала не оказывала существенного влияния на формирование проводящих каналов. Исследование зависимости удельной проводимости мембран от концентрации антибиотика показало, что число каналов в мембране имеет степенную зависимость от концентрации антибиотика. Очевидно, следует рассмотреть процессы следующих типов:

Рис. 9.1.5. Инактивационные участки кинетических кривых, представленных на рис. 9.1.1 (кривая 1) и 9.1.2 (кривая 2) [Ахмедли и др., 1985].



электрические, механические, диффузионные и химические. Как выяснилось в результате дополнительных исследований, электрические процессы в системе не оказывают определяющего влияния на кинетику каналообразования: включение электрического поля через различные промежутки времени после формирования мембранны и начала процесса, а также переключения полярности напряжения на мембране в ходе кинетических измерений не влияют на ход кинетических кривых. По-видимому, это доказывает практическое отсутствие сопряжения между электрическими и, определяющими кинетику, химическими процессами. Единственное, в чем может заключаться влияние электрических процессов – это некоторое искажение начальных участков кинетических кривых вследствие протекания емкостного тока. Но, как нетрудно показать, и это влияние пренебрежимо мало из-за быстроты указанных процессов по сравнению с временами, характерными для кинетики. Действительно, удельная емкость мембранны составляет $\sim 0.5 \text{ мкФ}/\text{см}^2$, а удельное сопротивление мембранны в наших экспериментах уже через 20 с после начала процесса каналообразования – не более $10^7 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$. Соответствующая постоянная времени, равная произведению этих величин, составляла не более $\sim 5 \text{ с}$ (эти величины намного меньше характерных времен кинетики).

Аналогичным образом можно пренебречь механическими процессами, т.е. процессами изменения геометрии мембранны, поскольку при кинетических исследованиях формирование мембранны занимало не более $\sim 10 \text{ с}$, а при односторонней модификации мембранны, кроме того, антибиотик добавлялся в систему уже после формирования

мембранны.

Рассмотрим теперь роль диффузионных и химических процессов. Уравнение скорости локального изменения концентрации C некоторого i -го химического компонента системы имеет вид:

$$\frac{\partial}{\partial t} C_i = - \operatorname{div} f_i + \sum_r v_{ir} \omega_r, \quad (9.1.4)$$

где первое слагаемое в правой части связано с диффузией, а второе – с химическими превращениями; f_i – диффузионный поток i -го вещества; ω_r – скорость r -й химической реакции, представляющая собой полиноминальную функцию переменных (C); v_{ir} – стехиометрические коэффициенты. Если в уравнении (9.1.4) диффузионный поток через мембрану разложить на нормальную и латеральную составляющую, то в этом случае уравнение (9.1.4) будет иметь вид:

$$\frac{\partial}{\partial t} C_i = - \frac{\partial}{\partial z} f_{ni} - \operatorname{div}_i f_{ni} + \sum_r v_{ir} \omega_r, \quad (9.1.5)$$

Пренебрегая локальными флуктуациями концентраций, нетрудно показать, что латеральная диффузия может быть исключена из рассмотрения.

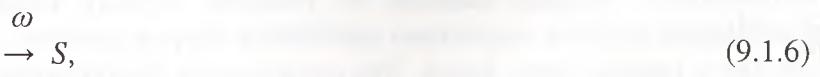
Таким образом, для моделирования кинетики проводимости может быть использована модель, описываемая целиком в терминах химических превращений, подчиняющихся закону действия масс. Тот факт, что кинетические кривые проводимости воспроизводятся, если антибиотик вводить в систему после предварительной инкубации мембранны в немодифицированном виде, а также при повторном введении антибиотика после первичной отмычки его из мембранны, позволяет утверждать, что кинетика проводимости не связана с процессами окисления липидных компонентов мембранны или другими необратимыми изменениями. Эти данные показывают, что бифазный характер проводимости обусловлен процессами взаимного превращения различных олигомерных форм антибиотика и их комплексов с компонентами БЛМ. Таким образом, для моделирования кинетики проводимости может быть использована динамическая модель.

При построении модели считалось, что за электрическую проводимость ответственна только одна из форм существования комплекс-

са в липидной фазе, т.е. одно образование, называемое проводящим ионным каналом, имеющее один и тот же состав, структуру и постоянную проводимость. Это предположение основано на опытах с одиночными каналами, в которых наблюдаются каналы единственного вида (только один дискретный уровень проводимости), а также на проведенных измерениях спектра шума проводимости на различных участках интегральной кривой, о котором речь пойдет ниже. Поэтому можно считать, что величина интегральной проводимости в любой момент времени прямо пропорциональна числу проводящих каналов, имеющихся в мембране, и может служить мерой концентрации соответствующего соединения.

При построении кинетической модели водная фаза представляется как бесконечный резервуар с раствором антибиотика постоянной концентрации. Так как объем водной фазы, окружающей мембрану, намного больше объема липидной фазы самих мембран, то первая может рассматриваться как система с постоянной концентрацией различных форм антибиотика. Концентрации же олигомерных и мономерных форм антибиотика в липидной фазе в начальный момент времени равны нулю. Таким образом, в качестве переменных модели выбираются концентрации различных форм антибиотика в липидной фазе, а самая первая стадия процесса с необходимостью представляется реакцией нулевого порядка с условной константой скорости ω , зависящей от концентрации антибиотика в водной фазе как параметра.

Из уравнения (9.1.1) следует, что в течение индукционного периода скорость образования ионных каналов лимитируется последовательностью либо одной реакции нулевого, либо двух реакций первого порядка. Выбор первого варианта предпочтителен, поскольку он приводит к меньшему числу компонентов и констант скоростей, в то время как никаких физических соображений для выбора второго варианта не было. Таким образом, модель индукционного периода включает следующие реакции:



где S – предшественник ионного канала, а C – проводящий канал. Эта модель приводит к следующей кинетике проводимости в индук-

ционном периоде:

$$C = \frac{1}{3} \omega^2 k_2 t^3 + O(t^5), \quad (9.1.8)$$

в полном соответствии с уравнением 9.1.1 (здесь и далее для обозначения концентраций в математических выражениях используются те же символы, что и для обозначения соответствующих компонентов в схемах превращений). Концентрация предшественника канала стремится к стационарному значению:

$$\hat{S} = (\omega / 2k_2)^{1/2} \quad (9.1.9)$$

Согласно уравнению (9.1.2), распад каналов происходит по реакции первого порядка. Дополнив реакции (9.1.6) и (9.1.7) реакцией:



получим модель периода активации. В этой модели характеристическое время активации $\tau_a = 1/k_3$, продолжительность лаг-периода определяется по формуле:

$$\tau_o = (2\omega k_2)^{-1/2}, \quad (9.1.11)$$

а максимальная проводимость g_m пропорциональна достигаемой по этой модели стационарной концентрации каналов:

$$\hat{C} = \omega / 2 k_3 \quad (9.1.12)$$

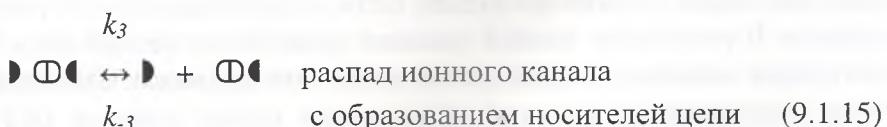
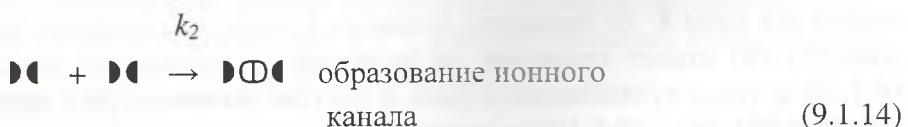
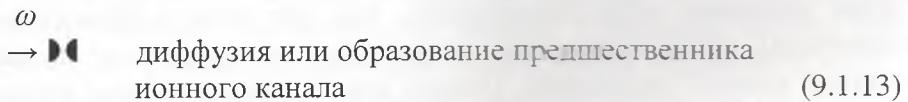
Уравнение (9.1.2) при этом получается как решение соответствующей задачи Коши при начальных условиях $C(0) = 0$.

Кинетика инактивации проводимости, согласно уравнению 9.1.3, соответствует распаду каналов по реакции первого порядка при практически полном отсутствии процессов сборки каналов, преобладающих в первых двух фазах. Это объясняется протеканием некоторой реакции, шунтирующей процесс образования каналов по реакции (9.1.8). Так как в первых двух фазах кинетики, скорость этой шунтирующей реакции пренебрежимо мала, следует предположить, что она автокаталитическая либо цепная. Рассмотрим возможность

такой цепной реакции с точки зрения химических свойств ПА. В соответствии с химической структурой ПА в водной фазе образуются гидрофильные ассоциаты, в которых молекулы антибиотиков связаны гидрофобными взаимодействиями полиеновых цепочек, обращенных внутрь ассоциата, а их гидрофильные цепи обращены наружу, в водную среду. Такие ассоциаты, представляющие собой вывернутые наизнанку гидрофильные ассоциаты, должны быть более устойчивыми в водной фазе. Переход гидрофильных ассоциатов из водной фазы в липидную (такой переход наблюдается в эксперименте) должен перевести гидрофильные ассоциаты в термодинамически более выгодную конформационную форму. Однако прямое такое превращение, состоящее в выворачивании ассоциатов наизнанку, может быть кинетически сильно затруднено. Все же оно, по-видимому, возможно благодаря последовательным стадиям реакций, в процессе которых образуется проводящая структура. В частности, возможна агрегация гидрофильных ассоциатов с образованием связей по реакции (9.1.8) и последующим разрывом гидрофобных связей по реакции (9.1.11). Не исключается, что в результате такого превращения образуются свободные молекулы антибиотика или ассоциаты, имеющие амфи菲尔ный характер. Они могут активно взаимодействовать с гидрофильными ассоциатами по цепному механизму, резко облегчающие их превращение в гидрофобные и тем самым шунтирующие реакцию образования проводящих структур.

Приведенные соображения позволяют предложить следующую схему процесса сборки и разборки ионных каналов:

Инициация цепи:



Продолжение цепи:



Обрыв цепи:



В символах ассоциатов на схеме гидрофобная поверхность изображена дугой “лука”, а гидрофильная – “тетивой”.

Рассмотрим, каким образом эта модель приводит к инактивационной кинетике. Если константы k_3 и k_4 достаточно малы, то в течение некоторого времени от начала процесса будет происходить монотонный рост концентрации предшественника канала S и самих ионных каналов C , обусловленной протеканием реакций (9.1.13.) – (9.1.15). Кинетические кривые роста указанных концентраций имеют вид кривых насыщения, причем, в соответствии с выражениями (9.1.9) и (9.1.12), концентрация предшественника стремится к предельному значению $(\omega/2k_2)^{1/2}$, а концентрация каналов – к предельному значению $\omega/2k_3$. Естественно, что при этом и проводимость мембранны, пропорциональная количеству каналов, растет по монотонной кривой насыщения. Однако как бы мала ни была величина константы k_4 , непрерывное накопление в системе по реакции (9.1.15) носителей цепи D со временем приведет к тому, что скорость реакции (9.1.16) станет сравнима по величине со скоростью реакции (9.1.14) и тогда существенную роль в системе начнет играть цепной процесс (9.1.16) – (9.1.17), в дальнейшем ускоряющийся под действием всех новых порций носителей цепи, образующихся при распаде каналов. В результате цепной реакции происходит резкий спад концентрации канального предшественника. Это приводит к почти полному прекращению реакции образования новых каналов (9.1.14). Начиная с этого момента, накопленные в системе ионные каналы

могут только распадаться по реакции (9.1.15) вплоть до достижения стационарного уровня, обусловленного обратимостью этой реакции [Ахмедли и др., 1985].

Проведенные рассуждения, конечно, носят качественный характер. К сожалению, громоздкость системы дифференциальных уравнений, описывающей данную модель, не позволяет провести строгий математический анализ. Однако численное моделирование при помощи персонального компьютера полностью подтверждает это качественное рассмотрение.

Зависимость типа кинетики от концентрации антибиотика регулируется величиной условной константы скорости нулевого порядка ω . Как было показано выше (см. соотношение 9.1.12), величина максимальной проводимости при немонотонной кинетике g_m пропорциональна величине ω . В то же время вследствие обратимости реакций (9.1.15), (9.1.17) и (9.1.18) и линейной зависимости между стационарной концентрацией компонента \bullet и величиной ω стационарная проводимость g_s зависит от ω как ω^a , где a в зависимости от соотношения констант может принимать любые значения в интервале от 1 до 4. Таким образом, рост стационарного уровня проводимости при увеличении концентрации антибиотика в водной фазе может опережать рост максимального уровня проводимости, обеспечивая переход к монотонному типу кинетики [Ахмедли и др., 1985].

Механизм процесса, приведенный на схеме (9.1.13-9.1.19), как было указано выше, использовался для численного моделирования кинетики проводимости. В результате подгонки констант скоростей по кривым на рис. 9.1.1 и 9.1.2 в обоих случаях достигнуто согласие опытных и расчетных данных в пределах экспериментальной ошибки при нормальном распределении невязок. Описанная модель для кинетической кривой подтверждена результатами численного моделирования с определением значений констант скоростей переходов между состояниями канала. Вычислены оптимальные значения констант, соответствующие рис. 9.1.1, которые оказались следующими:

$$\begin{array}{ll} \omega = 2 \cdot 10^{-21} \text{ моль} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1} & k_5 = 7 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1} \\ k_2 = 1,8 \cdot 10^{15} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} & k_{-5} = 5 \cdot 10^{15} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} \\ k_3 = 10^{-2} \text{ с}^{-1} & k_{-6} = 7 \cdot 10^{16} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} \\ k_{-3} = 5 \cdot 10^{11} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} & k_{-6} = 10^{-3} \text{ с}^{-1} \\ k_4 = 8 \cdot 10^{22} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} & k_7 = 1 \text{ с}^{-1} \end{array}$$

Предлагаемая модель – не единственно возможная для описания полученных экспериментальных данных. Однако в любой другой

модели, по-видимому, должны сохраняться основные принципы, положенные в основу рассматриваемой выше модели, в частности, наличие цепной либо другой автокаталитической реакции, шунтирующей процесс образования проводящих структур. Таким образом, формирование канала представляет собой многостадийный процесс, определяющий кинетику интегральной проводимости мембран.

9.2. О кинетических свойствах полиеновых каналов в условиях инактивации

В главе 8 экспериментально показано существование двух типов кинетики проводимости, индуцированной ПА в БЛМ - монотонный и немонотонный. Наблюдаемый тип кинетики зависит от рН, температуры, стеринового состава мембраны и концентрации антибиотика. Предполагается, что немонотонная кинетика обусловлена переходом канала из проводящего состояния в новое непроводящее состояние, характеризующееся выходом из канального комплекса одного или нескольких мономеров антибиотика (разборка канала). В рамках линейной модели канала с тремя состояниями показана возможность регулирования типа кинетики концентрацией антибиотика и константами скоростей переходов между состояниями каналов [Касумов и др., 1984 а]. Единственность проводящего состояния канала подтверждается тем, что спектры флуктуаций проводимости, снятые на различных участках кинетики, совпадают, а распределение времени жизни проводящего состояния экспоненциально [Малафриев др., 1991]. Распределение времени жизни непроводящего состояния канала отлично от экспоненты. Это значит, что непроводящее состояние представляет собой суперпозицию нескольких элементарных непроводящих состояний. Расчет зависимости проводимости от времени на активационной и инактивационной ветви кинетики, выполненный согласно модели, дает результаты, соответствующие эксперименту. Принятая модель ионного канала позволяет также объяснить свойства кинетики релаксации проводимости БЛМ при отмыке антибиотика: существование индукционного периода и зависимость постоянной времени релаксации от концентрации антибиотика. Модель ионного канала с тремя состояниями, как видно из сказанного, способна объяснить ряд экспериментальных фактов. Понятно, что предполагаемая модель является упрощенной, так как превращение антибиотика из мономера в олигомерный ионный канал должно включать много стадий и промежуточных форм анти-

биотика. Более сложные модели, которые могут объяснить широкий круг экспериментальных фактов, оказались недоступными для аналитического исследования. Поэтому был применен метод вычислительного эксперимента с использованием программы численного интегрирования кинетических уравнений с одновременным поиском значений констант скоростей, делающих минимальной отклонение вычисленной кинетики от эксперимента [Ахмедли и др. 1985]. Из исследованных моделей количественное согласие с экспериментом дали те, которые включали стадию обратимой потери канальным комплексом мономеров антибиотика. Это значит, что предложенная схема превращения ионного канала (модель с тремя состояниями) является существенным компонентом полного механизма сборки-разборки ионного канала.

Исследование кинетики релаксации проводимости БЛМ при отмыке антибиотика дает важную информацию о превращениях канального комплекса в мембране.

Изучение инактивации мембранный ионной проницаемости, индуцированной полиенами, весьма важно для практического применения антибиотиков. В работах Касумова и Малафриева исследовалась закономерности инактивации проницаемости в случае амфотерицина В и его метилированного производного метамфоцина [Касумов, Малафриев, 1982 а, б; Малафриев, 1985]. Была предложена модель, согласно которой инактивация обусловлена переходом каналов в устойчивую неактивную форму [Касумов, Малафриев, 1982 а, б; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006]. Проведенное исследование спектров электрического шума на разных участках немонотонной зависимости проводимости бислойных мембран от времени при модификации их метамфоцином, а также анализ времен жизни одиночных каналов, образованных этим антибиотиком, дают дополнительные данные в подтверждение предложенной модели.

Показано, что в случае метамфоцина интенсивность $1/f$ (фликкер) шума повышена на порядок по сравнению с исходным амфотерицином В [Малафриев и др., 1991]. Совпадение спектров флюктуаций, измеренных на разных участках изменения проводимости во времени (при ее росте, в максимуме и по достижении стационарного уровня), указывает на то, что за проводимость ответственна единственная форма канального комплекса.

Методики регистрации одиночных каналов и измерения спектральной плотности флюктуаций тока (проводимости) в системе многих каналов описаны в соответствующих разделах монографии (см.

главы 3 и 7). Укажем, что спектральную плотность измеряли также в условиях, при которых проводимость бислоя еще не достигала своего стационарного уровня. В таких случаях спектр равновесных флуктуаций (при нулевом напряжении) измеряли на металлопленочном резисторе с сопротивлением, равным среднему сопротивлению мембранны за время накопления сигнала. На бислой подавали напряжение $V=15\text{--}20$ мВ. Поскольку спектральная плотность флуктуаций пропорциональна квадрату напряжения на мембране, для удобства сравнения все данные приводили к 50 мВ умножением на $(50/V)^2$. Измеряли безразмерную величину

$$\varepsilon(f) = \frac{S_1(f) - S_{1e}(f)}{S_{1e}(f)} \quad (9.2.1)$$

где $S_1(f)$ – неравновесная, $S_{1e}(f)$ – равновесная ($V = 0$) спектральные плотности тока. Как уже обсуждалось в работах Безрукова и Ирхина [Безруков и др., 1979; Ирхин и др., 1984] во многих случаях удобно работать именно с этой величиной, поскольку для независимо работающих каналов она не зависит от площади и проводимости мембранны. Это позволяет непосредственно судить о надежности отделения избыточного шума от равновесного. Спектральная плотность флуктуаций определяется только динамикой, проводимостью каналов и приложенным к бислою напряжением [Безруков и др., 1979; Ирхин и др., 1984].

Записи тока через одиночный канал обрабатывали следующим образом. Составляли выборки времен пребывания канала в проводящем и непроводящем состояниях (объем выборки $n = 50\text{--}250$) и по известным методам статистики строили эмпирическую функцию распределения времен жизни (F). Далее сравнивали ее с теоретической F_T (экспоненциальной). Гипотезу о согласии теоретического и эмпирического распределения проверяли по критерию Смирнова. Если $\max |F - F_T| / \sqrt{n} > \lambda_\alpha$, то на уровне значимости α гипотеза отвергается. Для $\alpha = 0,05$ и $\alpha = 0,01$ соответственно $\lambda = 1,3581$ и $\lambda = 1,6726$. Для удобства кривые зависимости F строятся в спрямляющих координатах $l_n(1-F)$ – время.

При обработке спектра предполагалось, что он представляет сумму фликкер-компоненты (ε_F) и лоренцевой компоненты. Эти компоненты обусловливают переключения канала между открытым и закрытым состояниями. Так как параметры канала – проводимость

и времена жизни известны, то, вычитая из полного спектра вычисленный лоренциан, можно получить фликкер-шум в чистом виде. Поскольку $\epsilon_f = (\beta V^2/f)^\alpha$, где $\alpha \approx 1$, в логарифмических координатах разностный спектр спрямляется. Величины β и α (угловой коэффициент прямой) определяются методом наименьших квадратов.

Можно использовать и другой способ линеаризации спектров. Именно, так как:

$$\epsilon(f) = \left(\frac{A}{f}\right)^\alpha + \frac{B}{1 + (2\pi f\tau)^2},$$

то при $\alpha \approx 1$ и $(2\pi f\tau)^2 \gg 1$ величина $f^2 \epsilon$ есть линейная функция частоты:

$$f^2 \epsilon = Af + B/2\pi\tau^2$$

Методом наименьших квадратов определялись А и $B/2\pi\tau^2$, т.е. по отдельности вклад фликкер- и лоренцевой компонент.

Как следует из анализа экспериментов с различными модельными системами, компонента спектральной плотности электрического шума, пропорциональная $1/f$, по-видимому, связана с переключениями канала при его латеральном диффузионном движении в мембране [Ирхин, 1984; Безруков и др., 1979; Bezrukov et al., 1987]. Проведенные измерения показывают, что уровень $1/f$ шума для метамфоцина более чем на порядок превосходит таковой для исходного амфотерицина В (см. таблицу 9.2.1).

Таблица 9.2.1.

Параметры $1/f$ шума* для каналов амфотерицина В и его метильного аналога, pH 7,0 [Магафриев и др., 1991]

Соединение	α	β	Средне-квадратичное отклонение
Амфотерицин В	-	$1,9 \cdot 10^5 \text{ В}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	
Метамфоцин	1,026	$2,4 \cdot 10^6 \text{ В}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	0,031

* В используемом частотном диапазоне существенный вклад в спектр флюктуаций тока вносит лоренцевая компонента, генерируемая переходами каналов между открытым и закрытым состояниями. В случае амфотерицина В эта компонента доминирует [Безруков и др., 1979]. Поэтому спектры предварительно линеаризовали вычитанием лоренцевской компоненты с параметрами для амфотерицина В, хорошо согласующимися с данными работы Андреоли [Andreoli, 1973]. В результате спектральная плотность удовлетворительно описывалась соотношением $\epsilon(f) = (\beta V^2/f)^\alpha$.

Молекулярные массы и структуры амфотерицина В и метамфоцина очень близки, но амфотерицин В несет разноименные заряды на NH₂ и COOH группах. У метамфоцина сохранен только положительный заряд на аминогруппе. Согласно модели полиенового ионного канала, взаимодействие полярных групп соседних молекул антибиотика в канале стабилизирует его. Поэтому метамфоцин, несущий только один заряд, должен образовывать существенно менее стабильный канал, чем амфотерицин В. Макроскопически это проявляется в существовании инактивации проводимости, индуцированной метамфоцином. Явление инактивации может иметь место и в случае исходного антибиотика при сдвиге pH раствора в сильно кислую или щелочную область, когда амфотерицин теряет один из зарядов [Kasumov et al., 1979; Касумов, Малафриев, 1982 а; Малафриев, 1986]. Повышение уровня 1/f шума, обнаруженное для метамфоцина, может быть обусловлено именно этим свойством.

На рис. 9.2.1 *a* показано типичное эмпирическое распределение времени жизни для открытого (проводящего) состояния одиночного канала. Видно, что экспериментальные точки хорошо ложатся на прямую. Гипотеза об экспоненциальном распределении не отвергается

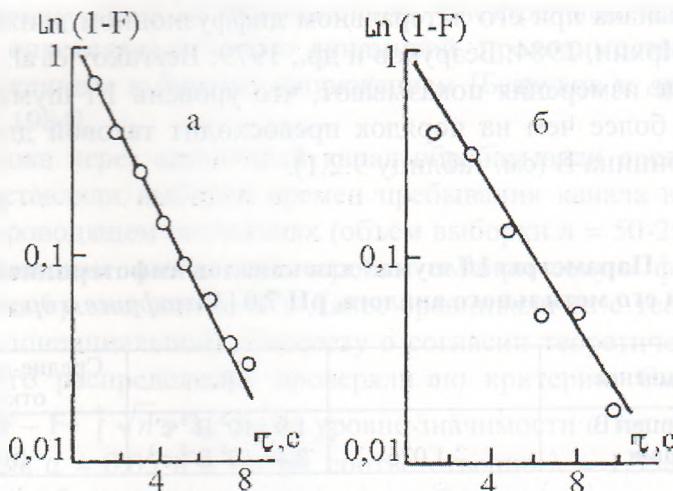


Рис. 9.2.1. Эмпирические функции распределения времен жизни одиночного канала. а – проводящее состояние (контроль), б – непроводящее. Обе функции построены в одном и том же эксперименте. Прямые проведены по методу наименьших квадратов. Состав мембранны - фосфолипид:эргостерин (20:1), антибиотик метамфоцин (10 нМ), солевой раствор 2 М KNO₃ [Малафриев и др., 1991].

на уровне значимости 0,01-0,05 (в различных экспериментах). Для непроводящего состояния разброс точек увеличивается (рис. 9.2.1 б), а проверка по критерию Смирнова отвергает на уровне значимости 0,01-0,05 гипотезу об экспоненциальном распределении. Переходы канала между формами канального комплекса образуют марковский случайный процесс, а потому время жизни каждой формы распределено по экспоненте. В случае, когда данному уровню проводимости (например, нулевому) соответствуют несколько различных форм канального комплекса, распределение времени жизни такого уровня проводимости, как показывает расчет, будет неэкспоненциальным [Малафриев, 1986]. Таким образом, имеется единственная форма, ответственная за проводимость, и имеются несколько непроводящих форм. Высказано предположение, что в ходе инактивации проводимости происходит разборка канала, сопровождающаяся последовательной потерей мономеров антибиотика внутри канального комплекса [Kasumov, Malafriv, 1984 а; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006].

Немонотонное изменение проводимости во времени, индуцированной метамфоцином, может быть связано: 1) с уменьшением проводимости канала; 2) с изменением его временных параметров - уменьшением времени нахождения канала в проводящем состоянии; 3) с существованием отдельной популяции инактивирующихся, расходящихся каналов и, наконец; 4) с уменьшением общего числа каналов без изменения свойств отдельного канала. Все указанные возможности, за исключением последней, должны приводить к различию спектров ε (f), измеренных на различных участках изменения проводимости. Так, если имеется особая популяция инактивирующихся каналов, спектр стационарного участка не будет содержать их вклада. Совпадение спектров (рис. 9.2.2) в пределах статистической ошибки указывает на то, что за проводимость бислоя ответственна единственная форма канала, а его кинетические свойства в частотном диапазоне, используемом для спектрального анализа, в процессе инактивации от времени не зависят.

Из сказанного выше следует, что процесс инактивации проводимости мембран связан с переходом канального комплекса из проводящего состояния в новое разобранное непроводящее состояние канала внутри мембранны. Разобранное состояние канала внутри мембранны можно считать новым – четвертым состоянием амфотерицинового канала, экспериментальное подтверждение которого будет показано в разделе (9.3).

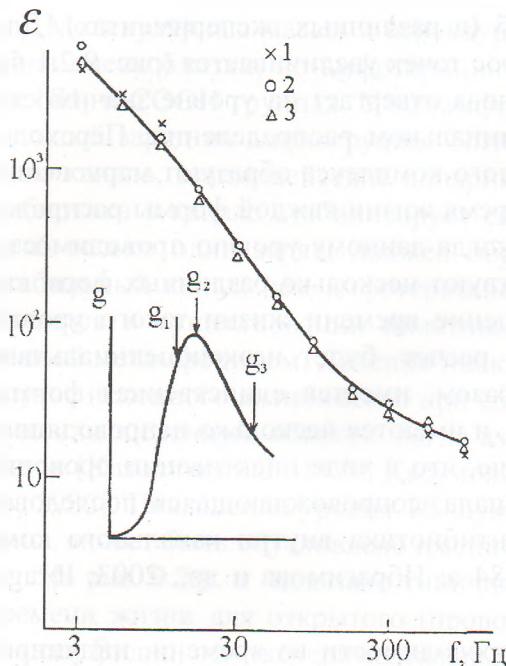


Рис. 9.2.2. Спектральная плотность шума, измеренная на участке роста проводимости (1), максимума (2) и инактивации (3) в присутствии метамфоцина ($5 \cdot 10^{-8}$ M) на мемbrane состава фосфолипид:холестерин (2:1). На вставке схематически показаны моменты начала измерений. Отношения проводимостей $g_1 : g_2 : g_3 = 0,8 : 1 : 5$ [Малафриев и др., 1991].

Спектры флюктуаций проводимости в присутствии метамфоцина в нестационарных условиях исследованы впервые. Их совпадение со стационарными спектрами показывает, что на всех участках кинетики проводимость обусловлена работой одних и тех же каналов. Вывод о единственности проводящего состояния подтверждается тем, что время пребывания одиночного канала в проводящем состоянии распределено по экспоненте. Функция распределения времени непроводящего состояния отлична от экспоненты, что указывает на множественность непроводящих состояний канала (ступенчатая разборка).

9.3. Доказательство существования четвертого состояния амфотерицинового канала

Исследование кинетики проводимости БЛМ от структуры каналаформирующих молекул позволяет судить о структурных перестройках ионного канала, вызывающих изменение проводимости мембран, о механизме их сборки и разборки и, наконец, о физико-химических свойствах ионных каналов внутри мембранны.

Использование ПА в качестве инструмента для подобного рода исследований важно потому, что позволяет детально разобраться

в молекулярных механизмах перестройки канального комплекса в зависимости от структуры молекул, формирующих канал, так и от условий внешней среды.

Амфотерицин В является основным представителем большого класса ПА, для которого установлена химическая структура. Несмотря на то, что амфотерицин В является самым эффективным лекарственным соединением в лечении глубоких системных микозов и широко используется в клинической медицине уже много десятилетий, однако механизм его действия на молекулярном уровне остается недостаточно изученным. Исследования на БЛМ показали, что амфотерицин В формирует в мембранах в комплексе с холестерином и другими чувствительными к нему стеринами трансмембранные поры-каналы молекулярных размеров [Касумов, 1986 а]. Физико-химические свойства полиеновых каналов изучены достаточно полно и даже предложена их структурно-конформационная модель [Andreoli, 1973; De Kruyff, Demel, 1974; Silberstein, 1998; Ибрагимова и др., 2006 б]. Однако динамические свойства, т.е. последовательность формирования олигомерной структуры каналов и их функционирование в мембранах изучены гораздо хуже. Ранее, на основе кинетических исследований, было показано, что индуцируемая амфотерицином В проводимость мембран растет по канальному типу [Kasumov, Malafriv, 1984 а; Малафриев и др., 1991]. Исследование физико-химических характеристик одиночных ионных каналов в мембранах, формируемых некоторыми ПА, показало, что полиеновые каналы характеризуются одним проводящим состоянием и по крайней мере двумя непроводящими состояниями [Kasumov et al., 1979]. За время жизни канала в мемbrane между ними наблюдаются большое число обратимых переходов [Ermishkin et al., 1977]. Химическая модификация полярных групп (аминной или карбоксильной) в молекуле амфотерицина В изменяет соотношение времен жизни канала в проводящем и непроводящем состояниях [Kasumov et al., 1979]. Блокирование или потеря одного из зарядов на полярных группах молекулы амфотерицина В резко уменьшает время жизни канала в проводящем состоянии [Kasumov et al., 1979]. Ясно одно, что химическая модификация полярных групп молекул амфотерицина В и других полиенов может дать важную информацию о свойствах ионных каналов в мембранах.

Исследования показали, что кроме указанных выше трех состояний канал может иметь еще одно – четвертое непроводящее разобранное состояние канального комплекса внутри мембраны. После

формирования проводящего одиночного канала он может перейти в непроводящее – разобранные состояния и повторная сборка канала и переход его вновь в проводящее состояние уже регулируется концентрацией антибиотика изнутри мембраны [Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006]. Важную информацию о механизме функционирования канального комплекса в мембранах можно получить с помощью кинетических и релаксационных экспериментов. В настоящей части монографии приведены результаты экспериментов по изучению кинетики интегральной проводимости мембран, а также кинетики релаксации проводимости мембран, содержащих амфотерицин В и его алкильные производные при их отмыкке из мембран.

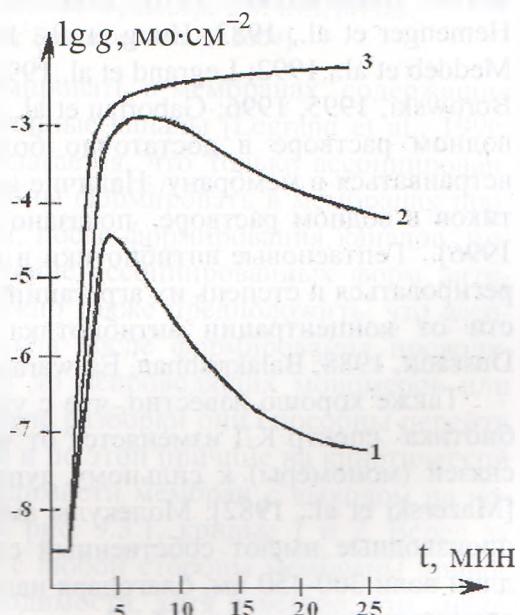
Для изменения условий, окружающих мембранны, использовали метод отмыкки антибиотика в градиенте плотности сахарозы (см. рис. 3.3.1). Для характеристики инактивации проводимости мембран, модифицированных антибиотиками различной структуры, т.е. для характеристики ее экспоненциального участка вводится постоянная времени релаксации (τ_r) – время убывания проводимости в e раз. Такая оценка времени инактивации проводимости достаточно информативна, ввиду независимости этой величины от площади мембраны при прочих фиксированных условиях.

Проводимость мембран, индуцированная амфотерицином В и его алкильными производными, пропорциональна числу каналов в данный момент времени. Было показано, что при исследовании проводимости мембран со многим числом каналов наблюдается немонотонная зависимость проводимости от концентрации алкильного производного амфотерицина В метамфоцина в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-8}$ М– $1 \cdot 10^{-7}$ М, рис. 9.3.1, кривые 1 и 2. Однако при концентрации $3 \cdot 10^{-7}$ М выше наблюдается только монотонный рост проводимости мембран, рис. 9.3.1, кривая 3. В начальный момент времени после введения антибиотика по обе стороны мембранны наблюдается формирование проводящих каналов, что сопровождается увеличением проводимости мембран, а спустя некоторое время (см. рис. 9.3.1, кривые 1 и 2), достигнув максимальной проводимости, происходит инактивация проводимости до некоторого стационарного значения. Здесь уместно отметить, что немонотонная кинетика не связана с процессами окисления липидных компонентов мембран или другими их необратимыми изменениями. Так, например, мембранны из окисленного холестерина [Pant, Rosenberg, 1971] в смеси с фосфолипидами под действием амфотерицина В имели ту же немонотонную характеристику, что и мембранны, полученные из смеси липидного

раствора исходного холестерина с фосфолипидами [Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006].

Предполагается, что наблюдаемая инактивация проводимости мембран может быть обусловлена тремя основными причинами: 1) уменьшением проводимости одиночных каналов; 2) уменьшением времени жизни канала в проводящем состоянии, и, наконец, 3) уменьшением общего числа проводящих каналов. Последняя версия является наиболее предпочтительной. В пользу этого говорят результаты, полученные при исследовании спектрального состава флуктуаций проводимости, индуцированной в липидном бислое метилированным аналогом амфотерицина В, который способен немонотонным образом менять во времени проводимость бислоя. Показано, что в случае метамфоцина интенсивность $1/f$ (фликкер) канального шума повышенна на порядок по сравнению с исходным амфотерицином В [Малафриев и др., 1991].

Рис. 9.3.1. Кинетика изменения проводимости липидных мембран от концентрации метамфоцина, при симметричном введении по обе стороны мембранны. Кривая 1 получена при концентрации метамфоцина $5 \cdot 10^{-8}$ М, кривая 2 - $1 \cdot 10^{-7}$ М, кривая 3 - $3 \cdot 10^{-7}$ М. Мембранны формировались из раствора фосфолипид:холестерин в весовом соотношении 2:1 в водных растворах, содержащих 2 М KCl, pH 6,5, $t=23^{\circ}\text{C}$. Формирование и измерение электрических характеристик мембран проводились при потенциале на мемbrane 100 мВ. Антибиотик вводился к мембранным при уже существующем на мемbrane потенциале [Ибрагимова и др., 2003].



Совпадение спектров флуктуаций, измеренных на разных участках изменения проводимости во времени - при ее росте, в максимуме и по достижении стационарного уровня указывает на то, что за проводимость ответственна единственная форма канального комплекса. В момент инактивации проводимости изменяется только число проводящих каналов в мембранах [Малафриев и др., 1991]. Для объяс-

нения экспериментально наблюдаемой двухфазной кинетики проводимости предполагается, что вначале роста проводимости происходит сборка каналов до проводящего состояния, а спад проводимости мембран связан с последующим распадом проводящего комплекса внутри мембраны до мономеров-димеров или других непроводящих структур. Оба типа кинетики могут быть реализованы в модели ионного канала с одним проводящим (промежуточным) и двумя непроводящими состояниями. Тип кинетики зависит от констант скоростей переходов между состояниями каналов. Конечное непроводящее состояние обусловлено разборкой ионного канала до непроводящих форм антибиотика, концентрация которых определяет скорость повторной сборки канала, а тем самым и наблюдаемый тип кинетики.

Показано, что ПА и их аналоги могут существовать в водных растворах электролитов как в мономерной, так и в ассоциированной форме [Вайнштейн, 1970; Ernst et al., 1981; Strauss, Cral, 1982; Hemenger et al., 1983; Hung et al., 1988; Mazerski et al., 1982, 1990; Meddeb et al., 1992; Legrand et al., 1992; Lambing et al., 1993; Mazerski, Borowski, 1995, 1996; Gaboriau et al., 1997 b]. Обе формы имеются в водном растворе в достаточно большом количестве и способны встраиваться в мембрану. Наличие ассоциированных форм антибиотиков в водном растворе показано с помощью КД [Legrand et al., 1996]. Гептаеновые антибиотики в водных растворах способны агрегироваться и степень их агрегации находится в прямой зависимости от концентрации антибиотика [Legrand et al., 1992; Gruda, Dussault, 1988; Balakrishnan, Easwaran, 1993].

Также хорошо известно, что с увеличением концентрации антибиотика спектр КД изменяется от четырех слабых положительных связей (мономеры) к сильному дуплету при 340 нм (олигомеры) [Mazerski et al., 1982]. Молекулы амфотерицина В и его алкильные производные имеют собственный спектр поглощения в интервале длин волн 300-450 нм, благодаря наличию в их молекулах конъюгированных двойных связей. Исследования спектра кругового дихроизма в присутствии алкильных производных амфотерицина В показали, что в спектрах КД, полученного с метамфоцином в концентрационном интервале $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ М был обнаружен дуплет, с увеличивающимися интенсивностями от $\Delta\epsilon = 130$ при 10^{-7} М до $\Delta\epsilon = 320$ при 10^{-8} М, рис. 9.3.2.

Следовательно, можно сказать, что при указанных концентрациях алкильные производные амфотерицина В находятся в ассоцииро-

МЕТАМФОЦИН

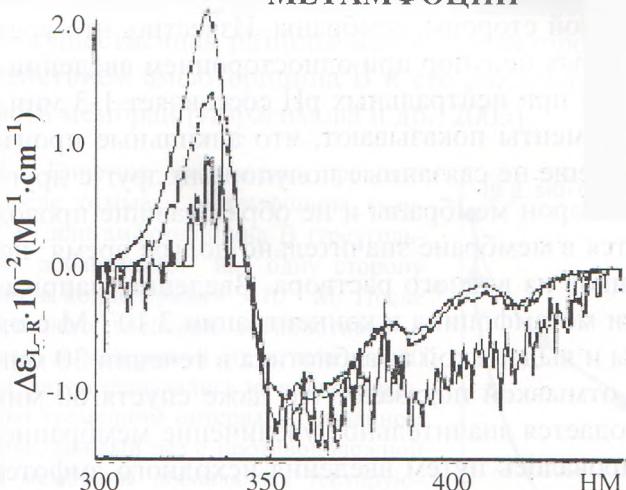


Рис. 9.3.2. Спектр КД в присутствии трех концентраций метамфоцина: $1 \cdot 10^{-7}$ М; $2 \cdot 10^{-7}$ М; $3 \cdot 10^{-7}$ М в растворе 2 М КСl, pH 6,5, $t=23^{\circ}\text{C}$ [Ибрагимова и др., 2003; Kasumov, Bolard, 2004].

ванной форме и способны формировать в мембранах, содержащих холестерин, трансмембранные ионные каналы [Legrand et al., 1996; Ibragimova et al., 2006]. Предполагается, что только ассоциированные формы антибиотиков способны формировать в мембранах проводящие каналы, и только затем, после формирования каналов, может происходить перераспределение ассоциированных форм антибиотиков внутри мембраны. Можно также предположить, что ассоциированные формы антибиотиков после формирования проводящих каналов могут разбираться до непроводящих мономеров или других структур в мембране. После разборки они способны перейти в новое непроводящее состояние и по этой причине на кинетической кривой наблюдается спад проводимости мембран с выходом на некоторый стационарный уровень, рис. 9.3.1, кривые 1 и 2. Вслед за этим введение амфотерицина В с любой стороны мембранны приводит к резкому нарастанию проводимости, хотя известно, что амфотерицин В при нейтральных pH не эффективен с одной стороны мембранны [Cass et al., 1970; Касумов, Либерман, 1972]. Этот эксперимент наглядно показывает, что происходит разборка проводящих каналов внутри мембраны, которые вновь индуцируются путем введения исходного амфотерицина В с любой стороны мембранны. Наличие непроводящих форм канального комплекса в мембране можно показать в экспериментах по отмыке алкильных производных после фиксации их с одной стороны мембранны. Тестом на определение

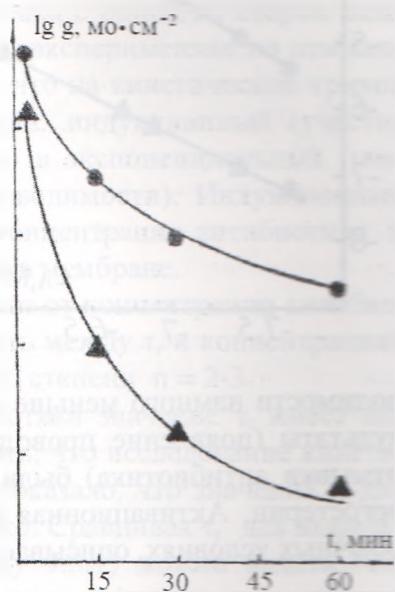
ние мембранный проводимости служит амфотерицин В, введенный с противоположной стороны мембраны. Известно, что время отмычки амфотерициновых полупор при одностороннем введении антибиотика к мембранам при нейтральных pH составляет 1-3 мин [Cass et al., 1970]. Эксперименты показывают, что алкильные производные амфотерицина В еще не связанные полупорами друг с другом с противоположных сторон мембраны и не образовавшие проводящий комплекс остаются в мембране значительно долгое время после отмычки антибиотиков из водного раствора. Введение, например, амфотерицина В или метамфоцина в концентрации $3 \cdot 10^{-7}$ М с одной стороны мембраны и выдержанной антибиотиком в течении 30 мин и с последующей его отмычкой показало, что даже спустя 60 мин после отмычки наблюдается значительное увеличение мембранный проводимости (тестировалось путем введения исходного амфотерицина В с противоположной стороны мембраны). Каждый раз, через определенные интервалы времени после отмычки антибиотика, тестируя проводимость амфотерицином В с неотмытой стороны, можно получить кинетику отмычки непроводящих структур из мембраны. Представляет интерес оценить скорость выхода из мембраны антибиотика, не связанного в каналы. Для этого был проделан следующий эксперимент. На внешнюю сторону мембраны добавляли 300 нМ амфотерицина В или метамфоцина, выдерживали 30 мин и отмывали. Затем на внутреннюю сторону мембраны вводили 300 нМ амфотерицина В и наблюдали рост проводимости, сменяющейся ее инактивацией. Была построена зависимость максимальной проводимости от времени, прошедшего от начала отмычки до введения амфотерицина В. Как видно на рис. 9.3.3, даже через 1 ч после отмычки проводимость имеет заметную величину. Амфотерицин В, введенный с одной стороны мембраны, отмывается гораздо быстрее, чем метамфоцин (рис. 9.3.3).

Метамфоциновые полупоры могут быстро распадаться в мембране на мономеры-димеры и в такой форме дольше оставаться в мембране. Увеличивая концентрацию алкильных производных на отмываемой стороне мембраны, можно получить зависимость проводимости мембран от концентрации непроводящих форм канальчного комплекса в мембране. Полученные данные показывают, что эта зависимость пропорциональна показателю степени $n = 1-1,5$.

В подобных экспериментах без отмычки антибиотика показатель степени соответствует $n = 4$ [Ибрагимова и др., 2003]. Различные значения показателя степени n , объясняются, по-видимому, различ-

ными условиями сборки канального комплекса в мембране. Так, имеется существенная разница между односторонним и симметричным действием амфотерицина В и его алкильных аналогов на проводимость мембран [Ибрагимова и др., 2003].

Рис. 9.3.3. Кинетика уменьшения проводимости после отмычки метамфоцина (кружочки - ●) или амфотерицина В (треугольники-▲) добавленных на одну сторону мембранны в концентрации $3 \cdot 10^{-7}$ М. После одностороннего введения антибиотиков к мембранны и выдержкой их в течение 30 мин они затем отмывались из водного раствора и во временном интервале, указанном на графике, каждый раз с противоположной стороны мембранны добавлялась тестирующая концентрация амфотерицина В - $3 \cdot 10^{-6}$ М. Каждая точка на графике соответствует конечному значению проводимости мембранны, вызванную амфотерицином В. Мембранны формировались из раствора фосфолипид:холестерин в весовом соотношении 2:1 в водных растворах, содержащих 10 mM KCl, pH 6,5, t=23°C. Потенциал на мемbrane 100 мВ. [Kasumov, Bolard, 2004; Ibragimova et al., 2006].



Кинетика проводимости имеет участки быстрого и медленного убывания. Полученный результат можно объяснить существованием в мембране непроводящих форм антибиотика различного размера, каждая из которых покидает мембрану со своей скоростью. Участок быстрого убывания проводимости соответствует быстро отмывающимся формам. Была получена также концентрационная зависимость проводимости при выдержке и отмывке антибиотиков. Как видно из рис. 9.3.4, в диапазоне 0,1-3 мкМ эта степенная функция с показателем 1,2-1,3.

Если зафиксировать концентрацию антибиотика с одной стороны и менять с другой, то концентрационная зависимость проводимости представляет собой степенную функцию с показателем степени 4. При высоких концентрациях антибиотика (~100 нМ) проводимость растет более медленно и достигает насыщения до величины проводимости $\sim 3 \cdot 10^{-3}$ ом⁻¹·см⁻². Полученная концентрационная зависимость при выдержке и отмывке соответствует «насыщенному» участку обычной концентрационной зависимости, но величина про-

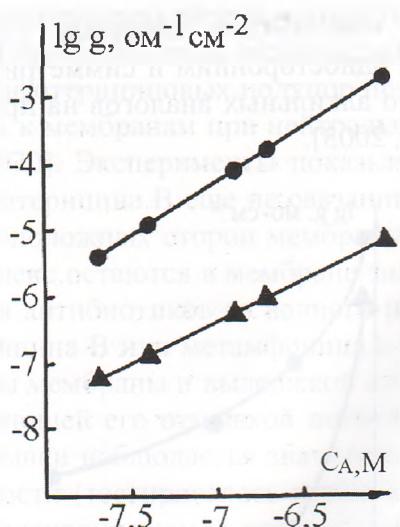


Рис. 9.3.4. Эффект выдержки и кинетика отмывки антибиотиков. Метамфоцин (●) и амфотерицин В (▲) в различных концентрациях выдерживали с внешней стороны мембранны в течение 30 мин., отмывали и через 30 мин добавляли внутрь 300 нМ амфотерицина В и регистрировали максимальную проводимость. Каждая точка получена в отдельном эксперименте. Мембранны формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 10 мМ KCl, pH 6,0, t=23°C. Потенциал на мемbrane 100 мВ [Kasumov, Bolland, 2004; Ibragimova et al., 2006].

водимости намного меньше «насыщенного» значения. Такие же результаты (появление проводимости через длительное время после отмывки антибиотика) были получены на мембранных, содержащих эргостерин. Активационная ветвь кинетики проводимости, как и в обычных условиях, описывается экспонентой (рис. 9.3.5).

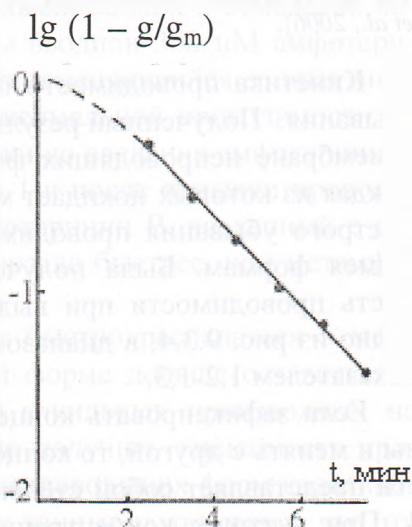


Рис. 9.3.5. Активационная ветвь кинетики проводимости при выдержке и отмывке 300 нМ метамфоцина. Мембранны формировались из фосфолипидов с эргостерином 20:1. Водный раствор: 10 мМ KCl, pH 6,0, t=23°C. Потенциал на мемbrane 100 мВ [Магафриев, 1985].

Кинетика отмывки амфотерицина В и его производных при симметричном их введении к мембранны существенно отличается от кинетики отмывки при односторонней модификации мембран этими антибиотиками. Применительно к данной задаче исследовалась ки-

нетика релаксации проводимости при скачкообразном удалении исходного амфотерицина В и его алкильных производных из примембранных растворов после достижения стационарной проводимости мембранны (рис. 9.3.1, кривая 3). После симметричного введения антибиотиков к мембранны и достижения ими стационарной проводимости производилась отмыка антибиотика с одной из сторон мембранны (обычно с наружной). Результаты экспериментов по отмыке антибиотика из мембранны показывают, что на кинетической кривой проводимости наблюдаются два участка: индукционный (участок медленного уменьшения проводимости) и экспоненциальный (участок относительно быстрого спада проводимости). Индукционный период увеличивается с возрастанием концентрации антибиотика и увеличением концентрации холестерина в мемbrane.

Исследования показали, что τ_r зависит от концентрации антибиотика. Как видно из рис. 9.3.3 зависимость между τ_r и концентрацией метамфоцина соответствует показателю степени $n = 2-3$.

При низких концентрациях антибиотика значение τ_r имеет постоянное значение. Необходимо отметить, что исследование кинетики отмыки исходного амфотерицина показало, что значение τ_r для исходного амфотерицина В очень высокое. Сравнивая τ_r для амфотерицина В и метамфоцина (см. таблицу 9.3.1) можно видеть, что большая скорость релаксации коррелирует с большей неустойчивостью ионного канала. Амфотерициновый канал становится неустойчивым путем сдвига pH в кислую или щелочную сторону. В этом случае можно получить увеличение $1/\tau_r$ (константы скорости релаксации K_r) более чем на порядок по сравнению с нейтральным pH. Константа скорости релаксации K_r при одностороннем действии метамфоцина при $5 \cdot 10^{-7}$ М значительно больше (0.03 мин^{-1}), чем при симметричном действии в той же концентрации, экстраполяция по кривой $K_r(C_A)$, рис. 9.3.6.

Значение τ_r зависит как от состава мембран, так и от концентрации составляющих ее компонентов. Для эргостеринсодержащих мембран значение τ_r намного выше, чем для холестеринсодержащих мембран. Величина τ_r , полученная при симметричном введении антибиотиков к мембранны, содержащим холестерин, отличается от величины τ_r при асимметричном введении антибиотиков. Приняв за основу механизм электростатического взаимодействия заряженных аминных и карбоксильных групп соседних молекул амфотерицина В в канале, можно показать, что метамфоциновые полупоры, как и полулюпоры других алкильных производных, менее стабильны, чем полу-

Влияние концентрации метамфоцина на константу скорости релаксации

Рис. 9.3.6. Зависимость константы скорости релаксации от концентрации метамфоцина. Мембранные формировались из фосфолипидов с холестерином 2:1. Водный раствор: 10 мМ KCl, pH 6,0, t=23°C. Потенциал на мембране 100 мВ [Kasumov, Bolard, 2004; Ibragimova et al., 2006].

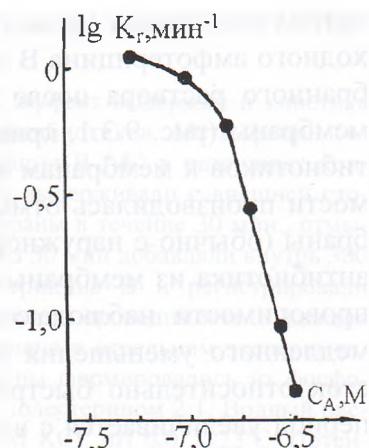


Таблица 9.3.1.

Значение постоянной времени релаксации проводимости τ_r липидных мембран, модифицированных амфотерицином В и его алкильными производными [Касумов и др., 1984 а]

Состав мембраны	Антибиотик	pH раствора	$\tau_r, \text{мин}$
Фосфолипид : эргостерин (весовое соотношение 2:1)	Метамфоцин	6,5	60
	Этамфоцин	6,5	70
	Пропамфоцин	6,5	80
	Бутамфоцин	6,5	90
Фосфолипид : холестерин (весовое соотношение 2:1)	Амфотерицин В	6,5	160
		3,0	4
		11,0	20
	Метамфоцин	6,5	38
	Этамфоцин	6,5	8,4
	Пропамфоцин	6,5	1,5
	Бутамфоцин	6,5	0,4

Примечание. Потенциал на мембране 100 мВ. Водный раствор, окружающий мембрану, содержал 2 М KCl, при t=23 °C. Концентрация антибиотика во всех случаях $3 \cdot 10^{-7}$ М.

поры исходного амфотерицина В. Для исходного амфотерицина В сила электростатического взаимодействия очень велика и велико значение τ_r (см. таб. 9.3.1). Однако, когда теряется один из зарядов на полярных группах, как в случае алкильных производных, у которых отсутствует отрицательный заряд на карбоксильной группе,

электростатическое взаимодействие между молекулами нарушается и канал легко может разобраться до непроводящих мономеров или димеров. Доводом в пользу предположения о том, что после распада канала в мембране образуются более мелкие непроводящие субъединицы, могут служить эксперименты, выполненные в неводных растворах ПА [Ибрагимова и др., 2002 б, 2006 а]. Известно, что маточные растворы антибиотиков содержат ДМСО. Проводимость мембран в растворах чистого ДМСО, содержащие ПА, очень низка. Исследование зависимости проводимости мембран от концентрации ПА при фиксированных концентрациях ДМСО в водных солевых растворах показало, что проводимость мембран зависит от концентрации ДМСО в водном растворе. При соотношении вода:ДМСО 10:1 проводимость мембран с антибиотиками чрезвычайно высока и также высока чувствительность мембран к антибиотикам. Под чувствительностью ПА к мембранам понимается минимальная концентрация антибиотика, под действием которого образуются одиночные каналы в единицу времени. По мере увеличения концентрации ДМСО чувствительность мембран к антибиотикам уменьшается, хотя угол наклона зависимости проводимости мембран от концентрации антибиотиков при этом не меняется. Однако, при соотношении вода:ДМСО 1:1, т.е. при концентрации ДМСО в воде 50% и выше действие антибиотиков не приводит к увеличению проводимости мембран. Приведенные данные показывают, что постепенное увеличение концентрации ДМСО в водном растворе способствует переходу молекул ПА из дисперсной, т.е. ассоциированной формы в мономолекулярную форму и в этой форме молекулы ПА оказываются биологически неактивными. Отсюда следует, что молекулы ПА, находясь в ассоциированной форме, обладают очень высокой мембранный активностью, а распад проводящего комплекса в мембране означает переход канала из олигомерной структуры в мономерно-димерную и потере им проводимости [Ибрагимова и др., 2002 б; Ибрагимова и др., 2003; Ibragimova et al., 2006].

Для амфотерициновых каналов, а также для каналов, образуемых другими ПА, диффузионные ограничения на вход ионов в пору несущественны [Ермишкин, Зильберштейн, 1982]. Известно, что сопротивление неперемешиваемых слоев включено последовательно сопротивлению мембраны и, стало быть, измеряемая проводимость всегда больше (меньше) истинной проводимости мембраны. Отсюда очевидно, что наблюдать инактивацию проводимости мембраны можно и на фоне собственной проводимости неперемешиваемых

слоев. Необходимо отметить, что в одних и тех же условиях (температура 22°C, pH 7,0) и при сравнимых уровнях проводимости для исходного амфотерицина В наблюдается только монотонная кинетика, т.е. наблюдается рост проводимости с дальнейшим выходом его на стационарный уровень. Однако для алкильных производных имеет место немонотонная кинетика в интервале концентраций 10^{-8} М– 10^{-7} М антибиотика. Оценим роль неперемещаемых слоев в диффузии ионов к устью амфотерицинового канала. Коэффициент диффузии проникающих ионов в воде составляет величину $D_{Cl} \approx 10^{-5}$ см/ s^2 , а толщина неперемещаемого диффузионного слоя $l = 2 \cdot 10^{-2}$ см. При концентрации 10 мМ KCl теоретическая оценка величины проводимости неперемещаемого примембранныго слоя составляет величину $g_{n.c.} = 4 \cdot 10^{-3}$ мО·см $^{-2}$. Эти расчеты показывают, что измеряемая проводимость мембраны всегда меньше проводимости неперемещаемого примембранныго слоя и стало быть регистрируемая кинетика проводимости отражает процессы, протекающие внутри самой мембраны. При фиксированной концентрации антибиотика длительность индукционного периода растет с увеличением концентрации стерина в мембране. Отсюда становится ясным, что неперемещаемые примембранные слои не являются определяющими для длительности индукционного периода. Еще одним доводом, подтверждающим предположение о трансформации канального комплекса в мембране, могут служить исследования, связанные с изучением спада проводимости после отмычки антибиотика из мембран (при соотношении фосфолипид:холестерин=20:10 по весу) при прохождении фронта отмывающего раствора. Если мембранны содержат в 10 раз меньше эргостерина, чем холестерина, то даже в данном случае всегда появляется долгий индукционный период независимо от концентрации антибиотика в растворе. В проводимых экспериментах с алкильными производными амфотерицина В на мембранах с холестерином проводимость существенно ниже проводимости неперемещаемых слоев и во всех этих случаях наблюдается концентрационнозависимый переход от немонотонной кинетики к монотонной [Касумов, Малафриев, 1982 а; Kasumov, Malafriv, 1984 а].

Эксперименты по отмычке антибиотиков после достижения стационарного уровня проводимости (см. рис. 9.3.1, кривая 3), которые были описаны выше, могут быть объяснены на основе двухстадийного механизма релаксации. Полагается, что перед отмычкой имеется равновесие между проводящими и непроводящими структурами канального комплекса в мембране. На первой стадии уменьшения

проводимости после отмычки антибиотиков мембрану покидают непроводящие структуры канального комплекса. По мере выхода из мембранных непроводящих структур происходит смещение реакции в сторону разборки проводящих каналов. С уменьшением концентрации непроводящих форм антибиотика в мембране разборка каналов становится необратимой и, поэтому, наблюдается экспоненциальный участок спада проводимости. Альтернативный механизм, объясняющий уменьшение проводимости мембран после отмычки антибиотиков, состоит в следующем. Вначале мембрану покидают проводящие структуры. До тех пор пока в мембране высока концентрация непроводящих структур с высокой константой скорости будет происходить повторная сборка проводящих каналов. По мере истощения мембранных непроводящими структурами повторная сборка каналов замедляется и на кинетической кривой виден резкий спад проводимости мембранны. Если принять за основу механизм отмычки полупор, то в таком случае трудно объяснить зависимость τ_r от концентрации антибиотиков, так как исходный амфотерицин В и его алкильные производные имеют одну и ту же структуру контакта между двумя полупорами. Однако, различные значения τ_r , полученные в эксперименте для исходного амфотерицина В и его алкильных производных, указывают на то, что зона контакта двух полупор не определяет τ_r . Следовательно, можно предположить, что значение τ_r определяется силой электростатического взаимодействия между молекулами, формирующими канал. Известно, что исходный амфотерицин В образует стабильный канал с большими временами жизни в проводящем состоянии за счет электростатического взаимодействия аминной и карбоксильной группы в канале [Kasumov et al., 1979]. Потеря одного из зарядов на молекулах путем сдвига pH или химической модификации полярных групп приводит к разрыву электростатического взаимодействия между молекулами [Kasumov et al., 1979]. При этом канал становится менее стабильным, время жизни канала в проводящем состоянии резко уменьшается и в мембране он может разбираться на мономеры и другие непроводящие структуры. В подтверждение гипотезы о электростатическом взаимодействии полярных групп в стабилизации канального комплекса в проводящем состоянии, можно привести данные, полученные на исходном амфотерицине В. При нейтральных pH значение τ_r очень высоко, однако при кислых pH 3,0 и щелочных pH 9,0, когда теряется один из зарядов на молекуле амфотерицина В, значение τ_r резко уменьшается (см. таб. 9.3.1). Таким образом, релаксацию мембранный проводимо-

сти и зависимость τ_r от концентрации антибиотиков можно объяснить в рамках модели отмычки непроводящих структур из мембранны.

Немонотонную кинетику проводимости, вызванную алкильными производными амфотерицина В, можно объяснить в линейной модели канала с тремя состояниями – одним проводящим, окруженное двумя непроводящими ($1 \leftrightarrow 2 \leftrightarrow 3$) [Ермишкин, 1976]. Непроводящее состояние 1 связано со сборкой непроводящих полупор с каждой стороны мембранны. Две полупоры, встречаясь в мемbrane, формируют проводящий канал – состояние 2, и, наконец, проводящий канал в мемbrane разбирается на мономеры или другие непроводящие структуры – состояние 3. В линейной модели канала с тремя состояниями можно получить немонотонную кинетику в зависимости от концентрации антибиотиков с учетом констант скоростей переходов между двумя состояниями ($2 \leftrightarrow 3$) [Ермишкин, 1976]. Когда концентрация антибиотика в мемbrane мала, собранный проводящий канал переходит из состояния 2 в состояние 3 ($2 \rightarrow 3$), так как константа скорости перехода канала из состояния $2 \rightarrow 3$ намного больше, чем из $2 \leftarrow 3$. Переход канала из $2 \rightarrow 3$ есть реакция первого порядка, тогда как обратный переход $2 \leftarrow 3$ есть реакция более чем второго порядка. При более высоких концентрациях антибиотиков $3 \cdot 10^{-7}$ М в водном растворе имеется достаточная концентрация мономеров, чтобы насытить ими мембранны. Благодаря насыщению мембранны мономерами, скорость повторной сборки канала из $2 \leftarrow 3$ будет расти быстрее, чем из $2 \rightarrow 3$ и на кинетической кривой наблюдается только монотонный рост проводимости, рис. 9.3.1, кривая 3. Это означает сдвиг равновесия в сторону сборки канала и фактическому запиранию состояния 3. Таким образом, тип кинетики мембранный проводимости определяется соотношением констант скоростей переходов между состояниями и концентрацией антибиотика в мемbrane [Касумов, Малафриев, 1982 а; Ибрагимова и др., 2003].

Компьютерный анализ пространственной структуры амфотерицинового канала показал, что комплекс антибиотик-стерин может находиться в двух устойчивых конфигурациях [Хугорский и др., 1987, 1988; Хугорский, Каменчук, 1988]. Одна из этих конфигураций находится в энергетически более выгодном положении, которое обусловлено электростатическим взаимодействием заряженных соседних молекул антибиотика в проводящем комплексе. Взаимодействие молекул приводит к образованию больших по диаметру пор. Согласно другой конфигурации канальный комплекс стабилизируется в проводящем состоянии Ван-дер-Ваальсовыми силами

взаимодействия между молекулами и наклоном молекул антибиотика к радиальной оси канала. Переходы между проводящим и непроводящим состояниями могут происходить в результате лишь небольшого смещения или поворота молекул антибиотиков относительно радиальной оси канала и перераспределения электростатических и Ван-дер-Ваальсовых сил в канале. Хотя модель двух полупор на сегодняшний день является наиболее предпочтительной, но имеется, по крайней мере, один существенный недостаток - эта модель не учитывает влияния вида и концентрации фосфолипидов на ионную проницаемость мембран, индуцированных ПА.

Было показано, что постоянная времени релаксации в ряду алкильных производных амфотерицина В уменьшается с увеличением длины алкильной цепи. Алкильные производные амфотерицина В быстро отмываются из холестеринсодержащих мембран и медленно из эргостеринсодержащих мембран. Результаты исследования кинетики релаксации позволили обосновать метод оценки биологической эффективности ПА по величине постоянной времени релаксации. С помощью этого метода показано, что алкильные производные амфотерицина В должны быть высокоэффективны против клеток грибов, но не токсичны для человека.

Приведенные выше данные могут иметь большой практический интерес. Хорошо известно, что ПА сильно связываются с мембранами микробных клеток [Brajtburg, Bolard, 1996]. Степень связывания ПА с мембраной может служить характеристикой токсичности данного антибиотика. Метамфоцин оказался в 10 раз менее токсичен, чем исходный амфотерицин В. Это может быть связано с повышенной скоростью выхода проводящих структур метамфоцина из мембраны. Как видно из таблицы 9.3.1 время отмычки алкильных производных амфотерицина В намного меньше их исходной формы. Известно, также, что эргостеринсодержащие мембранны примерно в 10-100 раз чувствительнее к ПА, чем холестеринсодержащие мембранны [Касумов, 1986 а; Cotero et al., 1998]. Следует отметить два важных обстоятельства: из эргостеринсодержащих мембран антибиотики практически не отмываются (см. таб. 9.3.1) и на эргостеринсодержащих мембранных имеется только монотонный рост проводимости. Учитывая то, что основным стериновым компонентом мембран патогенных микроорганизмов является эргостерин, можно, варьируя концентрацию антибиотиков, резко увеличить коэффициент дискриминации ПА в отношении их действия на патогенные микроорганизмы.

ГЛАВА 10. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ ПА НА КЛЕТОЧНЫЕ И ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

Транспорт ионов и органических соединений в мышечных клетках в состоянии покоя находится на относительно низком уровне, однако при мышечной активности он может возрастать более чем в 100 раз [Straub, 1965; MacKinnon, 2003]. Хорошо известно, что на транспорт и утилизацию глюкозы в мышечных клетках влияет инсулин и при мышечной активности процесс поглощения глюкозы скелетными мышцами резко усиливается [Липатников, Казаков, 1981; Лукьянчук, Савченкова, 1998; Berger et al., 1975]. При мышечной активности снижается уровень инсулина в плазме крови по сравнению с уровнем, определяемым в состоянии покоя [Никольский, Трошин, 1973; Никольский, 1977]. Для понимания механизма стимуляции транспорта ионов и органических соединений при мышечном сокращении наибольшую информацию дают эксперименты на изолированных мышцах. В период интенсивной деятельности мышца потребляет в 1000 раз больше молекул АТФ, чем в состоянии покоя. Главным источником синтеза энергии в мышечных клетках являются определенные субстраты, такие как ионы и углеводы. Обмен ионов K^+ в действующей мышце примерно в десять раз превышает обмен его в мышце, находящейся в покое. Когда мышечные клетки теряют ионы K^+ процесс транспорта K^+ из экстрацеллюлярного пространства в мышечные клетки против концентрационного градиента ускоряется примерно в десять раз. Мышечное волокно приходит в состояние возбуждения благодаря переносу ионов натрия и калия через сарколемму. Природа потенциала действия здесь такая же, как в аксоне, за исключением того, что основную роль в данном случае играют ионы Ca^{++} . Деполяризация сарколеммы сопровождается понижением разности потенциалов между поперечными канальцами и соседними участками саркоплазмы, что приводит к локальному изменению мембранныго потенциала саркоплазматического ретикулума. Концентрация кальция в саркоплазме в состоянии покоя не превышает $10^{-7} M$, а после возбуждения увеличивается до $10^{-4} M$. Такое резкое увеличение концентрации ионов кальция активирует миофibrиллы и вызывает их сокращение [Корыта, 1983]. Отсюда понятно, что при интенсивной мышечной деятельности потребность организма в ионах, углеводах и других органических субстратах резко возрастает и каналы мышечных клеток начинают работать с

большой интенсивностью [Волков и др., 2000]. Здесь возникает необходимость активизации работы нативных клеточных каналов с помощью экзогенных соединений, способных дополнительно формировать в мембранах катионселективные каналы. Для усиления мышечной деятельности и быстрого восстановления функционирования основных систем организма используются биологически активные соединения с установленным механизмом действия [Макарова, 1992]. Ясно, что использовать препараты с различным механизмом действия очень проблематично. Многогранность патогенетических звеньев развития гипоксического синдрома, возникающая в организме при дефиците кислорода при интенсивной мышечной деятельности, требует соответствующей фармакологической коррекции [Лукьянчук, Савченкова, 1998]. Это в основном связано с поиском высокоэффективных противоишемических препаратов среди различных фармакологических групп, известных в клинической практике, и синтезом соответствующих производных с установленной химической структурой молекул. Учитывая эти факторы, необходимо подойти к решению данной проблемы комплексно с позиции поиска соединений с известной химической структурой и в условиях напряженной мышечной деятельности, обладающих нетрадиционным механизмом действия. К веществам, обладающим нетрадиционным механизмом действия, относятся ПА, которые можно использовать для решения многих задач и, в частности, задач, касающихся биоэнергетики мышечной деятельности [Курбанов, Касумов, 2004]. В основе биологического действия ПА лежит формирование ими в липидных мембранных структурных ионных каналов молекулярных размеров с определенной проводимостью, избирательно проницаемых для ионов и некоторых субстратов (рис. 10.1). Путем встраивания в клеточные мембранные ПА с установленной химической структурой молекул удается моделировать процесс формирования каналов и экспериментально осуществить перенос через мембранные ионы калия, натрия, кальция, а также трансмембранный транспорт углеводов, столь необходимых при мышечной деятельности [Mazerski, Borowski, 1996; Shvinka, 2001]. Обоснованием для подобного утверждения служит тот факт, что полиены увеличивают ионную проводимость липидных и клеточных мембран, содержащих определенные стерины [Blum et al., 1969; Cass et al., 1970; Van Zutphen et al., 1971; Malewicz, Borowski, 1979; Malewicz et al., 1980, 1981; Gary-Bobo, Cybulska, 1982; Herve et al., 1985; Касумов, 1986 а; Szponarski et al., 1988; Wietzerbin et al., 1990; Shvinka, Caffner, 1995; Mazerski,

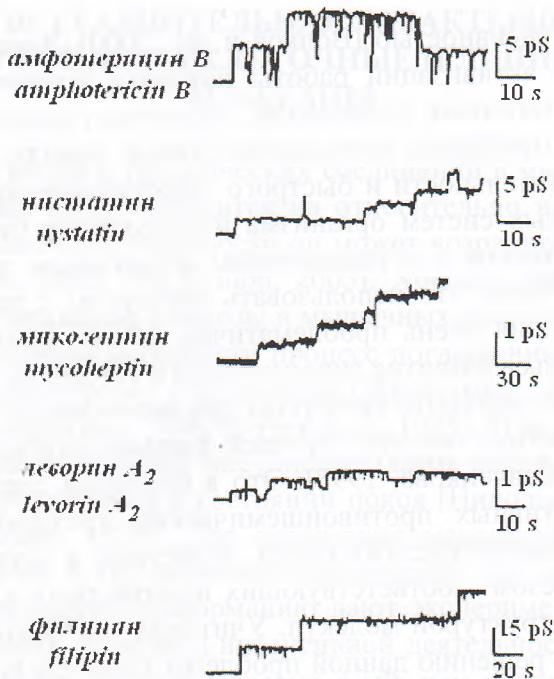


Рис. 10.1. Одиночные ионные каналы в бимолекулярных мембранах, образованных ПА с различной структурой молекул

Borowski, 1996; Cotero et al., 1998]. Избирательная проницаемость мембран и мембранныя активность ПА зависит от структуры молекул антибиотиков, включенных в состав мембраны [Касумов, 1986 a; Henry-Toulme et al., 1989 b; Franciolini, Petris, 1992; Brajtburg, Bolard, 1996; Cotero et al., 1998]. Так, амфотерицин В, нистатин и микогентин эффективно увеличивают проводимость липидных мембран для одновалентных анионов только при наличии их с обеих сторон мембраны [Cass et al., 1970; Касумов, Либерман, 1972; Kleinberg, Finkelstein, 1984]. Проводимость липидных мембран в присутствии амфотерицина и нистатина с одной стороны мембраны возрастает только при очень больших концентрациях антибиотиков, и результаты таких опытов плохо воспроизводимы. В то же самое время показано, что на мембранах эритроцитов, лимфоцитов, тимоцитов и мембранах мышечных волокон скелетных мышц указанные выше антибиотики эффективно увеличивают проницаемость мембран клеток при наличии их только с одной стороны мембраны [Rozengurt, Mendoza, 1980; Rast, Bartnicki-Garcia, 1981; Aszalos et al., 1984; Deuticke et al., 1973, 1984]. При этом, на мембранах наблюдается усиление потока не для анионов, а для катионов щелочных ме-

таллов [Andreoli et al., 1969; Hammond et al., 1974; Dalmark, 1976; Malewicz et al., 1980; Boxer et al., 1981; Eilam, Grossowicz, 1982; Mazerski et al., 1986; Швинка, Кафнер, 1989, 1991; Ел-Суфи, 1992; Hartsel et al., 1994; Shvinka, Caffner, 1994, 1995; Mazerski, Borowski, 1996; Hartsel, Bolard, 1996; Garcia-Chaumont et al., 2000 b; Shvinka, 2001; Gurbanov, Kasumov, 2003]. В отличие от неароматических антибиотиков, ПА с ароматической группировкой, в частности, леворин А₂ и его производные, резко увеличивают проницаемость липидных и клеточных мембран для катионов щелочных металлов, когда вводятся с одной стороны мембранны [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 a; Mazerski et al., 1986; Микаилова, 1990; Швинка, Кафнер, 1989, 1991; Shvinka, Caffner, 1994, 1995; Mazerski, Borowski, 1996; Kurbanov, Kasumov, 2003]. В химической структуре леворина А₂ содержатся две положительно заряженные аминные группировки и, несмотря на их наличие, ароматические полиены создают как в БЛМ, так и в клеточных мембранах почти идеальную избирательную проницаемость для катионов щелочных металлов [Kasumov et al., 1981; Касумов, 1986 a; Shvinka, 2001]. Использование исходного леворина и его производных с установленной химической структурой молекул может усилить транспорт ионов и энергозависимых субстратов через мембранны мышечных клеток, увеличить значение мембранныго потенциала и, как следствие, поднять энергетический потенциал организма на более высокий уровень [Dipple, Houslay, 1979; Kasumov, Gurbanov, 2003; Курбанов, Касумов, 2004].

Для детального изучения механизма избирательной проницаемости мембран в присутствии ПА необходим синтез новых ПА с измененной химической структурой молекул. Доступность молекул ПА к химической модификации молекул открывает реальный путь получения новых производных ПА с новыми физико-химическими свойствами [Volpon, Lancelin, 2002; Zotchev, 2003]. Наибольший интерес представляет модификация ПА по гидрофильной и гидрофобной цепи молекул. Эксперименты показали, что только эти системы в молекулах полиенов ответственны за биологическую активность и избирательную проницаемость мембран для ионов и органических соединений [Касумов, 1986 a; Mazerski et al., 1986; Garcia-Chaumont et al., 2000 a, b].

Резкая зависимость проводимости мембран от концентрации антибиотиков позволяет предположить, что ионная проницаемость связана с олигомерной структурой полиенового проводящего комплекса. Эти комплексы при взаимодействии с клетками увеличивают проницаемость мембран для ионов и низкомолекулярных соедине-

ний. ПА обладают высокой чувствительностью к мембранам, в состав которых содержатся стерины животного и растительного происхождения. Взаимодействие ПА со стеринами приводит к образованию в мембранах высокомолекулярных комплексов антибиотик-стериин [Schneider et al., 1986; Касумов, 1986 а; Gruda, Bolard, 1987; Milhaud et al., 1988; Santos et al., 1998]. Показано, что филиппин при взаимодействии с БЛМ, в составе которых содержится холестерин, образует плотноупакованные сферические комплексы диаметром 19 нм и высотой 0,4 нм, а также более крупные комплексы диаметром 90 нм и высотой 2,5 нм [Santos et al., 1998]. Такие комплексы индуцируют в мембранах проницаемость для ионов и органических соединений.

Известно, что ПА в воде не растворимы. Лучшим растворителем ПА является ДМСО, который при комплексном использовании усиливает биологическую активность ПА [Ibragimova et al., 2002; Ибрагимова и др., 2002 а, б]. Введение смеси ДМСО с ПА в водную среду приводит к формированию в водных растворах ассоциатов, состоящих из макромолекулярных комплексов ПА и только в такой форме ПА обладают высокой мембранный активностью [Barwicz et al., 1992; Coutinho, Prieto, 1995; Ибрагимова и др., 2002а, б; Ибрагимова и др., 2003]. Частота образования и размер агрегированных ассоциатов молекул ПА возрастает с увеличением концентрации ПА в ДМСО [Mazerski, Borowski, 1996]. В контрольных опытах было показано, что 1%-5%-ный раствор ДМСО практически не оказывает действия на проводимость БЛМ, калиевую проводимость изолированного мышечного волокна, а 2%-ный ДМСО не влияет на константу скорости выхода ионов калия из целой мышцы [Швinka, Кафнер, 1989].

Наибольший интерес представляют сравнительные исследования, связанные с особенностями взаимодействия ПА с БЛМ и клеточными мембранами. Изучен индуцированный полиенами ионный транспорт в клеточных мембранах. Транспорт ионов в присутствии ПА исследовался на эритроцитах, лимфоцитах, тимоцитах и одиночных мышечных волокнах. На изолированных лимфоцитах и суспензии эритроцитов показано, что амфотерицин В и леворин увеличивают проницаемость мембран для моносахаров [Ahner-Hilger et al., 1982; Mazerski et al., 1986; Ел-Суфи, 1992; Cybulska et al., 1992; Shvinka, Caffner, 1994, 1995]. Под действием ПА наблюдается также активация Na^+/K^+ АТФ – азы в клетках *Candida albicans* и в мембранах мышечных волокон [Соловьева и др., 1976; Garcia-Chaumont et al., 2000 б]. Полиены увеличивают транспорт ионов Ca^{++} в стеринсодержащих липосомах и клетках [Ramos et al., 1989; Cohen et al.,

1990], повышают иммунный статус организма [Brajtburg, Bolard, 1996]. В отличие от других ПА леворин резко увеличивает калиевую проницаемость и проницаемость мембран для нейтральных молекул, как в клеточных мембранах, так и на бислоях. Предполагается, что с помощью каналаобразующего антибиотика леворина и некоторых его производных можно индуцировать в клеточных мембранах мышечных волокон формирование дополнительных каналов проницаемости. Это приведет к усилению входа в клетки и ткани мышечных волокон необходимых энергозависимых субстратов и выхода из них образовавшихся продуктов метаболизма при интенсивной мышечной деятельности. Поводом для такого утверждения являются исследования, проведенные на изолированных лимфоцитах и суспензии эритроцитов. Было показано, что леворин индуцирует проницаемость для ионов и нейтральных молекул и степень их проницаемости находится в том же ряду, что и на БЛМ [Mazerski et al., 1986; Henry-Toulme et al., 1989 b; Ел-Суфи, 1992; Курбанов, Касумов, 2004; Shvinka, Caffner, 1994, 1995].

Антибиотики полиеновой структуры обладают гемолитической активностью [Weiss, Levine, 1972; Siegel, 1977; Айтхожина, Никитина, 1980; Cybulska et al., 1984; Salama et al., 1989]. Эритроциты млекопитающих представляют собой классическую модель для изучения биологического действия мембранотропных соединений, поскольку метаболические процессы, протекающие в них, очень слабы, а свойства мембран хорошо изучены. Эффективность действия ПА зависит от температуры, времени инкубации и вида эритроцитов, состава среды и других условий эксперимента. Гемолитический эффект 20 ПА изучен на мышиных эритроцитах, где было показано, что самым активным из них был филиппин, который превышал по этому показателю этрускомицин, кандидин и аэрофунгин [Kotler-Brajtburg et al., 1979]. На эритроцитах других видов животных установлены несколько иные ряды активности [Strom et al., 1979]. Филиппин обладает сильным гемолитическим действием на эритроциты человека и свиньи, и менее зависим от состава и свойств эритроцитарной мембранны [Knopik-Skrocka et al., 2002]. Однако степень гемолиза эритроцитов в присутствии амфотерицина В и нистатина находится в сильной зависимости от вида эритроцитарной мембранны млекопитающих [Knopik-Skrocka et al., 2002]. Гемолитическое действие филиппина можно снять ионами кальция, анионами фосфата, но не сульфата [Knopik-Skrocka et al., 2002]. Состав среды инкубации оказывает существенное действие на скорость гемолиза эритроцитов, индуцированного полиенами. В качестве примера можно при-

вести эксперименты, в которых изотонический солевой раствор заменяли мелитозой или сахарозой [Binet, Bolard, 1988]. Было показано, что кинетическая кривая гемолиза эритроцитов сдвигалась в сторону больших концентраций амфотерицина В, филипина, этрускомицина и других ПА [Brajtburg et al., 1980; Cybulska et al., 1984; Султанова и др., 2007]. Индуцированный ПА гемолиз эритроцитов полностью снимался с возрастанием молекулярного веса неэлектролитов и полностью подавлялся высокомолекулярными декстранами. Полученные результаты показывают, что неэлектролиты с небольшим молекулярным весом способны проникать в клетки через ПА-индуцированные водные поры. Эти данные хорошо согласуются с данными, полученными на БЛМ [Bunch, Edwards, 1969; Holz, Finkelstein, 1970; Kim, Mc Manus, 1971; Борисова, Ермишкин, 1984 а, б; Borisova et al., 1979; Oku et al., 1980; Зильберштейн, 1989; Ел Суфи, 1992; Ибрагимова и др., 2006 б]. Сравнение кинетических кривых выхода ионов K^+ и вслед за этим лизиса клеток, индуцированных ПА, было проведено на разных видах эритроцитов [Kotler-Brajtburg et al., 1979; Teerlink et al., 1980; Anert-Hilger et al., 1982; Glaser, 1982; Cybulska et al., 1984; Pooler, 1985; Capuozzo et al., 1990]. Авторы показали, что изученные ими ПА могут быть разделены на две группы. В первую группу входили “малые полиены” (тетра- и пентаены), которые вызывают выход ионов K^+ и лизис эритроцитов практически при одних и тех же концентрациях антибиотиков. Во вторую группу входили “большие полиены” (гептаены и нистатин), которые индуцировали выход ионов K^+ из эритроцитов при существенно меньших концентрациях, чем лизис. Можно рассмотреть несколько механизмов, лежащие в основе литических эффектов ПА. Наиболее вероятным является коллоидно-осмотический механизм, который предполагает, что лизис является следствием дисбаланса ионных потоков через клеточную мембрану [Cybulska et al., 1984; Pooler, 1985]. Транспорт ионов оценивался по регистрации изменения объема клеток, который, в общем, пропорционален разнице между входящим и выходящим потоками ионов через поры в клеточных мембранах, индуцированные ПА, или путем прямого измерения проницаемости [Carrasquer et al., 1989]. Данный механизм основывается на принципе химической деградации мембран (перекисное окисление), активация которой наблюдалась в присутствии ПА [Andrews et al., 1977; Brajtburg et al., 1985; Brajtburg et al., 1990 а, б]. Экспериментальным доказательством в пользу данного механизма являются исследования, демонстрирующие торможение ПА-индуцированного лизиса эритроцитов внесением в среду инкубации каталазы и активацию

клеток при прединкубационном периоде аскорбиновой кислотой [Gutteridge, Thomas, 1980; Sokol-Andersen et al., 1986; Stein et al., 1987]. Более того, в мембранах эритроцитов, обработанных ПА, наблюдалось увеличение содержания малонового диальдегида, продукта перекисного окисления липидов, величина которого изменялась пропорционально степени гемолиза. Очевидно, с этим механизмом связано влияние аскорбиновой кислоты на антигрибковое действие амфотерицина В [Brajtburg et al., 1989 a]. Однако механизм, посредством которого ПА усиливают процессы перекисного окисления мембран, остается неизвестным. Необходимо отметить, что, хотя ПА-индуцированный гемолиз существенно модифицируется антиоксидантами, однако трансмембранные потоки ионов оставались неизменными. Оба предполагаемых механизма ПА-индуцированного гемолиза (коллоидно-осмотический и химической деградации) не исключают друг друга, поскольку развитие перекисных процессов в мембранах делает мембранны более чувствительными к осмотическому шоку [Freedman, Hoffman, 1979].

Другой механизм, объясняющий разрушение мембран клеток под действием полиенов, может быть связан с детергентным эффектом воздействия исследуемых соединений. Этот эффект особенно важен для "малых полиенов", поскольку для них практически нет различий между концентрациями, вызывающими утечку ионов и последующий лизис клеток. Для других ПА этот механизм может быть ответственным за увеличение проницаемости мембран для катионов больших размеров при соотношениях ПА:липид > 0,01 [Aggett et al., 1982].

Эффекты действия ПА на клетки других млекопитающих напоминают таковые, полученные на эритроцитах, хотя имеются и некоторые существенные различия. Показано, что очень малые концентрации ПА оказывают стимулирующий эффект на ряд процессов, протекающих в организме, как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Концентрации ПА ($< 10^{-6}$ М) активируют рост и деление клеток [Brajtburg et al., 1984 a, b], стимулируют как клеточный, так и гуморальный иммунитет [Stein et al., 1978; Little et al., 1978, 1983; Shirley, Little, 1979 a, b; Lohr, Snyderman, 1982; Seay, Inman, 1982; Little, Shore, 1985; Henry-Toulme et al., 1989 a]. Эти эффекты ПА, по-видимому, связаны с дозированным усилением проницаемости плазматических мембран клеток. Повышение действующих концентраций ПА приводит к сильному увеличению проницаемости мембран для ионов и малых молекул, а при концентрациях ПА больше, чем $2 \cdot 10^{-5}$ М, к гибели клеток. Показано, что под действием ПА, в частности амфотерицина В, усиливается фагоцитарная активность мак-

рофагов и повышается устойчивость организма к некоторым инфекциям [Brajtburg et al., 1986; Lin et al., 1977; Chapman, Hibbs, 1978; Hauser, Remington, 1983; Henry-Toulme et al., 1989 a]. Авторами было обнаружено, что действие амфотерицина В на лимфоциты носит избирательный характер и он способен активировать Т-супрессоры в определенные моменты иммунного ответа. В опытах *in vitro* показана активация В-клеток амфотерицином В, сопровождающаяся увеличением их пролиферации. Вместе с тем было обнаружено, что амфотерицин В при концентрациях $5 \cdot 10^{-7}$ М– $2 \cdot 10^{-6}$ М заметно усиливает активность макрофагов, однако при концентрациях выше $2 \cdot 10^{-6}$ М наблюдается лизис макрофагов [Harold et al., 1978]. Эти результаты, по-видимому, являются следствием взаимодействия амфотерицина В с холестерином, поскольку при увеличении холестерина в плазматической мембране противоопухлевый эффект увеличивался.

Механизм стимулирующего действия ПА на клетки иммунной системы далеко не ясен. Некоторые исследователи считают, что нельзя связывать физиологические эффекты ПА только с их взаимодействием с липидным матриксом клеточных мембран. Другие авторы склоняются к мысли, что мутагенная и антимитотическая активность леворина А₂ это результат взаимодействия со специфическими рецепторами на клеточной поверхности [Агабейли и др., 1987; Искендерова, 1992; Агабейли, Мамедова, 2006].

Остается также открытым вопрос является ли иммуностимулирующий эффект ПА следствием ингибирующего действия поленов на какие-то регуляторные лимфоциты с необычной чувствительностью к ПА или их прямым стимулирующим действием на иммунно-компетентные клетки.

Обнаружилась способность поленов усиливать действие антибиотиков, находящихся внутри данного класса соединений. К сожалению, здесь имеются только единичные работы. Так, активация гемолитической активности этрускомицина наблюдается в присутствии пимаринина, амфотерицина В, нистатина и даже в присутствии производных самого этрускомицина. При взаимодействии этрускомицина с филипином активации этрускомицина не наблюдалось. Более того, при большой концентрации эритроцитов в суспензии выявилось увеличение устойчивости клеток к филипину [Strom et al., 1979].

Отличительная особенность ПА состоит в том, что они способны усиливать действие других антибиотиков при их совместном использовании – рифамицина, тетрациклина. ПА обладают способностью усиливать также действие антисептиков – клотrimазола и имидазола [Medoff et al., 1972; Kuwano, Ikebara, 1973; Medoff et al., 1973,

1981; Nakashima et al., 1974; Tärnvik, Ansehn, 1974; Twentyman, 1976; Ishikawa et al., 1977; Kitagawa, Andoh, 1978; Beggs et al., 1979; Kitao, Hattori, 1980; King et al., 1981; Odds, 1982; Ozols et al., 1983; Ohno et al., 1984; Hughes et al., 1984; Schmitt et al., 1988]. Более того, амфотерицин В и другие ПА увеличивают эффективность действия большого числа соединений, обладающие различным механизмом противоопухолевой активности – блеомицина, нитрозомочевины, актиномицина, антрациклинов, винкристина, преднизолона, циклофосфамида и многих других [Presant, Carr, 1980; Henry-Toulme, Bolard, 1986]. Противоопухолевое действие ПА может быть результатом их стимулирующего воздействия на иммунную систему организма или усиления цитотоксического действия используемых вместе с ними фармакологических препаратов. Цитотокическое действие может быть результатом индуцированного полиенами облегченного транспорта веществ внутрь клеток, либо путем совместного действия ПА с химическим агентом на молекулярные мишени в клетках. Экспериментальная проверка этих предположений показала, что ПА усиливают транспорт различных веществ в клетки. Причем наблюдалась проницаемость не только для малых, но и для больших молекул (например, ДНК) [Presant, Carr, 1980; Blanc et al., 2000]. Очень интересным является тот факт, что такие молекулы, как ДНК, проникают внутрь клеток через ПА образованные поры в цитоплазматической мембране. Возможно, что ПА создают в мембранах разные участки транспорта для тех или иных агентов. Определенную роль в активирующем влиянии ПА на транспорт фармакологических препаратов может играть изменение величины трансмембранных потенциала [Henry-Toulme, Bolard, 1986]. На рассматриваемый феномен активируемых ПА процессов может оказывать действие перекисное окисление липидов клеточных мембран. Однако все еще остается неясной взаимосвязь между результатами экспериментов, полученными *in vivo* и *in vitro*.

Эффективность действия ПА на грибковые клетки зависит от порядка внесения полиенов в тест-систему. Так, этрускомицин и филипин усиливали эффективное действие амфотерицина В, хотя сам амфотерицин В ингибировал эффекты предварительно внесенных этрускомицина и филипина. Имеет место и эффект антагонизма между ПА. Так, если к БЛМ, предварительно модифицированных амфотерицином В $4 \cdot 10^{-8}$ М, добавляли с одной стороны леворин $1 \cdot 10^{-6}$ М, то наблюдалось не дополнительное увеличение проводимости бислоя, а ее резкое уменьшение [Касумов, Микаилова, 1988]. Аналогичные результаты были получены при анализе совместного дейст-

вия нистатина и леворина А₂. Высказывается предположение, что такие антагонистические взаимоотношения между ПА могут быть использованы в клинической медицине.

Не вызывает сомнения тот факт, что размер молекул ПА ответствен за селективность их взаимодействия со стериновым рецептором мембран. Так, пентаены более эффективно взаимодействуют с холестеринсодержащими мембранами, тогда как гептаены с эргостеринсодержащими мембранами [Archer, 1976]. Пентаены вызывают гемолиз эритроцитов в существенно меньших концентрациях, чем гептаены, но оказываются значительно токсичнее последних, что не дает возможности использовать их в качестве антигрибковых препаратов.

При анализе свойств производных амфотерицина В и нистатина выявлено, что ионогенные группы ПА являются важной составной частью молекул антибиотиков [Herve et al., 1989; Hoeprich, 1987]. Показано, что у отрицательно заряженных антибиотиков амфотерицина В и нистатина (N-ацетил и N-сукцинил) сохраняется только 10% активности исходных молекул, хотя их положительно заряженные производные (метиловые эфиры) обладали той же активностью, что и исходные молекулы [Cass et al., 1970]. Обратная картина наблюдалась в случае перимицина и метиловых эфиров вайцидина и годамицина [Cybulska et al., 1983]. Положительно заряженные антибиотики слабее взаимодействуют с холестеринсодержащими везикулами, тогда как их активность по отношению к эргостеринсодержащим мембранам была высокой и равной активности исходных молекул. Избирательность действия амфотерицина В (сравнение эффекта действия на грибы, эритроциты и БЛМ) увеличивалась для алкилпроизводных амфотерицина В [Chen et al., 1977; Kasumov, Malafriev, 1984 a]. Повышение избирательности действия алкилпроизводных амфотерицина В на грибы по сравнению с их влиянием на эритроциты достигалось, по-видимому, более быстрым выходом антибиотиков из холестеринсодержащих мембран, чем из эргостеринсодержащих мембран [Касумов и др., 1984 a]. Для объяснения этих данных была предложена гипотеза, согласно которой аминогруппа в сахарном остатке полиенов должна обладать достаточной степенью подвижности и находиться в определенной конформации, подходящей для образования водородной связи с гидроксильной группой молекул стеринов [Cybulska et al., 1983]. У молекул ПА, имеющих оба заряда (+ и -) степень свободы аминной группы ограничивается из-за электростатического взаимодействия с карбоксильными группами в канальном комплексе. Обнаружено, что полусинтетические производные ПА обладают меньшей токсичностью для млекопитающих и

лучшим, чем исходные антибиотики, иммуномодулирующим действием [Cheron et al., 1988; Henry-Toulme, 1989 a]. С целью уменьшения токсического действия ПА интенсивно ведутся исследования по созданию новых лекарственных форм ПА. Их используют в виде комплексов с полимерами, липосомами и другими веществами, улучшающими терапевтическое действие антибиотиков [Ahmad et al., 1989 a, b; Brajtburg et al., 1990 a, b, c; Grant et al., 1989; Jullien et al., 1989; Tasset et al., 1989, 1991].

Полиены проявляют выраженное изменение иммунного статуса организма (их действие тестировалось на разных типах клеток иммунной системы). Показано, что амфотерицин В усиливает иммунный статус организма и обладает иммуностимулирующим действием [Rosselle, Kaufman, 1978; Brajtburg et al., 1990 c; Vecchiarelli et al., 1986; Bolard, 1991; Schindler et al., 1993; Yamaguchi, Tokuda, 1993]. При цитометрическом анализе клеток селезенки и тимуса было обнаружено, что тимоциты обладают высокой чувствительностью к ПА. У взрослого индивидуума зарождение новых лимфоцитов происходит главным образом в костном мозге, дальнейшая дифференцировка которых в Т-клетки происходит в тимусе. На 6-ой недели в тимусе крыс насчитывается довольно много лимфоидных клеток. Однако к 16-ой неделе количество клеток уменьшается примерно в четыре раза [Клаус, 1990]. В тимусе содержатся как зрелые, так и незрелые клеточные элементы, причем, зрелых клеточных элементов насчитывается значительно меньше (5%-10%). В тимусе, кроме Т-клеток, присутствуют также и β -клетки. Вероятно, они попадают в тимус из расположенных в непосредственной близости паратимических лимфатических узлов. Тимус молодых животных почти целиком состоит из лимфоидных клеток. Изредка среди них встречаются дендритные, эпителиальные клетки и макрофаги. Из изложенного следует, что тимоциты, как и эритроциты, высокочувствительны к действию ПА и поэтому являются хорошей клеточной моделью для изучения *in vivo* эффектов ПА и установления первых этапов иммуномодулирующего действия полиенов [Непгу-Toulme et al., 1989 a, c]. В результате проведенных исследований с эритроцитами и тимоцитами в присутствии амфотерицина В и леворина и их алкилпроизводных было установлено, что указанные соединения формируют в клеточных мембранах каналы, диаметр которых составляет 4 Å и сравнимо с результатами работ на БЛМ [Ермишкин, Зильберштейн, 1982; Ел-Суфи, 1992; Ибрагимова и др., 2006 б].

ГЛАВА 11. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПОЛИЕНОВЫХ МАКРОЛИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Антибиотики широко используются в медицинской практике при лечении большинства инфекционных заболеваний, а также некоторых злокачественных образований, превосходя по своей эффективности действия все другие химиотерапевтические средства [Drouhet et al., 1960; Шемякин и др., 1961; Drouhet, 1968; Егоров, 1969; Кинский, 1969; Mechlinski, 1973; Kerridge, Whelan, 1984; Навашин, Сазыкин, 1988; Cao, Zhen, 1989; Guo et al., 1991; Bolard, Milhaud, 1996]. Особое место среди них занимают ПА. В последнее время наметились реальные перспективы расширения сферы применения противогрибковых ПА для борьбы с такими широко распространенными заболеваниями человека, как вирусные и гнойные инфекции, злокачественные и доброкачественные новообразования и атеросклероз. Они активны *in vivo* и *in vitro* против возбудителей глубоких системных микозов и дрожжеподобных грибов [Kobayashi, Medoff, 1977; Bolard, Vertut-Doi, 1995; Zotchev, 2003; Касумов, 2004].

Российская медицинская промышленность выпускает сегодня для практического здравоохранения противогрибковые препараты, пригодные для лечения грибковых инфекций. Это противогрибковые антибиотики: нистатин, амфотерицин В, микогентин, леворин, трихомицин, которые экспортируются в 30 зарубежных стран и запатентованы в 11 странах мира. Ведущую роль в разработке новых ПА занимает Санкт-Петербургский научно-исследовательский технологический институт антибиотиков и ферментов.

Использование ПА в медицинской практике базируется на детальном изучении молекулярно-биологических механизмов их взаимодействия с клеткой. Установлено, что ПА обладают мембронотропным действием и взаимодействуют со стеринами, связанными с цитоплазматическими мембранами клеток, образуя в них поры (каналы), через которые клетки начинают терять жизненно важные метаболиты, что приводит их к гибели. Более того, ПА взаимодействуют со свободными стеринами, находящимися в крови, биологических жидкостях и тканях, образуя гидрофильные высокомолекулярные комплексы, быстро выводящие холестерин из организма.

Такие свойства полиенов нашли практическое применение при лечении, например,adenомы предстательной железы первой-второй стадии с помощью леворина. В центральных урологических клиниках России, где этот препарат был широко испытан, получены хоро-

шие результаты. Высказывается предположение, что уменьшение размеров простаты и улучшение состояния больных происходит в результате связывания леворина с холестерином в желудочно-кишечном тракте.

Как известно, нарушения липидного обмена играют существенную роль в патогенезе атеросклероза и жировой дистрофии печени. В опытах на животных показано, что с помощью полиенов можно значительно замедлить развитие этих заболеваний. Эффективность такого воздействия зависит от дозы и длительности введения препарата.

Роль холестерина в животном организме трудно переоценить. Достаточно упомянуть, что он является предшественником половых гормонов и кортикоидов, регулирующих важнейшие этапы жизненного цикла. Не меньшее значение имеют стерины, входящие в состав мембран, где они связаны с такими мембранными компонентами, как белки и фосфолипиды. Известно, что стероидный гомеостаз онкологических больных существенно меняется. Поскольку в мембранах опухолевых клеток содержится больше холестерина, чем в нормальных, представляется целесообразным воздействовать на развитие опухолевого процесса с помощью ПА. При исследовании ПА выяснилось, что они обладают способностью тормозить развитие метастазов у экспериментальных животных. На лабораторных животных и большом количестве моделей перевиваемых новообразований (sarкомы, лейкозы, асцитные опухоли) обнаружено, что ПА способны снижать токсическое действие ряда цитостатиков и усиливать их противоопухолевый эффект [Zhubanova et al., 1975; Ибрагимова и др., 2002 а; Ибрагимова, Алиев, 2003; Zotchev, 2003]. Это, по-видимому, связано со способностью полиенов избирательно увеличивать проницаемость опухолевых клеток, которые становятся чувствительны к действию химиотерапевтических агентов.

В последние годы выяснилось, что антибиотики полиеновой структуры обладают еще одним обнадеживающим свойством – инактивировать некоторые инфекционные и онкогенные вирусы, препятствовать проникновению их в клетку и ингибировать их репродукцию. Более того, водорастворимые производные амфотерицина В, леворина и микогептина при совместном введении с инактивированными противовирусными вакцинами способны стимулировать специфический иммуногенез [Stewart et al., 1981; Dromer et al., 1990; Zotchev, 2003].

Приходится, однако, отметить, что токсичность ПА для организма человека резко ограничивает их применение и требует создания

новых лекарственных форм. В настоящее время известны два пути синтеза новых лекарственных форм ПА. Первый путь – химическая трансформация полиеновой молекулы и второй путь - синтез молекул с помощью генно-инженерных работ, о которой речь пойдет ниже. Исследуя свойства одиночных ионных каналов на бислойных мембранах в присутствии ПА, удается внести вклад в установление связи между структурой и функцией молекул полиенов и тем самым конкретизировать пути для теоретических подходов к целенаправленному синтезу новых производных с заданными свойствами [Касумов, 1980]. Для многих ПА установлена химическая структура, разработаны методы направленной химической модификации молекул и синтезирован широкий спектр их производных. Исследование действия ПА на бислои позволяет установить взаимосвязь между структурой молекул ПА и свойств, образуемых ими ионных каналов, и расшифровать механизм их функционирования. ПА представляют интерес не только для исследования молекулярного механизма ионной избирательности клеточных мембран, но и для решения целого ряда прикладных задач. Так, они являются основными лекарственными препаратами для борьбы с грибковой инфекцией и другими заболеваниями. Поэтому весьма актуальной задачей является синтез и отбор высокоэффективных антибиотиков, нетоксичных для человеческого организма, но обладающих избирательным действием на клетки грибов. Эту проблему можно решить путем изучения взаимосвязи структуры и функции ПА на БЛМ, что будет способствовать созданию теоретической основы для получения новых соединений с определенными терапевтическими свойствами.

При использовании ПА в медицине возникает ряд острых, требующих решения, проблем: уменьшение токсичности полиенов для организма человека, предотвращение развития резистентности клеток грибов к действию ПА, повышение эффективности и специфиности взаимодействия антибиотиков со стериновым компонентом клеток грибов.

Токсичность. Одной из важнейших задач в этой области является поиск соединений, нетоксичных для организма и токсичных для клеток грибов. Ее решение представляется возможным путем синтеза производных ПА и изучения их свойств на БЛМ [Schaffner, 1984; Касумов, 1986 а; Borowski et al., 1995].

Многочисленные экспериментальные данные позволяют считать, что действие ПА на живые клетки, также как и на искусственные мембранны, связано с увеличением их проницаемости для ионов и не-

электролитов.

ПА высокоактивны против патогенных грибов. Однако широкое применение ПА сдерживается их высокой токсичностью для человека [Carnevale et al., 1980; Chavanet et al., 1994]. Принято считать, что механизм токсичности ПА состоит в связывании их с липопротеидами клеточных мембран [Chunn et al., 1977; Lago et al., 1977; Kuwano et al., 1981; Levy et al., 1985; Koldin et al., 1985; Heymans et al., 1990; Ahmad et al., 1990; Barwicz et al., 1991; Joly et al., 1992; Wasan et al., 1993, 1994 a, b, 1998; Vertut-Doi et al., 1994; Brajtburg et al., 1984 b, 1994 a, b, c; Anachi et al., 1995; Cohen, 1998; Barwicz et al., 1998]. Создание и отбор лекарственных соединений, сохраняющих высокую эффективность против патогенных клеток и нетоксичных для человека, является актуальной задачей фармакологии и медицины [Kotller-Brajtburg et al., 1974 a, b, 1977; Brajtburg et al., 1981; Schaffner, 1987; Saint-Julien et al., 1992; Reuhl et al., 1993]. Как показывают исследования, модификация молекулы ПА в области полярных групп может быть одним из путей решения этой задачи. Так, метиловый эфир амфотерицина В и метиловый эфир нистатина примерно в 250 раз менее токсичны, чем исходные антибиотики [Fisher, 1980]. Токсичность метамфоцина также весьма мала [Вайнштейн и др. 1982].

Очевидно, эффект антибиотика на клетку тем больше, чем выше концентрация антибиотика и, тем самым, уровень индуцированной им проницаемости (проводимости) мембранны. Но, как следует из экспериментальных данных, эта величина не является единственной характеристикой биологической эффективности ПА. В самом деле, проводимость, индуцированная в БЛМ метамфоцином, сравнима с проводимостью, индуцированной исходным амфотерицином В. Токсичность же последнего велика по сравнению с метамфоцином. Это может быть объяснено следующим образом. При прочих равных условиях эффект ПА тем сильнее, чем дальше он связан с клеточной мембраной. В условиях организма, который является проточной, открытой системой, происходит постепенная отмывка антибиотика из клеток. Это приводит к конечному времени существования его в мембране. Чем быстрее идет отмывка, тем менее токсичен антибиотик [Christansen et al., 1985]. Это предположение согласуется с более быстрой релаксацией проводимости БЛМ при отмывке метамфоцина. Отсюда можно сделать заключение, что одним из параметров, характеризующих биологическую эффективность ПА, является индуцируемый антибиотиками уровень проводимости, измеряемых на БЛМ, и постоянная времени релаксации проводимости при отмывке

антибиотика. Построить критерии биологической эффективности антибиотика, зависящие как от индуцированной проводимости g_s , так и от постоянной времени τ_r , можно (упрощенно) следующим образом. Под действием ПА чувствительные клетки теряют компоненты цитоплазмы, в том числе ионы. Полная потеря (утечка) за время

действия антибиотика пропорциональна $\int_0^\infty g(t)dt$. Полагая

$g(t) = g_s e^{-t/\tau_r}$ находим, что интеграл равен $g_s \cdot \tau_r$. Это и есть искомый критерий.

Рассмотрим с этой точки зрения результаты исследования алкильных производных амфотерицина В. Индуцированная проницаемость (проводимость) мембранны меняется в диапазоне нескольких порядков при изменении концентрации антибиотика в пределах одного порядка. Релаксация индуцированной проводимости происходит с постоянной времени, меняющейся в пределах 1-2 порядков. Таким образом, биологический эффект ПА может в широких пределах регулироваться его концентрацией.

Эффективность антибиотика и постоянная времени релаксации проводимости мембран при отмывке антибиотика сильно зависит от стеринового состава мембраны. Поэтому при прочих равных условиях эффект ПА на клетки с разным стериновым составом мембраны меняется в широких пределах. Существует, очевидно, оптимальная концентрация ПА (ее можно оценить в опытах с БЛМ), при которой должен наблюдаться наилучший терапевтический эффект.

Значительное уменьшение постоянной времени релаксации, а значит, и токсичности имеет место в ряду алкильных производных амфотерицина В: от исходного амфотерицина В до бутамфоцина с длинной алкильной цепью. Исследованные производные быстро отмываются из холестеринсодержащих мембран, но медленно отмываются из эргостеринсодержащих мембран. Учитывая, что холестерин является основным стериновым компонентом мембран животных клеток, а эргостерин – клеток грибов, в частности, патогенных, можно сделать вывод, что исследованные антибиотики слаботоксичны для человека, но токсичны для грибов, а потому могут быть использованы в медицине.

Установлено, что чувствительность клеток к ПА зависит от липидного состава мембран, химического строения и концентрации действующего антибиотика [Bolard et al., 1993]. Степень повреждения клеток зависит не только от уровня индуцированной проводимо-

сти, но и от времени нахождения антибиотика в мембране. Это время определяется в экспериментах с бислойными мембранами как постоянная времени релаксации проводимости мембраны при удалении (отмыкке) антибиотика из примембранных растворов. Таким образом, исследуя на бислойных мембранах антибиотики различной структуры, можно оценить их токсичность для клеток данного стеринового состава по величине постоянной времени релаксации. Как было показано выше, ПА сильно связываются с мембранами микробных клеток. Степень связывания ПА с мембраной может служить характеристикой токсичности данного антибиотика. Метамфоцин при сравнимых условиях в 10 раз менее токсичен, чем исходный амфотерицин В [Fisher, 1980; Вайнштейн и др., 1982]. Это может быть связано с повышенной скоростью выхода метафоцина из мембраны. Для оценки этой скорости был использован метод измерения постоянной релаксации проводимости при удалении алкильных производных амфотерицина В из примембранных растворов. Удлинение цепи на одну CH_2 группу уменьшает постоянную времени релаксации примерно в 4 раза, рис. 11.1. Экстраполяция этой зависимости к $n=0$, что соответствует исходному амфотерицину В, дает $\tau_r = 160$ с (рис. 11.1).

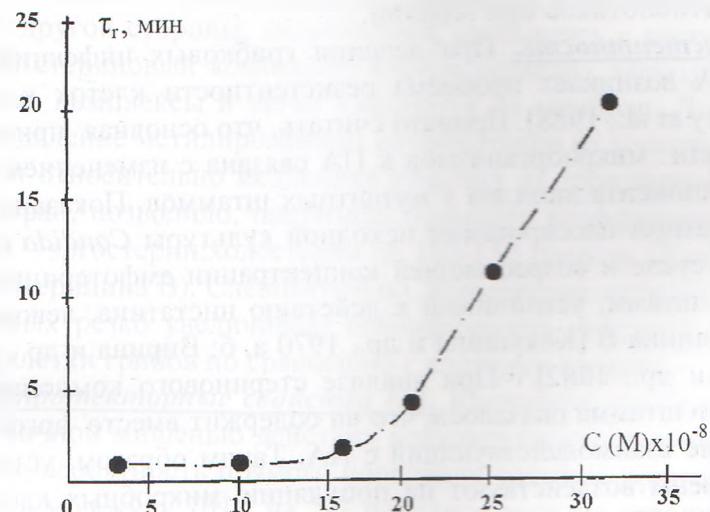


Рис. 11.1. Зависимость постоянной времени релаксации от длины алкильной цепи. Концентрация алкильных производных амфотерицина $5 \cdot 10^{-7}$ М. Состав мембраны: фосфолипид:холестерин 2:1. Водные растворы содержат 10 мМ KCl, pH 7,0, 23°C [Kasumov, Bolard, 2004].

Производные леворина (Na -соли, алкильные аналоги) влияют на время нахождения антибиотика в мембране. Модифицируя мембранны алкильными производными с разной длиной углеводородной цепи - $\text{R}=\text{CH}_3$ - метил; $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$ - этил; $\text{R}=\text{C}_3\text{H}_7$ - пропил; $\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9$ - бутил; $\text{R}=\text{C}_5\text{H}_{11}$ - амил можно точно контролировать время работы антибиотика в мембране.

Величина τ_r резко возрастает при замене в составе мембраны холестерина на эргостерин. При постоянной концентрации антибиотика, когда на холестеринсодержащих мембранах τ_r составляет несколько минут, на эргостеринсодержащих мембранах не удается наблюдать изменение проводимости в течение 40-50 мин [Касумов и др., 1984]. Эти данные показывают, что амфотерицин В и его аналоги значительно сильнее связываются с эргостеринсодержащими мембранами, чем с холестеринсодержащими. Результаты экспериментов по отмыкке приведены в табл. 9.3.1. Описанные данные позволяют заключить, что алкильные производные амфотерицина В высокоеффективны на клетках грибов, мембранных которых содержат эргостерин, но не токсичны для животных клеток, мембранных которых содержат холестерин. Предполагается, что токсичность антибиотика для клеток хозяина будет снижаться с ростом длины алкильной цепи. Такая модификация позволит регулировать время функционирования антибиотиков при терапии.

Резистентность. При лечении грибковых инфекций с помощью ПА возникает проблема резистентности клеток к полиенам [Powderly et al., 1988]. Принято считать, что основная причина резистентности микроорганизмов к ПА связана с изменением стеринового компонента липидов у мутантных штаммов. Показано, что при многократном пассировании исходной культуры *Candida albicans* в жидкомусле и возрастающей концентрации амфотерицина В был выделен штамм, устойчивый к действию нистатина, леворина A_2 и амфотерицина В [Кокушина и др., 1970 а, б; Вирина и др., 1976; Белоусова и др., 1982]. При анализе стеринового компонента резистентного штамма оказалось, что он содержит вместо эргостерина – стерин, не взаимодействующий с ПА. Таким образом, установлено, что полиены воздействуют на популяцию микробных клеток, обуславливая отбор мутантов с измененным синтезом стеринов в клеточных мембранах.

Эффективность. Ответственной за эффективность антибиотиков, является система сопряженных двойных связей в структуре молекулы полиена. В настоящее время отсутствуют способы ее хими-

ческой модификации с одновременным сохранением числа двойных связей в полиеновой цепи. Результаты собственных исследований показали, что концентрация, необходимая для сборки одиночного канала, растет с уменьшением числа двойных связей в полиеновой цепи молекул антибиотиков в ряду: амфотерицин<филипин<нистатин. В то же время метилирование полярных групп в молекулах гептаеновых антибиотиков с ароматической группировкой резко повышает ионную проницаемость при введении антибиотиков с одной стороны мембранны. Таким образом, одним из путей повышения эффективности ПА является метилирование полярных групп с одновременным увеличением размера макролидного кольца за счет повышения числа двойных связей в хромофоре молекул гептаеновых ароматических антибиотиков.

Специфичность. Одной из основных задач, стоящей перед медико-биологической промышленностью, является изыскание новых форм антибиотиков, обладающих высокой специфичностью к эргостеринсодержащим мембранам клеток грибов. Поиск пути решения этой проблемы связан здесь с тем, что метилированные гептаеновые антибиотики в комплексе с эргостерином (основной стериновый компонент клеток грибов) образуют каналы с высокими показателями времени жизни и практически не удаляются из мембранны при отмытке. С другой стороны, антибиотики, связываясь с холестерином (основной стериновый компонент клеток хозяина), образуют менее стабильные комплексы и легко удаляются из мембранны. Достаточно быстрое удаление метилированных антибиотиков из холестериновых мембранны и относительно медленная отмытка из эргостеринсодержащих мембранны, позволило, например, повысить коэффициент специфичности – эргостерин:холестерин до 100-150 (вместо 10 для исходного амфотерицина В). Следовательно, применение метилированных производных резко увеличивает специфичность действия антибиотиков на клетки грибов по сравнению с клетками хозяина.

Радиопротекторные свойства П.4. Клеточные мембранны являются первичной мишенью действия ионизирующего излучения. Показано, что вероятность прямого попадания частицы ионизирующей радиации в молекулу ДНК на 5-7 порядков меньше вероятности ее попадания в мембрану клеток [Маргулис. Маргулис, 2005]. Отсюда следует, что львиная доля энергии ионизирующего излучения поглощается мембранный системой клеток. Это было показано на примере инактивации амфотерициновых и нистатиновых каналов в БЛМ под действием ионизирующей радиации [Lamy-Freund et al., 1985;

Barth et al., 1993]. Исходя из структуры ПА, предполагается, что система конъюгированных двойных связей в молекулах ПА может служить хелатором, попадающей в мембрану энергии ионизирующей радиации. Поэтому становится целесообразным изучение роли мембральноактивных ПА в предохранении клеточных мембран от поражения ионизирующей радиацией и возможности использования их в качестве радиозащитных веществ [Ibragimova et al., 2008]. При изучении радиопротекторных свойств ПА был получен ряд противоречащих друг другу данных. Так, например, показано, что под действием амфотерицина В усиливается перекисное окисление липидов в клеточных мембранах [Brajtburg et al., 1985]. При парентеральном введении амфотерицина В крысам в дозе 1,5 мг/кг веса животного было обнаружено увеличение содержания малонового диальдегида (МДА) [Rao et al., 1997]. Больше всего их было обнаружено в почках, а затем по степени их уменьшения в других органах: в тканях мозга > печени > легких > сердце [Casaccia et al., 1991]. Предварительное введение фруктозо-1,6-дифосфата крысам в дозе 0,35 гр/кг веса животных предохраняло животных от последующего введения амфотерицина В и уменьшало количество МДА [Rao et al., 1997]. В работах Осака и др., а также Ибрагимовой и др. показано, что амфотерицин В и леворин могут играть роль радиопротектора [Osaka et al., 1997; Ibragimova et al., 2008].

Антибиотики, являясь самыми эффективными соединениями на протяжении последних 50 лет, продолжают и сегодня играть ведущую роль в резком сокращении смертности, благодаря своим антибактериальным и антипаразитарным свойствам [Kerridge, 1986; Zotchev, 2003]. Наличие грибковых инфекций представляет большую угрозу для жизни человека и прежде всего потому, что ослабляет иммунную систему организма и приводит к резкому росту иммунодефицитных больных и увеличивает восприимчивость организма к вирусу СПИДА [De Marie et al., 1994; Zotchev, 2003]. Такие факторы, как ВИЧ-инфекция, противоопухоловая химиотерапия, использование иммунодепрессивных препаратов после пересадки органов и тканей, приводят к появлению у этой группы больных инвазивных микозов, что представляет большую угрозу для жизни. Перечень высокоэффективных противогрибковых препаратов, способные разрешить эту проблему, очень ограничен. К таким препаратам относятся прежде всего флуцитозин, азоли и полиеновые макролиды [Zotchev, 2003]. На стадии разработки находятся и другие новые препараты, такие как эхинокандины [Arathoon, 2001]. Флуцитозин

препятствует синтезу ДНК и его использование ограничено тем, что он обладает очень узким спектром действия и приводит к быстрому возникновению резистентности патогенных грибов к этому препаратору [Ablordeppey et al., 1999]. Это относится и к противогрибковым препаратам, приготовленных на азольной основе, которые способны подавлять синтез эргостерина, как основного компонента мембран грибковых клеток, путем ингибирования ферментативной активности ланостериндиметилазы [Lupetti et al., 2002]. Противогрибковые препараты, приготовленные на азольной основе, обладают высокой фунгистатической активностью, однако на конечном этапе лечения они приводят к частым рецидивам. К сказанному следует добавить, что указанные выше препараты взаимодействуют с большим числом других фармакологических препаратов и в конечном итоге приводят к интоксикации печени [Bays, Dujoyne, 1998].

ПА являются самыми эффективными соединениями, используемые в борьбе с грибковой инфекцией [Drouhet et al., 1960; Omura, Tanaka, 1984]. Нистатин и амфотерицин В были первыми антибиотиками, которые оказались высокоактивными при лечении различных грибковых инфекций [Hazen, Brown, 1950, 1951; Vandeputte et al., 1955/1956]. Более 30 лет амфотерицин В используется в клинической практике при лечении грибковых инфекций и, несмотря на создание новых противогрибковых препаратов, остается самым эффективным среди них [Gallis et al., 1990; Allende et al., 1994]. В своей основе полиеновые макролиды являются токсичными и могут вызвать такие серьезные эффекты как повреждение печеночных канальцев, гемолиз эритроцитов и тромбофлебию (особенно при внутривенном введении) [Mandell, Petri, 1996]. Учитывая широкий спектр биологической активности и низкую частоту антибиотикорезистентности, ПА являются незаменимыми препаратами в борьбе с глубокими системными микозами. В течение уже многих лет ведется поиск новых антибиотиков и на их основе проводится химическая модификация структуры молекул с целью получения антибиотиков, обладающих целенаправленным действием и имеющих низкую степень токсичности [Jarzebski et al., 1978; Sarthou et al., 1986; Schaffner, 1987; Gondal et al., 1989; Bolard, 1991; Saint-Julien et al., 1992; Allendorfer et al., 1992; Taylor et al., 1993; Amantea et al., 1995; Zotchev, 2003]. Тот факт, что некоторые ПА обладают способностью подавлять грибковые и ВИЧ-инфекции, усиливать иммунный статус организма, препятствовать развитию гнойных инфекций, подавлять рост опухолевых клеток, снимать стрессовое состояние, указывает на необходимость дальнейшего изучения этого класса антибиотиков.

мость использования ПА как биологически активных фармакологических препаратов в терапевтических целях [Walls, Kay, 1982; Christansen et al., 1985; Chabot et al., 1989; Collette et al., 1989, 1991; Emminger et al., 1994; Ибрагимова, Алиев, 2002; Ibragimova et al., 2008]. В связи с этим необходим поиск и синтез новых производных ПА для увеличения биологической активности и уменьшения степени их токсичности [Denning, 1991; Taylor et al., 1993].

Для ПА возникает проблема быстрого выведения антибиотика из организма, ввиду их относительной токсичности при высоких концентрациях. Так, например, некоторые ПА, в том числе и амфотерицин В, обладают нефротоксичностью [Kubatiev et al., 1985; Эфендиев и др., 1986 а, б, 1989; Shell et al., 1989] и гемолитической активностью [Mazerski et al., 1986]. Отмывка ПА из мышечных клеток идет с большей скоростью, чем из липидных мембран [Швинка, Кафнер, 1995]. Процесс выведения антибиотика из организма резко усиливается при введении ПА в комплексе с ДМСО [Ибрагимова и др., 2002 б; Ибрагимова, Алиев, 2002; Курбанов, Касумов, 2004; Ибрагимова и др., 2006 а]. Это приводит к уменьшению коэффициента распределения антибиотика между мембраной и водой. Использование ПА в комплексе с ДМСО повышает эффективность действия полиенов, увеличивает степень резорбции и избирательного воздействия на патогенные микроорганизмы [Ibragimova et al., 2002; Ибрагимова и др., 2002 б; Ибрагимова, Алиев, 2002]. Важным параметром, определяющим токсичность антибиотика, является время нахождения антибиотика в мемbrane [Касумов, 1986 а; Brajtburg, Bollard, 1996]. Основная цель использования производных леворина (Na -соли, алкильных аналогов) состоит в регулировании времени нахождения антибиотика в мемbrane. Модифицируя мембранны алкильными производными ПА с разной длиной углеводородной цепи - $\text{R}=\text{CH}_3$ - метил; $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$ - этил; $\text{R}=\text{C}_3\text{H}_7$ - пропил; $\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9$ - бутил; $\text{R}=\text{C}_5\text{H}_{11}$ - амил можно точно контролировать время нахождения антибиотика в мемbrane. Проведенные эксперименты на липидных мембранах показали, что с увеличением длины алкильной цепи производных леворина время нахождения их в мемbrane по сравнению с исходным леворином уменьшается [Касумов, 1986; Микаилова, 1990]. Время пребывания антибиотика в мемbrane определялось по постоянной времени релаксации проводимости мембран после отмывки антибиотика. Используя алкильные производные леворина, можно резко уменьшить время пребывания антибиотика в мемbrane и тем самым уменьшить степень его токсичности.

Необходимо отметить еще одну важную особенность. Леворин, как и другие ПА, являются самыми эффективными соединениями, используемыми в медицинской практике для лечения грибковых инфекций [Цыганов, 1970]. Степень избирательного воздействия леворина и других ПА на патогенные микроорганизмы связана с различным стериновым составом грибковых клеток и клеток хозяина [Brajtburg, Bolard, 1996; Huang et al., 2002]. Клетки патогенных грибов, содержащие эргостерин, в 10-100 раз более чувствительны к действию ПА, чем клетки хозяина, содержащие холестерин [Касумов, 1986 а; Brajtburg, Bolard, 1996; Cybulska et al., 1995; Bogowski, 2000]. Более того, показано что леворин, как и другие ПА, прочно связываются с эргостеринсодержащими мембранами микробных клеток и практически не отмываются из них [Касумов, 1986 а; Микаилова, 1990; Brajtburg, Bolard, 1996]. Учитывая то, что основным стериновым компонентом мембран патогенных микроорганизмов является эргостерин, можно, варьируя концентрацию леворина и его алкильных производных, резко увеличить активность и избирательность действия антибиотиков в отношении патогенных микроорганизмов. Некоторые представители ароматических гептаеновых антибиотиков обладают способностью воздействовать не только на грибковые, но и с высокой эффективностью и избирательностью подавлять гнойные и вирусные инфекции [Kasumov, 2004; Касумов, Алиев, 2008].

Увеличить срок действия антибиотиков в организме, длительно поддерживать нужную их концентрацию, упростить методы введения, устраниТЬ возможные осложнения – такие задачи в последнее время встали перед учеными. Чтобы защитить вводимые антибиотики от действия ферментов и других органических молекул, их химически спивают между собой, затем заключают их в полимерные капсулы, погружают в студень-гель, связывают с поверхностно-активными веществами, иммобилизуют на различных носителях. Лучший эффект достигается при иммобилизации антибиотиков с водорастворимыми полимерами-носителями (полисахаридная матрица) [Tasset et al., 1989, 1991, 1992; Fromting, 1993; Lee et al., 1994 b; Rocheleau et al., 1994]. При этом значительно повышается активность и стабильность антибиотика, в десятки раз снижается аллергическое действие. Все это создает хорошие предпосылки для успешного использования в ближайшем будущем ПА по новому назначению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химическая трансформация молекул ПА является первым шагом на пути исследования структурно-функциональных особенностей взаимодействия полиенов с клеточными и модельными мембранами. На сегодняшний день нет тонких и современных физико-химических методов точечной и избирательной модификации функционально активных групп в молекулах антибиотиков. Например, проведение целенаправленного синтеза в гидрофильной части самого лактонного кольца, содержащей гидроксильные и карбонильные группы, сегодня не представляется возможным, так как все эти функциональные группы одинаково реакционноспособны. Существует другой путь получения новых молекул ПА – биологический путь синтеза, используя методы генной инженерии [Campelo, Gil, 2002; Fjærvik, Zotchev, 2005 а, б]. Известно, что ПА продуцируются определенными микроорганизмами и, это означает, что их синтез генетически детерминирован и, в связи с этим, появляются новые возможности трансформации молекул в труднодоступных местах лактонного кольца. Методом генной инженерии могут быть получены новые производные молекул ПА. Почвенные грамположительные микроорганизмы, принадлежащие к классу *Streptomyces*, продуцируют большинство ПА. Синтез ПА начинается с образования макролактонного кольца с участием фермента поликетидсингтетазы, который катализирует реакцию декарбоксилирования карбоксильных кислот [Hopwood, 1997]. Поликетидсингтетаза обладает тремя ферментативными активностями – кеторедуктазной, дегидратазной и эноилредуктазной. Указанные выше каталитические ферменты определяют степень поэтапной сборки поликетидной цепи. Комбинируя этими ферментами, можно осуществить синтез гидроксильных групп, а также синтез двойных связей в молекуле ПА [Hopwood, 1997; Katz, McDaniel, 1999]. При проведении полного поликетидного синтеза макролактонное кольцо замыкается в положении углеродного атома C₈. Методом генной инженерии из антибиотик-синтезирующих микроорганизмов были выделены гены, отвечающие за синтез пимарицина, нистатина, амфотерицина В и кандинцидина [Aparicio et al., 2000; Brautaset et al., 2000; Brautaset et al., 2002; Caffrey et al., 2001; Campelo, Gil, 2002]. Проведя полный анализ выделенных генов, можно определить пути биосинтеза полиеновых макролидов. Используя определенные биосинтетические ферменты, можно получить ряд мутантов, участвующих в синтезе нистатина и его аналогов, и предска-

зать модель биосинтеза нистатина [Zotchev, 2003]. Согласно этой модели, фермент поликетидсинтетаза катализирует реакцию поэтапной сборки тридцативосьмичленного лактонного кольца, состоящего из 15 единиц ацетата и 3 единиц пропионата. Подобная сборка позволяет точно проследить за последовательностью биохимических реакций при синтезе молекул нистатина и предсказать какие изменения в структуре молекул могут произойти при специфической манипуляции определенными ферментами. После формирования макролактонного кольца метильная группа при C₁₆ присоединяется к молекуле пропионата, которая в дальнейшем окисляется с помощью фермента Nys N P450 монооксигеназы вплоть до образования ензиклического карбоксила. На следующем этапе сборки модифицируется микозаминовое кольцо, гликозилируясь при C₁₉ ферментом NysDI – гликозилтрансферазой. На последнем этапе синтеза подключается другой фермент - P450 монооксигеназа, который проводит последнюю реакцию гидроксилирования при положении углеродного атома C₁₀, в результате которого формируется полная химическая структура нистатина A₁ [Zotchev, 2003]. Были получены генетически трансформированные бактерии, способные синтезировать новые аналоги ПА [Brautaset et al., 2000; Brautaset et al., 2002; Mendes et al., 2001]. Выделенные в результате генно-инженерных работ новые аналоги антибиотиков не обладали высокой антагрибковой активностью, но, тем не менее, работы в данном направлении продолжаются. Эти работы будут способствовать определению взаимосвязи между структурой молекул и их биологической активностью и в конечном итоге могут привести к синтезу новых антибиотиков с улучшенными терапевтическими свойствами.

ПА специфически взаимодействуют со стеринами чувствительных к антибиотикам организмов, таких как грибы и простейшие [Oroshnik, Mebane. 1963; Amati, Lago, 1974, 1975; Norman et al., 1976; Pfaller, Krogstad, 1981; Oranusi, Trinci, 1985; Bolard et al., 1991; Legrand et al., 1992]. Исследования молекулярного механизма взаимодействия ПА с мембранами показали, что полиены в комплексе со стеринами создают в мембранных каналах, через которые из клеток в наружную среду могут диффундировать ионы и внутриклеточные компоненты, что является одной из причин лизиса клеток [De Kruyff, Demel, 1974; Ermishkin et al., 1976; Lewis et al., 1977; Kasumov et al., 1979, 1981; Ел Суфи, 1992]. Фунгицидный эффект ПА объясняется выходом из клеток ионов через сформировавшиеся в мембранных каналах [Hammond, 1977]. Полиены более чувствительны к мембранам,

в составе которых содержится эргостерин, чем к мембранам, в составе которых имеется холестерин. Благодаря этой отличительной особенности полиены успешно используются в лечебных целях [Teerlink et al., 1980; Lyman, Walsh, 1992]. Гликозилированные ПА имеют терапевтический индекс выше, чем негликозилированные. Как показали исследования, гликозилированные антибиотики биологически более эффективны. Негликозилированные антибиотики обладают высокой токсичностью и их токсичность связана со способностью антибиотиков формировать в биологических мембранах большие по диаметру каналы, в сравнении с амфотерицином В, приводящие к разрыву клеточных мембран [Boland, 1986 a, b; Milhaud, 1992; Milhaud, Michels, 1999; Milhaud et al., 2002].

Проведенные исследования показали, что хромофоры молекул ПА, взаимодействуя с молекулами стерина, формируют канал в стехиометрическом соотношении 1:1 (8 молекул амфотерицина В на 8 молекул стерина). Стехиометрический коэффициент сборки одиночных каналов для разных ПА может сильно отличаться друг от друга и быть равным от 3 до 17 [Cass et al., 1970; Касумов, 1986 а; Moreno-Bello et al., 1988; Khutorsky, 1992; Golovanov, Tsygankova, 1995]. Следует отметить, что молекулярная структура гидрофильной части канала до сих пор не установлена из-за отсутствия соответствующих методов определения точной локализации молекулярных групп, выстилающих внутреннюю полость канала. Однако, соответствующие расчеты показывают, что канал формируется путем взаимодействия одной молекулы амфотерицина В с одной молекулой холестерина и согласно проведенным исследованиям, внутренний диаметр канала составляет величину 7-10 Å [Maher, Singer, 1984; Kolomytkin, 1987; Marin et al., 1991; Langlet et al., 1994; Baginski et al., 1994 a, b; 1997 a, b; Khutorsky, 1992]. Согласно модели ионного канала, аминная группа молекулы антибиотика, входящая в состав микозамина, может связываться с эхоциклической карбоксильной группой соседней молекулы и, таким образом, стабилизировать канал в проводящем состоянии, благодаря образованию водородной связи между двумя полярными группами. Компьютерное моделирование формирования ионного канала в присутствии амидного производного амфотерицина В показало, что ионизирующие группы молекул могут быть обращены как внутрь, так и вне канала, т.е. полярные группы могут быть в двух конформационных формах, благодаря повороту микозамина вокруг гликозидной связи [Resat et al., 2000]. Существует предположение о том, что биологическая активность ПА может зависеть

от природы межмолекулярных взаимодействий между заряженными группами молекул антибиотиков и фосфолипидов. Предполагается, что встраивание антибиотиков в мембрану происходит в результате образования водородной связи между ПА и фосфатными группами молекул фосфолипидов. Некоторые ПА легко образуют молекулярные комплексы на поверхности мембранны даже при отсутствии в составе мембран стеринов [Witzke, Bittman, 1984; Resat et al., 2000]. Из литературных источников известно, что толщина самой мембранны больше, чем длина полиеновой полупоры и, для того чтобы создать проводящий трансмембранный канал, необходимо взаимодействие двух канальных полупор с обеих сторон мембранны [Ермишкин, Зильберштейн, 1982; Касумов, 1986 а]. Механизм молекулярной сборки полиеновых каналов объяснить в настоящее время не представляется возможным. Однако, можно экспериментально наблюдать образование амфотерицином В канала, состоящего из двух полупор, и ионпроводящей полупоры при одностороннем введении к мембранам леворина [Касумов, Либерман, 1973; Касумов, 1986 а; Курбанов, Касумов, 2004; Ибрагимова и др, 2006 б].

Показано, что ПА образуют в водных растворах молекулярные ассоциаты [Вайнштейн, 1970; Lamy-Freund et al., 1989; Kajter et al., 1989; Mazerski, Borowski, 1996; Milhaud, Michels, 1999]. Полиеновые цепи, скрываясь от воды, составляют внутреннюю полость ассоциата, а гидрофильные цепи и полярные группы молекул антибиотиков обращены при этом в водную среду. В водной среде ассоциаты молекул амфотерицина В ориентируют свои полярные группы перпендикулярно к плоскости мембранны и тем самым определяют начальный этап взаимодействия антибиотиков с мембранами [Milhaud et al., 2002; Ибрагимова и др., 2006 б]. Следующим шагом формирования канального комплекса является взаимодействие антибиотиков со стеринами в бислое. За счет образования водородной связи между гидроксильными группами молекул холестерина и полярными группами молекул антибиотиков происходит выворачивание этих комплексов наизнанку внутри мембранны [Milhaud et al., 2002; Ибрагимова и др., 2006 б]. Агрегированные ассоциаты молекул ПА способны внедряться в гидрофобную область стеринсодержащих мембран (холестерин или эргостерин) и образовать трансмембранные ионпроводящие каналы. Если в первом приближении представляется возможным объяснить механизм взаимодействия антибиотиков с внешней поверхностью мембранны, то гораздо сложнее объяснить механизм сборки каналов внутри самой мембранны. Структура моле-

кул ПА такова, что они не способны сами в мономерной или ассоциированной форме пересечь фосфолипидную бислойную мембрану посредством пассивной диффузии. Это было показано экспериментально при изучении проницаемости фосфолипидных мембран для ПА меченых тритием [Касумов, 1986 а].

В настоящее время для лечения системных грибковых инфекций используются, в основном, амфотерицин В и нистатин. Сравнительный анализ биологической активности амфотерицина В и нистатина показывает, что амфотерицин В примерно в 6 раз более эффективен против большинства грибов, чем нистатин [Aszalos, 1975; Aszalos et al., 1985]. На БЛМ показано, что проводимость амфотерицинового канала примерно в 10 раз выше чем нистатинового канала [Ermishkin et al., 1976]. Амфотерицин В и нистатин очень близки друг к другу по своей химической структуре, однако мембранны с холестерином более чем в 100 раз чувствительны к амфотерицину В, чем к нистатину [Касумов, Либерман, 1972; Касумов, 1986 а; Курбанов, Касумов, 2004]. Отличие между амфотерицином В и нистатином состоит в прерывности системы двойных связей в структуре гидрофобной части молекул. Полиеновая цепь у нистатина A₁ и амфотерицина A одинакова и, как показали исследования, антигрибковая активность у этих двух антибиотиков идентична друг другу [Akiyama et al., 1980; Aszalos et al., 1985]. Из этих данных следует, что наличие определенного числа двойных связей в хромофоре ПА является важным фактором, определяющим их чувствительность к холестеринодержащим мембранам. Наблюдается прямая зависимость между числом двойных связей в хромофоре и биологической активностью полиенов. Показано, что чем выше число двойных связей в хромофоре ПА, тем выше их биологическая активность [Касумов, 1986 а; Joly et al., 1992 а, б]. ПА обладают высокой антигрибковой активностью, но в то же самое время они обладают и определенной токсичностью. Однако, это не может служить препятствием для проведения исследований, касающихся изучения взаимосвязи между структурой ПА и их функцией в мембранах. Исследование связи между структурой антибиотиков и степенью их токсичности показало, что N-ацетилирование аминной группы и этирификация екзоциклической карбоксильной группы заметно уменьшает степень гемолитической активности по сравнению с исходными антибиотиками [Cybulska et al., 1983]. Метилирование функциональной аминной и карбоксильной группы в молекулах ПА при условии сохранения положительно заряда на аминной группе показало, что степень гемолиза эритро-

цитов уменьшается [Cheron et al., 1988; Султанова и др., 2007]. Сохранение отрицательного заряда на карбоксильных группах молекул при синтезе ацетил-производных ПА оказывает слабое влияние на степень гемолиза эритроцитов и на число формируемых в мемbrane каналов. Соответствующая химическая модификация аминной группы молекул полиенов уменьшает антигрибковую активность антибиотиков. В то же время модификация карбоксильной группы в молекулах антибиотиков не оказывает влияния на степень их антигрибковой активности. Исследования показали, что полярные группы играют важную роль в проявлении биологической активности и избирательности действия ПА. Эксперименты, проведенные в присутствии некоторых производных амфотерицина В, модифицированных в положении углеродного атома C_{13} , показали уменьшение антигрибковой активности и избирательности действия антибиотиков на мембранны [Taylor et al., 1993]. На степень избирательности действия амфотерицина В оказывает влияние химическая модификация карбоксильной группы [Gary-Bobo, 1989]. Результаты проведенных экспериментов дают основание предположить, что механизм избирательного действия ПА основан на специфическом взаимодействии аминной группы молекул антибиотиков с 3β -ОН группой молекул стеринов с образованием водородной связи между ними. По сравнению с исходным амфотерицином В биологическая активность производного амфотерицина В, модифицированного по аминной группе, значительно меньше [Cheron et al., 1988]. Устойчивость полиенового канала в проводящем состоянии определяется силой Ван-дер-Ваальсового взаимодействия между полиеновыми связями молекул антибиотиков и молекулами стерина внутри мембранны, а также электростатическим взаимодействием между аминной и карбоксильной группой соседних молекул антибиотиков, расположенных у входа в канал [Kasumov et al., 1979; Czerwinski et al., 1987; Mazerski et al., 1995; Khutorsky, 1996]. Блокирование одного из зарядов на аминной или на карбоксильной группе в молекулах полиенов приводит к ослаблению электростатического взаимодействия между антибиотиками и молекулами стеринов. В стабилизации канального комплекса доминирующим фактором является гидрофобное взаимодействие антибиотиков со стеринами.

ПА, модифицированные по карбоксильной группе, отличаются высоким сродством к эргостерину и достаточно высокой степенью избирательности воздействия на грибковые клетки по отношению к клеткам хозяина. Полученные данные можно объяснить в рамках

электростатической модели взаимодействия положительно заряженной аминной группы с отрицательно заряженной 3 β -ОН группой молекул стерина [Baginski et al., 1994 a, b; 1997]. Число двойных связей в гидрофобной цепи полиеновых молекул определяет чувствительность антибиотиков к стерин-содержащим мембранам [Cybulska et al., 2000]. Результаты собственных исследований показали, что концентрация, необходимая для получения одиночного канала, растет с уменьшением числа двойных связей в полиеновой цепи молекул антибиотиков в ряду: амфотерицин В < филипин < нистатин [Касумов, 1986 a].

Важное место занимают исследования, связанные с изучением взаимосвязи между степенью агрегированности молекул и их токсичностью для клеток млекопитающих [Bolard et al., 1991; Barwicz, Tancrede, 1997]. Рост числа заряженных групп в молекулах ПА увеличивает их способность к образованию агрегированных комплексов в водных растворах [Mazerski et al., 1990; Mazerski, Borowski, 1996; Legrand et al., 1992]. Создание новых и эффективных гликозилированных ПА должно удовлетворять трем основным условиям: а) проведение целенаправленной модификации аминной группы молекул антибиотиков, которые способствовали бы образованию водородной связи с молекулами стеринов; б) целенаправленная модификация карбоксильной группы молекул полиенов для повышения избирательного взаимодействия со стеринами, содержащие 3 β -ОН группу; в) синтез молекул полиенов с определенным числом заряженных групп, препятствующий образованию больших агрегированных комплексов [Mandell, Petri, 1996]. В соответствии с этими требованиями и был синтезирован N-метил-N-D-фруктозил амфотерицин В. С помощью данного антибиотика было показано, что он имеет более высокую избирательность действия на стеринсодержащие мембранны и повышенную растворимость в воде. Однако противогрибковая активность этого антибиотика была значительно ниже по сравнению с исходным амфотерицином В [Grzybowska et al., 1997]. Требуется дальнейшее проведение целенаправленного синтеза ПА методами химического и биологического синтеза (генетическая инженерия) с целью получения новых ПА с улучшенными терапевтическими свойствами.

В настоящее время интерес к противогрибковым препаратам еще более возрос из-за широкого распространения ВИЧ-инфекции, которая оказалась чувствительной к наличию в организме грибковой инфекции [De Marie et al., 1994]. Есть сообщения о том, что около

90% ВИЧ-инфицированных пациентов поражены грибковой инфекцией и висцеральной лейшманией из-за резкого ослабления иммунной системы организма [Bjorksten et al., 1976; Brajtburg et al., 1981 a,b, 1982; Hansen et al., 1990; Pleskoff et al., 1995; Mbongo et al., 1998; Di Giorgio et al., 1999; Gangneux et al., 1999; Mamidi et al., 2002; Sepkowitz, 2002]. Кроме того, при трансплантации различных органов и в том числе костного мозга пациентам назначаются иммуноподавляющие препараты. Однако эти препараты создают условия для появления у пациентов ВИЧ - и грибковой инфекции [Kauffman, 2002; Vilchez et al., 2002]. Обычно различают два вида грибковых инфекций: поверхностная кожная и системные микозы, которые оказывают свое действие на внутренние органы и ткани. При введении парентеральным путем в организм терапевтических препаратов часто возникают системные микозы и они, быстро распространяясь, угрожают жизни пациентам. Поверхностная кожная грибковая инфекция вызывается дермофитами - *Trichophyton* и *Microsporum* и эффективно излечивается как ПА, так и неполиеновыми противогрибковыми препаратами - азолями и аллюламинами [Hitchcock, 1993; White, 1997; Loeffler et al., 2000; Weinstein, Berman, 2002; Surarit, Shepherd, 1987]. Более глубокие инфекции, как оральные и генитальные кандидозы, вызванные микроорганизмами рода *Candida*, лечатся такими ПА, как нистатин и кандицидин. При лечении азоловыми препаратами патогенные микроорганизмы становятся резистентными к используемым препаратам [Powderly et al., 1999]. При лечении кишечных инфекций, вызванных патогенными микроорганизмами рода *Candida*, используется нистатин, в то время как пимарицин применяется для лечения глазных и вагинальных микозов. Патогенные микроорганизмы рода *Candida*, *Cryptococcus* и *Aspergillus* вызывают такие тяжелые заболевания, как кандидозы, криптоккозы и легочные аспергиллезы. Только амфотерицин В используется для лечения системных грибковых инфекций, путем внутривенного его введения [Mandell, Petri, 1996]. Исследования, проведенные на мышах, показали, что летальная доза для нистатина в 6 раз ниже, чем для амфотерицина В [Ghielmetti et al., 1976]. Эти результаты совпали с ранними клиническими исследованиями, которые показали, что парентеральное введение нистатина вызывает возникновение лихорадки и образование тромбофлебита. Однако исследования, проведенные на мышах *in vivo*, показали, что нистатин обладает меньшей токсичностью, чем амфотерицин В [Zager, 2000]. Детально изучен спектр антигрибковой активности нистатина и амфотерицина В [Brown, 1974;

Kravchenko, 1977; Korting et al., 1988; Stern et al., 1988; Perfect et al., 1991]. Показано, что при парентеральном введении амфотерицина В наблюдается хороший лечебный эффект, однако в то же самое время амфотерицин В обладает определенной токсичностью – нефротоксичностью, вызывает расстройство центральной нервной системы и способствует появлению дисфункции печени [Fisher et al., 1975, 1976, 1978; Fujimoto et al., 1978; Fisher, Bryson, 1977; Fisher, 1980; Blanke et al., 1977; Mermer et al., 1981; Hughes et al., 1987; Schell et al., 1989; Wasan et al., 1994; Mandell, Petri, 1996; Wasan, Conklin, 1996; Wasan, Lopez-Berestein, 1997]. Причины, вызывающие эти осложнения, до сих пор неизвестны и поэтому приходится ограничивать вводимую ежедневную дозу до 1.5 мг/кг веса тела [Sabra, Branch, 1990]. При использовании амфотерицина В возникает еще одна существенная проблема – эта низкая растворимость препарата в воде [Bennet et al., 1963]. Благодаря именно этому свойству, молекулы амфотерицина В не обладают достаточной резорбцией и не могут в необходимом количестве достичь поврежденных органов и тканей и, соответственно, имеют низкий терапевтический индекс [Chabot et al., 1989 Tanaka et al., 1992]. Недавно были получены новые производные амфотерицина В – AmB-арабинодалактон и MEAME, которые хорошо растворимы в воде [Grzybowska et al., 1997; Falk et al., 1999]. Предварительные данные показывают, что MEAME оказался эффективным при лечении системных микозов у мышей. Однако, несмотря на наличие большого количества ПА и их производных, ни один из них по эффективности своего действия не может сравниться с исходным амфотерицином В при лечении системных грибковых инфекций и висцеральной лейшмании [Winston et al., 1979; Medoff et al., 1983; Pocchiarì, Casaccia, 1989; Ramos et al., 1990, 1994; Croft et al., 1991; Pfaller et al., 1994; Baily, Nandy, 1994; Yu et al., 1998].

Усилие ученых направлено на получение новых лекарственных форм ПА, особенно амфотерицина В, и на разработку новых способов их доставки к пораженным органам и тканям [Gus et al., 1991; Vertut-Groquin et al., 1984, 1985; Gruda et al., 1988; Mehta et al., 1984, 1985, 1994, 1997; Tasset et al., 1989; Brajtburg et al., 1990 a, b; Bolard. 1991 a; Lamb et al., 1991; Joly et al., 1992 a, b; Perkins et al., 1992; Souza et al., 1993; Caillot et al., 1992, 1993; Rocheleau et al., 1994; Bharma et al., 1997]. В клинической практике используется супензия амфотерицина В в комплексе с дезоксихолатом (фунгизон) для лечения системных грибковых инфекций и висцеральной лейшмании, даже несмотря на появление симптомов острой почечной недостат-

точности при введении данного препарата [Lambert, Hammond, 1973; Dolberg, Bissel, 1974; Washington et al., 1988; Davis, Washington, 1988; Brajtburg et al., 1989 b; Tollemar et al., 1990 a, b; Tancrede et al., 1990; Clements, Peacock, 1990; Sanders et al., 1991; Hostetler et al., 1992; Lamy-Freund et al., 1991, 1993; Ralph et al., 1991, 1993; Brajtburg et al., 1992; Jannof et al., 1993; Van Etten et al., 1993, 1995; Tobosa do Egito et al., 1994, 1995, 1996; Ramos et al., 1988, 1995; Wang et al., 1995; Sundar, Murray, 1996; Sundar et al., 1997; Petit et al., 1998, 1999; Swenson et al., 1998; Walker et al., 1998; Bates et al., 2001]. В этом отношении ПА инкапсулированные в липосомы являются более перспективным методом по сравнению с фунгизоном [New et al., 1981; Ahrens et al., 1984; Dufourc et al., 1984 a; Panosian et al., 1984; Mehta et al., 1985; Lopez-Berestein et al., 1984 a, b, 1985 a, b, 1987; Meunier et al., 1988, 1991; Midez et al., 1989; Andriole, Paterson, 1989; Hospenthal et al., 1989 a, b; Bolard, 1989; Kerridge, 1986; Juliano et al., 1987; Grant et al., 1989; Pontani et al., 1989; Jullien et al., 1990; Katz et al., 1990; Madden et al., 1990; Hamilton et al., 1991; Tasset et al., 1992; Legrand et al., 1993, 1997; Mills et al., 1994; Hillery, 1997; Yardley, Croft, 1997; Larabi et al., 2003]. Такие препараты, как липосомальная форма амфотерицина В (AmBisome), комплекс амфотерицина В с липидами (Abelcet), коллоидно-дисперсная форма амфотерицина В (Amphocil), интралипидная форма амфотерицина В и липосомальная форма нистатина (Nyotran) находятся на стадии клинического испытания [Beggs et al., 1978; Strauss, 1981; Taylor et al., 1982; Graybill et al., 1982; Lopez-Berestein et al., 1984 a, b; Ahrens et al., 1984; Vertut-Croguin et al., 1984, 1985; Hopfer et al., 1984, 1987; Tremblay et al., 1984; Jullien et al., 1988, 1989, 1990; Lopez-Berestein, 1987; Payne et al., 1987; Szoka et al., 1987; Lopez-Berestein, Juliano, 1987; Davis et al., 1987; Kirsh et al., 1988; Krause, Juliano, 1988; Schmitt et al., 1988; Gruda et al., 1988, 1991; Janoff et al., 1988, 1993; Ahmad et al., 1989 a, b; Pattersen et al., 1989; Sculier et al., 1989; Edmonds et al., 1989; Milhaud et al., 1989; Lopez-Berestein, Fidler, 1989; Grant et al., 1989; Tollemar et al., 1990 a, b; Dromer et al., 1990; Annaissie et al., 1991; Jullien, Bolard, 1990; Miyazaki et al., 1990; Clark et al., 1991; Fisher et al., 1991; Kan et al., 1991; Boggs et al., 1991; Proffitt et al., 1991; Olsen et al., 1991; Croft et al., 1991; Clemons, Stevens, 1991 a, b, 1992, 1993 a, b; Adler-Moore et al., 1991, 1993; Kintzel, Kennedy, 1991; Guo et al., 1991; Mitrano et al., 1991; Hamilton et al., 1991; Coker et al., 1991; Chopra et al., 1991; Speller, Warnock, 1991; Fielding et al., 1991, 1992; Moreau et al., 1992; Gilbert et al., 1992, 1994; Hanson, Stevens, 1992;

Sullivan et al., 1992 a, b; Chavanet et al., 1992; Janknegt et al., 1992; Berman et al., 1992; Moreau et al., 1992; Diente et al., 1993; Souza et al., 1993; Gates, Pinney, 1993; Gokhale et al., 1993 a, b; Guo, Working, 1993; Adler-Moore, Proffitt, 1993; Wasan, Lopez-Berestein, 1993; Clemons, Stevens, 1993 a, b; Ringdon, Tollemar, 1993; Stevens, 1994; Lee et al., 1994 a, b; Ringden et al., 1994; Moonis et al., 1994; Brajtburg et al., 1994a,b; Allen et al., 1994; Hay, 1994; Karyotakis, Annaissie, 1994; Wasan et al., 1990, 1993, 1994 a.b; Joly et al., 1990, 1994; De Marie et al., 1994; Pahls, Schaffner, 1994; Viviani et al., 1994; Perfect, Wright, 1994; Davidson et al., 1994, 1996; Francis et al., 1994; Mitsutake et al., 1994; Seaman et al., 1995; Elberg et al., 1995; Valero, Graybill, 1995; Fromtling, 1995; Graybill, Bocanegra, 1995; Glaser, 1995; Bolard, Andremont, 1995; Gangneux et al., 1996 a, b; Lister, 1996; Russo et al., 1996; Heinemann et al., 1997; Adedoyin et al., 1997; Walsh et al., 1998; Maesaki, 2002; Dupont, 2002]. От висцерального лейшманиоза страдает большое количество людей и при отсутствии эффективного и своевременного лечения от этой болезни погибает до 0,5 миллиона человек в год [Pearson, Sousa, 1996]. При лечении висцерального лейшманиоза используют препараты ПА, приготовленные на липидной основе, которые имеют относительно меньшую токсичность и лучший терапевтический индекс по сравнению с фунгизоном [Lopez-Berestein et al., 1983 a, b; Berman et al., 1986; Pisarik et al., 1990; Davidson et al., 1991; Mishra et al., 1992; Bangham, 1992; Joly et al., 1992 b; Washington et al., 1993; Legrand et al., 1993; Gates, Pinney, 1993; Hay, 1994 Meunier, 1994; Wasan, Lopez-Berestein, 1994; Bolard, Andremont, 1995; Russo et al., 1996; Thakur et al., 1996]. Однако полученные данные еще не является достаточным основанием для дачи конкретной рекомендации относительно указанных выше препаратов. Кажется, что получение и использование полиеновых препаратов зависит от типа инфекции и общего состояния больных. Не исключено, что степень безопасности этих препаратов может быть улучшена путем получения новых производных антибиотиков методами химической трансформации молекул и методами генной инженерии микроорганизмов, продуцирующих ПА.

Число исследовательских групп, занимающиеся исследованием биологического действия ПА, растет из года в год. Однако не все эти группы занимаются изучением противогрибковой активности ПА. Имеются данные о том, что ПА могут быть использованы и в других направлениях, так, например, для усиления иммунной системы организма, лечения злокачественных и доброкачественных опухолей,

ВИЧ-инфекций и гнойных заболеваний [De Paermentier et al., 1975; Ferrante et al., 1979; Krick, Remington, 1976; Valeriote et al., 1984; Krishan et al., 1985; Vertut-Croquin et al., 1986; Powderly et al., 1988; Belay et al., 1993; Yamaguchi et al., 1993; Mange et al., 2000]. Наличие заметного токсического эффекта амфотерицина В при больших концентрациях не позволяет эффективно использовать его в борьбе с гнойными инфекциями. В этом отношении производное амфотерицина В MS-8209, обладающий относительно низкой токсичностью, может быть рекомендован для использования в борьбе с гнойными инфекциями [Adjou et al., 1995; Beringue et al., 2000]. Есть надежда, что в скором времени будут получены нетоксичные для организма человека новые ПА, которые могут расширить сферу их использования. Кказанному необходимо добавить, что наметились перспективы использования полиеновых макролидов при генной терапии человека [Garcia-Chaumont et al., 2000 a,b; Hartl et al., 2002].

В области исследования иммуномодулирующих свойств ПА из всех полиенов наиболее интенсивно был изучен амфотерицин В. Было показано, что амфотерицин В индуцирует у мышей гуморальный и клеточный иммунитет [Nair, Schwartz, 1982; Little et al., 1984, 1987; Bolard, 1991 b]. При исследовании действия амфотерицина В *in vitro* на эффект усиления клеточного иммунитета были получены противоречивые результаты, которые не могут найти до сих пор должного объяснения [Abu-Salah, 1996]. Также до сих пор непонятно, чем обусловлен иммуностимулирующий эффект амфотерицина В *in vitro* при низких его концентрациях [Sarthou et al., 1986; Wolf, Massof, 1990].

Особую роль в возникновении очагов воспаления при сепсисе играют цитокинины, продуцируемые эукариотическими клетками и центральную роль здесь играет фактор α -TNF, синтезируемый активированными макрофагами, образующимися при некрозе опухолевых клеток. Фактор некроза опухолей α -TNF или кахектин, представляет собой негликозилированный белок, который обладает противоопухолевой активностью. Фактор некроза опухолей обладает также антитоксическим действием, иммуномодулирующим и противовоспалительным эффектом и участвует в противовирусном, противоопухолевом и транспланационном иммунитете. Фактор α -TNF способен активировать функции макрофагов и лимфоцитов, а также усиливать сопротивляемость организма хозяина к действию патогенных микроорганизмов, и, в частности, к вирусным инфекциям [Imanishi, 2000]. Высокие концентрации фактора α -TNF порождают

нежелательные эффекты и приводят к появлению лихорадки и деструкции воспалительной ткани в организме человека [Dinarello, 2000]. Показано, что амфотерицин В при низких концентрациях может индуцировать у человека резистентность к бактериальным инфекциям [Yamaguchi et al., 1993]. Интересно отметить, что амфотерицин В и его производные в сочетании с бактериальными полисахаридами могут стимулировать синтез α -TNF в макрофагах [Yamaguchi et al., 1993; Clayette et al., 2000]. При лечении амфотерицином В часто возникают нежелательные для организма воспалительные процессы и, по-видимому, эти эффекты появляются благодаря усилинию синтеза α -TNF в макрофагах. Высказывается мнение о том, что амфотерицин В можно использовать в качестве иммуностимулятора, и что концентрация антибиотика может быть эффективным регулятором синтеза фактора α -TNF.

Амфотерицин В подавляет функции мембранных ферментов – протонной АТФ-азы в грибковых клетках и К_{Na}-АТФ-азы в клетках млекопитающих [Vertut-Doi et al., 1988]. Ингибиование функции этих ферментов уменьшает свободную внутреннюю энергию клеток и их пролиферативную активность [Schindler et al., 1993]. Амфотерицин В и его производное - метиловый эфир амфотерицина В способны ингибировать пролиферацию различных вирусов, встроенных в липосомы, которые вызывают такие заболевания, как герпес, гепатит В и везикулярные стоматиты [Jordan et al., 1978; Stevens et al., 1975; Kessler et al., 1981; Stevens, 1994]. Однако эти сообщения не были восприняты достаточно серьезно, из-за проявления токсичности антибиотиков. В большинстве случаев степень токсичности полиенов превосходила собственный терапевтический эффект. Появление ВИЧ-инфекции и масштабы этой эпидемии несколько изменили отношение к полиенам. Приняв во внимание противовирусное действие ПА, были проведены новые дополнительные эксперименты по изучению действия полиенов на противовирусную активность [Selvam et al., 1993; Koporka et al., 1999]. Исследования в этом направлении показали, что амфотерицин В и его производные могут ингибировать *in vitro* репликацию вирусов, вызывающих ВИЧ-инфекцию [Borden et al., 1979; Schaffner et al., 1986; Cefai et al., 1991; Otake et al., 1991]. Важно отметить, что ПА ингибируют репликацию ВИЧ – инфекции при концентрациях, которые уже оказывают воздействие на клетки хозяина [Selvam et al., 1993; Koporka et al., 1999]. Хотя механизм ингибирования вируса под действием полиенов остается до конца невыясненным, но тем не менее есть предположение,

что в данном случае решающую роль играет взаимодействие полиенов с липидным компонентом мембран. Возможно, что низкие концентрации полиенов могут привести к структурным изменениям мембран и блокировать связывание вирусов с рецепторами клеток [Magierowska-Jung et al., 1996]. Однако для создания эффективных методов антиспидовой терапии необходимо проведение экспериментальных работ *in vivo*.

Для современного общества важной проблемой является исследование механизма возникновения нейродегенеративных расстройств, вызванных клетчатыми энцефалопатитами при пищевых отравлениях. Клещевой энцефалит обычно локализуется в корах головного мозга и выделяет абдоминальный протеин PrP^{Sc} [Sy et al., 2002]. Абдоминальный протеин PrP^{Sc} проявляет устойчивость к ферменту протеиназе K и нерастворим в воде [Prusiner et al., 1998]. Имеющиеся современные методы лечения этого заболевания не очень надежны. Было показано, что введение амфотерицина В замедляет инкубационный период течения болезни у хомяка [Pocchiari et al., 1987; Xi et al., 1992]. Интересно, что после введения исходного амфотерицина В, водорастворимого производного амфотерицина В MS-8209 и филипина животным, инфицированных вирусом-TSE, повышается их выживаемость [Demaimay et al., 1994, 1997, 1999; Adjou et al., 1995, 1999; Beringue et al., 2000; Mange et al., 2000 a; Marella et al., 2002]. Проведенные *in vitro* эксперименты показали, что амфотерицин В при низких концентрациях повышает резистентность организма к протеину PrP^{Sc} [Mange et al., 2000 a, b]. Наиболее вероятно, что амфотерицин В, связываясь со стеринами плазматических мембран, транспортирует гликазилфосфатидилинозитол-связанный протеин PrP^{Sc} внутрь клетки и эффективность этого транспорта зависит от содержания стерина в мембране [Kaneko et al., 1997; Mange et al., 2000 a, b; Grigoriev et al., 2002].

Обнаружено, что ПА способны тормозить рост злокачественных образований [Feigin, 1999]. Известно, что гепатомальные клетки (раки) лишены системы регуляции синтеза холестерина, но в то же время они способны синтезировать в своих мембранах предшественник холестерина - 7-дегидрохолестерин. Экспериментально установлено, что амфотерицин В обладает большей чувствительностью к мембранам, содержащих 7-дегидрохолестерин, чем к мембранам, содержащих эргостерин и холестерин [Charbonneau et al., 2001]. Предполагается, что используя специфические ингибиторы, такие как AY-9944, блокирующие синтез холестерина, можно на оп-

ределенном этапе создать условия для синтеза 7-дегидрохолестерина в гепатомальных клеточных мембранах и, учитывая высокую специфичность полиенов к 7-дегидрохолестерину, можно оказать эффективное и избирательное воздействие на гепатомальные клетки и лизировать их [Dvornik, Hill, 1968]. Однако для четкого доказательства данного предположения необходимы дополнительные эксперименты.

В заключении следует отметить, что ПА, хотя и были обнаружены более 50 лет тому назад, они и сегодня остаются самыми эффективными соединениями в борьбе с грибковой инфекцией. Несмотря на определенную токсичность, полиены оказывают самое эффективное воздействие на патогенные микроорганизмы и обладают способностью защитить иммуноослабленных больных, пораженных системной грибковой инфекцией, от летального исхода. Будущее ПА связано с химическим и биологическим синтезом новых антибиотиков и их производных с установлением их химической структуры и исследованием взаимосвязи между химической структурой ПА и их функцией в липидных и клеточных мембранах. Исследования, проводимые в указанном направлении, позволят получить лечебные препараты со значительно улучшенными фармакологическими свойствами и помогут эффективно использовать их в борьбе с грибковыми, гнойными и вирусными инфекциями, а также с злокачественными и доброкачественными образованиями. Эти исследования в дальнейшем будут способствовать расширению сферы использования новых ПА в терапевтических целях.

ЛИТЕРАТУРА

- Агабейли Р.А., Мамедова Н.Р. 2006. Генотоксиканты среды: риск, оценка и управление. Баку: Изд. «Елм», с. 1-172.
- Агабейли Р.А., Касумов Х.М., Малафриев О.К., Сардарлы Г.М., Меликова Н.К., Искендерова И.М. 1987. Оценка генетического эффекта полиеновых антибиотиков в различных тест-системах. - Тез. Док. "Генетические аспекты проблемы Человек и Биосфера", Москва, с. 6.
- Айтхожина Н.А., Никитина Е.Т. 1980. Гемолитическая активность некоторых актиномицетов-продуцентов пентаеновых антибиотиков. - Известия АН Каз. ССР. Серия биологическая, № 3, с. 48-52.
- Алекберли Э., Топалы В. 1979. Исследование биологического действия полиеновых антибиотиков с помощью искусственных липидных мембран (ИЛМ). - I Советско-Швейцарский симпозиум: Биологические мембранны. Структура и функции. Тезисы докладов. с. 61.
- Алекберли Э., Топалы В. 1980. Проницаемость бислойных липидных мембран для нистатина. - Биофизика, т. 25, с. 566 - 568.
- Алекберли Э., Топалы В. 1984. Проницаемость бислойных липидных мембран для амфотерицина В. - Биофизика, т. 29, с. 322 - 323.
- Алиев Д.А., Цупрун В.Л., Гулиев Н.М., Мамедов Т.Г. 1985. О четвертичной структуре карбоангидразы листьев двудольного растения *Cicer arietinum*. - Докл. АН СССР, т. 285, с. 1472-1475.
- Алиев Д.А., Гулиев Н.М., Мамедов Т.Г.. Цупрун В.Л. 1986. Физико-химические свойства и четвертичная структура карбоангидразы листьев нута. - Биохимия, т. 51, с. 1785-1794.
- Алиев Д.А., Гулиев Н.М. 1990. Карбоангидраза растений. - Изд. "Наука", Москва, с. 1-175.
- Алмерс В. 1981. Воротные токи и движение зарядов в возбудимых мембранах. - В кн.: Мембранны: ионные токи. М.: Мир, с. 129-136.
- Альберт А., Сержент Е. 1964. - В кн.: Константы ионизации кислот и оснований. М.-Л.
- Арсеньев А.С., Барсуков И.А., Сычев С.В.. Быстров В.Ф., Иванов В.Т., Овчинников Ю.А. 1984. Конформация двойной спирали грамицидина А. - Биологические мембранны, т. 1, № 1, с. 5-17.
- Ахмедли К.М., Малафриев О.К.. Касумов Х.М. 1985. Кинетическая модель ионных каналов, образованных в липидных мембранах полиеновыми антибиотиками. - Биологические мембранны. т. 2, № 9, с. 926 – 933.
- Ахмедли К.М., Малафриев О.К., Касумов Х.М. 1982. Исследование механизма сборки и разборки ионных каналов методом вычислительного эксперимента. - I-Всесоюзный биофизический съезд. Москва, с. 192.
- Ахрем А.А., Титов Ю.А. 1970. Стероиды и микроорганизмы. - М.: Наука.
- Ашбель С.И., Богословская И.А.. Соколова В.Г. 1970. Результаты клинического изучения леворина и его натриевой соли. - В кн.: Леворин и его клиническое применение, с. 142-144.
- Бажанов В.С. 1972. Сравнительное изучение избирательности противоопухолевого действия антибиотика лиеномицина при лечении перевиваемых асцитных опухолей у мышей. - Антибиотики, т. 17, с. 593.
- Барашкова Н.П. 1970. Характеристика нового актиномицета *Actinomyces*

plumbaeus sp. n., образующего полиеновые антибиотики. - В кн.: Материалы VI науч. сессии Ленингр. науч.-исслед. института антибиотиков. Л., с. 14.

Барашкова Н.П., Шенин Ю.Д., Коженко Т.В., Цыганов В.А. 1975. Новый тетраеновый антибиотик абхазомицин. - Антибиотики, т. 20, с. 195.

Барашкова Н.П., Шенин Ю.Д., Омельченко В.Н., Конев Ю.Е. 1977. *Actinomyces chromogenes* var. *graecus* var. *nov.* – продуцент нового гексаенового антибиотика. – Антибиотики, т. 22, с. 832.

Барсуков Л.И., Волкова В.И., Шапиро Ю.Е., Викторов А.В., Быстров В.Ф., Бергельсон Л.Д. 1977. Селективная адсорбция анионов фосфолипидами. - Биоорганическая химия, т. 3, № 10, с. 1355-1362.

Башкович А.П., Райгородская В.Я. и др. 1967. - Материалы V-ой научной конференции ЛНИИА, Л., 16-18.

Безруков С.М., Драбкин Г.М., Сибилев А.М., Фейгин А.М. 1979. Электрический шум ионных каналов, образованных амфотерицином В в бислойных липидных мембранах. - ДАН СССР, т. 249, с. 730-732.

Безруков С.М., Сибилев А.М. 1980. Измерение флуктуаций ионных токов и напряжений. - Препринт ЛИЯФ АН СССР, № 633.

Беленький Б.Г., Коган С.Б. и др. 1959. - Авт. свид. СССР № 126230.

Беленький М.Л. 1963. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. - М.

Белоусова И.И. 1975. - В кн.: Изучение механизмов действия антибиотиков. (Докл. Симп.). Л., с. 72-74.

Белоусова И.И. 1976. Резистентность к полиеновым антибиотикам. - Антибиотики, т. 21, № 8, с. 661-667.

Белоусова И.И. 1977. Действие полиеновых антибиотиков на связывание рибосом с мембранами *C. albicans*. - Антибиотики, т. 22, № 8, с. 695-699.

Белоусова И.И., Фейгин А.М., Вирина А.М., Соловьева Н.Н., Касумов Х.М. 1982. Роль структуры стеринов в чувствительности клеточных и искусственных мембран к полиеновым антибиотикам. - Мат. Всесоюз. Конферен. "Проблемы изыскания и биотехнологии новых антибиотиков", Москва, с. 78.

Берштейн И.Я., Лохина Н.Д. 1972. Определение содержания пентаеновых примесей в образцах микогептина методом дифференциальной спектрофотометрии. - Материалы V конференции молодых ученых ЛНИИА, Л., с. 7-8.

Борисова М.П., Ермишкин Л.Н., Зильберштейн А.Я., Касумов Х.М., Пощелуев В.М. 1978. Зависимость свойств ионных каналов от структуры лактонного кольца молекул полиеновых антибиотиков. - Биофизика, т. 23, № 5, с. 910-911.

Борисова М.П., Ермишкин Л.Н., Зильберштейн А.Я. 1978. Блокаторы ионных каналов, образуемых в липидном бислое полиеновыми антибиотиками. - Биофизика, т. 26, № 6, с. 1093-1094.

Борисова М.П. 1979. Свойства ионных каналов, образуемых полиеновыми макролидами. - Канд. дисс., Пущино.

Борисова М.П., Ермишкин Л.Н. 1984 а. Тетраметиламмоний-проникающий блокатор микогептиновых каналов в липидном бислое. - Биологические мембранны, т. 1, № 2, с. 141-144.

Борисова М.П., Ермишкин Л.Н. 1984 б. Кинетические параметры прохождения анионов через амфотерициновые каналы. - Биологические мембранны, т. 1, № 5, с. 537-540.

Боровский Э., Шаффнер К. 1961. – Структурные отношения в ряду гептаеновых

макролидных антибиотиков. - В кн.: Пятый Международный биохимический конгресс, рефераты секционных сообщений. М., т. 1, с. 13-15.

Боровский Э., Малышкина М.А., Котенко Т.В., Соловьев С.Н. 1965. Новый противогрибковый антибиотик микогептин из группы неароматических гептаенов. - Антибиотики, т. 10, № 9, с. 776-780.

Боровский Э., Белоусова И.И., Лишневская Е.Б., Малышкина М.А., Моргунова А.Ф., Невинский А.А., Соловьев С.Н., Филиппова А.И., Яковлева Е.П., Завьялова Л.Н. 1967. - Материалы V-ой научной конференции ЛНИИА. Л., с. 26-27.

Боровский Э.В., Шенин Ю.Д., Соловьев С.Н. 1973. Структура микогептина. - В кн.: Микогептин и его клиническое применение. М., с. 24-31.

Боровский Э., Фальковски Л., Зелиньски Е., Колодзейчик П., Голик Я., Цибульска Б., Зимински Т., Еречек Э., Павляк Я., Якобс Э., Шенин Ю.Д., Терешин И.М. 1977. Структура, модификация и биологические свойства антибиотиков из группы полиеновых макролидов. - Химико-фармацевтический журнал, № 11, с. 57-61.

Бужинский Э.П., Готлиб В.А., Лев А.А. 1968. Моделирование изменений ионной проницаемости мембран митохондрий, вызываемых валиномицином. - В сб. "Митохондрии. Ферментатив. процессы и их регуляция". М., "Наука", с. 141-146.

Бужинский Э.П., Готлиб В.А., Лев А.А. 1970. Изменения катионной специфичности модельных бимолекулярных фосфолипидных мембран при введении в них циклического олигопептида-валиномицина. - В сб. "Механизмы местной реакции и распространяющегося возбуждения". Л., "Наука", с. 71-73.

Варфоломеев С.Л., Березин И.В. 1979. Биокинетика. - Изд., Наука, с. 20.

Васильева Н.Г., Свешников Ю.Ф., Фрадкова Т.А. 1973. Определение биологической активности леворина и его натриевой соли. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5, с. 110-114.

Васильева Н.Г., Фрадкова Т.А. 1973. Определение биологической активности микогептина методом диффузии в агар. - В кн.: Микогептин и его клиническое применение. М., с. 61-64.

Васянин С.И., Виноградова Н.А., Зенин В.В., Никольский Н.Н., Трошин А.С. 1972. Влияние полиеновых антибиотиков на проницаемость естественных и искусственных мембран для сахаров. - В сб. IV Междунар. Биофиз. Конгресс, Москва, с. 109-110.

Вайнштейн В.А., Наумчик Г.Н. 1970. Солубилизация полиеновых антибиотиков на основе поливинилпирролидона. - В кн.: Материалы VI научной сессии Ленинград. научно-исслед. ин-та антибиотиков (ЛНИИА). с. 32-36.

Вайнштейн В.А. 1970. Исследование дисперсности противогрибкового антибиотика микогептина и его некоторых лекарственных форм. - Материалы 1 Лен. Гор. Конференции молодых ученых по биологии, медицине и биомедицинетике. Л., с. 226.

Вайнштейн В.А., Гринберг Г.Е., Михайлова М.А., Касумов Х.М. 1982. N-метилпроизводные полиеновых антибиотиков - новые мембраноактивные вещества. - Всесоюз. симпоз. "Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов", Рига, с. 235.

Ветлугина Л.А. 1968. Антибиотик розеофунгин, выделение и физико-химические свойства. - Антибиотики, т. 13, с. 992.

Ветлугина Л.А., Дзюбанова Р.М., Очкасова М.В. 1968. Выделение и химическая очистка антибиотика розеофунгина. - Изв. АН Каз. ССР. Серия биол., № 6, с.

32.

- Ветлугина Л.А., Дзюбанова Р.М. 1973. Некоторые свойства розеофунгина. - Антибиотики, т. 18, с. 774.
- Ветлугина Л.А., Дзюбанова Р.М. 1974 а. Хроматографическое изучение полиеновых антибиотиков группы микотицина-флавофунгина-розеофунгина. - Труды Института микробиологии и вирусологии АН Каз. ССР., т. 19, с. 94.
- Ветлугина Л.А., Дзюбанова Р.М. 1974 б. Изучение гомогенности антибиотика розеофунгина. - Труды Института микробиологии и вирусологии АН Каз. ССР., т. 19, с. 99.
- Ветлугина Л.А., Дзюбанова Р.М. 1976. Розеофунгины-новые антибиотики группы α -оксикетопентаенов. - В кн.: Вторая конф. Биохимиков республик Средней Азии и Казахстана. Тезисы докладов. Фрунзе, с.58.
- Ветлугина Л.А., Дзюбанова Р.М. 1977. Химическая очистка антибиотика розеофунгина. - Труды Института микробиологии и вирусологии АН Каз. ССР., т. 22, с. 172.
- Ветлугина Л.А. 1977. Новые антибиотики из актиномицетов, выделенных из почв Казахстана. - Автореф. докт. дисс. Алма-Ата.
- Ветлугина Л.А., Балгимбаева А.С., Амирбекова Д.О., Копытина М.Н. 1979. Выделение и первичная идентификация противогрибкового антибиотика А-23/791. - Труды Института микробиологии и вирусологии АН КазССР., т. 24, с. 76.
- Ветлугина Л.А., Никитина Е.Т. 1980. Противогрибковые полиеновые антибиотики. - Изд. "Наука" Каз. ССР, с. 1-248. Электронная версия: vova2002@mail.ru
- Виноградова К.А., Соколова З.Г., Полторак В.А., Силаев А.Б. 1973. *Actinomyces chromogenes var/ trienicus var/ nov/* - продуцент антибиотика триена. - Антибиотики, т. 18, с. 876.
- Вирина А.М., Фейгин А.М., Белоусова И.И., Терешин И.М. 1975. - В кн.: Изучение механизмов действия антибиотиков (докл. симп.). Л., с. 34-35.
- Вирина А.М., Фейгин А.М., Фатеева Л.И., Касумов Х.М., Белоусова И.И., Терешин И.М. 1976. Взаимодействие полиеновых антибиотиков с чувствительными и резистентными штаммами *Candida albicans*. - Химико-фармацевтический журнал, т. 7, № 12, с. 12 – 16.
- Вирина А.М., Белоусова И.И., Терешин И.М. 1979 а. О сродстве стеринов резистентных клеток *C. albicans* к полиеновым антибиотикам. - Антибиотики, т. 24, № 10, с. 755-757.
- Вирина А.М., Фейгин А.М., Белоусова И.И., Терешин И.М. 1979 б. Состав и некоторые свойства клеток *Candida albicans* с высоким уровнем резистентности к полиеновым антибиотикам. - Микробиология, т.18, с. 838-844.
- Волков Н.И., Несен Э.Н., Осиенко А.А., Корсун С.Н. 2000. Биохимия мышечной деятельности. - Киев, Изд. Олимпийская литература, с. 286-369.
- Вульфиус Е.А., Коваленко В.А. 1978. Холинорецепторы. - Итоги Науки и техники. ВИНИТИ АН СССР. М., т. 8.
- Гаджи-заде Х.А., Зильберштейн А.Я. 1983 а. Электрический потенциал у входа в амфотерициновый канал. Проводимость канала. - Биофизика, т. 28, № 3, с. 432-435.
- Гаджи-заде Х.А., Зильберштейн А.Я. 1983 б. Электрический потенциал у входа в амфотерициновый канал. Селективность канала. - Биофизика, т. 28, № 5, с. 807-811.
- Гаджи-заде Х.А. 1983. Электрический потенциал у входа в амфотерициновый

канал. - Биофизика, т. 28, № 6, с. 999-1001.

Гаджи-заде Х.А., Зильберштейн А.Я. 1984. Природа зависимости блокирования ионных каналов от мембранныго потенциала. - ДАН СССР, т. 275, № 5, с. 1204-1207.

Гатчина Т.А. 1976. О противоопухолевых свойствах пентаенового антибиотика. - В кн.: Изучение биологически-активных веществ-метаболитов микроорганизмов. Ч. 1. Л., с. 24.

Гаузе Г.Ф. 1969. Механизм действия антибиотиков. - М.: Мир.

Гаузе Г.Ф., Свешникова М.А., Максимова Т.С., Ольховатова О.Л. 1979. Образование антибиотического комплекса 4041 культурой *Actinoplanes ianthinogenes* subsp. *oestatycini* subsp. nov.- Антибиотики, т. 24, с. 563.

Гелетюк В.И., Казаченко В.Н. 1984. Одиночный K⁺ канал в глиальных клетках моллюска. - Биологические мембранны, т. 1, № 11, с. 1204-1219.

Герольд М., Вондрачек М., Нечасек Я., Доскочил И. 1966. Трихомицин. - В кн.: Антибиотики. М.: Медицина.

Голутвина А.Н., Мороз Е.Я. 1970. Применение леворина для лечения кандидозов мочеполового аппарата. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5, с. 145-147.

Готлиб В.А., Бужинский Э.П., Лев А.А. 1968. О природе катионной специфичности бимолекулярных фосфолипидных мембран с введенным в них валиномицином. - Биофизика, т. 13, с. 562-565.

Егоров Н.С. 1969. Основы учения об антибиотиках. - М.: Высш. школа.

Ел-Суфи Сами Ахмед Фуаад. 1992. Влияние мембраноактивных соединений на барьерные функции клеточных мембран. - Канд. дисс. Ташкент, с. 1-101.

Ермишкин Л. 1976. Граф состояний натриевого канала. - Биофизика, т. 21, № 1, с. 94-100.

Ермишкин Л.Н. 1980. Ионные каналы и переносчики в липидном бислое. - Докт. дисс., Пущино.

Ермишкин Л. 1981. Одно- и двусторонние амфотерициновые каналы в липидном бислое. - III-ий Сов.-Швед. Симпозиум. Физико-химическая биология, Тбилиси. Тез. док., М., с. 85-86.

Ермишкин Л., Зильберштейн А. 1982. Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. - В сб.: Итоги науки и техники. Биофизика мембран. Ионные каналы и их модели. М., т. 2, с. 82 - 160.

Жабинская Л.П. 1969. Канд. дисс. Л.

Жукова Р.А., Фурсенко М.В. 1973. Селекция продуцента микогептина *Streptomyces mycoheptinicum* Konev, Tsyanov. - В кн.: Микогептин и его клиническое применение. М., с. 14-23.

Завьялова Л.Н., Малышкина М.А., Конев Ю.Е. 1970. Выделение и идентификация гептаенового антибиотика, образуемого культурой *Actinomyces chromogenes* ЛИА-0331. - Труды Ленингр. научно-исслед. ин-та антибиотиков. Л., вып. 6, с. 57.

Зенин В.В. 1979. Проницаемость модифицированных амфотерицином В бислойных липидных мембран для неэлектролитов и ионов. - Автореф. канд. дис. Л., с. 1-23.

Зильберштейн А.Я. 1989. Блокирование неэлектролитами ионных каналов, образуемых амфотерицином В. - Биологические мембранны, № 12, с. 1317-1329.

Зурабова Э.Р., Гурьянова Н.А., Кузнецова М.Н., Ковалев В.С., Жукова Р.А. 1970. Селекция продуцента леворина. - В кн.: Леворин и его клиническое приме-

нение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5. с. 11-21.

Ибрагимова В.Х., Алиев Д.И., Алиева И.Н. 2002 а. О механизме взаимодействия различных по структуре полиеновых антибиотиков с липидными мембранами. - В кн.: Структура и функция биологических молекул и их комплексов. Баку, Наука: с. 200-208.

Ибрагимова В.Х., Алиев Д.И., Алиева И.Н. 2002 б. Биофизические и медико-биологические аспекты использования полиеновых антибиотиков в сочетании с диметилсульфоксидом. - Биофизика, т. 47, № 5, с. 833 – 841.

Ибрагимова В.Х., Алиев Д.И. 2002. Радиорезистентность и противоопухолевые свойства полиеновых антибиотиков в сочетании с диметилсульфоксидом. - Антибиотики и химиотерапия, т. 47, № 9, с. 3 – 8.

Ибрагимова В.Х., Алиева И.Н., Алиев Д.И. 2003. Инактивация проводимости амфотерициновых каналов. - Цитология, т. 45, № 8, с. 804-811.

Ибрагимова В.Х., Алиева И.Н., Касумов Х.М. 2006 а. Физико-химические свойства и биологическая роль диметилсульфоксида в комплексе с полиеновыми антибиотиками. - Изв. НАН Азерб. (серия биол. Наук), № 1-2, с. 130-151.

Ибрагимова В.Х., Алиева И.Н., Касумов Х.М. 2006 б. Эффект леворина A₂, вводимого с одной стороны липидных мембран. - Биологические мембранны, т. 23, № 6, с. 493-502.

Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. 1981. Динамическая структура липидного бислоя. - М.: Наука, с. 1-296.

Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. 1982. Липидный бислой биологических мембран. - М.: Наука, с. 1-224.

Ирхин А.И. 1982. Изучение свойств ионных каналов, образованных в бислойных липидных мембранах производными грамицидина А. - Автореф. канд. дисс., Москва.

Ирхин А.И., Безруков С.М., Мельник Е.И. 1984. Свойства ионных каналов, образованных в бислойных липидных мембранах димерными аналогами грамицидина А. - Биологические мембранны, т. 1, № 7, с. 739-749.

Искендерова И.М. 1992. Генетические эффекты полиеновых антибиотиков и их модификация. - Канд. дисс., Баку, с. 1 – 124.

Касумов Х.М., Либерман Е.А., Проневич Л.А., Ревин А.Ф. 1969. Вещества, вызывающие эстафетный перенос ионов через бимолекулярные фосфолипидные мембранны. - В сб.: Биофизика мембранных. Москва-Каунас, с. 117-119.

Касумов Х.М., Либерман Е.А., Ненашев В.А. 1971 а. Особенности изменения проницаемости бимолекулярных мембран полиеновыми антибиотиками. - В сб.: Биофизика мембранных. Москва-Каунас, с. 420-428.

Касумов Х.М., Либерман Е.А., Этингов Е.Д. 1971 б. Изучение механизма действия полиеновых антибиотиков на клеточные мембранны с помощью бимолекулярных мембран. - В сб.: Биофизика мембранных. Москва-Каунас, с. 429-439.

Касумов Х.М. 1971. Механизм действия полиеновых антибиотиков. - Автореф. канд. дисс. Москва-Пущино.

Касумов Х.М., Либерман Е.А. 1972. Ионная проницаемость бимолекулярных мембран в присутствии полиеновых антибиотиков. I. Нистатин и амфотерицин В. - Биофизика, т. 17, № 6, с. 1024 – 1031.

Касумов Х.М., Либерман Е.А. 1973. Ионная проницаемость бимолекулярных мембран в присутствии полиеновых антибиотиков. II. Леворин, трихомицин, кандинцидин. - Биофизика, т. 18, № 2, с. 264 – 271.

Касумов Х.М., Либерман Е.А., Этингов Е.Д. 1973. Взаимодействие производных полиенового антибиотика амфотерицина В с бимолекулярными мембранами. - Биофизика, т. 18, с. 1020 – 1023.

Касумов Х.М., Шишлов Ю.В. 1974. Липидные мембранные в неводных растворах нистатина. - В сб.: Биология и научно-технический прогресс. Пущино, с. 223-236.

Касумов Х.М., Либерман Е.А. 1974. Роль холестерина в увеличении проводимости бимолекулярных мембран полиеновыми антибиотиками. - Биофизика, т. 19, с. 71 – 74.

Касумов Х.М., Либерман Е.А., Ненашев В.А., Юрков И.С. 1975 а. Исследование катионной избирательности бимолекулярных мембран в присутствии нистатина и амфотерицина В. - Биофизика, т. 20, с. 62 – 65.

Касумов Х.М., Либерман Е.А., Холодова Ю.Д. 1975 б. Действие ультрафиолетового света на мембранные, содержащие стерины, в растворах нистатина. - Биофизика, т. 20, с. 831 – 833.

Касумов Х.М., Этингов Е.Д., Вайнштейн В.А. 1975 в. Избирательная проницаемость мембран, содержащих стерины, для одновалентных ионов в присутствии производных амфотерицина В и натриевой соли микогептина, - Мат. Всесоюз. Симп. "Изучение механизма действия антибиотиков". Ленинград, с. 23.

Касумов Х.М. 1977. Молекулярные основы действия полиеновых антибиотиков на биологические и искусственные мембранные. - Успехи современной биологии, т. 83, № 1, с. 23-37.

Касумов Х.М. 1979. Одиночные ионные каналы в липидном бислойе в присутствии полиенового антибиотика леворина А₂. - Деп. ВИНИТИ, Москва, № 1961-79.

Касумов Х.М. 1980. Принципы функционирования полиеновых антибиотиков в липидных мембранных – взаимосвязь структуры и функции. - Докт. дисс., Москва-Пущино.

Касумов Х.М. 1981. Современные представления о механизме действия полиеновых антибиотиков – взаимосвязь структуры и функции. - Антибиотики, т. 26, № 2, с. 143-155.

Касумов Х.М., Малафриев О.К. 1982 а. Механизм немонотонной кинетики проводимости, индуцируемой в липидном бислойе амфотерицином В и его производным метиловым эфиром N, N, N – триметиламфотерицина В. - Studia Biophysica, Berlin, т. 89, № 1, с. 71-78.

Касумов Х.М., Малафриев О.К. 1982 б. Исследование кинетики проводимости мембранных в присутствии амфотерицина В и метамфоцина. - Биофизика, № 4. Деп. ВИНИТИ, Москва, № 898-82.

Касумов Х.М., Каракозов С.Д., Самедова А.А., Шенин Ю.Д. 1982 а. Взаимосвязь структуры и функции полиеновых макролидных антибиотиков. - I-Всесоюзный биофизический съезд. Москва, с. 192.

Касумов Х.М., Малафриев О.К., Ахмедли К.М. 1982 б. Механизм немонотонной кинетики проводимости мембранных в присутствии полиеновых антибиотиков. - Тез. I Всесоюз. Биофиз. Съезд. М., с. 192.

Касумов Х.М., Малафриев О.К., Вайнштейн В.А. 1984 а. Действие алкильных производных амфотерицина В на проводимость бислойных липидных мембранных. - Антибиотики, т. 29, № 7, с. 513-516.

Касумов Х.М., Каракозов С.Д., Самедова А.А., Багирова И.Н., Шенин Ю.Д. 1984 б. Исследование механизма взаимодействия различных по структуре поли-

еновых антибиотиков с липидными мембранами. - Биофизика, № 1, с. 177. Деп. ВИНИТИ, № 6593-84.

Касумов Х.М., Каракозов С.Д., Самедова А.А. 1984 в. Сборка каналов из разных по селективности полиеновых полупор. - 16-я Конференция Федерации Европейских Биохимических Обществ (ФЕБО), Москва, XV-066, с. 346.

Касумов Х.М., Каракозов С.Д., Самедова А.А., Багирова И.Н., Шенин Ю.Д. 1985. Исследование механизма взаимодействия различных по структуре полиеновых антибиотиков с липидными мембранами. - Биофизика, т. 30, с. 31.

Касумов Х.М., Каракозов С.Д. 1985. Эффект амфотерицина В, вводимого с одной стороны мембранны. - Биофизика, т. 30, № 2, с. 281-284.

Касумов Х.М. 1986 а. Молекулярный механизм взаимодействия полиеновых антибиотиков с липидными мембранами. - Монография. Баку-Элм, с.1-223.

Касумов Х.М. 1986 б. Роль бислойных липидных мембран в изучении механизма ионной проницаемости. - Известия АН Азерб. Респуб. (Серия биол. наук), № 5, с. 84-88.

Касумов Х.М., Самедова А.А., Шенин Ю.Д. 1987. Исследование механизма взаимодействия индивидуальных компонентов препаратов леворина и нистатина с липидными мембранами. - Антибиотики и медицинская биотехнология, т. 32, № 11, с. 824-828.

Касумов Х.М., Микаилова У.Т. 1988. Молекулярные аспекты комплексного взаимодействия полиеновых антибиотиков с липидными мембранами. - Мат. Всесоюз. симп. "Современные проблемы антибиотикорезистентности", Москва, с. 16.

Касумов Х.М., Самедова А. 1991. Действие амфотерицина В с одной стороны мембранны. - Биофизика, т. 36, с. 734.

Касумов Х.М., Алиев Н.Н. 2008. Изучение эффективности влияния сверхмалых доз мембраноактивного препарата «РЕЗОРБИН» на возбудителей ряда инфекционных заболеваний. – В сб. IV Международного симпозиума «Механизмы действия сверхмалых доз». Институт биохимической физики РАН, Москва, с. 49-50.

Катц Б. 1968. Нерв, мышца, синапс. - М.: Мир.

Кашкин П.Н., Безбородов А.М., Елинов Н.П., Цыганов В.А. 1970. - В кн.: Антибиотики. Л. Медицина.

Кинский С. 1969. Полиеновые антибиотики. - В кн.: Механизм действия антибиотиков. Ред. Г.Ф. Гаузе. М.-Мир, с. 125-145.

Клаус Д. 1990. – В кн.: Лимфоциты: Методы. М.-Мир, с. 395.

Климов А.Н., Никифорова А.А. 1971. О химиотерапевтическом эффекте комплекса холестеирин-леворин. - Антибиотики, т. 16, № 2, с. 120-122.

Климов А.Н., Никифорова А.А., Этингов Е.Д. 1971. Взаимодействие полиеновых антибиотиков леворина и амфотерицина В с холестерином. - Антибиотики, т. 16, № 3, с. 243-247.

Кокушкина Т.М., Егоренкова А.Н., Караев З.О. 1970 а. Влияние полиеновых антибиотиков на формирование противогрибкового иммунитета. – Антибиотики и химиотерапевтические препараты и их лечебное применение. Материалы конференции, Киев, с. 70-71.

Кокушкина Т.М., Большакова Е.Н., Егоренкова А.Н., Жилина З.А., Караев З.О., Любимова Л.К., Михайлова М.А. 1970 б. Химиотерапевтическая эффективность леворина в условиях эксперимента. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5. Ленинград, с. 87-96.

Кокушкина Т.М., Экземпляров О.Н., Кашкин А.П., Егоренкова А.Н., Жилина

- З.А., Зельманов Р.Б., Любимова Л.К., Михайлова Н.Г., Кочкина Л.П. 1973. Химиотерапевтическая эффективность микогептина при экспериментальных инфекциях. - В кн.: Микогептин и его клиническое применение. М., с. 38-47.
- Конев Ю.Е., Цыганов В.А. 1967. Новый вид рода *Streptoverticillium*, образующий новый антибиотик микогептин. - Антибиотики, т. 10, с. 874-880.
- Конев Ю.Е., Цыганов В.А. 1973. Характеристика продуцента микогептина *Streptoverticillium mycoheptinicum*. - В кн.: Микогептин и его клиническое применение. М., с. 9-13.
- Конев Ю.Е., Барашкова Н.П., Шенин Ю.Д. 1974. Новые мутовчатые актиномицеты, образующие гексаеновые антибиотики. - Микробиология, т. 43, вып. 4, с. 659.
- Конев Ю.Е., Ефимова В.М., Этингов Е.Д., Завальная Н.М. 1978. *Streptoverticillium griseoviridum n. sp.* – продуцент противогрибкового гептаенового неароматического антибиотика 0185 группы кандидина-амфотерицина В. - Антибиотики, т. 23, с. 143.
- Кореняко А.И., Хохлова Ю.М., Никитина Н.И., Пучнина А.В. 1964. Актиномицеты – продуценты гептаеновых антибиотиков. – Микробиология, т. 30, вып. 4, с. 633.
- Корыта И. 1983. Ионы, электроды, мембранны. - Москва, Мир, с. 1-264.
- Костюк П.Г., Кришталь О.А., Пидопличко В.И., Шаховалов Ю.А. 1980. Спектральный анализ флуктуаций проводимости кальциевых каналов в мембране нервной клетки. - ДАН СССР, т. 250, с. 219-222.
- Котык А., Янчек К. 1980. Мембранный транспорт. - Изд. Мир, с. 94.
- Котенко В.Т., Барашкова Н.П., Шенин Ю.Д. 1970. *Actinomyces albus sterilis* – продуцент нового тетраенового антибиотика. – Труды Ленингр. науч.-исслед. ин-та антибиотиков, вып. 6, с. 84.
- Кройт Г.Р. 1955. В кн.: Наука о коллоидах. I. Необратимые системы. - М. ИЛ.
- Кругликова Л.Ф., Мицкевич В.М., Шенин Ю.Д., Цыганов В.А., Карпенко М.П., Этингов Е.Д., Яковлева Е.П. 1975. Новый гептаеновый антибиотик флавумицин, образуемый *Act. Flavus Var. Gepticinus Var. Nov.* - Антибиотики, т. 20, № 9, с. 771-775.
- Кругликова Л.Ф., Шенин Ю.Д. 1976. Характеристика нового ароматического гептаенового антибиотика – флавумицина А. - Антибиотики, т. 21, с. 407.
- Кругликова Л.Ф. 1977. Физико-химическая характеристика некоторых ароматических гептаеновых антибиотиков. Структура флавумицина А. - Автореф. канд. дисс., М.
- Кулалаева З.И. 1977. Изучение природы собственной люминесценции некоторых актиномицетов группы *Flavus*. - Автореф. канд. дисс., М.
- Кулалаева З.И., Полторак В.А., Силаев А.Б., Северинец Л.Я. 1977. Исследование некоторых антибиотиков из группы карбонил-конъюгированных пентаенов. - Науч. докл. высшей школы. Биологические науки, № 1 (157), с. 107.
- Кулалаева З.И., Гибалов В.И., Филиппова С.Н., 1978. Таксономическое изучение актиномицетов-продуцентов карбонил-конъюгированных пентаенов. - В кн.: II Республикаанская научно-теоретическая конф. Молодых ученых-микробиологов. Тезисы докладов. Ташкент, с. 85.
- Кульбах В.О., Карпенко М.П. 1960. - Авт. свид. СССР № 187238.
- Кульбах В.О., Карпенко М.П. 1965. - Франц. Пат. № 1397287; Англ. пат. № 1061893, 1964; пат. США № 3476856, 1969; пат. ФРГ № 1296143, 1969.

Кульбах В.О. и др. – Авт. Свид. СССР № 288231, 1969; Англ. Пат. № 1241740, 1971; пат. ФРГ № 1938437, 1971; Франц. Пат. № 2057143, 1971.

Кульбах В.О., Зельманов Р.Б. и др. 1966. Авт. Свид. СССР № 178058. Бюлл. изобр., 2, 50.

Кульбах В., Холодова Ж., Малахова Е., Шевякова И. 1968. Изучение физико-химических свойств водорастворимых препаратов леворина и нистатина. - Антибиотики, т. 13, с. 759 - 763.

Кульбах В.О., Райгородская В.Я., Холодова Г.В., Соколов Л.Б., Башкович А.П., Розанова А.Ю., Свешников Ю.Ф., Кузнецова О.А., Полупариева Г.П., Гришкун З.В., Васильева Н.Г. 1970 а. Выделение и очистка леворина. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5. с. 27-36.

Кульбах В.О., Холодова Г.В., Соколов Л.Б., Свешников Ю.Ф. 1970 б. Производные леворина. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5. с. 55-61.

Курбанов О.Г., Касумов Х.М. 2003. Использование положительно заряженных молекул полиеновых антибиотиков для усиления транспорта ионов и углеводов в мышечные клетки. – Цитология, т. 45, № 9, с. 969.

Курбанов О.Г., Касумов Х.М. 2004. Гептенаовый ароматический антибиотик леворин и его производные при мышечной деятельности. - Антибиотики и химиотерапия, т. 49, с. 40-46.

Ландау М.А. 1981. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений. - М.: Наука.

Лев А.А., Готлиб В.А., Бужинский Э.И. 1966. Катионная специфичность модельных бимолекулярных мембран. - Ж. Эвол. Биох. Физиол., т. 2, с. 109.

Лев А.А., Бужинский Э.И. 1967. Катионная специфичность модельных бимолекулярных мембран с введением в них валиномицина. - Цитология, т. 9, с. 102-106.

Лев А.А. 1976. Моделирование ионной избирательности клеточных мембран. - Изд.: Наука, Ленингр. отд., с. 1-210.

Левченко А.Б., Табунов Б.Е., Белоусова И.И., Симаров Б.В., Терешин И.М. 1979. Резистентность дрожжей к полиеновым антибиотикам. Сообщение I. Получение мутантов *Saccharomyces cerevisiae*, резистентных к нистатину, и их генетический анализ. - Генетика, т. 15, № 6, с. 1007-1014.

Лещенко В.М., Рабинович И.М. 1966. - В кн.: Аспергиллез, Л., с. 39-40.

Либерман Е.А., Топалы В.П. 1968. Перенос ионов через бимолекулярные мембранны и классификация разобщителей окислительного фосфорилирования. - Биофизика, т. 13, с. 1025-1035.

Либерман Е.А., Мохова Е.Н., Скулачев В.П., Топалы В.П. 1968. Действие разобщителей окислительного фосфорилирования на бимолекулярные мембранны. - Биофизика, т. 13, с. 188.

Либерман Е.А. 1969. Гипотеза о роли клеточных мембран в управляющей системе клетки. - В сб. "Биофизика мембран". Москва-Каунас, с. 147-154.

Либерман Е.А., Проневич Л.А., Топалы В.П. 1970. О механизме проницаемости фосфолипидных мембранны для катионов в присутствии антибиотиков. - Биофизика, т. 15, с. 612-621.

Либерман Е.А. 1970. Мембранны (ионная проницаемость, возбудимость, управление). - Биофизика, т. 15, с. 278-297.

Липатников В.Е., Казаков К.М. 1981. Физическая и коллоидная химия. - М-

сказа. Изд. Высшая школа, с. 60-64.

Лукьянчук В.Д., Савченкова Л.В. 1998. Антигипоксанты: состояние и перспективы. - Экспериментальная и клиническая фармакология, т. 61, № 4, с. 72-79.

Макарова Г.А. 1992. - В кн.: Общие и частные проблемы спортивной медицины. Краснодар, с. 1-242.

Малафриев О.К. 1985. Исследование кинетики проводимости бислойных липидных мембран в присутствии амфотерицина В и его алкильных производных. - Канд. дисс., Баку, с. 1-117.

Малафриев О.К. 1986. Исследование кинетики проводимости бислойных липидных мембран в присутствии амфотерицина В и его алкильных производных. - Автореф. канд. дисс., Москва, с. 1-22.

Малафриев О.К., Касумов Х.М., Безруков С.М. 1991. О кинетических свойствах полиеновых каналов в условиях инактивации. - Биологические мембранны, т. 8(6), с. 633 – 637.

Малышкина М.А., Беленький Б.Г., Коган С.Б., Малыхина Ю.А., Богданова Н.П. 1959. - Авт. Свид. № 126230.

Малышкина М.А., Беленький Б.Г., Соловьев С.Н. 1963 а. Химическая очистка антибиотика 26/1 (леворина). - Антибиотики, т. 7, с. 584-587.

Малышкина М.А., Беленький Б.Г., Соловьев С.Н. 1963 б. Изучение физико-химических свойств антибиотика 26/1 (леворина). - Антибиотики, т. 8, с. 999-1003.

Малышкина М.А. 1966. Физико-химические свойства гептаеновых антибиотиков. - Канд. дисс., Л.

Малышкина М.А., Завальная Н.М., Соловьев С.Н. 1970 а. - Ленинградский институт антибиотиков: Научн. конф.: Тезисы докладов. Л., с. 105-107.

Малышкина М.А., Завальная Н.М., Райгородская В.Я., Розанова А.Ю.. Соловьев С.Н. 1970 б. Физико-химические свойства леворина. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5, с. 37-45.

Маргулис М.А., Маргулис И.М. О механизме биологического действия ионизирующей радиации. - Журнал физической химии, 2005, т. 79, № 6, с. 1142-1151.

Моргунова А.Ф., Малышкина М.А., Соловьев С.Н. 1970. Компонентный состав гептаенового антибиотика, образуемого культурой ЛИА-0179. - В кн.: Материалы VI науч. Сессии ленингр. научн.-исслед. ин-та антибиотиков. Л., с. 123.

Маркин В.С., Пастушенко В.Ф., Чизмаджев Ю.А. 1974. Физика нервного импульса. - Успехи физ. наук, т. 123, с. 289-332.

Микаилова У.Т. 1990. Исследование кинетики проводимости бислойных липидных мембран в присутствии полиенового антибиотика леворина А и его алкильных производных. - Канд. дисс., Баку, с. 1-118.

Микаилова У.Т., Касумов Х.М., Безруков С.М., Пустовойт М.А. 1990. О природе инактивации левориновых каналов. - ДАН Азерб. Респуб. № 7, с. 52-54.

Михайлец Г.А., Волынская С.Л., Иванов Н.М., Слоницкая Н.Н., Думова А.М., Гринберг Г.Е., Яробкова Н.Д. 1970. Фармакологическая характеристика леворина и его натриевой соли. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5, с. 62-78.

Михайлец Г.А., Иванов Н.М., Слоницкая Н.Н. 1972. Влияние леворина и амфотерицина В на предстательную железу белых крыс и на содержание у них холестерина в сыворотке крови. - Антибиотики, т. 17, с. 802.

Михайлец Г.А., Кокушина Т., Экземпляров О., Рабинович И., Зельманов Р. 1973. О клинич. применении амфотерицина В для внутривенного введения. - Ме-

тодические указания. ЛНИИА. Л., с. 1-22.

Михайлец Г.А., Волынская С.Л., Думова А.М., Иванов Н.М., Моисеева М.В., Слоницкая Н.Н. 1973. Токсичность и фармакологические свойства микогептина. - В кн.: Микогептин и его клиническое применение. М., с. 48-53.

Мицкевич В.М., Котенко Т.В., Цыганов В.А., Шенин Ю.Д. 1973. Новый тетраеновый антибиотик флавовиридомицин. - Антибиотики, т. 18, с. 867.

Моргунова А.Ф., Малышкина М.А., Соловьев С.Н. 1970. Компонентный состав гептаенового антибиотика, образуемого культурой ЛИА-0179. - В кн.: Материалы VI научн. сессии ленингр. Науч.-исслед. Института антибиотиков. Л., с. 123.

Навашин С.М., Сазыкин Ю.О. 1988. Молекулярные основы современной антибиотикотерапии. - Антибиотики и химиотерапия, т. 33, с. 3-12.

Наместникова В.П., Львова Л.Е. 1970. Изучение условий ферментации *Actinomyces levoris* – продуцента леворина. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5. Ленинград, с. 22-26.

Наумчик Г.Н., Вайнштейн В.А. 1968. Способ перевода полиеновых антибиотиков в водный раствор. - Авт. свид., СССР, № 231718.

Наумчик Г.Н., Этингова Н.И., Сквирская Т.Ю., Вайнштейн В.А., Плискина Т.П., Реди Н.С., Кульбах В.О., Райгородская В.Я., Рабинович И.М., Иванов Н.М., Васильева Н.Г., Свешников Ю.Ф., Павлова А.И., Зельманов Р.Б.. 1970. Лекарственные формы леворина. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5, с. 97-109.

Наумчик Г.Н., Кульбах В.О., Холодова Г.В., Вайнштейн В.А., Этингова Н.И., Сквирская Т.Ю., Виноградова Э.М., Соколов Л.Б., Плискина Т.П. 1973. Лекарственные формы и производные микогептина. - В кн.: Микогептин и его клиническое применение. М., с. 65-75.

Невинский А.А., Карнаушкина А.И., Северинец Л.Я., Попова И.В., Этингов Е.Д. 1966. Метод количественного определения пентаэна в микогептине. - Материалы 3-ей конференции молодых ученых ЛНИИА, Л., с. 36-38.

Невинский А.А., Карнаушкина А.И., Этингов Е.Д., Наместникова В.П., Северинец Л.Я. 1971. Спектрофотометрический метод количественного определения полиеновых антибиотиков. - Антибиотики, т. 16, с. 541-545.

Некачалов В.Я., Яробкова Н.Д. 1970. Леворин в терапии кандидозов различной локализации. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5. Ленинград, с. 117-126.

Нестерова Л.А., Слободская В.В. 1976. Влияние водорастворимого производного леворина на течение экспериментальной жировой инфильтрации печени у крыс. - В кн.: Изучение биологически активных веществ-метаболитов микроорганизмов. Ч. 1. Л., с. 28.

Никольский Н.Н., Трошин А.С. 1973. - Транспорт сахаров через клеточные мембранны. Изд. Наука, Ленинград, с. 222.

Никольский Н.Н. 1977. В кн.: Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия. - Научные труды Института Цитологии АН СССР. Л., вып. 17, с. 23-25.

Обуховская А.С., Лишневская Е.В., Терешин И.М. 1979. Действие леворина на транспорт аминокислот у *Candida albicans*. - Антибиотики, т. 24, с. 354.

Овчинников Ю.А., Иванов В.Т., Шкраб А.М. 1974. Мембраноактивные комплексоны. - М.: Наука.

Осипов В.В., Ростовцева Т.К., Лев А.А. 1988. Вольт-амперные характеристи-

ки одиночных грамицидиновых каналов при симметричных и асимметричных условиях сорбции на мембранных анионов 1-анилинонафтатин-8-сульфоната. - Биологические мембранные, т. 5, № 2, с. 162-172.

Полторак В.А., Соколова З.Г., Виноградова К.А.. Силаев А.Б. 1972. Противогрибковый антибиотик триен, выделение и свойства. - Антибиотики, т. 17, с. 738.

Попелюев В.М. 1978. Свойства ионных каналов, образуемых амфотерицином В в липидном бислое с холестерином. - Автореф. канд. дисс.. Пущино.

Райгородская В.Я., Башкович А.П., Кульбах В.О. 1967. Реакция протонизации как метод дифференциации противогрибковых полиеновых антибиотиков. - Хим. Фарм. Журнал, № 6, с. 42-45.

Романкова А.Г., Зурабова Э.Р., Фурсенко М.В., Сухаревич В.И.. Пронина М.И. 1971. Отбор штаммов некоторых актиномицетов – продуцентов антибиотиков при многократных пересевах в условиях глубинного культивирования. - Антибиотики, № 7, с. 579-583.

Россолимо О.К., Иваницкая Л.П., Ковшарова И.Н., Константинова Н.В., Лаврова М.Ф., Манафова Н.А., Свешникова М.А. 1969. Изучение в эксперименте антимикробных свойств и противоопухолевой активности нового пентаенового антибиотика 661. - Антибиотики, т. 14, с. 849.

Сазыкин Ю.О. 1965. Биохимические основы действия антибиотиков на микробную клетку. - М.: Наука.

Сазыкин Ю.О. 1968. Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов. - М.: Наука, с. 85-105.

Самедова А.А. 1984. Действие филипина и индивидуальных компонентов нистатина на проводимость бислойных мембран. - Изв. АН Азерб. ССР. Серия биологических наук, № 6, с. 118-121.

Самедова А.А., Касумов Х.М. 1990. Спектральный анализ полиеновых антибиотиков в клеточных культурах. - Азербайджанский Медицинский Журнал, № 5. с. 71-73.

Самедова А.А. 1991. Взаимосвязь структуры и функции полиеновых антибиотиков. - Канд. дисс., Баку, с. 1-97.

Северинец Л.Я. 1970. Физико-химические свойства пентаеновых антибиотиков. - Автореф. канд. дис. Л., 1971 - Канд. дисс., Л.

Северинец Л.Я. Конев Ю.Е. 1974. Сургумицин – новый представитель группы α-оксикетопентаенов.-Антибиотики, т. 19, с. 291.

Силаев А.Б., Тохтамуратов Е. 1965. Изучение тераеновых антибиотиков, производимых актиномицетами. - Антибиотики, т. 10, с. 27.

Соловьев С.Н., Беленький Б.Г., Петрова Л.Я.. Малышкина Н.А., Большакова Л.О., Овчаров В.Г. 1960. - В кн.: Экспериментальные и клинические исследования по антибиотикам. Л., т. 2, с. 258-261.

Соловьева Н.Н., Белоусова И.И.. Терешин И.М. 1976. Изучение влияния полиеновых антибиотиков на активность лактатдегидрогеназы и АТФ-азы мембранных фракций *Candida albicans*. - Хим. Фарм. Журнал. т. 10, № 11, с. 18-20.

Соловьева Н.Н., Белоусова И.И., Терешин И.М. 1977 а. Действие полиеновых антибиотиков на активность щелочной фосфатазы мембранных фракций клеток *Candida albicans*. - Биохимия, т. 42, № 2, с. 277-282.

Соловьева Н.Н., Никифоров В.В., Капрельян А.С., Островский Л.Н., Белоусова И.И., Терешин И.М. 1977 б. Действие полиеновых антибиотиков и детергентов на клеточные мембранные чувствительного и резистентного к полиенам штаммов

Candida albicans. - Биохимия, т. 42, № 7, с. 1315-1321.

Султанова Г.Г., Самедова А.А., Касумов Х.М. 2007. Гемолиз эритроцитов при комбинированном действии ультразвуковых волн и полиеновых антибиотиков. - Антибиотики и химиотерапия, т. 52, № 9-10, с. 9-13.

Тасаки И. 1957. Проведение нервного импульса. М.

Терентьев П.В., Ростова Н.С. 1977. – Практикум по биометрии. Л.

Терешин И.М., Экземпляров О.Н. 1978. Итоги и перспективы научных исследований в области противогрибковых антибиотиков. - Антибиотики, т. 23, с. 387.

Тирамалахиар М., Рамахандран С., Ршалкар П., Падие А. 1966. Неогептаен, новый противогрибковый антибиотик. – В кн.: IX Международный конгресс по микробиологии. Тезисы докладов. М., с. 226.

Тохтамуратов Е., Силаев А.Б. 1965. Выделение и очистка антибиотиков, производимых *Actinomyces tumeferans*. - Антибиотики, т. 10, с. 30.

Тохтамуратов Е., Силаев А.Б. 1967. Изучение условий биосинтеза тетраеновых антибиотиков 18-45 и 18-80, гептаенового антибиотика 2368. - Антибиотики, т. 12, с. 887.

Ушакова Т.А., Фролова В.И., Кузовков А.Д., Розынов Б.В., Трубников В.И. 1971. Изучение строения антибиотика ауренина. Сообщение 3. Структура ауренина. – Хим. Фарм. Журн., т. 5, с. 18.

Фейгин А.М., Белоусова И.И., Терешин И.М. 1978. Роль структуры стерина в комплексообразовании с полиеновыми антибиотиками. - Антибиотики, т. 23, № 12, с. 1079-1083.

Фейгин А.М., Белоусова И.И., Яхимович Р.И., Василевская В.Н., Терешин И.М. 1979. Роль числа и положения двойных связей в тетрациклическом ядре стерина при взаимодействии с полиеновыми антибиотиками. - Биофизика, т. 24, с. 330-331.

Фейгин А.М., Гианин Т., Пасечник В.И., Флеров Ш.Н., Богословский Н.Д., Литвинова Г.Е., Белоусова И.И., Терешин И.М. 1981. Роль стеринов во взаимодействии полиеновых антибиотиков с липидными мембранами. - Антибиотики, т. 26, № 7, с. 522-526.

Филиппова А.И., Шенин Ю.Д. 1974. Физико-химические свойства компонентов леворина. - Антибиотики, т. 19, № 1, с. 32-35.

Филиппова А.И., Лашков Г.И., Козел С.П., Шенин Ю.Д. 1987. Спектрофотометрическое исследование фотохимической изомеризации полиенового макролидного антибиотика леворина A₂. - Антибиотики и медицинская биотехнология, т. 32, с. 749-754.

Хаггис Д., Михи А., Робертс К., Уокер П. 1967. Введение в молекулярную биологию. - М. – Мир.

Хантер Ф., Шварц А. 1969. Грамицидин. В сб.: Механизм действия антибиотиков. - М.: Мир, с. 605-611.

Ходжкин А. 1965. Нервный импульс. М.

Ходоров Б.И. 1969. Проблема возбудимости. Изд. "Медицина".

Ходоров Б.И. 1975. Общая физиология возбудимых мембран. - М.: Наука.

Холодова Г.В., Кульбах В.О. и др. 1968. - Антибиотики, т. 5, с. 455.

Холодова Г.В., Этингов Е.Д., Кашкин А.П., Кульбах В.О., Свешников Ю.Ф. 1970. Изучение стабильности натриевой соли микогептина. - Материалы VI научной сессии ЛНИИА, Л., с. 190-192.

Хохлова Ю.М., Пучнина А.В., Блинов Н.О. 1963. Изучение гептаеновых анти-

биотиков № 2339 и 2789 методом хроматографии на бумаге. – Антибиотики, т. 8, с. 417.

Хуторский В.Е. 1984. Гидратация Na^+ , K^+ в трансмембранном канале грамицидина А. - Биологические мембранны, т. 1, с. 99-101.

Хуторский В.Е., Каменчук А.А. 1988. Молекулярная модель ионной проницаемости и селективности амфотерицинового канала. - Биологические мембранны, т. 5, № 2, с. 173-180.

Хуторский В.Е., Каменчук А.А., Ермишкин Л.Н. 1988. Компьютерный анализ пространственной структуры амфотерицинового канала. - Биофизика, т. 33, № 5, с. 794-797.

Цыганов В.А., Голяков П.Н., Малышкина М.А., Фурсенко М.В., Филиппова А.И. 1963. К характеристике антибиотиков, образуемых *Actinomyces levoris*. - Антибиотики, т. 1, с. 29-33.

Цыганов В.А., Конев Ю.Е., Наместникова В.П. 1965. Характеристика актиномицета № 44B/1 – продуцента нового противогрибкового антибиотика микогептина. - Антибиотики, т. 7, с. 599-602.

Цыганов В.А. 1970. Характеристика продуцента леворина *Actinomyces levoris*. – В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5, с. 7-10.

Цыганов В.А., Яковлева Е.П. 1970. Типовой состав леворина А и свойства составляющих его компонентов. - В кн.: Леворин и его клиническое применение. Труды ЛНИИА, Л., вып. 5. Ленинград, с. 46-54.

Цыганов В.А., Большакова Л.О., Соловьев С.Н., Малышкина М.А. 1970. Гепцин – новый гептаен, образуемый *Actinosporangium griseoroseum n. sp.* – Антибиотики, т. 15, с. 963.

Цыганов В.А., Барашкова Н.П., Шенин Ю.Д. 1972 а. Плюмбомицины А и В – новые тетраеновые антибиотики, образуемые *Actinomyces plumbeus sp. nov.* – Антибиотики, т. 17, с. 483.

Цыганов В.А., Моргунова А.Ф., Конев Ю.Е., Соловьев С.Н., Малышкина М.А. 1972 б. Криптомицин, новый гептаеновый антибиотик, образуемый *Actinomyces bulgaricus*. – Антибиотики, т. 17, с. 1067.

Цыганов В.А., Большаякова Л.О., Барашкова Н.П. 1973 а. Тетрамедин – новый тетраеновый антибиотик, образуемый культурой *Actinomyces mediocidicus*. – Антибиотики, т. 18, с. 195.

Цыганов В.А., Шенин Ю.Д., Соловьев В.Н. 1973 б. *Actinomyces tumetacerasans Krass., Kov., 1962, var. griseoarenicolor var. nov.* – продуцент нового тетраенового антибиотика ареномицина В. – Антибиотики, т. 18, с. 973.

Цыганов В.А., Яковлева Е.П., Кругликова Л.Ф., Шенин Ю.Д., Этингов Е.Д., Михайлец Г.А., Егоренкова А.Н. 1975. *Actinomyces fulvoviolaceus var. achromogenes var. nov.* – продуцент нового гептаенового комплекса фульвомицина. – Антибиотики, т. 20, с. 579.

Швинка Н.Э., Кафнер Г. 1989. Влияние амфотерицина В и нистатина на транспорт катионов в мемbrane мышечного волокна. - Биологические мембранны. т. 6, с. 1216-1221.

Швинка Н.Э., Кафнер Г. 1991. Исследование кинетики взаимодействия амфотерицина В с мембраной мышечного волокна. Биологические мембранны, т. 8, с. 1292-1303.

Шемякин М.М., Хохлов А.С., Колесов М.Н., Бергельсон Л.Д., Антонов В.К.

1961. - Химия антибиотиков. т. 1,2. М.-Л.
- Шенин Ю.Д., Котенко Т.В., Егоренкова А.Н. 1969. Нистатин. IV. Гептаеновый компонент образцов нистатина – нурсимицин. – Хим. Фарм. Журнал, т. 3, с. 15.
- Шенин Ю.Д., Соколова Э.Н., Конев Ю.Е. 1970. Образование нового гептаенового неароматического антибиотика тбилимицина культурой *Actinomyces chartreuses* var. *Tbilisus*. - Антибиотики, т. 15, № 1, с. 9-14.
- Шенин Ю.Д., Соловьев В.Н., Невинский А.А. 1973. Структура полиенового антибиотика ареномицина В. – Антибиотики, т. 18, с. 872.
- Шенин Ю.Д., Кругликова Л.Ф. 1977. Структура агликона ароматического гептаенового антибиотика флавумицина А. - Биоорганическая химия, т. 3, № 2, с. 259-267.
- Шенин Ю.Д., Терешин И.М. 1977. Структура, модификация и биологические свойства антибиотиков из группы полиеновых макролидов. - Хим. Фарм. Журнал, т. 2, с. 57-61.
- Шенин Ю.Д., Малков М.А., Фадеева Л.Е., Кругликова Л.Ф. 1980. Всесоюзный науч.-исслед. технол. ин-т антибиотиков и ферментов медицинского назначения. - Научн. конф.: Тезисы докладов. Л., с. 152-153.
- Шишлов Ю.В., Ненашев В.А., Касумов Х.М. 1975. Адсорбция полиеновых антибиотиков нистатина и леворина на бислойных липидных мембранах. - Мат. Всесоюз. Симпоз., Ленинград, с. 21-22.
- Шорин В.А., Россолимо О.К., Бажанов В.С., Авербух Л.А., Крятова Г.А., Лепешкина Г.Н. 1971. Исследование противоопухолевой активности лиеномицина в опытах на животных. – Антибиотики, т. 16, с. 708.
- Эмануэль Н.М., Кнопре Д.Г. 1969. – В кн.: Курс химической кинетики. М. Высшая школа.
- Этингов Е.Д., Холодова Г.В., Кульбах В.О., Карнаушкина А.И. 1972. Кислотно-основные свойства амфотерицина В. - Антибиотики, т. 17, № 4, с. 301-305.
- Этингов Е.Д., Карнаушкина А.И., Завальная Н.М., Жукова Р.А., Фурсенко М.В. 1973. Физико-химические свойства микогептина. - В кн.: Микогептин и его клиническое применение. М., с. 32-37.
- Эфендиев А.М., Помойнецкий В., Кубатиев А. 1986 а. Активность простагландинсингтазы в разных слоях почек молодых крыс при действии полиеновых антибиотиков. - Бюлл. Эксперим. Биол. и Медицины, Москва, № 3, с. 302-304.
- Эфендиев А.М., Помойнецкий В., Кубатиев А. 1986 б. Влияние полиеновых антибиотиков на активность ферментов метаболизма простагландинов в разных слоях почек старых крыс. - Антибиотики и Медицинская Биотехнология, Москва, № 4, с. 284-288.
- Эфендиев А.М., Помойнецкий В., Кубатиев А. 1989. Влияние полиеновых антибиотиков на синтез простагландинов в разных слоях почек старых крыс. - Ж. Патолог. Физиол. и Эксперим. Терапии, Москва, № 1, с. 63-66.
- Яковлева Е.П. 1968. - Канд. дисс., Л.
- Яременко К.В., Харитоненко Т.С., Голубева Т.А. 1975. О влиянии амфотерицина В и его сочетания с 5-фторурацилом на развитие перевиваемой лимфосаркомы крыс. – Антибиотики, т. 20, с. 433.
- Яременко К.В., Еремеева А.А., Терешин И.М. 1977. О потенцировании противоопухолевого действия алкилирующих соединений амфотерицином В. – Антибиотики, т. 22, с. 153.
- Ablordeppay S.Y., Fan P., Ablordeppay J.H., Mardenborough L. 1999. Systemic

antifungal agents against AIDS-related opportunistic infections: current status and emerging drugs in development. - Curr. Med. Chem., v. 6, № 12, p. 1151-1195.

Abramson M.B., Ockman N. 1973. – Binding at lipid surfaces: Nystatin . - Journal of Colloid and Interface Science, v. 43, p. 530-538.

Abu-Salah K.M. 1996. Amphotericin B: an update. - Br. J. Biomed. Sci., v. 53, № 2, p. 122-33.

Adedoyin A., Bernardo J., Swenson C., Bolsack L., Horwith G., Devit S., Kelly E., Klasterksy J., Sculier J., Devaleriola D., Anaissle E., Lopez-Berestein G., Lianos-Cuentasd A., Boyle A., Branch R. 1997. Pharmacokinetic profile of ABELCET (amphotericin B lipid complex injection): combined experience from phase I and phase II studies. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 41, № 10, p. 2201-2208.

Adjou K.T., Demaimay R., Lasmezas C., Deslys J.P., Seman M., Dormont D. 1995. MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 39, p. 2810-2812.

Adjou K.T., Demaimay R., Deslys J.P., Lasmezas C., Beringue V., Demart S., Lamoury F., Seman M., Dormont D. 1999. MS-8209, a water-soluble amphotericin B derivative, affects both scrapie agent replication and PrPres accumulation in Syrian hamster scrapie. - J. Gen. Virol., v. 80, p. 1079-1085.

Adler-Moore J.P., Chiang S.M., Satorius A., Guerra D., McAndrews B., McManus E.J., Proffitt R.T. 1991. Treatment of murine candidiasis and cryptococcosis with a unilamellar liposomal amphotericin B formulation (AmBisome). - J. Antimicrob. Chemother., v. 28 (Suppl. B), p. 63-71.

Adler-Moore J.P., Fugii G., Lee M.J.A., Satorius A., Bailey A., Proffitt R.T. 1993. In vitro and in vivo interactions of AmBisome with pathogenic fungi. - J. Liposome Res., v. 3, p. 151-163.

Adler-Moore J.P., Proffitt R.T. 1993. Development, characterization, efficacy and mode of action of AmBisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B. - J. Liposome Res., v. 3, p. 429-450.

Aggett P.J., Fenwick P.K., Kirk H. 1982. The effect of amphotericin B on permeability of lipid bilayers to divalent trace metals. - Biochim. Biophys. Acta, v. 684, p. 291-294.

Ahmad I., Sarkar A.K., Bachhawat B.K. 1989 a. Liposomal amphotericin B in the control of experimental aspergillosis in mice. I. Relative therapeutic efficacy of free and liposomal amphotericin B. - Indian J. Biochem. Biophys., v. 26, p. 351-356.

Ahmad I., Sarkar A.K., Bachhawat B.K. 1989 b. Design of liposomes to improve delivery of amphotericin B in the treatment of aspergillosis. - Molec. Cellular Biochem., v. 91, p. 85-90.

Ahmad I., Sarkar A.K., Bachhawat B. K. 1990. Effect of cholesterol in various liposomal compositions of the in vivo toxicity, therapeutic efficacy and tissue distribution of amphotericin B. - Biootechnology and Applied Biochemistry, v. 12, p. 550-556.

Ahnert-Hilger G., Chhatwal G.S., Hessler H., Habermann E. 1982. Changes in erythrocyte permeability due to palytoxin as compared to amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 688, p. 486-494.

Ahrens J., Graybill J.R., Craven P.C., Taylor R.L. 1984. Treatment of experimental murine candidiasis with liposome-associated amphotericin B. - Sabouraudia, v. 22, p. 163-166.

Aiso K., Arai T., Washida K., Tanaami T. 1952. Mycelin, a new antifungal substance extracted from the mycelium of a *Streptomyces*. - J. Antibiot., v. 5, p. 218.

- Aizawa S., Shibaya M., Shizato S. 1971. Resistaphylin a new antibiotic. I. Production, isolation and properties. - J. Antibiot., v. 24, p. 393-396.
- Akasaki K., Karasawa K., Watanabe M., Yonehara H., Umezawa H. 1963. Monazomycin, a new antibiotic produced by a streptomycetes. - J. Antibiot. Ser. A., v. 16, p. 127-131.
- Akiyama S., Tabuki T., Kaneko M., Komiyama S., Kuwano M. 1980. Classification of polyene antibiotics according to their synergistic effect in combination with bleomycin A2 or fusidic acid. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 18, p. 226-230.
- Al Bassam T., Poulain D., Giummelly P., Lematre J., Bonaly R. 1985. Chemical and antigenic alterations of *Candida albicans* cell walls related to the action of amphotericin B sub-inhibitory doses. - J. Antimicrob. Chemother., v. 15, p. 263-269.
- Aliev J.A., Ajalov V.A., Mamedov A.Ch., Shahmuradov I.A. 1993. Restriction analysis and mapping of chloroplast DNA of *Cicer arietinum*. Abstract 1 of 3d Congress of the Society of Russian Plant Physiologists. Sankt-Peterburg, p.4.
- Aliev J.A., Mamedov A.Ch., Ajalov V.A. 1994. Comparative analysis of chloroplast DNA of different varieties *Cicer arietinum* and cloning of gene psb A. - 16th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. New Delhi, India, v. 3, p.39.
- Aliev J.A., Mamedov A.Ch., Ajalov V.A. 1995. Study of phylogenesis by comparative restriction analysis of the chickpea (*Cicer arietinum*) chloroplast genome. Abstracts of 23rd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies. Basel, Switzerland, p.223.
- Allen S.D., Sorensen K.N., Nejdi M.J., Durant C., Proffitt R.T. 1994. Prophylactic efficacy of aerosolized liposomal (AmBisome) and non-liposomal (Fungizone) amphotericin B in murine pulmonary aspergillosis. - J. Antimicrob. Chemother., v. 34, p. 1001-1013.
- Allende M.C., Lee J.W., Francis P., Garrett K., Dollenberg H., Berenguer J., Lyman C.A., Pizzo P.A., Walsh T.J. 1994. Dose-dependent antifungal activity and nephrotoxicity of amphotericin B colloidal dispersion in experimental pulmonary aspergillosis. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 38, p. 518-522.
- Allendorfer R., Yates R.R., Sun S.H., Graybill J.R. 1992. Comparison of amphotericin B-lipid complex with amphotericin B and SCH-39304 in the treatment of murine coccidioidal meningitis. - J. Med. Vet. Mycol., v. 30, p. 377-384.
- Al-Mohammed H., Cnance M., Bates P. 2005. Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 49, p. 3274-3280.
- Amantea M.A., Bowden R.A., Forest A., Working P.K., Newman M.S., Mamelok R.D. 1995. Population pharmacokinetics and renal function sparing effects of amphotericin B in colloidal dispersion in patients receiving bone marrow transplants. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 39, p. 2042-2047.
- Amati P., Lago C. 1974. Sensitivity to amphotericin B of in vitro established cell lines. - Nature., v. 247, p. 466-469.
- Amati P., Lago C. 1975. Differential susceptibility to amphotericin B of 3T3 cells transformed by SV40 or polyoma. - Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, v. 39 , p. 371-374.
- Anachi R.B., Bansal M., Easwaran K.R.K., Namboodri K., Gaber B.P. 1995. Molecular modeling studies on amphotericin B and its complex with phospholipid. - J. Biomol. Struct. Dyn., v. 12, p. 957-970.

- Andreoli T., Monahan M. 1968. The interaction of polyene antibiotics with thin lipid membranes. - J. Gen. Physiol., v. 52, p. 300-325.
- Andreoli T.E., Dennis V.W., Weigl A.M. 1969. The effect of amphotericin B on the water and nonelectrolyte permeability of thin lipid membranes. - J. Gen. Physiol., v. 53, p. 133-156.
- Andreoli T. 1973. On the anatomy of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. - Kidney International, v. 4, p. 337-345.
- Andreoli T. 1974. The structure and function of amphotericin B cholesterol pores in lipid bilayer membranes. - Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 235, p. 448-468.
- Andrews F.A., Beggs W.H., Sarosi G.A. 1977. Influence of antioxidants on the bioactivity of amphotericin B. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 11, p. 615-618.
- Andriole V.T., Paterson T.F. 1989. The role of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic fungal infections. - Eur. J. Clin. Oncol. v. 25, p. S63 - S68.
- Anert-Hilger G., Chatwal G.S., Hessler H.J., Habermann E. 1982. Changes in erythrocyte permeability due to palytoxin as compared to amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 688, p. 486-494.
- Annaissie E., Pasternick V., Proffitt R., Adler-Moore J., Bodey G.P. 1991. Comparison of the in vitro antifungal activity of free and liposome-encapsulated amphotericin B. - Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v. 10, p. 665-668.
- Aparicio J.F., Caffrey P., Gil J.A., Zotchev S.B. 2003. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. - Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 61, p. 179-188.
- Apell H.J., Bamberg E., Alpes H., Lauger P. 1974. Formation of ion channels by a negatively charged analog of gramicidin A. - J. Membrane Biol., v. 31, p. 171-188.
- Aracava Y., Smith I.C.P., Schreier S. 1981 a. Effects of amphotericin B on membranes: a spin probe study. - Biochemistry, v. 20, p. 5702-5707.
- Aracava Y., Schreier S., Phadke R., Deslauriers R. 1981 b. Effects of amphotericin B on membrane permeability-kinetics of spin probe reduction. - Biophys. Chem., v. 14, p. 325-332.
- Arai T., Aiso K. 1953. Antibiotic substance, mycelin from *Streptomyces fradiae*. - Japan Pat. № 5450.
- Arathoon E.G. 2001. Clinical efficacy of echinocandin antifungals. - Curr. Opin. Infect. Dis., v. 14, p. 685-691.
- Arcamone F., Bertazoli G., Canevazzi G., Dimarco A., Ghione M., Grein A. 1957. La etruscomicina, nuova antibiotice prodotto dallo *Streptomyces lucensis* sp. nov. - Giorn. Microbiol., v. 4, p. 119-128.
- Archer D.B. 1975. The use of a fluorescent sterol to investigate the mode of action of amphotericin methyl ester, a polyene antibiotic. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 66, № 1, p. 195-201.
- Archer D.B., Gale E.F. 1975. Antagonism by sterols of the action amphotericin B and filipin on the release of potassium ions from *Candida albicans* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *carpi*. - J. Gen. Microbiol., v. 90, pt. 1., p. 187-190.
- Archer D.B. 1976. Effect of the lipid composition of *Mycoplasma Mycoides Subspecies Carpi* and phosphatidylcholine vesicles upon the action of polyene antibiotics. - Biochim. Biophys. Acta, v. 436, № 1, p. 68-76.
- Arima N., Sakamoto J., Okamoto E. 1960. Protocidin, an antibiotic substance. - Japan. Pat. № 8648, 1960 (C.A., 1961, v. 55, 7758).
- Arishima M., Sakamoto J. 1960. Cryptocidin, an antibiotic substance. - Japanese Patent 13897.

- Arishima M., Sakamoto J. 1961a. - Japanese Patent 1148.
- Arishima M., Sakamoto J. 1961b. Noldcidin A, an antibiotic substance. - Japanese Patent 1148, 1961 (C.A., 1961, v. 55, 21476).
- Armstrong J.J., Grove J.F., Turner W.B., Ward G. 1965. An antifungal triens from a *Streptomyces* sp. - Nature, v. 206, p. 399-400.
- Armstrong C.M. 1974. Ionic pores, gates and gating currents. - Quart. Rev. Biophys., v. 7, p. 179-210.
- Armstrong C.M., Bezanilla F. 1975. Currents associated with the ionic gating structures in nerve membranes. - Ann. N.Y. Acad. Sci. USA., v. 264, p. 265-277.
- Asselineau J., Lederer E. 1960. Lipide metabolism. - New York; John Wiley and Sons, p. 337.
- Aszalos A., Robinson R.S., Lemanski P., Berk B. 1968. Trienine an antitumour triene antibiotic. - J. Antibiotics, v. 21, p. 611-615.
- Aszalos A. 1975. Differential potentiation by nystatin of the effect of antibiotics on yeast and mammalian cells. - Antimicrob. Agents Chemother, v. 7, p. 754-757.
- Aszalos A., Bradlaw J.A., Reynaldo E.F., Yang G.C., El-Hage A.N. 1984. Studies on the action of nystatin on cultured rat myocardial cells and cell membranes, isolated rat hearts, and intact rats. - Biochem. Pharmacol, v. 33, p. 3779-3786.
- Aszalos A., Bax A., Burlinson N., Roller P., McNeal C. 1985. Physico-chemical and microbiological comparison of nystatin, amphotericin A and amphotericin B, and structure of amphotericin A . - J Antibiot (Tokyo), v. 38, p. 1699-1713.
- Athar M.A., Winner H.I. 1971. The development of resistance by *Candida* species to polyene antibiotics in vitro. - J. Med. Microbiol., v. 4, p. 505-517.
- Backes B.J., Rychnovsky S.D. 1992. A reverse-phase HPLC assay for measuring the interaction of polyene macrolide antifungal agents with sterols. - Anal. Biochim., v. 205, p. 96-99.
- Backus E.J., Dann M. 1960. - Fr. Pat. № 1231650, 1960.
- Baginski M., Tempczyk A., Borowski E. 1989. Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics. - Eur. Biophys. J., v. 17, p. 159-166.
- Baginski M., Gariboldi P., Borowski E. 1994 a. The role of amphotericin B amine group basicity in its antifungal action. A theoretical approach. - Biophysical Chemistry, v. 49, p. 241-250.
- Baginski M., Bruni P., Borowski E. 1994 b. Comparative analysis of the distribution of the molecular electrostatic potential for cholesterol and ergosterol. - J. Mol. Struct., v. 311, p. 285 - 296.
- Baginski M., Borowski E. 1997. Distribution of electrostatic potential around amphotericin B and its membrane targets. - J. Mol. Struct., v. 389, p. 139-146.
- Baginski M., Resat H., McCammon J. 1997 a. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: molecular dynamics simulation. - Molecular Pharmacology, v.52, p. 560 - 570.
- Baginski M., Gariboldi P., Bruni P., Borowski E. 1997 b. Conformational analysis of amphotericin B. - Biophys. Chem., v. 65, p. 91-100.
- Baginski M., Resat H., Borowski E. 2002. Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. - Biochim. Biophys. Acta, v.1567, p.63-78.
- Baily G.G., Nandy A. 1994. Visceral leishmaniasis is more prevalent and more problematic. - J. Infect., v. 29, p. 241-247.

Baker H., Sidorowicz A., Sehgal S.H., Vezina C. 1978. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. III. *In vitro* and *in vivo* evaluation. – J. Antibiot., v. A13, p. 539.

Balakrishnan A.R., Easwaran K.R.K. 1993. Lipid-amphotericin B-complex structure in solution: a possible first step in the aggregation process in cell membranes. – Biochemistry, v. 32, p. 4139-4144.

Balcavage W.X., Beale M., Chasen B., Mattoon J.R. 1968. Effect of filipin on rat-liver and yeast mitochondria. - Biochim. Biophys. Acta, v. 162, № 4, p. 525-532.

Ball S., Bessel C.J., Mortimer A.M. 1957. The production of polyene antibiotics by soil streptomycetes. – G. Gen. Microbiol., v. 17, p. 96.

Bamberg E., Jahko K. 1976. Single channel conductance at lipid bilayer membranes in the presence of monazomucin. - Biochim. Biophys. Acta, v. 426, p. 447-450.

Bamberg E., Benz R. 1976. Voltage-induced thickness changes of lipid bilayer membranes and the effect of an electric field on gramicidin A channel formation. - Biochim. Biophys. Acta, v. 426, p. 570-580.

Bamberg E., Noda K., Gross E., Lauger P. 1976. Single-channel parameters of gramicidin A, B and C. - Biochim. Biophys. Acta, v. 419, p. 228-233.

Bangham A.D. 1972 a. Model membranes. - Chem. and Phys. Lipids., v. 8, № 4, p. 386-392.

Bangham A.D. 1992 b. Liposomes: realizing their promise. - Hosp. Pract., v. 27, p. 51-62.

Bard M. 1972. Biochemical and genetic aspects of nystatin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. - Journal of Bacteriology, v. 111, № 3, p. 649-657.

Barth C., Stark G., Wilhelm M. 1993. Inactivation by ionizing radiation of ion channels formed by polyene antibiotics amphotericin B and nystatin in lipid membranes: An inverse dose-rate behavior. - Biophys. J., v. 64, p. 92 - 97.

Bartner E., Zinnes H., Moe R.A., Kulesza J.S. 1957/1958. Studies on a new solubilized preparation of amphotericin B. - Antibiotics. Ann., p. 53-58.

Barton D.H., Gunatilaka A.A., Jarman T.R., Widdowson D.A., Bard M., Woods R.A. 1975. Biosynthesis of terpenes and steroids. X. The sterols of some yeast mutants doubly defective in ergosterol biosynthesis. – J. Chem. Soc. [Perkin 1], № 1, p. 88-92.

Barwicz J., Gareau R., Audet A., Morisset A., Villiard J., Gruda I. 1991. Inhibition of the interaction between lipoproteins and amphotericin B by some delivery systems. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 181, p. 722-728.

Barwicz J., Christian S., Gruda I. 1992. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 36, p. 2310-2315.

Barwicz J., Tancrede P. 1997. The effect of aggregation state of amphotericin-B on its interactions with cholesterol- or ergosterol-containing phosphatidylcholine monolayers. - Chem Phys Lipids, v. 85, p. 145-155.

Barwicz J., Dumont I., Ouellet C., Gruda I. 1998. Amphotericin B toxicity as related to the formation of oxidatively modified low-density lipoproteins. – Biospectroscopy, v. 4, p. 135-144.

Bastide M., Jouvert S., Bastide J.M. 1982. A comparison of the effects of several antifungal imidazole derivatives and polyenes on *Candida albicans*: an ultrastructural study by scanning electron microscopy. – Can. J. Microbiol, v. 28, p. 1119-1126.

Bates D.W., Su L., Yu D.T., Chertow G.M., Seger D.L., Gomes D.R., Dasbach E.J., Platt R. 2001. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. - Clin. Infect. Dis., v. 32, p. 686-693.

- Batra S.K., Joshi N.C., Raisinghani M. 1977. Caracterization of *Streptovorticillium echimense* strain 388 and its antibiotic. - Indian J. Exp. Biol., v. 15, p. 534.
- Baumann G., Mueller P. 1974. A molecular model of membrane excitability. - J. Supramolec. Struct., v. 2, p. 538-557.
- Bays H.E., Dujovne C.A. 1998. Drug interactions of lipid-altering drugs. - Drug Saf., v. 19, p. 355-371.
- Beezer A.E., Chowdry B.Z. 1980. Flow microcalorimetric study of the effects of pH, metal ions and sterols on the interaction of polyene antibiotics with *Saccharomyces cerevisiae*NCYC239. - Microbios, v. 28, p. 107-121.
- Beezer A.E., Sharma P.B. 1981 a. On the uptake of nystatin by *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Basic considerations. - Microbios, v. 30, p. 139-151.
- Beezer A.E., Sharma P.B. 1981 b. On the uptake of nystatin by *Saccharomyces cerevisiae* 3. Electrochemistry of the yeast cell surface. - Microbios, v. 31, p. 7-16.
- Beezer A.E., Sharma P.B. 1982. On the uptake of nystatin by *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Electron microscopic investigation of some morphological and physical differences between fresh and frozen inocula and between treated and untreated cells. - Microbios, v. 33, p. 161-168.
- Beezer A.E., Chowdry B.Z., Cosgrove R.F., Sharma P.B. 1982. On the uptake of nystatin by *saccharomyces cerevisiae*. 5 The release of amino acids. - Microbios, v. 34, p. 71-88.
- Beggs A.W., Andrews F.A., Sarusi G.A. 1978. Effects of temperature, aeration and antioxidants on amphotericin B decay in a synthetic liquid medium. - In Program and Abstracts of the 18th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Abstr., p. 399.
- Beggs W.H., Andrews F.A., Sarusi G.A. 1979. Enhancement of amphotericin B activity with vitamin C and sulfhydryl-containing compounds. - FEMS Microbiol. Lett., v. 6, p. 409-411.
- Behnke O., Tranum-Jensen J., Van Deurs B. 1984. Filipin as a cholesterol probe. II. Filipin-cholesterol interaction in red blood cell membranes. - Eur. J. Cell. Biol., v. 35, p. 189-199.
- Belay T., Hospenthal D.R., Rogers A.L., Patterson M.J. 1993. Treatment of systemic candidasis in a neutropenic murine model using immunoglobulin G bearing liposomal amphotericin B. - Mycopathologia, v. 123, p. 9-17.
- Beloussova I.I., Virina A.M., Petrov. L.N., Tereshin I.M. 1982. Circular dichroism study of amphotericin B interaction with the sterols of *Candida albicans* strains sensitive and resistant to polyene antibiotics. - Antibiotiki (Russia), v. 27, p. 95-98.
- Bennet J.E., Hill G.J., Butler W.T., Emmons C.W. 1963. Correlation of particle size of intravenous amphotericin B with toxic and chemotherapeutic effects. - Antimicrob. Agents Chemother., p. 745-752.
- Berdan R.C., Shivers R.R. 1985. Filipin-cholesterol complexes in plasma membranes and cell junctions of *Tenebrio molitor* epidermis. - Tissue Cell, v. 17, N 2, p. 177-187.
- Berdicevsky I., Grossowicz N. 1977. Effect of a polyene antibiotic on growth and phosphate uptake by *Candida albicans*. - J. Gen. Microbiol., v. 102, p. 299-304.
- Berger M., Hagg S., Ruderman N. 1975. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Interaction of insulin and exercise on glucose uptake. - Biochem. J., v. 146, p. 231-238.
- Bergy D.S., Eble T.E. 1968. The filipin complex. - Biochemistry, v. 7, p. 653-658.

- Beringue V., Adjou K., Lamoury F., Maignien T., Deslys J., Race R., Dormont D. 2000. Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. - *J. Virol.*, v. 74, p. 5432-5440.
- Berman J.D., Hanson W.L., Chapman W.L., Alving C.R., Lopez-Berestein G. 1986. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 30, p. 847-851.
- Berman J.D., Ksionski G., Chapman W.L., Waits V.B., Hanson W.L. 1992. Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphotericin B) in experimental visceral leishmaniasis. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 36, p. 1978-1980.
- Berry M.P., Whiting M.C. 1964. The relative configuration of two asymmetric centers in lagosin. - *J. Chem. Soc.*, p. 862.
- Bezrukov S.M., Irchin A.I., Sibilev A.I. 1987. An upper estimate for 1/f noise intensity in ionic conductors from experiments with a molecular microcontact. - *Phys. Lett.*, v. 123, p. 477-480.
- Bharma R., Sa'ad A., Bolcsak L., Janoff A., Swenson C. 1997. Behavior of amphotericin B lipid complex in plasma in vitro and in the circulation of rats. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 34, № 5, p. 886-892.
- Bhate D.S., Ambeker G.R., Bhatnagar K.K., Hulyalkar R.K. 1961. Hamycin, a new antifungal antibiotic. II. Isolation and chemical properties. - *Hindustan Antibiotics Bull.*, v. 3, p. 139-143.
- Bhate D.S., Ambeker G.R., Bhatnagar K.K. 1962. Dermostatin, a new antifungal antibiotic. II. Isolation and physico-chemical properties. - *Hindustan Antibiotics Bull.*, v. 4, p. 159.
- Bhate D.S., Acharya S.P. 1963. Studies on hamycin. Isolation of a new haptene, hamycin X. - *Hindustan Antibiot. Bull.*, v. 6, p. 1.
- Bhate D.S., Acharya S.P. 1964. Aureofungin, a new antifungal antibiotic. II. Isolation and chemical properties. - *Hindustan Antibiotic. Bull.*, v. 6, p. 170-172.
- Bifano E.M., Novak T.S., Freedman J.C. 1984. Relationship between the shape and the membrane potential of human red blood cells. - *J. Membrane Biol.*, v. 82, p. 1-13.
- Binet A., Bolard J. 1988. Recovery of hepatocytes from attack by the pore former amphotericin B. - *Biochem. J.*, v. 253, p. 435-444.
- Birch A.J., Holzapfel C.W., Rickards R.W., Djerassi C., Seidel P.C., Suzuki M., Westley J.W., Dutcher J.D. 1964. Nystatin. Part VI. Chemistry and partial structure of the antibiotic. - *Tetrahedron Letters*, v. 23, p. 1491-1497.
- Bittman R., Fischkoff A. 1972. Fluorescence studies of the binding of the polyene antibiotics filipin 3, amphotericin B, nystatin, and lagosin to cholesterol. - *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 69, p. 3795-3799.
- Bittman R., Chen W.C., Anderson O.R. 1974 a. Stopped-flow kinetic and equilibrium studies of filipin 3 binding to sterols. - *Biochemistry*, v. 13, p. 1364-1373.
- Bittman R., Chen W.C., Anderson O.R. 1974 b. Interaction of filipin 3 and amphotericin B with lecithin-sterol vesicles and cellular membranes. Spectral and electron microscope studies. - *Biochemistry*, v. 13, p. 1364-1373.
- Bittman R., Majuk Z., Honig D.S., Compans R.W., Lenard J. 1976. Permeability properties of the membrane of vesicular stomatitis virions. - *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 433, p. 63-74.
- Bittman R. 1978. Sterol-polyene antibiotic complexation: probe of membrane structure. - *Lipids*, v. 13, p. 686-691.

- Bittman R., Bjau L., Clejan S., Rottem S. 1981. Determination of cholesterol asymmetry by rapid kinetics of filipin-cholesterol association: effect of modification in lipids and proteins. - *Biochemistry*, v. 20, p. 2425-2432.
- Bittman R., Clejan S., Rottem S. 1983. Transbilayer distribution of sterols in mycoplasma membranes: a review. - *Yale J. Biol. Med.*, v. 56, p. 397-403
- Bjorksten B., Ray C., Quie P.G. 1976. Inhibition of human neutrophil chemotaxis and chemiluminescence by amphotericin B. - *Infect. Immun.*, v. 14, p. 315-317.
- Blanc I., Bueno Da Costa M., Bolard J., Saint-Pierre Charalet M. 2000. Oligonucleotide delivery by a cationic derivative of the polyene antibiotic amphotericin B. I: Interaction oligonucleotide vector as studied by optic spectroscopy and electron microscopy. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1464 (2), p. 299-308.
- Blanke T.J., Little J.R., Shirley S.F., Lynch R.G. 1977. Augmentation of murine immune responses by amphotericin B. - *Cell Immunol.*, v. 33, p. 180-190.
- Blau L., Bittman R. 1977. Interaction of filipin with cholesterol in vesicles of saturated phospholipids. - *Biochemistry*, v. 16, № 19, p. 4139-4144.
- Blau L., Bittman R. 1978. Cholesterol distribution between the two halves of the lipid bilayer of human erythrocyte ghost membranes. - *J. Biol. Chem.*, v. 253, p. 8366-8368.
- Blau L., Bittman R., Lagocki P., Byrne R., Scanu A.M. 1982. Organization of unesterified cholesterol in high density lipoproteins probed by filipin. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 712, p. 437-443.
- Blum S.F., Shohet S.B., Nathan D.G., Gardner F.H. 1969. The effect of amphotericin B on erythrocyte membrane cation permeability. Its relation to in vivo erythrocyte survival. - *J. Lab. Clin.*, v. 73, p. 980-987.
- Boggs J.M., Chang N.H., Goundalkar A. 1991. Liposomal amphotericin B inhibits in vitro T-lymphocyte response to antigen. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 879-885.
- Bognar R. 1960. Chemie und Eigenschaften Flavofungins. - *Angew. Chem.*, Bd. 72, p. 139.
- Bognar R. 1966. Chemistry of the flavofungin. - In: *Antibiotics, Advances in research, production and clinical use*. London-Prague, p. 438.
- Bognar R., Brown B.O., Lockley W.J.S., Makleit S., Toube T.P., Weedon B.C.L., Zsupan K. 1970. The structure of flavofungin. - *Tetrahedron Lett.*, № 7, p. 471.
- Boheim G. 1974. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. - *J. Membrane Biol.*, v. 18, p. 277-303.
- Boheim G., Kolb H.A. 1978. Analysis of the multi-pore system of alamethicin in a lipid membrane. I. Voltage-jump current-relaxation measurements. - *J. Membrane Biol.*, v. 38, p. 99-150.
- Bohlman F., Dehmlow E.V., Neubahn H.Y., Brandt R., Reinicke B. 1970 a. New heptaen-macrolide. I. Charakterisierung und abbau. - *Tetrahedron*, v. 25, p. 2191-2198.
- Bohlman F., Dehmlow E.V., Neubahn H.Y., Brandt R., Bethke H. 1970 b. Neue heptaen-macrolide. II. Grundskelett, stellung der funktionellen gruppen und struktur der aglycque. - *Tetrahedron*, v. 26, p. 2199-2207.
- Bolard J., Seigneuret M., Boudet G. 1980. Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin B. Lipid state and cholesterol content dependence. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 599, № 1, p. 280-293.
- Bolard J., Vertut-Croquin A., Cybulski B., Garry-bobo C.M. 1981. Transfer of the polyene antibiotic amphotericin B between single-walled vesicles of dipalmitoyl-

phosphatidylcholine and egg-yolk phosphatidylcholine. - Biochim. Biophys. Acta, v. 647, p. 241-248.

Bolard J., Cheron M. 1982. Association of the polyene antibiotic amphotericin B with phospholipid vesicles. Perturbation by temperature changes. - Can. J. Biochem., v. 60, p. 782-789.

Bolard J. 1984. Spectroscopic methods (circular dichroism, Raman resonance, nuclear magnetic resonance and electron paramagnetic resonance) in the study of the interaction of polyene macrolide antibiotics with membranes. - Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin, v. 222, p. 89-93.

Bolard J., Cheron M., Mazerski Y. 1984. Effect of surface curvature on the interaction of single lamellar phospholipid vesicles with aromatic and nonaromatic heptaene antibiotics (vacidin A and amphotericin B). - Biochem. Pharmacology, v. 33, № 22, p. 3675-3680.

Bolard J. 1986 a. Interaction of polyene antibiotics with membrane lipids: physicochemical studies of the molecular bases of selectivity. - Drugs Exp. Clin. Res., v. 12, p. 613-618.

Bolard J. 1986 b. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?. - Biochim.Biophys.Acta, v. 864, p. 257-304.

Bolard J. 1989. Future prospects with polyene antibiotics. - In Bioactive Metabolites from Microorganisms, ed. M.E.Bushel and U. Gafe Elsevier, p. 151.

Bolard J., Legrand P., Heitz F., Cybulskia B. 1991. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membrane is determined by its self-association in the medium. - Biochemistry, v. 30, p. 5707-5715.

Bolard J. 1991 a. Mechanism of action of an anti-Candida drug: amphotericin B and its derivatives. In R. Prasad (ed.), *Candida albicans*. - Cellular and molecular biology. Springer-Verlag KB, Berlin, p. 213-238.

Bolard J. 1991 b. Modulation of the immune defenses against fungi by amphotericin B and its derivatives. - In Yamaguchi H., Kobayashi G.S. and Takakashi H. (ed.). Recent progress in antifungal chemotherapy. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 293-305.

Bolard J., Joly V., Yeni P. 1993. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. Its modulation by delivery systems. - J. Liposome Res., v. 3, p. 409-427.

Bolard J., Andremont A. 1995. Lipid formulations of amphotericin B: from clinical trials to in vitro studies. In Puisieux F., Couvreur P., Delattre J. and Devissaguet J.P. (ed.). Liposomes: new systems and new trends in their applications. - Editions de Sante, Paris, p. 397-428.

Bolard J., Vertut-Doi A. 1995. Internalization of amphotericin B and other polyene antifungals in mammalian cells: a possible origin of their toxicity. – In book: “Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy”. Marcel Dekker, Inc., p. 307-326.

Bolard J., Milhaud J. 1996. Interaction of the ANII-candida amphotericin B (and other polyene antibiotics) with lipids. – In book: “Lipids of Pathogenic Fungi”. Edited by Rajendra Prasad and Mahmoud A. Ghannoum CRC Press, Boca Raton New York, London, Tokyo, p. 253-274.

Bonilla-Marin M., Moreno-Bello M., Ortega-Blake I. 1991. A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channel. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1061, p. 65-77.

Bonner D.P., Mechlinski W., Schaffner C.P. 1975. Stability studies with amphotericin B. - J. Am. Oil Chem. Soc., v. 52, p. 437-441.

tericin B and amphotericin B methyl ester. - J. Antibiotics, v. 28, p. 132-135.

Borden E.C., McBain J.A., Leonhardt P.H. 1979. Effects of amphotericin B and its methyl ester on the antiviral activity of polyinosinic:polycytidylic acid. - Antimicrob. Agents Chemother, v. 16, p. 203-209.

Borisova M.P., Ermishkin L.N., Silberstein A.Y., Kasumov Kh.M., Potseluev V.M. 1978. Dependence of the properties of ionic channels formed by the polyene antibiotics on the structure of molecules forming channels. - Sixth International Biophysics Congress, Japan, Abstracts, IV-10-C(1), p. 143.

Borisova M.P., Kasumov Kh.M. 1978. Sterol structure-dependent properties of amphotericin B channels. - Studia Biophysica, Berlin, Band 71, Heft 3, p. 197-202.

Borisova M.P., Ermishkin L.N., Silberstein A.Y. 1979. Mechanism of blockage of amphotericin B channels in a lipid bilayer. - Biochim. Biophys. Acta, v. 553, p. 450-459.

Borisova M.P., Brtyan R.A., Ermishkin L.N. 1986. Mechanism of anion-cation selectivity of amphotericin B channels. - J. Membrane Biol., v. 90, p. 13-20.

Borowski E., Schaffner C.P., Lechavalier H., Schwartz B.B. 1961. Perimycin, a novel type of heptaene antifungal antibiotic. - Antimicrob. Agents Annual., v. 1960, p. 532-538.

Borowski E., Malyshkina M., Kotienko T., Soloviev S. 1964/65. Mycoheptin, a new member of non-aromatic group of heptaene macrolide antifungal antibiotics. - Chemotherapy, v. 9, p. 359-369.

Borowski E., Malyshkina M., Soloviev S., Ziminski T. 1965/1966. Isolation and characterization of levorin A and B, the heptaenic macrolide antifungal antibiotics of aromatic subgroup. - Chemotherapy, v. 10, p. 178-194.

Borowski E., Schaffner C., Neelakantan S., Falkowski L., Mechlinski W., Ziminski T. 1966. - Roczniki chem., v. 40, p. 633.

Borowski E., Cybulska B. 1967. Potassium death-less on *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with N- succinyl perimycin and the reversal of fungicidal action of the antibiotic by potassium ions. - Nature (London), v. 213, p. 1034-1035.

Borowski E., Zielinski J., Ziminski T., Falkowski L., Kolodziejczyk P., Golik J., Jereczek E. 1970. Chemical studies with amphotericin B. III. The complete structure of the antibiotic. - Tetrahedron Letters, v. 45, p. 3909-3914.

Borowski E., Zielinski J., Falkowski L., Ziminski T., Golik J., Kolodziejczyk P., Jereczek E., Golulewicz M., Shenin Yu., Kotienko T. 1971 a. The complete structure of the polyene macrolide antibiotic nystatin A. - Tetrahedron Letters, v. 8, p. 685-690.

Borowski E., Falkowski L., Golik J., Zielinski J., Ziminski T., Mechlinski W., Jereczek E., Kolodziejczyk P., Aldercreutz H., Schaffner C.P., Neelskantan S. 1971 b. The structure of candidin, a polyene macrolide antifungal antibiotic. - Tetrahedron Letters, v. 22, p. 1987-1992.

Borowski E., Golik J., Zielinski J., Kolodziejczyk P., Pawlak J., Falkowski L., Galazka M., Shenin Yu. 1972. The structure of mycoheptin – the heptaene macrolide antifungal antibiotic. - 8th International Symposium on the Chemistry of natural products, N.D., p. 439.

Borowski E., Malewicz B., Cybulska B., Falkowski L. 1974. The interaction of polyene antibiotics with plasma membrane of *chlorella vulgaris*. - In Systemic Fungicides (Eds H. Lyr and H. Polter). Academic Verlag. p. 93-100.

Borowski E., Golik J., Zielinski J., Falkowski L., Kolodziejczyk P., Pawlak J., Shenin Yu. 1978. The structure of mycoheptin, a polyene macrolide antifungal antibiotic. - J. Antibiotics, v. 31, № 2, p. 117-123.

Borowski E., Grzybowska J., Gumeniak J., Sowinski P., Cybulski B., Zieniawa T., Mignini F., Santacroce F., Bolard J. 1995. Second generation amphotericin B derivatives of low toxicity: design and properties. - 95th General Meeting of American Society for Microbiology, Washington D.C., USA: Abstr., p. 105.

Borowski E. 2000. Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. - Farmaco., v. 55, p. 206-208.

Bosshardt R., Bickel H. 1968. Data on levorin A and candicidin. - Experientia, v. 24, p. 422-424.

Boudet G., Bolard J. 1979. Interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with phospholipid bilayer membranes: a circular dichroism study. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 88, № 3, p. 993-1002.

Boxer L.A., Ingraham L.M., Allen J., Oseas R.S., Baehner R.C. 1981. Amphotericin-B promotes leukocyte aggregation of nylon-wool-fiber-treated polymorphonuclear leukocytes. - Blood., v. 58, p. 518-523.

Bradley S.G. 1958. Interactions between phosphate and nystatin in *Candida stellatooides*. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., v. 98, p. 786-789.

Bradley S.G., Jones L.A. 1960. Mechanisms of action of antibiotics. - Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 89, № 1, p. 122-133.

Bradley S.G., Farber P.J., Jones L.A. 1961. Action of polyene antibiotics on *Candida*. - Antimicrob. Agents Annual, 1960, Washington, D. S., Soc. Industr. Microbiol., p. 558-569.

Brajburg J., Medoff G., Kobayashi G.S., Elberg S., Finegold C. 1980. Permeabilizing and hemolytic action of large and small polyene antibiotics on human erythrocytes. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 18, p. 586-592.

Brajburg J., Medoff G., Kobayashi G.S. 1981 a. In: Antitumor Compounds of Natural Origin. - Chemistry and Biochemistry (A. Aszalos, ed.), CRC Press, Boca Raton., v. 2, p. 130-142.

Brajburg J., Elberg S., Medoff G., Kobayashi G. 1981 b. Increase in colony-forming units of *Candida albicans* after treatment with polyene antibiotics. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 19, p. 199-200.

Brajburg J., Kobayashi D., Medoff G., Kobayashi G.S. 1982. Antifungal action of amphotericin B in combination with other polyene or imidazole antibiotics. - J. Infect. Dis., v. 146, p. 138-146.

Brajburg J., Elberg S., Medoff J., Kobayashi G.S., Schlessinger Jr.D., Medoff G. 1984 a. Stimulatory, permeabilizing, and toxic effects of amphotericin B on L cells. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 26, p. 892-897.

Brajburg J., Elberg S., Bolard J., Kobayashi G.S., Levy R.A., Ostlund R.E., Schlessinger Jr.D., Medoff G. 1984 b. Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. - J. Infect. Dis., v. 149, № 6, p. 986-997.

Brajburg J., Elberg S., Schwartz D.R., Vertut-Croquin A., Schlessinger Jr.D., Kobayashi G.S., Medoff G. 1985. Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 27, p. 172-176.

Brajburg J., Elberg S., Kobayashi G.S., Medoff G. 1986. Toxicity and induction of resistance to *Listeria monocytogenes* infection by amphotericin B in inbred strains of mice. - Infect. Immun., v. 54, p. 303-307.

Brajburg J., Elberg S., Kobayashi G.S., Medoff G. 1989 a. Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B. - J. Antimicrob. Chemother., v. 24, p. 333-337

- Brajtburg J., Gruda I., Daigle I., Medoff G. 1989 b. Concentration dependent dual effect of the monolauryl ester of sucrose on the antifungal activity and absorption spectra of amphotericin B (Fungizone). - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 985, p. 307-312.
- Brajtburg J., Powderly W.G., Kobayashi G.S., Medoff G. 1990 a. Amphotericin B current understanding of mechanisms of action. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 34, p. 183-188.
- Brajtburg J., Powderly W.G., Kobayashi G.S., Medoff G. 1990 b. Amphotericin B: delivery systems. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 34, p. 381-384.
- Brajtburg J., Elberg S., Kobayashi G.S., Medoff G. 1990 c. Inhibition of amphotericin B (Fungizone) toxicity to cells by egg lecithin-glycocholic acid mixed micelles. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 34, p. 2415-2416.
- Brajtburg J., Elberg S., Kobayashi G.S., Bolard J. 1992. Characterization and cellular effects of amphotericin B (AmB) formulated with egg lecithin-bile salt mixed micelles, abstr. A-42. Abstr. 92nd Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., p. 8.
- Brajtburg J., Elberg S., Seyfried W., Bolard J. 1994 a. Influence of drug to egg lecithin ratio on the stability and therapeutic activity in mice of amphotericin B formulated with egg lecithin and bile salt. - In Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology. Abstr. 64A2. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 28.
- Brajtburg J., Elberg S., Travis S.J., Kobayashi G.S. 1994 b. Treatment of murine candidiasis and cryptococcosis with amphotericin B incorporated into egg lecithin-bile salt mixed micelles. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, p. 294-299.
- Brajtburg J., Elberg S., Kobayashi G., Bolard J. 1994 c. Amphotericin B incorporated into egg lecithin-bile salt mixed micelles: molecular and cellular aspects relevant to therapeutic efficacy in experimental mycoses. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, p. 300-306.
- Brajtburg J., Bolard J. 1996. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. - *Clinical Microbiology Review*, v. 9, p. 512-531.
- Brandriss H.W., Wolff S.W., Moores R., Stohlmann F. 1964. Anemia induced by amphotericin B. - *J. Am. Med. Assoc.*, v. 189, p. 663-666.
- Brautaset T., Sekurova O.N., Sletta H., Ellingsen T.E., Strom A.R., Valla S., Zotchev S.B. 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. - *Chem. Biol.*, v.7, p. 395-403.
- Brautaset T., Bruheim P., Sletta H., Hagen L., Ellingsen TE., Strom A.R., Valla S., Zotchev S.B. 2002. Hexaene derivatives of nystatin produced as a result of an induced rearrangement within the nysC polyketide synthase gene in *S. noursei* ATCC 11455. - *Chem. Biol.*, v. 9, p. 367-373.
- Brit. Pat. № 712547 (C.A. 1955, v. 49, 2682).
- Brit. Pat. № 719878, 1954 (C.A. 1955, v. 49, № 10, 7199).
- British Patent № 796982. 1958. An antifungal agent designated ayfactin. – Bristol Laboratories Inc.
- Brown R., Hazen E.L. 1949. Activation of antifungal extracts of actinomycetes by ultrafiltration through gradocol membranes. - *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 71, p. 454.
- Brown R., Hazen E.L. 1957. Present knowledge of nystatin an antifungal antibiotic. - *Trans. N.Y. Sci.*, v. 19, p. 447-456.
- Brown A.D. 1974. Microbial water relations: features of the intracellular composition of sugar-tolerant yeasts. – *J. Bacteriol.*, v. 118, p. 769-777.

- Brutyan R., McPhee P. 1996. On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes. - J. Gen. Physiol., v. 107, p. 69-78.
- Bruzzone T., Binda I., Ghielmetti G., Notarianni A.F. 1974. Partricin. an antifungal and antiprotozoal polyene antibiotic. – Farmaco. Ed. Sci., v. 29, p. 331.
- Bulgakova V.G., Petrykina Z.M., Poltorak V.A., Polin A.N. 1981. Effect of polyene antibiotics on bacterial protoplasts. – Microbiologiya, v. 50, p. 498-503.
- Bunch W., Edwards C. The permeation of non-electrolytes through the single barnacle muscle cell. - J. Physiol.(London), 1969, v.202, p.683 - 697.
- Bunow M.R., Levin I.W. 1977. Vibrational Raman spectra of lipid systems containing amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 464, p. 202-216.
- Burke R.C., Swartz J.H., Chapman S.S., Huang W.Y. 1954. Mycoticin, a new anti-fungal antibiotic. - J. Invest. Dermatol., v. 23, p. 163-168.
- Butler W.T., Alling D.W., Cotlove E. 1965. Potassium loss from human erythrocytes exposed to amphotericin B. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., v. 118, p. 297-300.
- Butler W.T. 1966. Pharmacology, toxicity, and therapeutic usefulness of amphotericin B.- JAMA, v. 195, p. 371-375.
- Caffrey P., Lynch S., Flood E., Finnane S., Oliynyk M. 2001. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. - Chem. Biol., v. 8, p. 713-723.
- Caillot D., Chavanet P., Casasnovas O., Solary E., Zanetta G., Buisson M., Wagner O., Cuisenier B., Bonnin A., Camerlynck P., Portier H., Guy H. 1992. Clinical evaluation of a new lipid-based delivery system for intravenous administration of amphotericin B. - Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v. 11, p. 722-725.
- Caillot D., Casasnovas O., Solary E., Chavanet P., Bonnotte B., Reny G., Entezam F., Lopez J., Bonnin A., Guy H. 1993. Efficacy and tolerance of an amphotericin B lipid (Intralipid) emulsion in the treatment of candidaemia in neutropenic patients. - J. Antimicrob. Chemother., v. 31, p. 161-169.
- Calot L., Cercos A.P. 1963. *Streptomyces ornatus*, nov. sp. Et *Streptomyces erumpens*, non. sp. Producteurs d'ornamicine et antibiotique 17. 732. – Ann. Inst. Pasteur, v. 105, p. 159.
- Caltrider P., Gottlieb D. 1961. Studies on the mode of action of filipin on *Saccharomyces cerevisiae*. - Trans. III. State Acad. Sci., v. 54, p. 189-195.
- Campelo A.B., Gil J.A.. 2002. The candidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570 - Microbiology, v. 148, p. 51-59.
- Campos Galba, Maranhao Rios Eugenia, Machado Fernandes de Albuquerque Marisa, Cavalcany da Silva Ely, Lins de Oliveira Lizete. 1974. Griseocarnin, um antibiótico antifúngico isolado do *Streptoverticillium griseocarneum* (IA-7527). – Rev. Inst. Antibiot., v. 14, № 1-2.
- Cao S., Zhen Y. 1989. Potentiation of antimetabolite antitumor activity in vitro by dipyridamole and amphotericin B. - Cancer Chemotherapy and Pharmacology, v. 24, № 3, p. 181-186.
- Capuozzo E., Bolard J. 1985. Interaction of the polyene antibiotic etruscomycin with large unilamellar lipid vesicles: binding and proton permeability inducement. - Biochim. Biophys. Acta, v. 820, p. 63-73.
- Capuozzo E., Jullien S., Salerno C., Crifo C. 1990. Inhibition of erythrocyte ghost ATPase by polyene antibiotics. - Biochem. Internat., v.20, p. 1135-1139.
- Carnevale N., Galgiani J., Stevens D., Herrick M., Langston W. 1980. Amphotericin B-induced myelopathy. - Archives Intern. Med., v. 140, p. 1189-1192.

Carrasquer G., Wu X., Kissel D., Rehm W.S., Schwartz M., Dinno M.A. 1989. Microelectrode studies of amphotericin B on Na^+ and K^+ conductance in bullfrog cornea. - Biochim. Biophys. Acta, v. 982, p. 73-78.

Casaccia P., Ladogana A., Xi Y.G., Ingrosso L., Pocchiari M., Silvestrini M.C., Cittadini A. 1991. Measurement of the concentration of amphotericin B in brain tissue of scrapie-infected hamsters with a simple and sensitive method. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 35, p. 1486-1488.

Cass A., Finkelstein A., Krespi V. 1970. The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. - J. Gen. Physiol., v. 56, p. 100-124.

Cass A., Dalmark M. 1973. Equilibrium dialysis of ions in nystatin-treated red cells. - Nature. New Biol. (London), v. 244, p. 47-49.

Cassinelli G., Grein A., Orezzi P., Pennell P., Aurora Sanfilippo. 1967. New antibiotics produced by *Streptoverticillium orinoci*, n. sp. - Arch. Microbiol., Bd. 55, p. 358.

Cassone A., Kerridge D., Gale E.F. 1979. Ultrastructural changes in the cell wall of *Candida albicans* following cessation of growth and their possible relationship to the development of polyene resistance. - J. Gen. Microbiol., v. 110, p. 339-349.

Castanbo, M., Prieto M. 1992. Fluorescence study of the macrolide pentaene antibiotic filipin in aqueous solution and in a model system of membranes. - Eur. J. Biochem., v. 207, p. 125-134.

Castanbo M., Coutinho A., Prieto M. 1992. Absorption and fluorescence spectra of polyene antibiotics in the presence of cholesterol. - J. Biol. Chem., v. 267, p. 204-209.

Castanbo M., Brown W., Prieto M. 1994. Filipin and its interaction with cholesterol in aqueous media studied using static and dynamic light scattering. - Biopolymers, v. 34, p. 447-456.

Castanho M., Prieto M. 1995. Filipin fluorescence quenching by spin-labeled probes: studies in aqueous solution and in a membrane model system. - Biophysical Journal, v. 69, p. 155-168.

Castanho M., Prieto M., Jameson D.M. 1999. The pentaene macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: a fluorescence pressure dependence study. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1419, p. 1-14.

Ceder O. 1964. Polyene macrolide antibiotics: the structures of fungichromine, pinmaricin and filipin. - Svensk. Kem. Tidskr., v. 76, p. 1-15.

Ceder O., Ryhange R. 1964. The structure of filipin. - Acta Chem. Scand., v. 18, p. 558-560.

Cefai D., Hadida F., Jung M., Debre P., Vernin J.G., Seman M. 1991. MS-8209, a new Amphotericin B derivative that inhibits HIV-1 replication in vitro and restores T-cell activation via the CD3/Tcr in HIV-infected CD4+ cells. - AIDS, v. 5, p. 1453-1461.

Celman W.D. 1971. Stereochemical problems in macrolide antibiotics. - Pure and Appl. Chem., v. 28, № 4, p. 413-453.

Celmer C.D., Solomons I.A. 1955. - J. Am. Chem. Soc., v. 77, p. 2861.

Celmer W.D., Cullen W.P., Moppet Ch.E., Routien J.B., Shibakawa R., Tone J. 1977. Mixture of antibiotics produced by a species of actinoplanes. - US Pat. № 604260.

Chabot G.G., Pazdun R., Valeriote F.A., Baker L.H. 1989. Pharmacokinetics and toxicity of continuous infusion of amphotericin B in cancer patients. - J. Pharm. Sci., v. 78, p. 307-310.

Chakrabarti S., Chandra A.L. 1976. A-7, a new tetraene antifungal antibiotic. - Indian J. Exp. Biol., v. 14, p. 722.

- Chapados C., Barwicz J., Gruda I. 1994. Separation of overlapping spectra from evolving systems using factor analysis. II. Amphotericin B in aqueous propanol and in aqueous lauroyl sucrose. - *Biophys. Chem.*, v. 51, p. 71-80.
- Chapman H.A.Jr., Hibbs G.B. 1978. Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics: Support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 75, № 9, p. 4349-4353.
- Charbonneau C., Fournier I., Dufresne S., Barwicz J., Tancrede P. 2001. The interactions of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy. - *Biophys. Chem.*, v. 91, p. 125-133.
- Chas Pfiser and Co., Inc. 1960. Antibiotic designated compound 616 from *Streptomyces par visporogenes*. - *Brit. Pat.* № 832391.
- Chavanet P., Charlier N., Brenet A., Goux A., Muggeo E., Caillot D., Casanova O., Kistermann J.P., Waldner A., Portier H. 1992. Emulsion of amphotericin B in intralipid 20 %: in vitro and vivo. - *Pathol. Biol.*, v. 40, p. 507-512.
- Chavanet P., Joly V., Rigaud D., Bolard J., Carbon C., Yeni P. 1994. Influence of diet on experimental toxicity of amphotericin B deoxycholate. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, p. 963-968.
- Chen W.C., Sud I.J., Chou D.L., Feingold D.S. 1977. Selective toxicity of the polyene antibiotics and their methyl ester derivatives. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 74, № 26 p. 480-487.
- Chen W.C., Bittman R. 1977. Kinetics of association of amphotericin B with vesicles. - *Biochemistry*, v. 16, p. 4145-4149.
- Chen W.C., Chou D., Feingold D.C. 1978. Dissociation between ion permeability and lethal action of polyene antibiotics on *Candida albicans*. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 13, p. 914-917.
- Cheron M., Bolard J., Brajtburg J. 1984. Inhibition by Cu²⁺ of amphotericin B induced lysis of erythrocytes. - *FEBS Lett.* 2033, v. 178, № 1, p. 127-131.
- Cheron M., Cybulska B., Mazerski J., Grzybowska J., Czerwinski A., Borowski E. 1988. Quantitative structure-activity relationships in amphotericin B derivatives. - *Biochim. Pharmacol.*, v. 37, p. 827-836.
- Cherry R.J., Chapman D., Graham D.E. 1972. - *J. Membrane Biol.*, v. 7, p. 325.
- Christansen K., Bernard E.M., Gold J.W.M., Armstrong D. 1985. Distribution and activity of amphotericin B in humans. - *J. Infect. Dis.*, v. 152, p. 762-765.
- Chong C.N., Rickards R.W. 1970. Macrolide antibiotic studies. XVI. The structure of nystatin. - *Tetrahedron Letters*, № 59, p. 5145-5148.
- Chopra R., Blair S., Strang J., Cervi P., Patterson K.G., Goatstone A. H. 1991. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of fungal infections in neutropenic patients. - *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 28, p. 93 - 104.
- Chuen-Chin Hsu Chen, Feingold D.S. 1973. Polyene antibiotic action on lecithin liposomes and fatty acyl chains. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 51, № 4, p. 972-978.
- Chunn C.J., Starr P.R., Gilbert D.N. 1977. Neutrophil toxicity of amphotericin B. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 12, p. 226-230.
- Cirillo V.P., Harsch M., Lampen J.O. 1964. Action of the polyene antibiotics filipin, nystatin and N-acetylceramidin on the yeast cell membrane. - *J. Gen. Microbiol.*, v. 35, № 2, p. 249-259.
- Clark J.M., Koehler J.K. 1990. Observations of hamster sperm-egg fusion in freeze-fracture replicas including the use of filipin as a sterol marker. - *Mol. Reprod. Dev.*, v.

27, N 4, p. 351-365.

Clark J., Whitney R., Olsen S., George R., Swerdel M., Kunselman L., Bonner D. 1991. Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 35, p. 615-621.

Clayette P., Martin M., Beringue V., Dereuddre-Bosquet N., Adjou K.T., Seman M., Dormont D. 2000. Effects of MS-8209, an amphotericin B derivative, on tumor necrosis factor alpha synthesis and human immunodeficiency virus replication in macrophages. - Antimicrob Agents Chemother., v. 44, p. 405-407.

Clejean S., Bittman R. 1985. Rates of amphotericin B and filipin association with sterols. A study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. - J. Biol. Chem., v. 260, N 5, p. 2884-2889.

Clements J.S., Jr., Peacock J.E., Jr. 1990. Amphotericin revisited: reassessment of toxicity. - Am. J. Med., v. 88, p. 5-22N-5-27N.

Clemons K.V., Stevens D. 1991 a. Comparative efficacy of amphotericin B colloidal dispersion and amphotericin B deoxycholate suspension in treatment of murine coccidioidomycosis. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 35, p. 1829-1833.

Clemons K.V., Stevens D. 1991 b. Comparative efficacies of amphotericin B lipid complex and amphotericin B deoxycholate suspension against murine blastomycosis. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 35, p. 2144 - 2146.

Clemons K.V., Stevens D. 1992. Efficacies of amphotericin B lipid complex (ABLC) and conventional amphotericin B against murine coccidioidomycosis. - J. Antimicrob. Chemother., v. 30, p. 353 - 363.

Clemons K.V., Stevens D. 1993 a. Therapeutic efficacy of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) against murine blastomycosis. - J. Antimicrob. Chemother., v. 32, p. 465 - 472.

Clemons K. V., Stevens D. A. 1993 b. Comparison of a liposomal amphotericin formulation (AmBisome) and deoxycholate amphotericin B (Fungizone) for the treatment of murine paracoccidioidomycosis. - J. Med. Vet. Mycol., v. 31, p. 387-394.

Cohen B.E. 1975. The permeability of liposomes to nonelectrolytes. II. The effect of nystatin and gramicidin A. - J. Membrane Biol., v. 20, p. 235-268.

Cohen B. E. 1986. Concentration and time dependance of amphotericin B-induced permeability changes across ergosterol-containing liposomes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 857, p. 117-122.

Cohen B.E., Benaim G., Ruiz M.C., Michelangeli F. 1990. Increased Ca^{2+} permeability is not responsible for the rapid lethal effects of amphotericin B on *Leishmania* sp. - FEBS Lett., v. 259, p. 286 -288.

Cohen B. E. 1992. A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effects of sterol and phospholipid composition. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1108, p. 49 -58.

Cohen B.E. 1998. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. - International Journal of Pharmaceutics, v. 162, p. 95-106.

Coker R. J., Murphy S. M., Harris J.R.W. 1991. Experience with liposomal amphotericin B (AmBisome) in cryptococcal meningitis in AIDS. - Journal of Antimicrobial Chemotherapy., v. 28, p. 105-109.

Collette N., Van der Auwera P., Lopez A. P., Heymans C., Meunier F. 1989. Tissue concentrations and bioactivity of amphotericin B in cancer patients treated with amphotericin B-deoxycholate. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 33, p. 362-368.

Collette N., Van der Auwera P., Meunier F., Lambert C., Sculier J.P., Coune A..

1991. Tissue distribution and bioactivity of amphotericin B administered in liposomes to cancer patients. - J. Antimicrob. Chemother., v. 27, p. 535-548.

Colline A., Bolard J., Chinsky L., Fang J., Rinehart K.L., Jr. 1985. Raman spectra of nystatin. Influence of impurities. - J. Antibiot., v. 38, p. 181-185.

Cooper N.G., McLaughlin B.J. 1984. The distribution of filipin-sterol complexes in photoreceptor synaptic membranes. - J. Comp. Neurol., v. 230, N 3, p. 437-443.

Cope A.C., Johnson H.E. 1958. Fungichromin. Determination of the structure of the pentaene chromophore. - J. Amer. Chem. Soc., v. 80, p. 1504.

Cope A.C., Bly R.K., Burrows E.P., Ceder O.J., Cidanek E., Gillis B.T., Porter R.F., Johnson H.E. 1962. Fungichromin: complete structure and absolute configuration at C₂₆ and C₂₇. - J. Amer. Chem. Soc., v. 84, p. 2170-2181.

Cope A.C., Burrows E.P., Erie M.E., Moon S., Wirth W. 1965. Rimocidin. I. Carbon skeleton, partial structure and absolute configuration at C₂₇. - J. Amer. Chem. Soc., v. 87, p. 5462.

Cope A.C., Axen V., Burrows E.P. 1966 a. Rimocidin. II. Oxygenation pattern of the aglycone. - J. Amer. Chem. Soc., v. 88, p. 4221-4227.

Cope A.C., Axen V., Burrows E.P., Weinblich J. Amphotericin B. 1966 b. I. Carbon skeleton ring size and partial structure. - J. Amer. Chem. Soc., v. 88, p. 4228.

Conti F., Defelice L.J., Wanke E. 1975. Potassium and sodium ion current: noise in the membrane of the squid giant axon. - J. Physiol. Lond., v. 248, p. 45-82.

Coronelli C., Pasqualucci R.C., Thieman J.E., Tomoni C. 1967. Micotrienin, a new polyene antibiotic isolated from *Streptomyces*. - J. Antibiot., v. 20A, p. 329-333.

CoteroB., Rebollo-Antunez S., Ortega-Blake I. On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel. - Biochim. Biophys. Acta, 1998, v. 1375, p. 43 - 51.

Countinho A., Prieto M. 1995. Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study. - Biophysical Journal, v. 69, p. 2541- 2557.

Countinho A., Prieto M. 2003. Cooperative partition model of nystatin interaction with phospholipid vesicles. - Biophysical Journal, v. 84 (5), p. 3061-3078.

Craveri R., Giolitti G. 1956. Isolation and study of an antifungal antibiotic. - ANN. Microbiol. Enzimol., v. 7, p. 81-92.

Craveri R., Giolitti G. 1957. An antibiotic with fungicidal and insecticidal activity produced by *Streptomyces*. - Nature, v. 179, № 4573, p. 1307.

Craveri R., Shotwell O.L. Dworschack R.G., Pridham T.G., Jackson R.W. 1960. Antibiotics against plant disease. VII. The antifungal heptaene component (F-17-C) produced by *Streptomyces cinnamomeus forma azacoluta*. - Antibiot. and Chemother., v. 10, p. 430-439.

Craveri R., Coronelli C., Beretta G., Tamoni G., Sensi P. 1962 a. Isolamento e studio dell'antibiotico tetraesin. - Ann. Microbiol. and Enzimol., v. 12, p. 155.

Craveri R., Shotwell O.L., Pridham T.G. 1962 b. Azacolutinin extraction from *Streptomyces cinnamomeus var. azacoluta*. - US Pat. № 3. 317-327.

Craveri R., Coronelli C., Sensi P. 1965. Tetrahexine - a new polyenic antibiotic. - Fr. Pat. № 1395876 (C.F., 1965, v. 63, 17092h).

Craveri R., Coronelli C., Sensi P. 1974. Tetrahexin and process for preparing same. - US Pat. № 380833.

Crifo C., Strom R., Santoro A.S, Mondovi B. 1971. Fluorescence of lucensomycin upon binding to erythrocyte ghosts. - FEBS Lett., v. 17, p. 121-126.

Crifo C., Oratore A., Rossi Fanelli F., Cangiano F., Equizi S., Strom R. 1976. Con-

centration of "available" unesterified cholesterol in human plasma as evaluated from inhibition of hemolysis by lucensomycin. - Experientia, v. 32, p. 239-240.

Croft S. L., Davidson R. N., Thornton E. A. 1991. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. - J. Antimicrob. Agents, v. 28 (Suppl. B), p. 111-118.

Croquin A.V., Bolard J., Chabbert M., Bobo C.G. 1983. Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles: a circular dichroism and permeability study. - Biochemistry, v. 22, p. 2939-2944.

Cybulska B., Borowski E. 1974. Effect of N-succinyl perimicin on yeast membrane permeability to monovalent cations. - In Systemic Fungicides (Eds H.Lyr and Polter) Akademie erlag., p. 83-92.

Cybulska B., Jacobs E., Falkowski L., Borowski E. 1976. Structure-selective toxicity relationship in polyene macrolide antifungal antibiotics. - A Intern. Symposium: systemic fungicides. Akademie Verlag., p. 77-81.

Cybulska B., Borowski E., Prigent Y., Gary-Bobo C.M. 1981. Cation permeability induced by two aromatic heptaenes, vacidin A and candicidin D on phospholipid unilamellar vesicles. - J. Antibiot. (Tokyo), v. 34, p. 884-891.

Cybulska B., Ziminski T., Borowski E., Gary-Bobo C.M. 1983. The influence of electric charge of aromatic heptaene macrolide antibiotics on their activity on biological and lipid model membranes. - Mol. Pharmacol., v. 24, p. 270-276.

Cybulska B., Mazerski J., Borowski E., Gary-Bobo C.M. 1984 a. Structure activity relationships in aromatic heptaenes-a group of polyene macrolide antifungal antibiotics. - Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin, v. 222, p. 299-307.

Cybulska B., Mazerski J., Borowski E., Gary-Bobo C.M. 1984 b. Hemolytic activity of aromatic heptaenes. - Biochem. Pharmacol., v. 33, p. 41-46.

Cybulska B. 1986. Effect of the polar head structure of polyene macrolide antifungal antibiotics on the mode of permeabilization of ergosterol-and cholesterol-containing lipid vesicles studied by ^{31}P -NMR. - Mol. Pharmacol., v. 29, p. 293-298.

Cybulska B., Herve M., Borowski E., Gary-Bobo C.M. 1986. Effect of the polar head structure of polyene macrolide antifungal antibiotics on the mode of permeabilization of ergosterol- and cholesterol-containing lipidic vesicles studied by ^{31}P -NMR. - Mol. Pharmacol., v. 29, p. 293-298.

Cybulska B., Borowski E., Gary-Bobo C.M. 1989. Relationship between ionophoric and haemolytic activities of perimycin A and vacidin A, two polyene macrolide antifungal antibiotics. - Biochem. Pharmacol., v. 38, p. 1755-1762.

Cybulska B., Seksek O., Henry-Toulme N., Czerwinski A., Bolard J. 1992. Polyene macrolide antibiotics: indirect stimulation of the Na^+/H^+ exchanger of BALB/c B lymphoid cell line, A20. - Biochem. Pharmacol., v. 44, p. 539-544.

Cybulska B., Bolard J., Seksek O., Czerwinski A., Borowski E. 1995. Identification of the structural elements of amphotericin B and other polyene macrolide antibiotics of the heptaene group influencing the ionic selectivity of the permeability pathways formed in the red cell membrane. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1240, p. 167 - 178.

Cybulska B., Gadomska I., Mazerski J., Borowski E., Cheron M., Bolard J. 2000. N-Methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MF-AME), a novel antifungal agent of low toxicity: monomer/micelle control over selective toxicity. - Acta Biochim. Pol., v. 47, p. 121-131.

Czerwinski A., Konig W.A., Sowinski P., Borowski E. 1987. Amides of polyene

macrolide aureofacin. Synthesis and biological properties. – J Antibiot (Tokyo). v. 40, p.1023 –1027.

Dalmark M. 1976. Chloride in the human erythrocyte: distribution and transport between cellular and extracellular fluids and structural features of the cell membrane. – Progr. Biophys. Mol. Biol., v. 31, p. 145-164.

D'Amico K.L., Manos C., Christensen R.L. 1980. Electronic energy levels in a homologous series of unsubstituted linear polyenes. – J. Am. Chem. Soc., v. 102, p. 1777-1782.

Danilenko I.L., Stepanyuk V.V. 1982. Ultrastructure, composition of neutral lipids and their fatty acids of *Candida tropicalis* strain D-2 mutants resistant to the polyene antibiotic nystatin. - Biochim. Biophys. Acta, v. 691, p. 201-210.

Dannaoui E., Borel E., Persat F., Piens M., Picot S. 2000. Amphotericin B resistance of *Aspergillus terreus* in a murine model of disseminated aspergillosis. - J. Med. Microbiol., v. 49, p. 601-606.

Davidson R. N., Croft S., Scott A., Maini M., Moody A., Bryceson A. 1991. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. - Lancet, v. 337, p. 1061-1062.

Davidson R. N., Dimartino L., Gradoni L., Giacchino R., Russo R., Gaeta G. B., Pempinello R., Scott A., Raimondi F., Cascio A., Prestileo T., Caldeira L., Wilkinson R. J., Bryceson A. D. M. 1994. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in mediterranean visceral leishmaniasis. A multicentre trial. - Q. J. Med., v. 87, p.75-81.

Davidson R.N., Di Marino L., Gradoni L., Giacchino R., Gaeta G.B., Pempinello R., Scotti S., Cascio A., Castagnola E., Maisto A., Gramiccia M., Di Caprio D., Wilkinson J., Bryceson A.D. 1996. Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). - Clin. Infect. Dis., v. 22, p. 938-943.

Davis S. S., Washington C., West P., Illum L., Liversedge G., Sternson L., Kirsh R.. 1987. Lipid emulsions as drug delivery systems. - Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 507, p. 75-88.

Davis S.S., Washington C. 1988. Surfactant-stabilized drug emulsion. - Eur. Patent Applied EP., v. 296, p. 845.

Davission J.W., Tanner F.W., Finlay A.C., Solomons I.A. 1951. Rimocidin, a new antibiotic. - Antbiot. Chemother., v. 1, p. 289-290.

Davission J.W., Tanner F.W., Finlay A.C., Kane J. H. 1960. Rimocidin and methods for its recovery. - US Pat. № 2963401, 1960.

Decio de Andrade L.F., Machado Fernandes de Albuquerque M.. Goncalves de Lima O., Dalia Maia M.H., Medeiros Maciel G. 1961. Dois antibioticos antifungos isolados de micelio de um *Streptomyces sp.* (1645-IAUR). Primeiros informes. – Rev. Inst. Antibiot., Univ. Recife, № 3, p. 13.

Decio de Andrade L.F., Magalide Araujo J., Andrade Alda L.. Cavalcanti Da Silva E., Machado Fernandes de Albuquerque M. 1971. *Streptomyces guanamyceticus nov. sp.*, productor dos antibiotics guanamicina e guamicina. – Rev. Inst. Antibiot., v. 11, p. 27.

De Felice L.J., Michalides J.P. 1972 Electrical noise in synthetic membranes. J. Membrane Biol., v. 9, p. 261-290.

De Goede et al. 1985. Location of I/f noise ionic channel or bulk ionic solution. - J Physiol. (Gr. Brit.), v. 366, p. 8.

De Kruyff B., Demel R., Van Deenen L.L.M. 1972. The effect of cholesterol and epicholesterol incorporation on the permeability and on the phase transition of intact

Acholeplasma laidlawii cell membranes and derived liposomes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 255, № 1, p. 331 - 347.

De Kruyff B., De Greef W.J., Van Eyk R.V.W., Demel R.A., Van Deenen L.L.M. 1973 a. The effect of different fatty acid and sterol composition on the erythritol flux through the cell membrane of *Acholeplasma laidlawii*. Biochim. - Biophys. Acta, v. 298, № 2, p. 479-499.

De Kruyff B., Van Dijck P.W.H., Goldbach R.W., Demel R.A., Van Deenen L.L.M. 1973 b. Influence of fatty acid and sterol composition on the lipid phase transition and activity of membrane-bound enzymes *Acholeplasma laidlawii*. - Biochim. Biophys. Acta, v. 330, № 3, p. 269-282.

De Kruyff B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., Demel R.A., Van Deenen L.L.M. 1974 a. Polyene-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. - Biochim. Biophys. Acta, v. 339, p. 30-43.

De Kruyff B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., Van Dijck P.W.H., Demel R.A., Van Deenen L.L.M. 1974 b. Polyene-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* and lecithin liposomes. II. Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation. - Biochim. Biophys. Acta, v. 339, p. 44-56.

De Kruyff B., Demel R. 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene-antibiotic-cholesterol complexes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 339, p. 57 - 70.

Demaimay R., Adjou K., Lasmezas C., Lazarini F., Cherifi K., Seman M., Deslys J.P., Dormont D. 1994. Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamster scrapie. - J. Gen. Virology, v. 75, p. 2499-2503.

Demaimay R., Adjou K., Beringue V., Demart S., Lasmezas C., Deslys J., Seman M., Dormont D. 1997. Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. - J. Virology, v. 71, p. 9685-9689.

Demaimay R., Race R., Chesebro B. 1999. Effectiveness of polyene antibiotics in treatment of transmissible spongiform encephalopathy in transgenic mice expressing Syrian hamster PrP only in neurons. - J. Virology, v. 73, p. 3511-3513.

De Marie S., Janknegt R., Bakker-Woudenberg I. A. J. 1994. Clinical use of liposomal and lipid-complexed amphotericin B. - J. Antimicrob. Chemother., v. 33, p. 907-916.

Demel R.A., Van Deenen L.L.M., Kinsky S.C. 1965. Penetration of lipid monolayers by polyene antibiotics. Correlation with selective toxicity and mode of action. - J. Biol. Chem., v. 240, № 6, p. 2749-2753.

Demel R.A., Crombag F.J.L., Van Deenen L.L.M., Kinsky S.C. 1968. Interaction of polyene antibiotics with single and mixed lipid monomolecular layers. - Biochim. Biophys. Acta, v. 150, p. 1-12.

Demel R.A., Bruckdorfer K.B., Van Deenan L.L.M. 1972. Structural requirements of sterols for the interaction with lecithin at the air water interface. - Biochim. Biophys. Acta., v. 255, p. 311-320.

Denning D. W. 1991. Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. - J. Antimicrob. Chemother., v. 28, p.1-16.

Dennis V.W., Stead N.W., Andreoli T.S. 1970. Molecular aspects of polyene and sterol-dependent pore formation in thin lipid membranes. - J. Gen. Physiol., v. 55, № 3, p. 375-400.

De Paermentier F., Bassleer R., Lepoint A., Desaive C., Goessens G., Lhoest-

Gautier M.P. 1975. Mode of action of amphotericin B on chick embryo fibroblasts and on mouse Ehrlich tumour cells: a cytological and cytochemical analysis. - J. Cell. Sci., v. 18, p. 441-451.

Deshpande G.R., Kerur D.R., Narasimhachari N. 1966. Chemical studies on hamycin. I. Purification, counter-current distribution and chemical degradation. - Hindustan Antibiotic Bull., v. 8, p. 185-193.

Despois R., Pinnert-Sindico S., Ninet L., Preud'homme J. 1956. Trois antibiotique de groupes différents produits par une même souche de *Streptomyces*. - Giorn. Microbiol., № 2, p. 76.

Deuticke B., Kim M., Zollner C. 1973. The influence of amphotericin B on the permeability of mammalian erythrocytes to nonelectrolytes, anions and cations. - Biochim. Biophys. Acta, v. 318, p. 345-359.

Deuticke P., Lutkemeier P., Sistemich M. 1984. Ion selectivity of aqueous leaks induced in the erythrocyte membrane by crosslinking of membrane proteins. - Biochim. Biophys. Acta, v. 775, p. 150-160.

Dhar M.L., Thaller V., Whiting M.C., Ryhage R., Stallberg-Stenhagen S., Stenhammar E. 1959. The carbon skeleton of lagosin (antibiotic A 246). - Proc. Chem. Soc., p. 154.

Dhar M.L., Thaller V., Whiting M.C. 1960. The structures of lagosin and filipin. - Proc. Chem. Soc., p. 310.

Dhar M.L., Thaller V., Whiting M.C. 1964. Researches on polyenes. Part. VIII. The structure of lagosin and filipin. - J. Chem. Soc., v. 2, p. 842-861.

Diaz-Fontdevila M., Bustos-Obregon E., Fornes M. 1992. Distribution of filipin-sterol complexes in sperm membranes from hypercholesterolaemic rabbits. - Andrologia, v. 24, N 5, p. 279-283.

Diette R.E., Milan P., Berman J.D., Grogg M., Falqueto A., Feitosa T.F., Luz K.G., Suassuna F.A., Marinho L.A., Ksionski G. 1993. Treatment of Brazilian kala-azar with a short course of Amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion). - Clin. Infect. Dis., v. 17, p. 981-986.

Di Giorgio C., Faraut-Gambarelli F., Imbert A., Minodier P., Gasquet M., Dumon H. 1999. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania* infantum isolates from patients with visceral leishmaniasis. - J. Antimicrob. Chemother., v. 44, p. 71-76.

Dinarello C.A. 2000. Proinflammatory cytokines. - Chest., v. 118, p. 503-508.

Dipple I., Houslay M.D. 1979. Amphotericin B has very different effects on the glucagon and fluoride-stimulated adenylate cyclase activities of rat liver plasma membranes. - FEBS Lett., v. 106, p. 21-24.

Divekar P.V., Vora V.C., Khan A.W. 1966. Comparison of hamycin with trichomycin. - J. Antibiot., v. A 19, p. 63.

Djerassi C., Ishikawa M., Budzikiewicz H., Shoolery J.N., Johnson L.F. 1961. The structure of the macrolide antibiotic filipin. - Tetrahedron Lett., p. 383.

Dolberg D., Bissel M.J. 1974. Side effects of amphotericin B-deoxycholate (fungizone) and nystatin in chick cells in culture. - In Vitro, v. 10, p. 26-29.

Dornberger K., Fugner R., Bradler G., Thrum H. 1971. Tetramycin, a new polyene antibiotic. - J. Antibiot., v. 24, p. 172-177.

Dornberger K., Thrum H., Radics L. 1979. The structure of tetramycin, a new polyene macrolide antibiotic. - Tetrahedron, v. 35, p. 1851-1856.

Dorset D.L., Fishman H.M. 1975. Excess electrical noise during current flow

through porous membrane separating ionic solutions. - J. Membrane Biol., v. 21, p. 291-309.

Drabikowski W., Lagwinska E., Sarzala M.G. 1972. Filipin as a fluorescent probe for the location of cholesterol in the membranes of fragmented sarcoplasmic reticulum. - Biochim. Biophys Acta, v. 291, № 1, p. 61-70.

Dromer F., Barbet J., Charreire J., Yeni P. 1990. Improvement of amphotericin B activity during experimental *Cryptococcosis* by incorporation into specific immunoliposomes. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 34, p. 2055-2060.

Drouhet E., Hirth L., Lebeurier G. 1958. Influence de l'amphotericine B sur le métabolisme respiratoire de *Candida albicans*. - C. R. Acad. Sci., v. 247, № 25, p. 2416-2419.

Drouhet E., Hirth L., Lebeurier G. 1960. Some aspects of the mode of action anti-fungal antibiotics. - Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 89, № 1, p. 134-155.

Drouhet E. 1968. Some biological activities of antifungal antibiotics and their modes of action. - In G. E. W. Wolstenholme and R. Porter (ed.) CIBA Found Symp. Systemic Mycoses. Churchill. London, p. 206-240.

Drouhet E., Hirth L., Lebeurier G. Some aspects of the mode of action antifungal antibiotics. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960, v. 89, № 1, p. 134-155.

Drouhet E. 1968. Some biological activities of antifungal antibiotics and their modes of action. - In G.E.W. Wolstenholme and R. Porter (ed.) CIBA Found Symp. Systemic Mycoses. Churchill. London, p. 206-240.

Dufourc E. J., Smith I. C. P., Jarrell H. C. 1984 a. Amphotericin B and model membranes. The effect of amphotericin B on cholesterol-containing systems as viewed by ^2H -NMR. - Biochim. Biophys. Acta, v. 776, p. 317-329.

Dufourc E. J., Smith I. C. P., Jarrell H. C. 1984 b. Interaction of amphotericin B with membrane lipids as viewed by ^2H -NMR. - Biochim. Biophys. Acta, v. 778, p. 435-442.

Dufourc E. J., Smith I. C. P. 1985. ^2H -NMR evidence for antibiotic-induced cholesterol immobilization in biological model membranes. - Biochemistry, v. 24, p. 2420-2424.

Dupont B. 2002. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. - J. Antimicrob. Chemother., v. 49, p. 31-36.

Dutcher I.D., Walters D.R., Wintersteiner O.P. 1955. Studies of the chemical properties and structure of nystatin (mycostatin). - In therapy of fungus diseases an international symposium. T.H. Stenberg and V.D. Newcomer, editors. Little Brown and Company, Boston, Hass, p. 168.

Dutcher I.D., Young M.B., Cherman I.H., Hibbits W., Walters D.R. 1956-1957. Chemical studies on amphotericin B. I. Preparation of the hydrogenation product and isolation of mycosamine an acetolysis product. - In antibiotics Annual H. Welch and F. Harti. Medical Encyclopedia, New York, p. 866-870.

Dutcher J.D., Vandeputte J. 1958. Nystatin purification. - U.S. Patent № 2.865.807.

Dutcher J.D. et al., 1959. - Патент США № 2908612.

Dvornik D., Hill P. 1968. Effect of long-term administration of AY-9944, an inhibitor of 7-dehydrocholesterol delta 7-reductase, on serum and tissue lipids in the rat. - J. Lipid Res., v. 9, p. 587-95.

Edmonds L.E., Davidson L., Bertino J. S. 1989. Solubility and stability of amphotericin B in human serum. - Ther. Drug Monit., v. 11, p. 323-326.

Ehrenstein G., Lecar H., Nassal R. 1970. The nature of the negative resistance in

bimolecular lipid membranes containing exitability inducing material. - J. Gen. Physiol., v. 55, p. 119-133.

Ehrlich J., Knudsen M.P., Bartz A.R. 1955. Production of antibiotic sistomycosin using *Streptomyces viridosporus*. - Canadian Pat. № 514894.

Eilam Y., Grossowicz N. 1982. Nystatin effects on cellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. - Biochim. Biophys. Acta, v. 692, p. 238-243.

Eisenberg-Grunberg M. 1972. - Diss. Thesis, Calif. Inst. Technol. Pasadena.

Eisenberg M., Hall J.E., Mead C.A. 1973. The nature of the voltage-dependent conductance induced by alamethicin in black lipid membranes. - J. Membrane Biol., v. 14, p. 143-176.

Eisenbrandt K. 1967. Hexamycin, ein fungizides Hexaenantibiotikum. - Z. Chem.. Bd. 7, S. 311.

Eisenbrandt K., Muller H.J., Klinkowski M. 1968. Eigeschaften des Hexaenantibiotikums Hexamycin. - Z. Allgem. Mikrobiol., Bd. 8, S. 175.

Elberg S., Seyfried W., Brajtburg J. 1995. Effects of amphotericin B (AmB) formulated with deoxycholate (Fungizone), egg lecithin and glycocholate (Egam), or egg lecithin and deoxycholate (Edam) on survival of mice infected with *Candida albicans* resistant to AmB. - In Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology 1995. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Abstr., p. 43 A2.

Elias, P. M., Friend D. S., Goerke J. 1979. Membrane sterol heterogeneity. Freeze-fracture detection with saponins and filipin. - J. Histochem. Cytochem., v. 27, p. 1247-1260.

Ellis W.G., Sobel R.A., Nielson S.L. 1982. Leukoencephalopathy in patients treated with amphotericin B. - J. Infect. Dis., v. 146, p. 125-137.

Ellul H., Beezer A.E., Brain A.P.R., Miles R.J., Sivayaogan S.R. 1985. The effect of chemical modification of *Saccharomyces cerevisiae* on electrophoretic mobility, cell-wall structure and amphotericin B uptake. - Biochim. Biophys. Acta, v. 845, p. 151-157.

Emminger W., Graninger W., Emminger-Schmidmeier W., Zoubek A., Pillwein K., Susani M., Wasserer A., Gadner H.. 1994. Tolerance of high doses of amphotericin B by infusion of a liposomal formulation in children with cancer. - Ann. Hematol., v. 68, p. 27-31.

English A.R., McBride T.J. 1958. PA 150, PA 153, and PA 166: new polyene anti-fungal antibiotics. Biological studies. - Antibiot. Ann. 1957-1958, p. 893.

Ermishkin L., Kasumov Kh., Potseluyev V. 1976. Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics. - Nature, v. 262, p. 698-699.

Ermishkin L.N., Kasumov Kh.M., Potseluyev V.M. 1977. Properties of amphotericin B channels in a lipid bilayers. - Biochim. Biophys. Acta, v. 470, p. 357-367.

Ernst C., Grange J., Rinnert H., Dupont G., Lematre J. 1981. Structure of amphotericin B aggregates as revealed by UV and CD spectroscopies. - Biopolymers, v. 20, p. 1575-1588.

Espinel-Ingroff A. 2001. In vivo fungicidal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. - J. Clin. Microbiol., v. 39, p. 954-958.

Espuelas P., Legrand P., Loiseau P., Bories C., Barratt G., Irache J. 2000. In vitro reversion of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* by poloxamer 188. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 44, p. 2190-2192.

Etchebest C., Pullman A., Rangantham S. 1985. The gramicidin A channel: theoretical energy profile computed for single occupancy by a divalent cation Ca^{++} . - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 818, № 1, p. 23-30.

Etchebest C., Pullman A. 1986 a. The gramicidin A channel: energetics and structural characteristics of the progression of a sodium ion in the presence of water. - *J. Biol. Struct. Dyn.*, v. 3, № 4, p. 805-825.

Etchebest C., Pullman A. 1986 b. The gramicidin A channel. The energy profile calculated for Na^+ in the presence of water with inclusion of the flexibility of the ethanolamine tail. - *FEBS.*, v. 204, № 2, p. 261-265.

Falk R., Domb A.J., Polacheck I. 1999. A novel injectable water-soluble Amphotericin B-Arabinogalactan conjugate. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 1975-1981.

Falkowski L., Golik J., Zielinski J., Borowski E. 1976. The structure of romocidin. - *J. Antibiot.*, v. 29, p. 197.

Falkowski L., Pawlak J., Zielinski J., Golik J., Troka E., Stefanska B., Jereczek E. 1982. The structure of N-glycosyl derivatives of polyene macrolide antibiotics. The reaction of nystatin with D-glucose. - *Polish J. Chem.*, v. 56, p. 123-130.

Farbwerke-Hoechst A. 1962. - G. Pat. DBRN № 1128083.

Feigin A.M. 1999. Selective modification of sterol composition of hepatomas: new opportunities for chemotherapy. - *Med. Hypotheses*, v. 52, p. 383-388.

Feingold D.S. 1965. The action of amphotericin B on *Mycoplasma laidlawii*. - *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, v. 19, № 2, p. 261-267.

Feinstein M.B., Fernandes S.M., Shaafi R.I. 1975. Fluidity of natural membranes and phosphatidylserine and ganglioside dispersions. Effect of local anesthetics, cholesterol and protein. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 413, p. 354-370.

Ferrante A., Rowan-Kelly B., Thong Y.H. 1979. Suppression of immunological responses in mice by treatment with amphotericin B. - *Clin. Exp. Immunol.*, v. 38, p. 70-76.

Fielding R. M., Smith P. C., Wang L. H., Porter J., Guo L. 1991 Comparative pharmacokinetics of amphotericin B after administration of a novel colloidal delivery system, ABCD, and a conventional formulation to rats. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 1208-1213.

Fielding R.M., Singer A., Wang L., Babbar S., Guo L. 1992. Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 36, p. 299-307.

Fiertel A., Klein H. 1959. On sterols in bacteria. - *J. Bacteriol.*, v. 78, p. 738-739.

Fieser L.E., Fieser M. 1959. - *Steroids*. New York, Reinhold, p. 9.

Fincher J.H. 1968. Particle size of drugs and its relationship to absorption and activity. - *J. Pharm. Sci.*, v. 57, p. 1825-1835.

Finkelstein A., Cass A. 1968. Permeability and electrical properties of thin lipid membranes. - *J. Gen. Physiol.*, v. 52, p. 145-172.

Finkelstein A., Holz R. 1973. Aqueous pores created in thin lipid membranes by polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. - In: *Membranes*. Ed. G. Eisenman (Marcell Dekker, New York, Inc.), v. 2, p. 377-407.

Finkelstein A., Andersen O.S. 1981. The gramicidin A channel: a review of its permeability characteristics with special reference to the single-sile aspects of transport. - *J. Membrane Biol.*, v. 59, p. 155-172.

Fisher P.B., Goldstein N.I., Bonner D.P., Mechlinski W., Bryson V., Schaffner C.P.

1975. Toxicity of amphotericin B and its methyl ester toward normal and tumor cell lines. - *Cancer Res.*, v. 35, p. 1996-1999.

Fisher P.B., Goldstein N.I., Bryson V., Schaffner C.P. 1976. Reduced toxicity of amphotericin B methyl ester (AME) vs. amphotericin B and fungizone in tissue culture. - *In Vitro*, v. 12, p. 133-140.

Fisher P.B., Bryson V. 1977. Toxicity of nystatin and its methyl ester toward parental and hybrid mammalian cells. - *In Vitro*, v. 13, p. 548-556.

Fisher P.B., Bryson V., Schaffner C.P. 1978. Polyene macrolide antibiotic cytotoxicity and membrane permeability alterations. I. Comparative effects of four classes of polyene macrolides on mammalian cells. - *J. Cell. Physiol.*, v. 97, p. 345-352.

Fisher P.B. 1980. Structurally modified polyene macrolide antibiotics as tools for cell and tissue culture research. - *Process Biochem.*, v. 15, № 1,2,4,6-8,29.

Fisher E. W., Toms A., Fisher P., Cheesman A. D.. 1991. Rhinocerebral mucormycosis: use of liposomal amphotericin B. - *J. Laryngol. Otol.*, v. 105, p. 575-577.

Fjærvik E., Zotchev S.B. 2005 a. Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* all 6 versions. - *Tetrahedron Lett.*, v. 30, p. 4521-4524.

Fjærvik E., Zotchev S.B. 2005 b. Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. - *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 67, p. 436-443.

Flick C., Gelerinter E. 1977. Cholestan spin label study of filipin action on lipid planar multibilayers. - *Chem. Phys. Lip.*, v. 18, p. 62-72.

Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. - *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497-509.

Foresti M., Amati P. 1983. Influence of amphotericin B on leucine uptake in 3T3 cells. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 732, p. 251-255.

Fournie I., Barwicz J., Tancrede P. 1998. The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1373, p. 76-86.

Fr. Pat. № 1063828 (*Chem. Zentr.*, 1955, v. 126, 9152).

Fr. Pat. № 1425264, 1962.

Fr. Pat. № 2620, 1964.

Franciolini F., Petris A. 1992. Transport mechanisms in chloride channels. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1113, p. 1-11.

Francis P., Lee J. W., Hoffman A., Peter J., Francesconi A., Bacher J., Shelhamer J., Pizzo P.A., Walsh. T. J. 1994. Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits. The potential role of bronchoalveolar d-mannitol and serum galactomannan as markers of infection. - *J. Infect. Dis.*, v. 169, p. 356-358.

Freedman J.C., Hoffman J.F. 1979. Ionic and osmotic equilibria of human red blood cells treated with nystatin. - *J. Gen. Physiol.*, v. 74, p. 157-185.

Fringeli U.P., Fringeli M. 1979. Pore formation in lipid membranes by alamethicin. - *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v. 76, p. 3852-3856.

Fromling R. A. 1993. Amphotericin B cholesterol sulfate complex (colloidal dispersion). - *Drugs Future*, v. 18, p. 303-306.

Fromling R. A. 1995. Amphotericin B lipid complex. - *Drugs Future*, v. 20, p. 129-134.

Fryberg M., Oehlschlager A.C., Unrau A.M. 1974. Sterol biosynthesis in antibiotic-resistant yeast: nystatin. - *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 160, № 1, p. 83-

- Fugano T., Higashide E., Suzuki T., Yamamoto H., Harada S., Kishi. 1970. Interconversion of T-2636 antibiotics produced by *Streptomyces rochei* var. *volubilis*. – Experientia, v. 26, p. 26.
- Fujii T. 1957. Biochemical studies on pathogenic fungi. VIII. The effect of an antibiotic, trichomycin on the respiration and phosphorous metabolism of *Trichophyton gypseum*. – Pharmacol. Bull. Japan, № 5, p. 511-514.
- Fujii G., Chang I.E., Coley T., Steere B. 1997. The formation of amphotericin B ion channels in lipid bilayers. - Biochemistry, v. 36, p. 4959-4968.
- Fujimoto W.Y., Starman B.J., Rowe D.W. 1978. The effect of amphotericin B-deoxycholate on proliferation and protein synthesis in human skin fibroblast cultures. – In Vitro, v. 14, p. 1003-1009.
- Fujita H. 1959. Chemical study on akitamycin, an antifungal antibiotic. – J. Antibiot., v. 12B, p. 297.
- Fujita H., Ishimura K., Matsuda H. 1981. Freeze-fracture images on filipin-sterol complexes in the thyroid follicle epithelial cell of mice with special regard to absence of cholesterol at the site of micropinocytosis. - Histochemistry, v. 73, N 1, p. 57-63.
- Fuska J., Proska B. 1976. Cytotoxic and antitumor antibiotics produced by microorganisms. – Adv. Appl. Microbiol., N.Y., v. 20, p. 259.
- Gaboriau F., Cheron M., Petit C., Bolard J. 1997 a. Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its in vitro toxicity: a new way to improve its therapeutic index. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 41, p. 2345-2351.
- Gaboriau F., Cheron.M, Leroy L., Bolard J. 1997 b, Physico-chemical properties of the heat-induced superaggregates of amphotericin B. – Biophys. Chem., v. 66, p.1 - 12.
- Gagos M., Koper R., Gruszecki I. 2001. Spectrophotometric analysis of organisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1511, p. 90-98.
- Gale G.R. 1960. The effects of amphotericin B on yeast metabolism. – J. Pharmacol. Exp. Therap., v. 129, p. 257-261.
- Gale E.F. 1973. Perspectives in chemotherapy. – Br. Med. J., v. 4, p. 33-38.
- Gale E.F. 1974. The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. - J. Gen. Microbiol., v. 80, № 2, p. 451-465.
- Gale E.F., Johnson A.M., Kerridge D., Koh T.Y. 1975. Factors affecting the changes in amphotericin sensitivity of *Candida albicans* during growth. - J Gen. Microbiol., v. 87, p. 20-36.
- Gale E.F., Johnson A.M., Kerridge D. 1977. The effect of aeration and metabolic inhibitors on resistance to amphotericin in starved cultures of *Candida albicans*. – J. Gen. Microbiol., v. 99, p. 77-84.
- Gale E.F., Johnson A.M., Kerridge D., Miles E.A. 1978. Phenotypic resistance to amphotericin B in *Candida albicans*: the role of reduction. – J. Gen. Microbiol., v. 109, p. 191.
- Gale E.F., Ingram J., Kerridge D., Notario V., Wayman F. 1980. Reduction of amphotericin resistance in stationary phase cultures of *Candida albicans* by treatment with enzymes. - J. Gen. Microbiol., v. 117, p. 383-391.
- Gale E.F. 1984. Mode of action and resistance mechanisms of polyene macrolides. Macrolide antibiotics - Chemistry, Biology and Practice, p. 425-455.
- Gallis H. A., Drew R. H., Pickard W. W. 1990. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. - Rev. Infect. Dis., v. 12, p. 308-329.

- Gallucci E., Micelli S., Lippe C. 1971. Nonelectrolyte-permeability across lipid bilayer membranes. - Eur. Biophys. Congr. Proc., v. 3, p. 181-184.
- Gangneux J.P., Sulahian A., Garin Y.J., Derouin F. 1996 a. Lipd formulations of amphotericin B in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. - Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 90, p. 574-577.
- Gangneux J.P., Sulahian A., Garin Y.J., Farinotti R., Derouin F. 1996 b. Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 40, p. 1214-1218.
- Gangneux J.P., Dullin M., Sulahian A., Garin Y., Derouin F. 1999. Experimental evaluation of second-line oral treatments of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 43, p. 172-174.
- Ganis E.P., Avitabile G., Mechlinski W., Schaffner C.P. 1971. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. - J. Am. Chem. Soc., v. 93, p. 4560-4564.
- Garcia-Chaumont C., Seksek O., Grzybowska J., Borowski E., Bolard J. 2000 a. Delivery systems for antisense oligonucleotides. - Pharmacol. Ther., v. 87(2-3), p. 255 - 277.
- Garcia-Chaumont C., Seksek O., Jolles B., Bolard J. 2000 b. A cationic derivative of amphotericin B as a novel delivery system for antisense oligonucleotides. - Antisense Nucleic Acid Drug Dev., v. 10 (3), p. 177-184.
- Gary-Bobo C.M., Cybulska B. 1982. Comparative study of the permeability induced by aromatic and non aromatic heptaenes on small and large lipidic vesicles. - J. Antibiotics (Tokyo), v. 35, p. 1068-1071.
- Gary-Bobo C.M. 1989. Polyene-sterol interaction and selective toxicity. - Biochimie, v. 71, № 1, p. 37-47.
- Gassner D., Komnick H. 1983. Filipin activation of latent Na/K-ATP-ase. - Eur. J. Cell. Biol., № 2, p. 9.
- Gates C., Pinney R. J.. 1993. Amphotericin B and its delivery by liposomal and lipid formulation. - J. Clin. Pharm. Ther., v. 18, p. 147-153.
- Gaudiano G., Bravo P., Quilico B.T. 1966 a. The structure of lucensomycin. Part I. - Tetrahedron Letters, v. 30, p. 3559-3565.
- Gaudiano G., Bravo P., Quilico B.T., Golding B.T., Rickards R.W. 1966 b. The structure of lucensomycin. Part II. - Tetrahedron Letters, v. 30, p. 3567-3571.
- Gaudiano G., Bravo P., Quilico B.T., Golding B.T., Rickards R.W. 1966 c. Struc-tura della lucensomycina. Part III. - Gazz. Chim. Ital., v. 96, p. 1470-1491.
- Gear C.M. 1971. - Communis. Ass. Comput. Math., v. 14, p. 185-190.
- Gent N.P.N., Prestegart J.H. 1976. Interaction of the polyene antibiotics with lipid bilayer vesicles containing cholesterol. - Biochim. Biophys. Acta, v. 426, № 1, p. 17-30.
- Ghannoum M., Race L. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. - Clin. Microbiol. Rev., v. 12, p. 501-517.
- Ghielmetti G., Bruzzese T., Bianchi C., Recusani F. 1976. Relationship between acute toxicity in mice and polymorphic forms of polyene antibiotics. - J. Pharm. Sci., v. 65, p. 177-183.
- Ghosh B.K., Halder D., Chatterjee A.N. 1960. Effect of nystatin on the metabolism of a protozoal organism, *Leishmania donowani*. - Ann. Biochem. Exptl. Med., v. 20, № 2, p. 55-56.
- Ghosh B.K., Chatterjee A.N. 1961. Action of an antifungal antibiotics nystatin on

the protozoa *Leishmania donovani*. p.II. Studies on the release of intracellular constituents. - Ann. Biochem. Exptl. Med., v. 21, № 11, p. 343-354.

Ghosh A., Ghosh J.J. 1962. Absorbtion of nystatin by *Candida albicans*. - Sci. Culture, v. 28, № 5, p. 239-240.

Ghosh B.K., Chatterjee A.N. 1962 a. Leishmanicidal activity of nystatin, a polyene antifungal antibiotics. I. The probable of action of nystatin on *Leishmania donovani*. - Antibiotic Chemother., v. 12, № 3, p. 204-206.

Ghosh B.K., Chatterjee A.N. 1962 b. Leishmanicidal activity of nystatin, a polyene antifungal antibiotics. II. Isolation of bound nystatin from cells of *Leishmania donovani* and its clinical application. - Antibiotic Chemother., v. 12, № 4, p. 221-224.

Ghosh B.K., Chatterjee A.N. 1963 a. Action of an antifungal antibiotic, nystatin, on the protozoa *Leishmania donovani*. II1. Studies on the lysis of cells of *Leishmania donovani*. - Ann. Biochem. Exptl. Med., v. 23, p. 173-186.

Ghosh B.K., Chatterjee A.N. 1963 b. Action of an antifungal antibiotic, nystatin, on the protozoa *Leishmania donovani*. - Ann. Biochem. Exptl. Med., v. 23, p. 309-318.

Ghosh B.K. 1963 a. Action of an antifungal antibiotic, nystatin on the protozoa *Leishmania donovani*. IV. Studies on the cytological and cytochemical changes. - Ann. Biochem. Exptl. Med., v. 23, № 6, p. 193-200.

Ghosh B.K. 1963 b. Action of an antifungal antibiotic, nystatin on the protozoa *Leishmania donovani*. VI. Investigations concerning the effect on isolated membranes and the isolation of antibiotic rich cell portions of *L. donovani*. - Ann. Biochem. Exptl. Med., v. 23, № 9, p. 337-344.

Ghosh A., Ghosh J.J. 1963 a. Factors affecting the absorbtion of nystatin by *Candida albicans*. - Ann. Biochem. Exptl. Med., v. 23, № 3, p. 101-112.

Ghosh A., Ghosh J.J. 1963 b. Changes in the intracellular constituents of *Candida albicans* on nystatin and amphotericin B treatment. - Ann. Biochem. Exptl. Med., v. 23, № 4, p. 113-122.

Gilbert B. E., Wyde P. R., Wilson S. Z.. 1992. Aerosolized liposomal amphotericin B for treatment of pulmonary and systemic *Cryptococcus neoformans* infections in mice. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 36, p. 1466- 1471.

Gilbert B. E., Wyde P. R., Lopez-Berestein G., Wilson S. Z.. 1994. Aerosolized amphotericin B-liposomes for treatment of systemic *Candida* infections in mice. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 38, p. 356-359.

Glaser R. 1982. Echinocyte formation induced by potential changes of human red blood cells. - J. Membrane Biol., v. 66, p. 79-85.

Glaser V. 1995. Liposomal antifungals battle for market share. - Bio/Technology, v. 13, p. 728-729.

Gokhale P. C., Barapatre R. J., Advani S. H., Kshirsagar N. A., Pandya S.K. 1993 a. Pharmacokinetics and tolerance of liposomal amphotericin B in patients. - J. Antimicrob. Chemother., v. 32, p. 133-139.

Gokhale P. C., Barapatre R. J., Advani S. H., Kshirsagar N. A., Pandya. S. K. 1993 b. Successful treatment of disseminated candidiasis resistant to amphotericin B by liposomal amphotericin B: a case report. - J. Cancer Res. Clin. Oncol., v. 119, p. 569-571.

Gold W., Stout H.A., Pagano J.F., Donovick R. 1956. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. I. In vitro studies. - Antibiot. Annu.. p. 579-586.

Golding B.T., Rickards R.W., Meyer W.E., Patrick J.B., Barber M. 1966. The structure of the macrolide antibiotic pimaricin. - Tetrahedron Letters, v. 30, p. 3551-3557.

- Golik J., Zielinski J., Borowski E. 1980. The structure of mepartycin A and mepartycin B. - J. Antibiotics (Tokyo), v.33, p. 904-907.
- Golovanov I.B., Tsygankova I.G. 1995. Simulation of an amphotericin B channel. - Biologicheskie Membrany (Russia), v. 12, № 3, p. 327-336.
- Gondal J. A., Swartz R. P., Rahman A. 1989. Therapeutic evaluation of free liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 33, p. 1544-1548.
- Goodal M.C. 1970. Structural effects in the action of antibiotics on the ion permeability of lipid bilayers. III. Gramicidin A and S and lipid specificity. - Biochim. Biophys. Acta, v. 219, p. 471-478.
- Goodal M.C. 1973. Thickness dependence in the action of gramicidin A on lipid bilayers. - Arch. Biochem. Biophys., v. 157, p. 514-519.
- Gopalkrishnan K.S., Narasimhachari N., Joshi V.B., Thirumalachar M.J. 1968. Chainin, a new methylpentenae antibiotic from a species of *Chainia*. - Nature, v. 218, p. 597-598.
- Gordon M.A., Lapa E.W. 1966. Durhamycin, a pentenae antifungal antibiotic from *Streptomyces durhamensis sp. nov.* - Appl. Microbiol., v. 14, p. 757-760.
- Gordon H.W., Schaffner C.P. 1968. The effect of polyene macrolides on the prostate gland and canine prostatic hyperplasia. - Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 60, p. 1201.
- Gordon L.G.M., Haydon D.A. 1972. The unit conductance channel of alamethicin. - Biochim. Biophys. Acta, v. 255, p. 1014-1018.
- Gordon L.G.M. 1973. Conductance channels in neutral lipid bilayers. I. The conductance of a model channel. - J. Membrane Biol., v. 12, p. 217-225.
- Gordon L.G.M., Haydon D.A. 1975. Potential-dependent conductance in lipid membranes containing alamethicin. - Phil. Trans. Roy. Soc., London, v. 270, p. 433-447.
- Gottlieb D., Bhattacharya P.K., Carter H.E., Anderson H.W. 1951. Endomycin, a new antibiotic. - Phytopathology, v. 41, p. 393.
- Gottlieb D., Carter H.E., Sloneker J.H., Ammann A. 1958. Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols. - Science, v. 128, № 3320, p. 361.
- Gottlieb D., Carter H.E., Gaudy E. 1959. Sterol reversal of inhibitory action of filipin on the growth of fungi. - Bacteriol. Proc., v.59, p. 114.
- Gottlieb D., Pote H.L. 1960. Tetrin, an antifungal antibiotic. - Phytopathology, v. 50, p. 817-822.
- Gottlieb D., Ramachandran S. 1961. Mode of action of antibiotics. I. Site of action of ascosin. - Biochim. Biophys. Acta., v. 53, № 2, p. 391-396.
- Gottlieb D., Carter H.E., Sloneker J.H., Wu L., Caudy E. 1961. Mechanisms of inhibition of fungi by filipin. - Phytopathology, v. 51, p. 321-330.
- Govindjee 1982. Photosynthesis. v. 1. Energy conversion by plants and bacteria. - Academic Press. A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, New York.
- Grant C., Hamilton K.S., Hamilton K.D., Barber K. 1989. Physical biochemistry of a liposomal amphotericin B mixture used for patient treatment. - Biochim. Biophys. Acta, v. 984, p. 11-20.
- Graybill J.R., Craven P.C., Taylor R.L., Williams D.M., Magee W. E. 1982. Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. - J. Infect. Dis., v. 145, p. 748-752.
- Graybill J. R. 1994. Is there a correlation between serum antifungal concentration and clinical outcome? - J. Infect., v. 28 (Suppl. 1), p. 17-24.

- Graybill J. R., Bocanegra R. 1995. Liposomal amphotericin B therapy of murine histoplasmosis. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, p. 1885-1887.
- Grzybowska J., Sowinski P., Gumieniak J., Zieniawa T., Borowski E. 1997. N-methyl-N-D-fructopyranosylamphotericin B methyl ester, new amphotericin B derivative of low toxicity. - *J Antibiot (Tokyo)*, v. 50, p. 709-711.
- Grigoriev V.B. Adjou K.T., Sales N., Simoneau S., Deslys J.P., Seman M., Dормont D., Fournier J.G. 2002. Effects of the polyene antibiotic derivative MS-8209 or the Astrocyte Lysosomal system of scrapie-infected hamsters. - *J. Mol. Neurosci.*, v. 18 p 271-281.
- Grindle M. 1973. Sterol mutants of *Neurospora crassa*: their isolation, growth characteristics and resistance to polyene antibiotics. - *Mol. Gen. Genet.*, v. 120, p. 283.
- Gross E., Witkop B. 1965. Gramicidin IX. Preparation of gramicidin A, B and C. - *Biochemistry*, v. 4, p. 2495-2501.
- Gruda I., Nadeau P., Brajtburg J., Medoff G. 1980. Application of differential spectra in the ultraviolet-visible region to study the formation of amphotericin B-sterol complexes. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 602, p. 260-268.
- Gruda I., Bolard J. 1987. On the existence of an amphotericin B-sterol complex in lipid vesicles and in propanol-water systems. - *Can. Biochem. Cell Biol.*, v. 65, p. 234-238.
- Gruda I., Dussault N. 1988. Effect of the aggregation state of amphotericin B on its interaction with ergostetrol. - *Can. Biochem. Cell Biol.*, v. 66, p. 127-134.
- Gruda I., Gauthier E., Elberg S., Brajtburg J., Medoff G. 1988 Effects of the detergent sucrose monolaurate on binding of amphotericin B to sterols and its toxicity for cells. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 154, p. 954-958.
- Gruda I., Milette D., Brother M., Kobayashi G. S., Medoff G., Brajtburg J. 1991 Structure-activity study of inhibition of amphotericin B (Fungizone) binding to sterols toxicity to cells, and lethality to mice by esters of sucrose. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 24-28.
- Gumieniak J., Kolodziejczyk J., Zielinski J., Golik J., Borowski E., Shenin Yu 1979. The structure of trichomycin A and B a heptaene macrolide antibiotics. - In: International Symposium on Antibiotics. Weimar (GDR).
- Guo L.S., Fielding R., Lasic D.D., Hamilton R.H., Mufson D. 1991. Novel anti-fungal drug delivery: stable amphotericin B-cholesteryl sulfate discs. - *Int. J. Farm.*, v 75, p. 45 -54.
- Guo L.S., Working P. K. 1993. Complexes of amphotericin B and cholesteryl sulfate. - *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 473-490.
- Gupta K.C. 1964. Monicamycin, a new polyene antifungal antibiotic. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 1965, p. 65.
- Gus L.S., Fielding R., Lasic D. D., Hamilton R. L., Mufson D. 1991. Novel anti-fungal drug delivery: stable amphotericin B-cholesteryl sulfate discs. - *Int. J. Pharmaceuticals*, v. 75, p. 45-54.
- Gutteridge M.C., Thomas H. 1980. Thiobarbituric acid reactivity of autoxidized candicidin. - *Biochem. Med.*, v. 24, p. 194-200.
- Hagemann G., Nomine G., Penasse L. 1959. Antifungin 4915. - German Pat. № 1053738.
- Hall J. 1975. Toward a molecular understanding of excitability. - *Biophys. J.*, v. 15, p. 934-939.
- Hamilton-Miller J.M.T. 1972 a. Sterols from polyene-resistant mutants of *Candida*

albicans. - J. Gen. Microbiol., v. 73, p. 201-203.

Hamilton-Miller J.M.T. 1972 b. Physiological properties of mutagen-induced variants of *Candida albicans* resistant to polyene antibiotics. - J. Med. Microb., v. 5, p. 425-440.

Hamilton-Miller J.M.T. 1973 a. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. - Bacteriological Reviews, v. 37, № 2, p. 166-196.

Hamilton-Miller J.M.T. 1973 b. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics in *Candida albicans*. - J. Bacteriol., v. 89, p. 1533-1539.

Hamilton K., Barber K., Davis J., Neil K., Gram C. 1991. Phase behaviour of amphotericin B multilamellar vesicles. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1062, p. 220-226.

Hammarstrom L., Smith E. 1976. Mitogenic properties of polyene antibiotics for murine B cells. - Scand. J. Immunol., v. 5, p. 37-43.

Hammarstrom L., Smith C.I., Dresdner G. 1980. Is cholesterol the receptor for polyene antibiotic-induced B-lymphocyte activation? - Cell. Immunol., v. 56, p. 193-203.

Hammond S.M., Lambert R.A., Kliger B.N. 1974. The mode of action of polyene antibiotics; induced potassium leakage in *Candida albicans*. - J. Gen. Microbiol., v. 81, p. 325-330.

Hammond S.M., Kliger B.N. 1976. Differential effects of monovalent and divalent ions upon the mode of action of the polyene antibiotic candididin. - J. Appl. Bacteriol., v. 41, p. 59-68.

Hammond S.M. 1977. Biological activity of polyene antibiotics. - Progress in Medicinal Chemistry, v. 14, p. 105-179.

Han X., Wang E. 2001. Ion-channel sensing of ferricyanide anion based on a supported bilayer lipid membrane. - Anal. Sci., v. 17, p. 1171-1174.

Hansen S.H., Thomsen M. 1976. Comparison of candididin, levorin and trichomycin by means of high-performance liquid chromatography. - J. Chromatogr., v. 123, p. 205.

Hansen J., Witzke N., Nielsen C., Mathiesen L., Teglbaerg L., Nielsen C., Nielsen J. 1990. Derivatives of amphotericin inhibit infection with human immunodeficiency virus in vitro by different modes of action. - Antiviral Research, v. 14, p. 149-160.

Hanson L.H., Stevens D. A. 1992. Comparison of antifungal activity of amphotericin B cholesteryl sulfate colloidal dispersion. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 36, p. 486-488.

Harman J.W., Masterson J.G. 1957. The mechanism of nystatin action. - Irish. J. Med. Sci., v. 378, № 3, p. 249-253.

Harold A., Chapman Jr., John B., Hibbs Jr. 1978. Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics. Support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage function. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 75, № 9, p. 4349-4353.

Harrand M., Petricolas W.L., Dupeyrat R. 1982. Polarized Raman spectroscopy of oriented macrodomain of phospholipids containing amphotericin. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 104, p. 1120-1126.

Hartl A., Leistner E., Pullen C., Groth I., Schlegel B., Grafe U. 2002. Inhibition of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase by polyene macrolides. - Pharmazie, v. 57, p. 218.

Harsch M., Lampen J.O. 1963. Modification of K^+ - transport in yeast by the polyene antifungal antibiotic N-acetyl candidin. - Biochem. Pharmacol., v. 12, № 8, p. 875-883.

Hartsel S.C., Perkins W.R., McGarey G.J., Cafiso D.S. 1988. A selective choles-

terol-dependent introduction of H^+/OH^- currents in phospholipid vesicles by amphotericin B. - Biochemistry, v. 27, p. 2656-2660.

Hartsel S.C., Benz S.K., Peterson R.P., Whyte B.S. 1991. Potassium-selective amphotericin B channels are predominant in vesicles regardless of sidedness. - Biochemistry, v. 30, p. 77-82.

Hartsel S., Hatch C., Ayenew W. 1993. How does amphotericin B work? Studies on model membrane systems. - J. Liposome Res., v. 3, p. 377-408.

Hartsel S., Benz S., Ayenew W., Bolard J. 1994. Na^+ , K^+ and Cl^- selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics. - Eur. Biophys. J., v. 23, p. 125-132.

Hartsel S., Bolard J. 1996. Amphotericin B: new life for an old drug. - Trends in Pharmacological Sciences, v. 17, p. 445-449.

Hatten M.E., Burger M.M. 1979. Effect of polyene antibiotics on the lectin-induced agglutination of transformed and untransformed cell lines. - Biochemistry, v. 18, p. 739-745.

Hattori K., Nakano H., Seki M., Hirata Y. 1956. Studies on trichomycin. IV. - J. Antibiot., v. 9, p. 176.

Hattori K. 1962 a. Studies on trichomycin. VIII. Structure of C_{21} -aldehyde. - J. Antibiot., v. 15, p. 37-38.

Hattori K. 1962 b. Studies on trichomycin. VIII. Chemical structure of trichomycin. - J. Antibiot., v. 15, p. 39-43.

Hauser W.E., Remington J.S. 1983. Effect of amphotericin B on natural killer cell activity in vitro. - J. Antimicrob. Chem., v. 11, p. 257-262.

Hay R.J. 1994. Liposomal amphotericin B, AmBisome. - J. Infect., v. 28, p. 35-43.

Haydon D.A., Hladky S.B. 1972. Ion transport across thin lipid membranes: a critical discussion of mechanism in selected systems. - Quart. Rev. Biophys., v. 5, p. 187-282.

Haynes M.P., Chong P.L.G., Buckley H.R., Pieringer R.A. 1996. Fluorescence studies on the molecular action of amphotericin B on susceptible and resistant fungal cells. - Biochemistry, v. 35, p. 7983-7992.

Hazen E.L., Brown R.F. 1950. Two antifungal agents produced by a soil actinomycetes. - Science, v. 112, p. 423.

Hazen E.L., Brown R.F. 1951. Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 76, p. 93.

Hebeka E.K., Solotorovsky M. 1962. Development of strains of *Candida albicans* resistant to candidin. - J. Bacteriol., 84, p. 237-241.

Hebeka E.K., Solotorovsky M. 1965. Development of resistance to polyene antibiotics in *Candida albicans* to candidin. - J. Bacteriol., 89, p. 1533-1539.

Heinemann V., Bosse D., Jehn U., Kahny B., Wachholz K., Debus A., Scholz P., Kolb H., Wilmanns W. 1997. Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (AmBisome) in critically III patients. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 41, № 6, p. 1275-1280.

Heitz F. et al. 1986. Analysis of the ion transfer through the channel of 9,11,13,15-phenylalanylgramicidin A. - Biophys. Chem., v. 24, p. 143-148.

Hemenger R.P., Kaplan T., Gray I.J. 1983. Structure of amphotericin B aggregates based on calculations of optical spectra. - Biopolymers, v. 22, p. 911-918.

Henis Y., Grossowicz N., Aschner M. 1957. Heptamycin, an antifungal and antiprotozoa antibiotic. - Bull. Res. Council Israel E6: vii-vii.

Henis Y., Grossowicz N. 1960. Studies on the mode of action of antifungal hept-

taene antibiotics. - J. Gen. Microbiol., v. 23, p. 345-355.

Henry-Toulme N., Bolard J. 1986. Synergistic incorporation of daunorubicin in erythrocytes in the presence of polyene antibiotics. Role of the membrane potential. - Biochim. Biophys. Acta, v. 854, p. 84-92.

Henry – Toulme N., Bolard J., Hermier B., Seman M. 1989 a. Immunomodulating properties of the N-(1-deoxy-D-fructos-yl) derivative of amphotericin B in mice. - Immunology Letters, v. 20, p. 63-66.

Henry – Toulme N., Sarthou P., Seman M., Bolard J. 1989 b. Membrane effects of the polyene antibiotic amphotericin B and of some of its derivatives on lymphocytes. - Mol. Cellular Biochem., v. 91, p. 39-44.

Henry – Toulme N., Seman M., Bolard J. 1989 c. Interaction of amphotericin B and its N-fructosyl derivative with murine thymocytes: a comparative study using fluorescent membrane probes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 982, № 2, p. 245-252.

Henry-Toulme N., Sarthou P., Bolard J. 1990. Early membrane potential and cytoplasmic calcium changes during mitogenic stimulation of WEHI 231 cell line by polyene antibiotics, lipopolysaccharide and anti-immunoglobulin. - Biochim. Biophys. Acta. v. 1051, p. 285-292.

Herve M.B., Cybulski B., Gary-Bobo M. 1985. Cation permeability induced by valinomycin, gramicidin D and amphotericin B in large unilamellar vesicles studied by ³¹P-NMR. - Eur. Biophys. J., v. 12, p. 121-128.

Herve M.B., Debouzy J.C., Borowski E., Cybulski B., Gary-Bobo C.M. 1989. The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A ³¹P-NMR study. - Biochim. Biophys. Acta, v. 980, № 2, p. 261-272.

Heyer E.J., Muller R.U., Finkelstein A. 1976. Inactivation of monazomycin-induced voltage-dependent conductance in thin lipid membranes. I. Inactivation produced by long chain quaternary ammonium ions. - J. Gen. Physiol., v. 67, p. 703-729.

Heymans C., Van Der Auwera P., Sculier J. P., Coune A., Brassinne C., Laduron C., Hollaert C., Meunier F.. 1990. In-vitro evaluation of the antifungal activity of amphotericin B entrapped into liposomes during storage for one year. - J. Antimicrob. Chemother., v. 25, p. 361-366.

Hickey R.J., Hidy P.H. 1951. Crystalline fradicin. - Science, v. 113, p. 261.

Hickey R.J., Corum C.J., Hidy P.H., Cohen I.R., Nager U.F., Kropp E. 1952. Ascosin, an antifungal antibiotic produced by a streptomycete. - Antibiot. Chemother., v. 2, p. 472-483.

Hickey R.J. 1953. The antagonism between the antifungal antibiotic, ascosin, and some long-chain unsaturated fatty acids. - Arch. Biochem. Biophys., v. 46, № 2, p. 331-336.

Hidaka K., Endo H., Akiyama S., Kuwano M. 1978. Isolation and characterization of amphotericin B-resistant cell lines in Chinese hamster cells. - Cell, v. 14, p. 415-421.

Hille B. 1970. Ionic channels in nerve membranes. - Progr. Biophys. Mol. Biol., v. 21, p. 1-32.

Hillery A.M. 1997. Supramolecular lipidic drug delivery systems: from laboratory to clinic. A review of recently introduced commercial liposomal and lipid – based formulation of amphotericin B.- Advanced Drug Delivery Reviews , v. 24, p. 345 – 363.

Hitchcock C. 1993. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. - Biochem. Soc. Trans., v. 21, p. 1039-1047.

Hladky S., Haydon D. 1970. Discreteness of conductance change in bimolecular

lipid membranes in the presence of certain antibiotics. - Nature, v. 225, p. 451-453.

Hladky S., Haydon D. 1972. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of unit conductance channel. - Biochim. Biophys. Acta, v. 274, p. 294-312.

Hoeprich P.O., Flynn N.M., Kawachi M.M., Lee K.K., Lawrence R.M., Heath L.K., Schaffner C.P. 1987. Treatment of fungal infections with semisynthetic derivatives of amphotericin B. - Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 544, p. 517-546.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. 1952. Carrents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. - J. Physiol. (London), v. 116, p. 449-472.

Holz R.W., Finkelstein A. 1970. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. - J. Gen. Physiol., v. 56, p. 125-145.

Holz R.W. 1974. The effects of the polyene antibiotic nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. - Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 235, p. 469-479.

Holz R.W. 1979. Polyene antibiotics: nystatin, amphotericin B and filipin. - In: Hahn F.E., ed. "Antibiotics". Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, v. 2, p. 313-340.

Hoogeveest P.V., De Kruijff B. 1978. Effect of amphotericin B on the cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoyl phosphatidylcholine. - Biochim. Biophys. Acta, v. 511, p. 397-407.

Hopfer R.L., Mehta R., Lopez-Berestein G. 1987. Synergistic antifungal activity and reduced toxicity of liposomal amphotericin B combined with gramicidin S or NF. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 31, p. 1978-1981.

Hopfer R. L., Mills K., Mehta R., Lopez-Berestein G., Fainstein V., Juliano R.L. 1984. In vitro antifungal activities of amphotericin B and liposome-encapsulated amphotericin B. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 25, p. 387-389.

Hopwood DA. 1997. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. - Chem Rev., v. 97, p. 2465-2498.

Horri S., Shima T., Ouchida A. 1970. Partial structure of the eurocidin complex. - J. Antibiot., v. 22, p. 102-104.

Horvath J., Shentirmai A. 1960. The mode of inhibition of induced amylase synthesis by nystatin. - Antibiot. Chemother., v. 10, № 5, p. 303-305.

Hosoya S., Komatsu N., Soeda M., Yuwaguchi T., Sonoda Y. 1952. Trichomycin, a new antibiotic with trichomonadicidal and antifungal activites. - J. Antibiot., v. B5, p. 564.

Hosoya S., Ogata S., Hamamura N., Soeda M., Nakazawa S., Komatsu N. 1955. Purification of trichomycin and preparation of water-insoluble derivatives thereof, with special reference to rivanol-trichomycin and marfanil-trichomycin. - J. Anibiot., v. A8, p. 5-8.

Hosoya S., Soeda M., Okada K., Fujita H. 1959. - Toho Igakki Zasshi, v. 6, p. 285 (C.A., 1960, v. 54, 16537).

Hospenthal D., Gretzinger K., Rogers A. 1989 a. Treatment of a murine model of systemic candidiasis with liposomal amphotericin B bearing antibody to *Candida albicans*. - J. Med. Microbiol., v. 30, p. 193-197.

Hospenthal D.R., Rogers A.L., Beneke E.S. 1989 b. Effect of attachment of anti-candidal antibody to the surfaces of liposomes encapsulating amphotericin B in the treatment of murine candidiasis. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 33, p. 16-18.

- Hostetler J.S., Clemons K.V., Напвоп L.H., Stevens D.A. 1992. Efficacy and safety of amphotericin B colloidal dispersion compared with those of amphotericin B deoxycholate suspension for treatment of disseminated murine cryptococcosis. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 36, p. 2656-2660.
- Hotchkiss R.D., Dubos R.J. 1941. The isolation of bactericidal substances from cultures of *Bacillus brevis*. - J. Biol. Chem., v. 141, p. 155-162.
- Hotchkiss R.D. 1944. Gramicidin, tyrocidine and tyrothricin. - Adv. Enzymol., p. 153-200.
- Hsu Chen C.C., Feingold D.S. 1973 a. Polyene antibiotic action on lecithin liposomes: effect of cholesterol and fatty acyl chains. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 51, № 4, p. 972-978.
- Hsu Chen C.C., Feingold D.S. 1973 b. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on lecithin membrane models (liposomes). - Antimicrob. Agents Chemother., v. 4, № 3, p. 309-315.
- Hsu Chen C.C., Feingold D.S. 1973 c. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies in natural membranes. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 4, № 3, p. 316-319.
- Hsu Chen C.C., Feingold D.S. 1974. Two types of resistance to polyene antibiotics in *Candida albicans*. - Nature (London), v. 251, p. 658-659.
- Huang W., Zhang Z., Han X., Tang J., Wang J., Dong S., Wang E. 2002. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. - Biophys. J., v. 83, p. 3245-3255.
- Hughes C.E., Harris C., Petersen L.R., Gerding D.N. 1984. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp. by tetracycline analogs. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 26, p. 837-840.
- Hughes C.E., Bennet R.L., Beggs W.H. 1987. Broth dilution testing of *Candida albicans* susceptibility to ketoconazole. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 31, p. 643-646.
- Hung C.T., Lam F.C., Perrier D.G., Souter A. 1988. A stability study of amphotericin B in aqueous media using factorial design. - Int. J. Pharmaceutics, v. 44, p. 117-123.
- Hunt G. R. A., Jones I. C., Veiro J. A. 1984. Phosphatic acid regulates the activity of the channel-forming ionophores alamethicin, melittin, and nystatin: a ¹H-NMR study using phospholipid membranes. - Biosci. Rep., v. 4, p. 403-413.
- Ibragimova V.Kh., Aliev D.I., Alieva LN. 2002. Biophysical and Medicobiological Aspects of Application of Polyene Antibiotics in Combination with Dimethyl Sulfoxide. - Biophysics (Translate from Russia), v. 47, № 5, p. 774-781.
- Ibragimova V., Alieva I., Kasumov Kh., Khutorsky V. 2006. Transient permeability induced by alkyl derivatives of amphotericin B in lipid membranes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1758, p. 29-37.
- Ibragimova V., Alieva I., Kasumov Kh. 2008. Radioprotective properties and anti-tumoral activity of the polyene antibiotics in complex with dimethyl sulfoxide. - J. Qafqaz University (Azerbaijan), № 23, p. 109-120.
- Igarashi S., Ogata K., Miyake A. 1956. Streptomyces. An antifungal substance produced by *Streptomyces aureofaciens*. - J. Antibiot., v. B9, p. 79.
- Imanishi J. 2000. Expression of cytokines in bacterial and viral infections and their biochemical aspects. - J Biochem (Tokyo), v. 127, p. 525-530.

Iqbal Z., Weidekamm E. 1979. Pre-resonance Raman spectra and conformations of nystatin in powder, solution and phospholipid-cholesterol multilayers. – *Biochim. Biophys. Acta*, v. 555, p. 426-435.

Ishikawa H., Nirimatsu H., Saito K. 1977. Mechanisms of the adjuvant effect of nystatin on in vitro antibody response of mouse spleen cells: indication of nystatin as a B-cell mitogen and as a stimulant for polyclonal antibody synthesis in B cells. – *Microb. Immunol.*, v.21, p. 137-152.

Iwashita K., Ueda K., Fujimoto T. 1962. Treatment of trichophytosis with takamycin, a new antifungal antibiotic. – *J. Antibiot.*, v. B15, p. 119.

Janknegt, R., De Marie S., Bakker-Woudenberg I.A.J.M., Crommelin D.J.A. 1992. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. - Clinical pharmacokinetics. C11п. *Pharmacokinet.*, v. 23, p. 279-291.

Janoff A.S., Boni L.T., Popescu M.C., Minchey S.R., Cullis P.R., Madden T.D., Taraschi T., Gruner S.M., Shyamsunder F., Tate M.W., Mendelsohn R., Bonner D. 1988. Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 6122- 6126.

Janoff A.S., Perkins W.R., Saletan S.L., Swenson C.E. 1993. Amphotericin B lipid complex (ABLC). A molecular rationale for the attenuation of amphotericin B related toxicities. - *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 451- 471.

Japan Pat. № 1593, 1955 (C.A., 1957, v. 51, 676).

Japan Pat. № 8148, 1955 (C.A., 1957, v. 51, 18494).

Jarzebski A., Falkowski L., Borowski E. 1978. Studies on the correlation between chemical structure of derivatives of polyene macrolide antibiotics and their biological properties. - In: Quantitative structure-activity Analysis (Ed. R. Franke, P. Oehme) Berlin: Acad.- Verl., p. 97-100.

Jarzebski A., Falkowski L., Borowski E. 1982. Synthesis and structure-activity relationships of amides of amphotericin B. - *J. Antibiotics*, v. 35, № 2, 220-226.

Jiebisch D.C., Tosteson H.H. 1978. Membrane transport in biology (Ed. By Jiebisch, D.C. Tosteson, H.H. Ussing), Springer-Verlag, v. 1, p. 48-65.

Johnson W.H., Miller C.A., Brumbaugh J.H. 1962. Induced loss of pigment in planarians. - *Physiol. Zool.*, v. 35, p. 18-26.

Johnson L.E., Dietz A. 1971. Scopafungin, a crystalline antibiotic produced by *Streptomyces hygroscopicus* var. *enhygrus* var. nov. - *Appl. Microbiol.*, v. 22, p. 303.

Johnson B., White R.I., Williamson G.M. 1978. Factors influencing the susceptibility of *Candida albicans* to the polyenoic antibiotics nystatin and amphotericin B. – *Br. J. Gen. Microbiol.*, v. 104, p. 325-333.

Joly V., Saint-Julien L., Carbon C., Yeni P. 1990. Interactions of free and liposomal amphotericin B with renal proximal tubular cells in primary cultures. - *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 252, p. 17-22.

Joly V., Bolard J., Saint-Julien L., Carbon C., Yeni P. 1992 a. Influence of phospholipid/amphotericin B ratio and phospholipid type on in vitro renal cell toxicities and fungicidal activities of lipid-associated amphotericin B formulations. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 36, № 2, p. 262-266.

Joly V., Bolard J., Yeni P. 1992 b. In vitro models for studying toxicity of antifungal agents. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 36, № 9, p. 1799-1804.

Joly V., Saint-Pierre-Chazalet M., Saint-Julien L., Bolard J., Carbon C., Yeni P. 1992 c. Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture. – *J. Infect. Dis.*, v. 165, p. 337-

Joly V., Farinotti R., Saint-Julien L., Carbon C., Yeni P. 1994. In vitro renal toxicity and in vivo therapeutic efficacy in experimental murine cryptococcosis of amphotericin B (Fungizone) associated with Intralipid. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, p. 177-183.

Jordan G.W., Humphreys S., Zee Y.C. 1978. Effect of amphotericin B methyl ester on vesicular stomatitis virus morphology. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 13, p. 340-341.

Jordan G., Seet E.C. 1978. Antiviral effects of amphotericin B methyl ester. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 13., p. 199-204.

Juliano R.L., Grant W.M., Barber K.R., Kalp M.A. 1987. Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes. - *Mol. Pharmacol.*, v. 31, p. 1-11.

Jullien S., Vertut-Croquin A., Brajtburg J., Bolard J. 1988. Circular dichroism for the determination of amphotericin B binding to liposomes. - *Anal. Biochem.*, v. 172, p. 197-202.

Jullien S., Contrepois A., Sligh J.E., Domart Y., Yeni P., Brajtburg J., Medoff G., Bolard J. 1989. Study of the effects of liposomal amphotericin B on *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and erythrocytes by using small unilamellar vesicles prepared from saturated phospholipids. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 33, № 3, p. 345 - 349.

Jullien S., Brajtburg J., Bolard J. 1990. Affinity of amphotericin B for phosphatidylcholine vesicles as a determinant of the in vitro cellular toxicity of liposomal preparations. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1201, p. 39-45.

Jullien S., Bolard J. 1990. La stabilité de la liaison amphotericin B-liposome détermine l'augmentation de l'index thérapeutique in vitro des formulations liposomales du médicament. - *Cancer Commun.*, v. 4, p. 19-22.

Kaduk Ch., Dathe M., Bienert M. 1998. Functional modifications of alamethicin ion channels by substitution of glutamine 7, glycine 11 and praline 14. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1373, p. 137-146.

Kajter M., Virom M., Morlin E., Szejl J. 1989. Aggregation of amphotericin B in the presence of p-cyclodextrin. - *Biopolymers.*, v. 28, № 9, p. 1585-1596.

Kalasz H., Szell V., Gyimesi J., Magyar K., Horvath I., Szabo I. 1972. Antibiotics produced by by *Streptomyces*. IX. Heptafungin A. a new heptaene macrolide antibiotic. - *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, v. 19, p. 111.

Kan V. L., Bennett J. E., Amantea M. A., Smolskis M. C., McManus E., Grasela D. M., Sherman J.W. 1991. Comparative safety, tolerance and pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex and amphotericin B deoxycholate in healthy male volunteers. - *J. Infect. Dis.*, v. 164, p. 418-425.

Kaneko K., Vey M., Scott M., Pilkuhn S., Cohen F.E., Prusiner S.B. 1997. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. - *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 2333-2338.

Kannan L.V., Khan A.W., Kutty M.R., Vora V.C. 1967. A new heptaene antibiotic (X-63) from *Streptomyces species*. - *J. Antibiot.*, v. A20, p. 293.

Kaplan N.A., Heinemann B., Mydlinski I., Buckwalter H., Lein J., Hoops I.R. 1958. An antifungal substance (AYF) produced by a strain of *Streptomyces aureofaciens*. - *Antibiot. Chemother.*, v. 8, p. 491-497.

Karyotakis N.C., Anaissie E.J. 1994. Efficacy of escalating doses of liposomal am-

photericin B (AmBisome) against hematogenous *Candida lusitaniae* and *Candida krusei* infection in neutropenic mice. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 38, № 11, p. 2660-2662.

Kasumov Kh.M., Liberman E.A. 1972. Interaction of polyene antibiotics with artificial bimolecular membranes. - IV International Biophysics congress. Moscow. Abstracts. Section E XXI, a5/12, v. 4, p. 289-291.

Kasumov Kh., Borisova M., Ermishkin L., Potseluyev V., Silberstein A., Vainshtein V. 1979. How do ionic channel properties depend on the structure of polyene antibiotic molecules? - Biochim. Biophys. Acta, v. 551, p. 229-237.

Kasumov Kh.M., Malafriev O.K. 1981. A new state of the amphotericin B channel. - III-Soviet-Swidish symposium on the physico-chemical biology, Tbilisi, p. 67.

Kasumov Kh.M., Mekhtiev N.Kh., Karakozov S.D. 1981. Potential-dependent formation of single conducting ionic channels in lipid bilayers induced by the polyene antibiotic levorin A₂. - Biochim. Biophys. Acta, v. 644, p. 369-372.

Kasumov Kh.M., Karakozov S.D. 1984. The one sided effect of amphotericin B on lipid bilayer membranes. - VII-School on Biophysics of membrane transport, part II, Poland, p. 261.

Kasumov Kh., Malafriev O. 1984 a. Research of membrane conductivity relaxation kinetics in the presence of amphotericin B alkyl derivatives. - Studia Biophysica, Berlin, v. 99, № 2, p. 137-142.

Kasumov Kh.M., Malafriev O.K. 1984 b. The estimation of biological effect selectivity of amphotericin B alkyl derivatives. - Molecular aspects of Chemotherapy. Post-symposium of IUPAC 14-th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Gdansk, Poland, p. 24.

Kasumov Kh.M. 1986. The properties of ionic channels formed in lipid membranes by polyene antibiotics of different structures. - VIII-School on biophysics of membrane transport, Poland, v. 2, p. 284.

Kasumov Kh.M. 2001. Nonlinear conductance induced by derivatives of amphotericin B. - 4-th International Conference on Biological Physics, Kyoto, Japan, Abstracts, ICBP, L 148, p. 130.

Kasumov Kh., Kurbanov O. 2003. The mechanism of transient permeability induced by levorin and its alkyl cationic derivatives in lipid membranes. - 16-th Physiology and Pharmacology Congress, Tehran, Iran, p. 48.

Kasumov Kh. 2004. Positively charged aromatic polyene macrolide antibiotics at treatment of exogenic and endogenic diseases (RESORBIN-PATENT). - International Conference Science and Business Partnerships in Action: Issues and Solutions in Discovery and Use of Novel Biomolecules: Biodiversity and Environment, Russia-Pushchino, p. 89-90, 238.

Kasumov Kh., Bolard J. 2004. Transient permeability induced by cationic derivatives of amphotericin B in lipid membranes. - Pol. J. Chem., v. 78, p. 1057-1065.

Kataoka T., Williamson J.R., Kinsky S.C. 1973. Release of macromolecular markers (enzymes) from liposomes treated with antibody and complement. An attempt at correlation with electron microscopic observations. - Biochim. Biophys. Acta, v. 298, № 2, p. 158-171.

Kataoka T., Koprowski H. 1975. Lipids and cell fusion in vitro: effect of amphotericin B. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., v. 149, № 2, p. 447-451.

Kates M. 1986. Techniques of lipidology. In R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg (ed.), Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier. Am-

sterdam. - The Netherlands. v. 3, p. 100-110, 163-164, 251-253.

Katz N., Pierce P., Anzeck R., Visner M., Canter H., Foegh M., Pearle D., Tracy C., Rahman A. 1990. Liposomal amphotericin B for treatment of pulmonary aspergillosis in a heart transplant patient. - J. Heart Transplantation, v. 9, № 1, p. 14-17.

Katz L., McDaniel R. 1999. Novel macrolides through genetic engineering. - Med. Res. Rev., v. 19, p. 543-558.

Kauffman C.A. 2002. Endemic mycoses in patients with hematologic malignancies. - Semin. Respir. Infect., v. 17, p. 106-112.

Kelly P.M., Holland J.F., Bieber L.L. 1979. Interaction of isotopically labeled and unlabeled filipin with egg lecithin vesicles and rat erythrocytes. - Biochemistry, v. 18, p. 4769-4775.

Kerridge D., Koh T.Y., Johnson A.M. 1976. The interaction of amphotericin B methyl ester with protoplasts of *Candida albicans*. - J. Gen. Microbiol., v. 96, p. 117-123.

Kerridge D. 1979. The polyene macrolide antibiotics. - Postgrad. Med. J., v. 55, p. 653-656.

Kerridge D., Whelan W. 1984. The polyene macrolide antibiotics and 5-fluorocytosine: molecular actions and interactions. Mode of action of antifungal agents. - British Mycological Society Symposium 9. Cambridge University Press, Cambridge, p. 345-375.

Kerridge D. 1986. Mode of action of clinically important antifungal drugs. - Adv. Microb. Physiol., v. 27, p. 1-72.

Kessel R.G., Tung H.N., Roberts R. 1985. Filipin-sterol complexes in the plasma membrane of zebrafish spermatozoa. - Anat. Rec., v. 212, N 4, p. 358-363.

Kessler H., Dixon J., Howard C., Tsiquaye K., Zuckerman A. 1981. Effects of amphotericin B on hepatitis B virus. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 20, № 6, p. 826-833.

Khokhlova Y.M., Korenyako A.I., Nikitina N.I., Puchnina A.V., Blinov N.O. 1963. Actinomycetes as producers of polyene antibiotics. - Z. allgem. Microbiol., v. 3, p. 195.

Khutorsky V.E. 1992. Structures of amphotericin B-cholesterol complex. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1108, p. 123-127.

Khutorsky V. 1996. Ion coordination in the amphotericin B channel. - Biophys. J., v. 71, p. 2984-2995.

Kim H.D., Mc Manus T.J. 1971. Studies on the energy metabolism of pig red cells. I. The limiting role of membrane permeability in glycolysis. - Biochim. Biophys. Acta, v. 230, p. 1-11.

Kim S.J., Kwon-Chung K.J., Milne G.W.A., Hill W.B., Paterson G. 1975. Relationship between polyene resistance and sterol compositions in *Cryptococcus neoformans*. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 7, p. 99-106.

Kim J., Okada Y. 1983. Asymmetric distribution and temperature-dependent clustering of filipin-sterol complexes in the nuclear membrane of *Ehrlich ascites* tumor cells. - Eur. J. Cell Biol., v. 29, N 2, p. 244-252.

King T.C., Schlessinger D., Krogstad D.J. 1981. The assessment of antimicrobial combinations. - Ren. Inf. Dis., v. 3, p. 627-633.

Kinsky S.C. 1961 a. Alteration in the permeability of *Neurospora crassa* due to polyene antibiotics. - J. Bacteriol., v. 82, p. 889-897.

Kinsky S.C. 1961 b. The effect of polyene antibiotics on permeability in *Neurospora crassa*. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 4, p. 353-357.

- Kinsky S.C. 1962 a. Effect of polyene antibiotics on protoplasts of *Neurospora Crassa*. - J. Bacteriol., v. 83, p. 351-358.
- Kinsky S.C. 1962 b. Nystatin binding by protoplasts and a particulate fraction of *Neurospora Crassa* and a basis for the selective toxicity of polyene antifungal antibiotics. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 48, № 6, p. 1049-1056.
- Kinsky S.C., Avruch J., Permutt M., Rogers H.B. 1962. The lytic effect of polyene antifungal antibiotics on mammalian erythrocytes. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 9, № 6, p. 503-507.
- Kinsky S.C. 1963. Comparative responses of mammalian erythrocytes and microbial protoplasts to polyene antibiotics and vitamin A. - Arch. Biochem. Biophys., v. 102, № 2, p. 180-188.
- Kinsky S.C. 1964. Membrane sterols and the selective toxicity of polyene antifungal antibiotics. - Antimicrob. Agents Chemother., p. 384 - 394.
- Kinsky S.C., Gronau G.R., Weber M.M. 1965. Interaction of polyene antibiotics with subcellular membrane systems. I. Mitochondria. - Mol. Pharmacol., v. 1, p. 190-201.
- Kinsky S.C., Luse S.A., Van Deenen L.L.M. 1966. Interaction of polyene antibiotics with natural and artificial membrane systems. - Federation Proc., v. 25, № 5, p. 1503-1510.
- Kinsky S.C., Demel R.A., Van Deenen L.L.M. 1967 a. Further studies on the hemolytic action of filipin and derivatives. - Biochim. Biophys. Acta, v. 135, p. 835-843.
- Kinsky S.C., Luse S.A., Zopf D., Van Deenen L.L.M., Haxby J.A. 1967 b. Interaction of filipin and derivatives with erythrocyte membranes and lipid dispersion: electron microscope observations. - Biochim. Biophys. Acta, v. 135, № 5, p. 844-861.
- Kinsky S.C., Luse S.A., Van Zutphen H., Van Deenen L.L.M. 1967 c. Effect of polyene antibiotic filipin on bilayer membrane systems. - Feder. Proc., v. 26, № 2, p. 862.
- Kinsky S.C. 1967. Mechanisms of action and biosynthesis of antibiotics. - Springer Verlag. Heidelberg., v.1, p. 122.
- Kinsky S.C., Haxby J.A., Kinsky C.B., Demel R.A., Van Deenen L.L.M. 1968. Effect of cholesterol incorporation on the sensitivity of liposomes to the polyene antibiotic, filipin. - Biochim. Biophys. Acta, v. 152, № 1, p. 174-185.
- Kinsky S.C. 1970. Antibiotics interaction with model membranes. - Ann. Rev. Pharmacol., v. 10, p. 119-142.
- Kinsky S.C. 1971. - In antibiotics (Gottlieb D. and Shaw P.D., eds.) Springer Verlag, Berlin, v. 1, p. 122-141.
- Kintzel P.E., Kennedy P.E. 1991. Stability of amphotericin B in 5% dextrose injection at 25° C. - Am. J. Hosp. Pharm., v. 48, p. 283-285.
- Kirsh R., Goldstein R., Tarloff J., Parris D., Hook J., Hanna N., Bugelski P., Poste G. 1988. An emulsion formulation of amphotericin B improves the therapeutic index when treating systemic murine candidiasis. - J. Infect. Dis., v. 158, p. 1065-1070.
- Kirschbaum J., Kahn S. 1967. Micelle size and stability of aqueous amphotericin B (Polyene) systems. - J. Pharmaceutical Sci., v. 56, № 2, p. 278.
- Kitagawa T., Andoh T. 1978. Stimulation by amphotericin B of uridine transport, RNA synthesis and DNA synthesis in density-inhibited fibroblasts. - Exp. Cell Res., v. 115, p. 37-46.
- Kitajima Y., Sekiya T., Nozawa Y. 1976. Freeze-fracture ultrastructural alterations induced by filipin, pimaricin, nystatin and amphotericin B in the plasmia membranes of

- Epidermophyton, Saccharomyces* and red complex-induced membrane lesions. - Biochim. Biophys. Acta, v. 455, p. 452-465.
- Kitao T., Hattori K. 1980. Erythrocyte entrapment of daunomycin by amphotericin B without hemolysis. - Cancer Res., v. 40, p. 1351-1353.
- Kleinberg M.E., Finkelstein A. 1984. Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayer membranes. - J. Membrane Biol., v. 80, p. 257-269.
- Kleinschmidt M.C., Chough K.S. 1972. Effect of filipin on liposomes prepared with different types of steroids - Plant Physiol., v. 49, p. 852-856.
- Knopik-Skrocka A., Klafaczycka A., Bielawski J. 2002. The effect of polyene antibiotic filipin on pig red blood cells. - Cell. Mol. Biol. Lett., v. 7, Supplement 200.
- Ko C.P., Propst J.W. 1986. Absence of sterol-specific complexes at active zones of degenerating and regenerating frog neuromuscular junctions. - J. Neurocytol., v. 15, N 2, p. 231-240.
- Kobayashi G.S., Medoff G. 1977. Antifungal agents: recent developments. - Ann. Rev. Microbiol., v. 31, p. 291-308.
- Koe B.K., Tanner F.W., Rao K.V., Sabin B.A., Celmar W.D. 1958. PA 150. 153 and 166: new polyene antibiotics. - Antibiotic Ann., p. 157-158, 397-905.
- Koh T.Y., Marriott M.S., Taylor J., Gale E.F. 1977. Growth characteristics and polyene sensitivity of a fatty acid auxotroph of *Candida albicans*. - J. Gen. Microbiol., v. 102, p. 105-110.
- Kolb H.A., Bamberg E. 1977. Influence of membrane thickness and ion concentration on the properties of the gramicidin A channel. Autocorrelation, spectral power density, relaxation and single-channel studies. - Biochim. Biophys. Acta, v. 464, p. 127-141.
- Kolb H.A., Boheim G. 1978. Analysis of the multi-pore system of alamethicin in a lipid membrane. - J. Membrane Biol., v. 38, p. 151-191.
- Koldin M.H., Kobayashi G., Brajtburg I., Medoff G. 1985. Effects of elevation of serum cholesterol and administration of amphotericin B complexed to lipoproteins on amphotericin B-induced toxicity in rabbits. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 28, № 1, p. 144-145.
- Kolomytkin O.V. 1987. Structure of planar membrane formed from liposomes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 900, p. 145-156.
- Kolomytkin O.V., Mantzyghin J.A., Swyatukhina N.V. 1988. Antibodies effect the ionic conductance of channels formed by amphotericin B in lipid bilayer. - Biochim. Biophys. Acta, v. 945, № 2, p. 335-349.
- Kolomytkin O.V., Mantzyghin J.A., Swyatukhina N.V. 1989. Increase of ionic conductance of amphotericin B channels under antibody action. - Gen. Physiol. and Biophys., v. 8, № 1, p. 73-78.
- Konopka K., Guo L.S., Duzgunes N. 1999. Anti-HIV activity of amphotericin B-cholesteryl sulfate colloidal dispersion in vitro. - Antiviral Res., v. 42, p. 197-209.
- Korting H.C., Ollert M., Georgii A., Froschl M. 1988. In vitro susceptibilities and biotypes of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. - J. Clin. Microbiol., v. 26, p. 2626-2631.
- Kotler-Brajtburg J., Price H.D., Medoff G., Schlessinger D., Kobayashi G.S. 1974 a. Molecular basis for the selective toxicity of amphotericin B for yeast and filipin for animal cells. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 5, p. 377-382.
- Kotler-Brajtburg J., Medoff G., Schlessinger D., Kobayashi G.S. 1974 b. Characterization of the binding of amphotericin B to *Saccharomyces cerevtsiae* and relationship to the antifungal effects. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 6, p. 770-776.

- Kotler-Brajbburg J., Medoff G., Kobayashi G.S., Schlessinger D. 1977 a. Sensitivity to amphotericin B and the cholesterol-phospholipid molar ratios of 373, L. BHK and Hela cells. - Biochem. Pharmacol., v. 26, p. 705-710.
- Kotler-Brajbburg J., Medoff G., Schlessinger D., Kobayashi G.S. 1977 b. Amphotericin B and filipin effects on L and HeLa cells: dose response. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 1, p. 803-808.
- Kotler-Brajbburg J., Medoff G., Kobayashi G., Boggs S., Kotler-Brajbburg J., Medoff G., Kobayashi G., Boggs S., Kotler-Brajbburg J., Medoff G., Kobayashi G., Boggs S., Schlessinger D., Pandey R., Rinehart K. 1979. Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 15, p. 716 – 722.
- Kottke M., Sisler H.D. 1962. Effect of fungicides on permeability of yeast cells to the pyruvate ion. - Phytopathology, v. 52, № 9, p. 959-961.
- Krause, H. J., Juliano R.L. 1988. Interactions of liposome-incorporated amphotericin B with kidney epithelial cell cultures. - Mol. Pharmacol., v. 34, p. 286-297.
- Kravchenko L.S. 1977. Investigation of the proteolytic activity of dog kidney lysosomes under the action of amphotericin B in vitro. - Biokimiya, v. 42, p. 1655-1659.
- Krawczyk S. 1978. Ionic channel formation in a living cell membrane. - Nature, v. 273, p. 56-57.
- Krick J.A., Remington J.S. 1976. Opportunistic invasive fungal infections in patients with leukaemia and lymphoma. - Clin. Lab. Haematol., v. 5, p. 249-310.
- Krishan A., Sauerteig A., Gordon K. 1985. Effect of amphotericin B on adriamycin transport in P388 cells. - Cancer Res., v. 45, p. 4097-4102.
- Kubatiev A., Pomolnetsky V., Efendiyev A.M. 1985. The role of prostaglandins in the mechanism of the nephrotoxic effect of polyene antibiotics. - 13-th Internation Congress of Biochemistry. Amsterdam. The Netherlands, p. 106.
- Kumar B.V., Medoff G., Kobayashi G.S., Schlessinger D. 1974. Uptake of *Escherichia coli* DNA into *HeLa cells* enhanced by amphotericin B. - Nature, v. 250, p. 323-325.
- Kunemund A., Hofer M. 1983. Passive fluxes of K⁺ and H⁺ in wild strain and nystatin-resistant mutant of Rhodotorula gracilis (ATCC 26194). - Biochim. Biophys. Acta., v. 735, p. 203-210.
- Kurbanov O.G., Kasumov Kh.M. 2003. The transport of ions and carbohydrate in cells by the action of membrane-active pharmaceutical compounds at the muscle performance. - The 5-th National Congress on Physical Education and Sports Science, 27-28, Feb., Iran, p. 170.
- Kuroya – Japan Pat. № 8547, 1954 (C.A., 1956, v. 50, 9696).
- Kuwano M., Ikehara Y. 1973. Inhibition by alpha-amanitin of messenger RNA formation in cultured fibroblasts: potentiation by amphotericin B. - Exp. Cell. Res., v. 82, p. 454-457.
- Kuwano M., Akiyama S., Takaki R., Okono H., Nishimoto T. 1981. Inhibition of DNA synthesis and cell cycle in Chinese hamster cells by sterol-binding polyene amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 652, p. 266-273.
- Lago C., Sartorius B., Tramontano D., Amati P. 1977. A cell membrane alteration specifically induced by SV40 transformation. - J. Cell. Physiol., v. 92, p. 265-274.
- Lala Anil K., Buttke Thomas M., Bloch Konrad. 1979. On the role of the sterol hydroxyl group in membranes. - J. Biol. Chem., v. 254, № 21, p. 10582-10585.
- Lamb K.A., Washington C., Davis S.S., Denyer S.P. 1991. Toxicity of amphotericin

B emulsion to cultured canine kidney cell monolayers. - J. Pharm. Pharmacol., v. 43, p. 522-524.

Lambert P.A., Hammond S. M. 1973. Potassium fluxes, first indication of membrane damage in microorganisms. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 54, p. 796-800.

Lambing H.E., Wolf B.D., Hartsel S.C. 1993. Temperature effects on the aggregation state and activity of amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1152, p. 185-188.

Lampen J.O., Morgan E.R., Slocum A.C. 1956. Inhibition of sugar utilization by nystatin. - Federat. Proc., v. 15, № 1, p. 295-296.

Lampen J.O., Morgan E.R., Slocum A.C. 1957. Effect of nystatin on the utilization of substrates by yeast and other fungi. - J. Bacteriol., v. 74, p. 297-302.

Lampen J.O., Arnow P.M. 1959. Significance of nystatin uptake for its antifungal action. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., v. 101, № 4, p. 792-797.

Lampen J.O., Morgan E.R., Slocum A., Arnow P.M. 1959. Absorption of nystatin by microorganisms. - J. Bacteriol., v. 78, № 2, p. 282-289.

Lampen J.O., Arnow P.M., Safferman R.S. 1960. Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. - J. Bacteriol., v. 80, № 2, p. 200-206.

Lampen J.O., Arnow P.M., Borowska Z., Laskin A.I. 1962. Location and role of sterol at nystatin - binding sites. - J. Bacteriol., v. 84, p. 1152-1160.

Lampen J.O. 1962. Fungi and fungus diseases. Springfield (III). C.C. Thomas.

Lampen J.O., Gill J.W., Arnow P.M., Magana-Plaza L. 1963. Inhibition of the pleuropneumonia-like organism *Mycoplasma gallisepticum* by certain polyene antifungal antibiotics. - J. Bacteriol., v. 86, p. 945-949.

Lampen J.O., Arnow P.M. 1963. Differences in action of large and small polyene antifungal antibiotics. - Bull. Res. Council Israel, A 11, № 4, p. 286-291.

Lampen J.O. 1966. Interference by polyene antifungal antibiotics (especially nystatin and filipin) with specific membranes functions. - Symposium Soc. Gen. Microbiol., v. 16., p. 111-130.

Lampen J.O. 1969. Amphotericin B and other polyenic antibiotics. - American J. Clinical Pathology, v. 52, № 2, p. 138-146.

Lamy-Freund M.T., Ferreira V.F.N., Schreier S. 1985. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B: evidence for radical formation in the process of autoxidation. - J. Antibiotics, v. 38, p. 753-757.

Lamy-Freund M.T., Ferreira V.F.N., Schreier S. 1989. Polydispersity of aggregates formed by the polyene antibiotic amphotericin B and deoxycholate. A spin label study. - Biochim. Biophys. Acta, v. 981, № 2, p. 207-212.

Lamy-Freund M.T., Schreier S., Peitzsch R.M., Reed W.F. 1991. Characterization and time dependence of amphotericin B: deoxycholate aggregation by quasielastic light scattering. - J. Pharm. Sci., v. 80, p. 262-266.

Lamy-Freund M.T., Ferreira V.F.N., Faljonialario A., Schreier S. 1993. EfFect of aggregation on the kinetics of autoxidation of the polyene antibiotic amphotericin B. - J. Pharm. Sci., v. 82, p.162-166.

Langlet J., Berges J., Caillet J., Demaret J.P. 1994. Theoretical study of the complexation of amphotericin B with sterols. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1191, p. 79-93.

Larabi M., Yardley V., Loiseau P., Appel M., Legrand P., Gulik A., Bories C., Croft S., Barratt G. 2003. Toxicity and antileishmanial activity of a new stable lipid suspension of amphotericin B. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 47, p. 3774-3779.

Largy H.A., Johnson D., McMurrau W.C. 1958. Antibiotics as tools for metabolic

studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolitic systems. - Arch. Biochem. Biophys., v. 78, p. 587-597.

Lechevalier H., Acker R.F., Cirke C.T., Haenseler C.M., Waksman S.A. 1953. Candicidin, a new antifungal antibiotic. - Mycologia, v. 45, p. 155-171.

Lechevalier H.A., Borowski E., Lampen J.O., Schaffner C.P., Water soluble N-acetyl derivatives of heptaene macrolide antifungal antibiotics: microbiological studies. 1961. - Antibiot. Chemother., v. 11, p. 640-647.

Lee C.H., Schaffner C.P. 1969. Perimycin. The structure of some degradation products. - Tetrahedron, v. 25, p. 2229-2232.

Lee J., Amantea M., Francis P., Navarro E., Bacher J., Pizzo Ph., Walsh Th. 1994 a. Pharmacokinetics and safety of a unilamellar liposomal formulation of amphotericinB (AmBisome) in rabbits. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 38, № 4, p. 713 - 718.

Lee M.D., Hess M.M., Boucher B.A., Apple A.M.. 1994 b. Stability of amphotericin B in 5% dextrose injection stored at 4 or 25° C for 120 hours. - Am. J. Hosp. Pharm., v. 51, p.394-396.

Legrand Ph., Eneida A., Romero E., Cohen B., Bolard J. 1992. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 36, p. 2518-2522.

Legrand Ph., Vertut-Doi A., Bolard J. 1993. Liposomal amphotericin B bases of therapeutic index increase. - Biomat. Art.Cells and Immob. Biotech., v.21(3), p. 407-413.

Legrand Ph., Vertut-Doi A., Bolard J. 1996. Comparative internalization and recycling of different amphotericin B formullations by macrophage-like cell line J774. - J. Antimicrob. Chemother., v. 37, p. 519-533.

Legrand Ph., Cheron M., Leroy L., Bolard J. 1997. Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells. - J. Drug Target, v. 4, p. 311 - 319.

Levin E.Y., Bloch K. 1964. Absence of sterols in *Blue-green Algae*. - Nature, v. 202, № 4927, p. 90-91.

Levitt D.G. 1978. Electrostatic calculations for an ion channel. I. Energy and potential profiles and interactions between ions. - Biophys. J., v. 22, p. 209-219.

Levy R.A., Ostlund R.E., Jr., Brajtburg J. 1985. The effects of amphotericin B on lipid metabolism in cultured human skin fibroblasts. In Vitro Cell. - Dev. Biol., v. 21, p. 26-31.

Lewis S.A., Eaton D. C., Clausen O., Diamond J. M. 1977. Nystatin as a probe for investigating the electrical properties of a tight epithelium. - J. Gen. Physiol., v. 70, p. 427-440.

Lberman E.A., Topaly V.P. 1968. Selective transport of ions through bimolecular phospholipid membranes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 163, p. 125-136.

Lin S.H., Medoff G., Kobayashi G.S. 1977. Effects of amphotericin B on macrophages and their precursor cells. - Antimicrob. Agents Chemother, v. 11, p. 154-160.

Liras P., Lampen J. O. 1974 a. Sequence of candididin action on yeast cells. - Biochim. Biophys. Acta, v. 372, p. 141-153.

Liras P., Lampen J.O. 1974 b. Protection by K+ and Mg2+ of growth and macromolecule synthesis in candididin-treated yeast. - Biochim. Biophys. Acta, v. 374, p. 159-163.

Lister J. 1996. Amphotericin B lipid complex. (Abelcet^R) in the treatment of invasive mycoses: the north American experience. - Eur. J. Haematol., v. 56 (suppl. 57), p.

- Little J.R., Plut E.R., Kotler-Brajbburg J., Medoff G., Kobayashi G.S. 1978. Relationship between the antibiotic and immunoadjuvant effects of amphotericin B methyl ester. - *Immunochemistry*, v. 15, p. 219-224.
- Little J.R., Abegg A., Plut E. 1983. The relationship between adjuvant and mitogenic effects of amphotericin methyl ester. - *Cell Immunol.*, v. 78, p. 224-235.
- Little J.R., Little K.D., Plut E., Koldin M., Kobayashi G.S. 1984. Induction of amphotericin B-specific antibodies for use in immunoassays. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, p. 824-828.
- Little J.R., Shore V. 1985. Modulation by lipoproteins of amphotericin B-induced immunostimulation. - *Cell Immunol.*, v. 93, p. 212-221.
- Little J.R., Stein S.H., Little K.D. 1987. In *Antibiotics and host immunity*; Szenti-vany, H.; Friedman H.; Gillissen G., Ed.: Plenum: New York, p. 253-263.
- Liu H., Davoudi H., Last T. 1995. Determination of amphotericin B in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography. - *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, v. 13, p. 1395-1400.
- Löffler J., Einsele H., Hebart H., Schumacher U., Hrastnik C., Daum G. 2000. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. - *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 185, p. 59-63.
- Lohr K.M., Snyderman R. 1982. Amphotericin B alters the affinity and functional activity of the oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocytes. - *J. Immunol.*, v. 129, p. 1594-1599.
- Loiseau P., Imbertie L., Bories C., Betbeder D., De Miguel I. 2002. Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 46, p. 1597-1601.
- Lomb M., Fryberg M., Oehlschlager A.C., Unrau A.M. 1975. Sterol and fatty acid composition of polyene macrolide antibiotic resistant *Torulopsis glabrata*. - *Can. J. Biochem.*, v. 53, p. 1309-1315.
- Lopes S.C.D.N., Goormaghtigh E., Costa Cabral B.J., Castanho M.R.B. 2004. Filipin orientation revealed by linear dichroism. Implication for a model of action. - *J. Am. Chem. Soc.*, v. 126, N 17, p. 5396-5402.
- Lopez-Berestein G., Mehta R., Hopfer R.L., Mehta K., Hersh E.M., Juliano R.L. 1983 a. Effects of sterols on the therapeutic efficacy of liposomal amphotericin B in murine candidiasis. - *Cancer Drug Delivery*, v. 1, p. 37-51.
- Lopez-Berestein G., Mehta R., Hopfer R.L., Mills K., Kasi L., Mehta K., Fainstein V., Luna M., Hersh E.M., Juliano R.L. 1983 b. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. - *J. Infect. Dis.*, v. 147, p. 939-945.
- Lopez-Berestein G., Hopfer R.L., Mehta R., Mehta K., Hersh E.M., Juliano R.L. 1984 a. Liposome-encapsulated amphotericin B for treatment of disseminated *Candidiasis* in neutropenic mice. - *J. Infect. Dis.*, v. 150, p. 278-283.
- Lopez-Berestein G., Hopfer R.L., Mehta R., Mehta K., Hersh E.M., Juliano R.L. 1984 b. Prophylaxis of *Candida albicans* infection in neutropenic mice with liposome-encapsulated amphotericin B. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 25, p. 366-367.
- Lopez-Berestein G., Fainstein V., Hopfer R., Mehta K., Sullivan M.P., Keating M., Rosenblum M.G., Mehta R., Luna M., Hersh E.M., Reuben J., Juliano R.L., Bodey G.P. 1985 a. Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. - *J. Infect. Dis.*, v. 151, p. 704-711.

- Lopes-Berestein G., Mc Queen T., Mehta K. 1985 b. Protective effect of liposomal-amphotericin B against *C. albicans* infection in mice. – Cancer Drug Delivery, v. 2, p. 183-189.
- Lopez-Berestein G. 1987. Liposomes as carriers of antimicrobial agents. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 31, p. 675-678.
- Lopez-Berestein G., Juliano R.L. 1987. Application of liposomes to the delivery of antifungal agents. - In M. J. Ostro (ed.), Liposomes. Marcel Dekker, New York, p. 253-276.
- Lopez-Berestein G., Bodey G.P., Frankel L.S., Mehta K.. 1987. Treatment of hepatosplenic candidiasis with liposomal-amphotericin B. - J. Clin. Oncol., v. 5, p. 310-317.
- Lopez-Berestein G., Fidler J. 1989. Treatment of systemic fungal infections with liposomal amphotericin B. - In O. Lopez-Berestein and J. Fidler (ed.), Liposomes in the therapy of infectious diseases and cancer. Alan R. Liss, Inc., New York., p. 317-327.
- Loura L.M.S., Cactanho M.A.R.B., Fedorov A., Prieto M. 2001. A photophysical study of the polyene antibiotic filipin self-aggregation and filipin-ergosterol interaction. - Biochim. Biophys. Acta, v.1510, p.125-135.
- Lubkowski J., Blazejowski J. 1989. Thermal behaviour and stability of amphotericin B. - Thermochimica Acta, v. 155, p. 29-38.
- Lupetti A., Danesi R., Campa M., Del Tacca M., Kelly S. 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. - Trends Mol. Med., v. 8, p. 76-81.
- Lyman C.L., Walsh T.Y. 1992. Systemically administered antifungal agents: a review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. – Drugs, v. 44, p. 9-35.
- Machado Fernandes de Albuquerque M., Goncalves de Lima O., Decio de Andrade L.F.. Magali de Araujo T., Barros Coelho J.S., Da Salete Baros C.M., Costa Mareira L. 1969. Guamicina, un antibiotico tetraenico. Isolamento e caracterizacao. – Rev. Inst. Antibiot., v. 9, p. 39.
- Mackay D.H., Berens P.H., Wilson K.R., Hagler A.T. 1984. Structure and dynamics of ion transport through gramicidin A channels. - Biophys. J., № 2, p. 229-248.
- MacKinnon R. 2003. Potassium channels. - FEBS Lett., v. 555, p. 62-65.
- Madden T.D., Janoff A.S., Cullis P.R.. 1990. Incorporation of amphotericin B into large unilamellar vesicles composed of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol. - Chem. Phys. Lipids, v. 52, p. 189-198.
- Maesaki S. 2002. Drug delivery system of anti-fungal and parasitic agents. - Curr. Pharm. Des., v. 8, p. 433-440.
- Magierowska-Jung M., Cefai D., Marrakchi H., Chieze F., Agut H., Huriaux J.M., Seman M. 1996. In vitro determination of antiviral activity of MS8209, a new amphotericin B derivative, against primary isolates of HTV1. - Res. Virol., v. 147, p. 313-318.
- Mahajan R., Renapurkar D. 1993. Cryopreservation of *Angiostrongylus cantonensis* third-stage larvae. - J. Helminthol., v. 67., p. 233 - 237.
- Maher P., Singer S.J. 1984. Structural changes in membranes produced by the binding of small amphipathic molecules. – Biochemistry, v. 23, p. 232-240.
- Majuk Z., Bittman R., Landsberger F.R., Compans R.W. 1977. Effects of filipin on the structure and biological activity of enveloped viruses. - J. Virol., v. 24, p. 883-892.
- Malewicz B., Borowski E. 1979. Energy dependence and reversibility of membrane alterations induced by polyene macrolide antibiotics in *Chlorella vulgaris*. – Nature, v. 281, p. 80-82.
- Malewicz B., Jenkin H.M., Borowski E. 1980. Dissociation between the induction of potassium efflux and cytostatic activity of polyene macrolides in mammalian cells. –

Antimicrob. Agents Chemother., v. 17, p. 699-706.

Malewicz B., Jenkin H.M., Borowski E. 1981. Repair of membrane alterations induced in baby hamster-kidney cells by polyene macrolide antibiotics. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 19, p. 238-247.

Mamidi A., DeSimone J.A., Pomerantz R.J. 2002. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. - J. Neurovirol., v. 8, p. 158-167.

Mandell G.L., Petri W.A. 1996. - In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics; Hardman J.G., Limbird L.E., Ed.; McGraw-Hill: New York, p. 1175-1190.

Mange A., Nishida N., Milhavet O., McMahon H.E., Casanova D., Lehmann S. 2000 a. Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. - J. Virol., v. 74, p. 3135-3140.

Mange A., Milhavet O., McMahon H.E., Casanova D., Lehmann S. 2000 b. Effect of amphotericin B on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells: putative mechanism of action in transmissible spongiform encephalopathies. - J. Neurochem., v. 74, p. 754-762.

Maniar A.O., Mavdikar S. 1962. Microbiological assay of hamycin and other anti-fungal polyene antibiotics. - Hindustan Antibiot. Bull., v. 4, p. 168.

Manning L.K., Robertson B.M. 1959. A case of aspergillosis treated with nystatin. - Br. Med. J., v. 1, p. 345-346.

Marella M., Lehmann S., Grassi J., Chabry J. 2002. Filipin prevents of pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. - J. Biol. Chem., v. 277, p. 25457-25464.

Marin M.B., Bello M.M., Blake I.O. 1991. A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channel. - Biochim. Biophys. Acta, v. 373, p. 481-489.

Marini F., Arnow P.M., Lampen J.O. 1961. The effect of monovalent cations on the inhibition of yeast metabolism by nystatin. - J. Gen. Microbiol., v. 24, № 1, p. 51-62.

Marriott M.S. 1975. Isolation and chemical characterization of plasma membranes from the yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. - J. Gen. Microbiol., v. 86, p. 115-132.

Martin J.H., Edward J., Porter J.N. 1972. Antifungal BH 890. - US Pat. № 3700769.

Martin J.F., McDaniel L.E. 1974 a. Isolation, purification and properties of the hexaene macrolides candihexin I and candihexin II. - J. Antibiot., v. 27, p. 610.

Martin J.F., McDaniel L.E. 1974 b. The submerged culture production of the polyene antifungal antibiotics candidin and candihexin. - Dev. Ind. Microbiol., v. 15, p. 324.

Martin D.R., Williams R.J.P. 1975. The nature and function of alamethicin. - Biochem. Soc. Trans., v. 3, p. 166-167.

Martin D.R., Williams R.J.P. 1976. Chemical nature and sequence of alamethicin. - Biochem. J., v. 153, p. 184-190.

Martin E., Schlasius U., Bhakdi S. 1992 a. Flow cytometric assay for estimating fungicidal activity of amphotericin B in human serum. - Med. Microbiol. Immunol., v. 181, p. 117-126.

Martin G.P., El-Hairir L.M., Marriott C. 1992 b. Bile salt- and lysophosphatidyl-choline-induced membrane damage in human erythrocytes. - J. Pharm. Pharmacol., v. 44, p. 646-650.

Marty A., Finkelstein A. 1975. Pore formed in lipid bilayer membranes by nystatin.

- J. Gen. Physiol., v. 65, № 4, p. 515-526.
- Maruta H. 1999. Anticancer molecules: structure, function, and design. - Annals of the New York Academy of Sciences, v. 886, p. 303.
- Matsuoka M., Umezawa H. 1960. Unamycin, an antifungal substance produced by *Streptomyces fungicidicus*. - J. Antibiot., v. 13 A, p. 114-120.
- Matsuoka M. 1960. Biological studies on antifungal substance produced by *Streptomyces fungicidicus*. - Antibiot., v. 13 A, p. 121.
- Maurin L., Baucel F., Morin P., Bienvenue A. 1988. Interaction between a paramagnetic analogue of cholesterol and filipin. - Biochim. Biophys. Acta, v. 939, p. 102-110.
- Mayro A., Nanavati R.P., Heyer E. 1972. Time-variant conductance of bilayer membranes treated with monazomycin and alamethicin. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA., v. 69, p. 3742-3744.
- Mazerski J., Bolard J., Borowski E. 1982. Self-association of some polyene macrolide antibiotics in aqueous media. - Biochim. Biophys. Acta, v. 719, p. 11-17.
- Mazerski J., Bolard J., Borowski E. 1983. Circular dichroism study of the interaction between aromatic heptaene antibiotics and small unilamellar vesicles. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 116, № 2, p. 520-526.
- Mazerski J., Cybulski B., Bolard J., Borowski E. 1986. Structural features determining the haemolytic activity of vacidin A derivatives. - Drugs Exptl. Clin. Res., v. 12, p. 627 – 633.
- Mazerski J., Grzybowska J., Borowski E. 1990. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. - Eur. Biophys. J., v. 18, p. 1-6.
- Mazerski J., Bolard J., Borowski E. 1995. Effect of the modifications of ionizable groups of amphotericin B on its ability to form complexes with sterols in hydroalcoholic media. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1236, p. 170-176.
- Mazerski J., Borowski E. 1995. Molecular dynamics of amphotericin B. I. Single molecule in vacuum and water. – Biophys. Chem., v. 54, p. 49-60.
- Mazerski J., Borowski E. 1996. Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water. – Biophys. Chem., v. 57, p. 205 - 217.
- Mbongo N., Loiseau Ph., Billion M., Robert-Gerol M. 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. – Antimicrob. Agents Chemother., v. 42, p. 352-357.
- McLaughlin S., Eisenberg M. 1975. Antibiotics and membrane biology. – Annu. Rev. Biophys. Bioeng., v. 4, p. 335-366.
- Mechlinski W., Schaffner C.P., Ganis P., Avitabile C. 1970. Structure and absolute configuration of the polyene macrolide antibiotic amphotericin B. - Tetrahedron Letters, v. 44, p. 3873-3876.
- Mechlinski W., Schaffner C.P. 1972. Polyene macrolide derivatives. I N-acylation and esterification reactions with amphotericin B. – J. Antibiotics, v. 25, p. 256-258.
- Mechlinski W. 1973. The polyene antifungal antibiotics. – In: Handbook Microbiol. CRC Press, Boca Raton, Florida, v. 3, p. 93-107.
- Meddeb S., Berges J., Caillet J., Langlet J. 1992. Comparative theoretical study of the conformations of amphotericin methyl ester and amphotericin B polar heads in the presence of water. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1112, p. 266-272.
- Medoff G., Kobayashi G.S., Kwan C.N., Schlessinger D., Venkov P. 1972. Potentiation of rifampicin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B. -

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 69, p. 196-199.

Medoff G., Kwan., C.N., Schlessinger D., Kobayashi G.S. 1973. Potentiation of rifampicin, rifampicin analogs, and tetracycline against animal cells by amphotericin B and polymyxin B. - Cancer Res., v. 33, p. 1146-1149.

Medoff G., Valeriote F., Dieckman J. 1981. Potentiation of anticancer agents by amphotericin B. - J. Natl. Cancer Inst., v. 67, p. 131-135.

Medoff G., Brajtburg J., Kobayashi G.S., Bolard J. 1983. Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections. - Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 23, p. 303-330.

Mehta R., Lopez-Berestein G., Hopfer R., Mills K., Juliano R. 1984. Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. - Biochim. Biophys. Acta, v. 770, p. 230-234.

Mehta R.T., Mehta K., Lopez-Berestein G., Juliano R.L. 1985. Effect of liposomal amphotericin B on murine macrophages and lymphocytes. - Infect. Immunol., v. p. 429-433.

Mehta R.T., Lopes-Berenstein G., Hopfer R.L., Mehta K., White R.A., Juliano R.L. 1985. Prophylaxis of murine candidiasis via application of liposome-encapsulated amphotericin B and a muramyl dipeptide analog, alone and in combination. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 28, p. 511-513.

Mehta R.T., McQueen T.J., Keyhani A., Lopez-Berestein G. 1994. Phagocyte transport as mechanism for enhanced therapeutic activity of liposomal amphotericin B. - Chemotherapy, v. 40, p. 256-264.

Mehta J., Kelsey S., Chu P., Powles R., Hazel D., Riley U., Evans C., Newland A., Treleaven J., Singhal S. 1997. Amphotericin B lipid complex (ABLC) for treatment of confirmed or presumed fungal infections in immunocompromised patients with hematologic malignancies. - Bone Marrow Transplantation, v. 20, p. 39-43.

Melchior D.L., Morowitz H., Sturtevant Y.M., Tsong T.Y. 1970. Characterization of the plasma membrane of *Mycoplasma laidlawii*. - Biochim. Biophys. Acta, v. 219, p. 114-122.

Mendes M.V., Recio E., Fouces R., Luiten R., Martin J.F., Aparicio J.F. 2001. Engineered biosynthesis of novel polyenes: a pimaricin derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*. - Chem. Biol., v. 8, p. 635-44.

Menon S.K., Lavate W.V. 1961. Hamycin, a new antifungal antibiotic. III. Microbiological and spectrophotometric assay. - Hindustan Antibiot. Bull., v. 3, p. 97.

Mermer D.J., Fields B.T., Jr., France G.L., Steele R.W. 1981. Ketoconazole, amphotericin B, and amphotericin B methyl ester: comparative in vitro and in vivo toxicological effects on neutrophil function. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 20, p. 660-665.

Meunier F., Sculier J.P., Coune A., Brassinne C., Heymans C., Laduron C., Collette N., Hollaert C., Bran D., Klastersky J. 1988. Amphotericin B encapsulated in liposomes administered to cancer patients. - Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 544, p. 598-610.

Meunier F., Prentice H., Ringden O. 1991. Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial. - J. Antimicrob. Chemother., v. 28, p. 83-91.

Meunier F. 1994. Alternative modalities of administering amphotericin B: current issues. - J. Infect., v. 28(Suppl 1), p. 51-56.

Meyer C.E., Reusser F. 1967. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. - Experientia, v. 23, p. 85-86.

- Meyer H.W. 1979. Amphotericin B induced structural changes of the erythrocyte membrane. - *Exp. Pathol.*, v. 17, p. 429-433.
- Meyer H.W., Richter W., Winkelmann. 1983. Nystatin- and amphotericin B-induced structural alterations of the erythrocyte membrane: importance of reduced ionic strength. - *Exp. Pathol.*, v. 24, p. 163-166.
- Midez J.A., Hopfer R.L., Lopez-Berestein G., Mehta R.T. 1989. Effects of free and liposomal amphotericin B and gramicidin S alone and in combination on potassium leakage from human erythrocytes and *Candida albicans*. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 33, № 2, p. 152 - 155.
- Milhaud J., Bolard J., Benveniste P., Hartmann M.A. 1988. Interaction of the polyene antibiotic filipin with model and natural membranes, containing plant sterols. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 943, № 2, p. 315-325.
- Milhaud J., Hartmann M.A., Bolard J. 1989 a. Interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with model membranes; differences between small and large unilamellar vesicles. - *Biochimie*, v. 71, № 1, p. 49-56.
- Milhaud J., Mazerski J., Bolard J., Dufourc E.J. 1989 b. Interaction of filipin with dimyristoylphosphatidylcholine membranes studied by $^2\text{H-NMR}$, circular dichroism, electronic absorption and fluorescence. - *Eur. Biophys. J.*, v. 17, p. 151-158.
- Milhaud J., Mazerski J., Bolard J. 1989 c. Competition between cholesterol and phospholipids for binding to filipin. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 987, p. 193-198.
- Milhaud J. 1992. Permeabilizing action of filipin III on model membranes through a filipin-phospholipid binding. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1105, p. 307-318.
- Milhaud J., Berrehar J., Lancelin J.M., Michels B., Raffard G. 1997. Association of polyene antibiotics with sterol-free lipid membranes. II. Hydrophobic binding of nystatin to dilauroylphosphatidylcholine bilayers. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1326, p. 54-66.
- Milhaud J., Michels B. 1999. Binding of nystatin and amphotericin B with sterol-free L-dilauroylphosphatidylcholine bilayers resulting in the formation of dichroic lipid superstructures. - *Chem. Phys. Lipids*, v. 101, p. 223-235.
- Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B. 2002. Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1558, p. 95-108.
- Miller R. G. 1984. The use and abuse of filipin to localize cholesterol in membranes. - *Cell. Biol. Int. Rep.*, v. 8, p. 519-535.
- Mills W., Chopra R., Linch D., Goldstone A. 1994. Liposomal amphotericin B in the treatment of fungal infections in neutropenic patients: a single-centre experience of 133 episodes in 116 patients. - *British J. Haematology*, v. 86, p. 754-760.
- Mishra M., Biswas V., Jha D., Khan A. 1992. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. - *Lancet*, v. 340, p. 1256-1257.
- Mislow K. 1965. Introduction to stereochemistry. - N. Y. Benjamin W.A., p. 76.
- Mitrano F.P., Outman W.R., Baptista R.J., Palombo J.D. 1991. Chemical and visual stability of amphotericin B in 5% dextrose injection stored at 4°C for 35 days. - *Am. J. Hosp. Pharm.*, v. 48, p. 2635-2637.
- Mitsutake K., Kohno S., Miyazaki Y., Noda T., Miyazaki H., Miyazaki T., Kaku M., Koga H., Hara K.. 1994. In vitro and in vivo antifungal activities of liposomal amphotericin B, and amphotericin B lipid complex. - *Mycopathologia*, v. 128, p.13-17.
- Miyamura S., Niwayama S. 1959. An agar plate diffusion method using *HeLa cells* for antitumor screening. - *Antibiot. Chemother.*, v. 9, p. 497.
- Miyazaki T., Kohno S., Kaku M., Koga H., Yamaguchi K. 1990. Liposome encap-

sulated amphotericin B in the treatment of experimental murine candidiasis. - J. Exp. Med., v. 161, p. 273-281.

Molle G., Dugasa J., Duclohiera H., Spacha G. 1988. Conductance properties of des-Aib-Leu-des-Pheol-Phe-alamethicin in planar lipid bilayers. - Biochim. Biophys. Acta, v. 938, p. 310-314.

Molzahn S.W., Woods R.A. 1972. Polyene resistance and the isolation of sterol mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. - J. Gen. Microbiol., v. 72, № 2, p. 339-348.

Mondovi B., Strom R., Agro A.F. Caiafa P., De Sole P., Bozzi A., Rotilio G., Fanelli A.R. 1971. Effect of polyene antibiotics on *Ehrlich* ascites and Novikoff hepatoma cells. - Cancer Res., v. 31, p. 505.

Montal M., Mueller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 69, p. 3561-3565.

Moonis M., Ahmad I., Bachhawat B.K. 1994. Effect of elimination of phagocytic cells by liposomal dichloromethylene diphosphonate on aspergillosis virulence and toxicity of amphotericin B in mice. - J. Antimicrob. Chemother., v. 33, p. 571-588.

Moore L.E., Neher E. 1976. Fluctuation and relaxation analysis of monazomycin induced conductance in black lipid membranes. - J. Membrane Biol., v. 27, p. 347-362.

Moreau P., Milpied N., Fayette N., Ramee J.F., Harousseau J.L. 1992. Reduced renal toxicity and improved clinical tolerance of amphotericin B mixed with intralipid compared with conventional amphotericin B in neutropenic patients. - J. Antimicrob. Chemother., v. 30, p. 535-541.

Moreno-Bello M., Bonilla-Marin M., Gonzalez-Beltran C. 1988. Distribution of pore sizes in black lipid membranes treated with nystatin. - Biochim. Biophys. Acta, v. 94, p. 97-100.

Morris D.C., Safe S., Subden R.E. 1974. Detection of the ergosterol and episterol isomers lichesterol and fecosterol in nystatin-resistant mutants of *Neurospora crassa*. - Biochem. Genet., v. 12, p. 459-466.

Moulki H., Lematre J., Pierfitte M. 1976. The mode of action of antifungal agents. Effect of horse erythrocyte membranes on amphotericin B. - C. R. Seances Soc. Biol. Fil., v. 170, p. 994-998.

Mpona-Minga M., Hakkou A., Coulon J., Bonaly R. 1988. Influence d'une dose subinhibitrice d'Amphotericine B sur la composition en acides gras et sterols cellulaires de *Candida albicans*. - Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., v. 139, p. 547-555.

Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. 1962. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. - Nature, v. 194, p. 979-980.

Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membrane in aqueous solution. - J. Phys. Chemis., v. 67, p. 534-535.

Mueller P., Rudin D.O. 1963. Induced excitability in reconstructed cell membrane structure. - J. Theoret. Biol., v. 4, p. 268-280.

Mueller P., Rudin D.O. 1967. Development of K^+ - Na^+ discrimination in experimental bimolecular lipid membranes by macrocyclic antibiotics. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 25, p. 398-404.

Mueller P., Rudin D.O. 1968 a. Action potentials induced in bimolecular lipid membranes. - Nature, v. 217, p. 713-719.

Mueller P., Rudin D.O. 1968 b. Resting and action potentials in experimental bi-

molecular lipid membranes. - J. Theoret. Biol., v. 18, p. 222-258.

Mueller P., Rudin D.O. 1969. Translocation in bimolecular lipid membranes: their role in dissipative and conservative bioenergy transductors. - Curr. Top. Bioenerg., v. 3, p. 157-249.

Mueller P. 1975. Membrane excitation through voltage-induced aggregation of channel precursors. - Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 264, p. 247-265.

Mukharjee S., Chandra A.L. 1975. A new antifungal antibiotic produced by a soil *Streptomyces*. - Curr. Sci., v. 44, p. 211.

Mukhopadhyay K., Prasad T., Saini P., Pucadyil T., Chattopadhyay A., Prasad R. 2004. Membrane sphingolipid-ergosterol interaction are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 48, № 5, p. 1778-1787.

Muller R.U., Finkelstein A. 1972. Voltage-dependent conductance induced in thin lipid membranes by monazomycin. - J. Gen. Physiol., v. 60, p. 263-284.

Myers V.B., Hydon D.A. 1972. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. - Biochim. Biophys. Acta, v. 274, p.313-322.

Nadeau P., Gruda I., Medoff G., Brajtburg J. 1982. Relative avidity of etruscomycin to cholesterol and ergosterol. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 21, p. 545-550.

Nair M.P.N., Schwartz S.A. 1982. Immunomodulatory effects of amphotericin-B on cellular cytotoxicity of normal human lymphocytes. - Cell Immunol., v. 70, p. 287-300.

Nakajima Y., Bridgman P. 1981. Absence of filipin-sterol complexes from the membranes of active zones and acetylcholine receptor aggregates at frog neuromuscular junctions. - J. Cell Biol., v. 88, p. 453-458.

Nakamura T., Nishikawa M., Inoue K., Nojima S., Akiyama T., Sankawa U. 1980. Phosphatidylcholine liposomes containing cholesterol analogues with side chains of various lengths. - Chem. Phys. Lipids, v. 26, p. 101-110.

Nakano H. 1961 a. Studies on trichomycin. V. - J. Antibiot., v. A14, p. 68-71.

Nakano H. 1961 b. Studies on trichomycin. VI. - J. Antibiot., v. A14, p. 72.

Nakashima T., Kuwano M., Matsui K., Komiyama S., Hiroto I. 1974. Potentiation of bleomycin by an antifungal polyene, pentamycin, in transformed animal cells... Cancer Res., v. 34, p. 3258-3261.

Nakazawa K. 1965. Studies on *Streptomyces eurocidin*, and antibiotic produced by *Streptomyces albireticuli*. - J. Agr. Chem. Soc., v. 29, p. 650-652.

Naoto O., Shoshichi N., Keizo T. 1980. Selective release of nonelectrolytes from liposomes upon perturbation of bilayers by temperature change or polyene antibiotics. - Biochim. Biophys. Acta, v. 595, № 2, p. 277-290.

Narasimhachari N., Swami M.B. 1968. Chemistry of dermostatin. II. A new pentaene structure. - Chemotherapy, v. 13, p. 181.

Narasimhachari N., Swami M.B. 1970. Dermostatin: a revised hexaene structure. - J. Antibiot., v. A23, p. 566.

Neher E., Stevens C.F. 1977. Conductance fluctuations and ionic pores in membranes. - Ann. Rev. Biophys. Bioenerg., v. 6, p. 341-364.

Nelson L., Anholt R., Linstrom L., Montal M. 1980. Reconstitution of purified acetylcholine receptors with functional ion channels in planar lipid bilayers. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA., v. 77, p. 3057-3061.

Neseman G., Prave P., Sukatsch D., Vertesy L. 1972. Ein polyen-antibiotikum aus bacterien. - Naturwissenschaften, v. 59, p. 81-82.

Neumke B. 1978. I/f noise in membranes. - Biophys. Struct. Mechanism, v. 4, p.

- New B.R., Chance M.L., Heath S. 1981. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. - J. Antimicrob. Chemother., v. 8, p. 371-381.
- Nicolaou K.C., Chakraborty T.K., Ogawa Y., Daines R.A., Simpkins N.S., Furst G.T. 1988. Chemistry of amphotericin B. Degradation studies and preparation of amphoteronolide B. - J. Am. Chem. Soc., v. 110, p. 4660-4672.
- Nishikiori T., Masuma R., Oiwa R., Katagiri M., Awaya J., Iwai Y., Omura S. 1978. Aurantinin, a new antibiotic of bacterial origin. - J. Antibiot., v. 31, p. 525.
- Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino N. 1984. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. - Nature, v. 312, p. 121-127.
- Nolan W.G., Bishop D.G. 1978. Effect of amphotericin B on membrane-associated photosynthetic reactions in maize chloroplasts. - Archiv. Biochem. Biophys., v. 190, p. 473-482.
- Norman A., Demel R., De Kruyff B., Van Deenen L.L.M. 1972 a. Studies on the biological properties of polyene antibiotics. Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. - J. Biol. Chem., v. 247, № 6, p. 1918-1929.
- Norman A., Demel R., De Kruyff B., Geurts van Kessel W., Van Deenen L.L.M. 1972 b. Studies on the biological properties of polyene antibiotics: comparison of other polyenes with filipin in their ability to interact specifically with sterol. - Biochim. Biophys. Acta, v. 290, № 1, p. 1-14.
- Norman A.W., Spielvogel A.M., Wong R.G. 1976. Polyene antibiotic - sterol interaction. - Adv. Lipid Research., v. 14, p. 145-171.
- Notario V., Gale E.F., Kerridge D., Wayman F. 1982. Phenotypic resistance to amphotericin B in *Candida albicans*: relationship to glucan metabolism. - J. Gen. Microbiol., v. 128, p. 761-771.
- Nozawa Y., Kitajima Y., Sekiya T., Ito Y. 1974. Ultrastructural alterations induced by amphotericin B in the plasma membrane of *Epidermophyton floccosum* as revealed by freeze-etch electron microscopy. - Biochim. Biophys. Acta, v. 367, p. 32-38.
- Ockman N. 1974. Reflection spectra from monolayers of amphotericin B and amphotericin B-cholesterol spread on water. - Biochim. Biophys. Acta, v. 345, p. 263-282.
- Odds F.C. 1982. Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi in vitro. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 22, p. 763-770.
- Oehlschlager A.C., Laks P. 1980. Nitroxide spin-probe study of amphotericin B-ergosterol interaction in egg phosphatidylcholine multilayers. - Can. J. Biochem., v. 58, p. 978-985.
- Ogata K., Igarashi M., Miyake A., Yamamoto H. 1957. Mycelin IMO, a new antibiotic. - Japanese Patent № 5898.
- Ogata K., Igarashi S., Nakao Y. 1958. Culture medium for separation of bacteria from mixture of bacteria, yeasts and moulds. - Japanese Patent № 9245.
- Ogawa H., Ito T., Inoue S., Nishio M. 1960. Chemical study of moldcidin B and its identification with pentamycin. - J. Antibiot., v. 13 A, p. 353-355.
- Ohno K., Nakano C., Eda I., Takeshita K. 1984. Fibroblasts from patients with myotonic muscular dystrophy: cholesterol requirement for proliferation and sensitivity to polyene antibiotics. - Brain Dev., v. 6, p. 566-570.
- Oku N., Noljima S., Inoue K. 1980. Selective release of non-electrolytes from lipo-

- somes upon perturbation of bilayers by temperature change or polyene antibiotics. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 595, p. 277-290.
- Oldfield E., Chapman D. 1972. Dynamics of lipids in membranes: heterogeneity and the role of cholesterol. - *FEBS Lett.*, v. 23, № 3, p. 285-297.
- Olds G.R., Stewart S.J., Ellner J.J. 1981. Amphotericin B-induced resistance to *Schistosoma mansoni*. - *J. Immunol.*, v.5, p. 1667-1670.
- Olsen S.J., Swerdel M.R., Blue B., Clark J.N., Bonner D.P. 1991. Tissue distribution of amphotericin B lipid complex in laboratory animals. - *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 43, p. 831-835.
- Omura S., Tanaka H. 1984. In *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice*. - Omura S., Ed.; Academic Press: New York, p. 351-404.
- O'Neill L.J., Miller J.G., Peterson N.O. 1986. Evidence for nystatin micelles in L-cell membranes from fluorescence photo-bleaching measurements of diffusion. - *Biochemistry*, v. 25, p. 177-181.
- Onki K., Nozawa Y., Ohnishi S. 1979. Interaction of polyene antibiotics with sterols in phosphatidylcholine bilayer membranes as studied by spin probes. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 554, p. 39-50.
- Oranusi N.A., Trinci A.P. 1985. - Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B. - *Microbios*, v. 43, p. 17-30.
- Orci L., Miller R.G., Montesano R., Perrelet A., Amherdt M., Vassali P. 1980. Opposite polarity of filipin-induced deformations in the membrane of condensing vacuoles and zymogen granules. - *Science*, v. 210, N 4473, p. 1019-1021.
- Orci L., Montesano R., Meda P., Malaisse-Lagae F., Brown D., Perrelet A., Vassali P. 1981. Heterogeneous distribution of filip-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. - *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, v. 78, N 1, p. 293-297.
- Orci L., Brown D., Amherdt M., Perrelet A. 1982. Distribution of intramembrane particles and filipin-sterol complexes in plasma membranes of kidney. I. Corpuscle of Malpighi. - *Lab. Invest.*, v. 46, N 6, p 45-553.
- Oroshnik W., Vining L.C., Mebane A.D., Taber W.A. 1955. Polyene antibiotics. - *Science*, v. 121, p. 147-148.
- Oroshnik W., Mebane A.D. 1963. - The polyene antifungal antibiotics.- *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, v. 21, p. 17-79.
- Osaka, K., Ritov, V.B., Bernardo, J.F., Branch, R.A., Kagan, V.E. 1997. Amphotericin B protects cis-parinaric acid against peroxy radical-induced oxidation: amphotericin B as an antioxidant. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 41, p. 743-747.
- Osteux R., Tran-Van-Ky, Biguet J. 1958. Contribution to the study of the mode of action of nystatin on *Candida albicans*. - *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, v. 247, № 25, p. 2475-2478.
- Ostrosky-Zeichner L., Bazemore S., Paetznick V.L., Rodriguez J.R., Chen E., Wallace T., Cossum P., Rex J.H. 2001. Differential antifungal activity of isomeric forms of nystatin. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 2781-2786.
- Oswald E.J., Reedy R.J., Randall W.A. 1956. An antifungal agent, 1968, produced by a new *Streptomyces species*. - *Antibiot. Ann.*, 1955-1956, p.236-239.
- Otake T., Miyano K., Moti H., Morimoto M., Ueba N., Kunita N., Nakashima H.. Kurimura T. 1991. Anti-HIV-1 activity of sulfated amphotericin B in vitro. - *Antiviral Res.*, v. 16, p. 243-255.
- Ozols R.F., Hogan W.M., Grotzinger K.R., McCoy W., Young R.C. 1983. Effects

of amphotericin B on adriamycin and melphalan cytotoxicity in human and murine ovarian carcinoma and in L1210 leukemia. - Cancer Res., v. 43, p. 959-964.

Pahls S., Schaffner A. 1994. Comparison of the activity of free and liposomal amphotericin B in vitro and in a model of systemic candidiasis and localized murine candidiasis. - J. Antimicrob. Chemother., v. 33, p. 73-81.

Pal A., Nandi P. 1964. A new antifungal antibiotic *Streptomyces* sp. AC₂435. - Experientia, v. 20, p. 321.

Palacios J., Serrano R. 1978. Proton permeability induced by polyene antibiotics. A plausible mechanism for their inhibition of maltose fermentation in yeast. - FEBS Lett., v. 91, p. 198-201.

Panday R.C., Rinehart K.L. 1970. Polyene antibiotics. V. Characterization of components of the filipin complex. - J. Antibiot., v. 23, p. 414-417.

Panday R.C., German V.F., Nishikawa Y., Rinehart K.L. 1971. Polyene antibiotics. II. The structure of tetrin A. - J. Amer. Chem. Soc., v. 93, p. 3738-3747.

Panday R.C., Narasimhachari N., Rinehart K.L., Millington D.S. 1972. Polyene antibiotics. IV. The structure of chainin. - J. Amer. Chem. Soc., v. 94, p. 4306-4310.

Pandey R.C., Guenther E.C., Aszalos A.A., Brajburg J. 1982. Physicochemical and biological comparison of polyene macrolide antibiotics fungichromin, lagozin and cogramycin. - J. Antibiot. (Tokyo), v. 35, p. 988-996.

Panosian C.B., Barza M., Szoka F., Wyler F. 1984. Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with liposome-intercalated amphotericin B. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 25, p. 655-656.

Pant H.C., Rosenberg B. 1971. Electrochemistry on a bimolecular lipid membrane. - Chem. Phys. Lipids, v. 6, p. 39-45.

Patterson T.F., Miniter P., Dijkstra J., Szoka F.C., Jr., Ryan J.L., Andriole V.T. 1989. Treatment of experimental invasive aspergillosis with novel amphotericin B/cholesterol sulfate complexes. - J. Infect. Dis., v. 159, p. 717-724.

Pawlak J., Zieliński J., Kolodziejczyk P., Golik J., Gumenisk J., Jzereczek E., Borowski E. 1979. The structure of lienomycin, a novel type of polyene macrolide antibiotic. - Tetrahedron Letters, № 17, p. 1533-1536.

Pawlak J., Zieliński J., Golik J., Gumieniak J., Borowski E. 1980. The structure of lienomycin, a pentaene macrolide antitumor antibiotic. I. The structure of the carbon skeleton and the location of functionalities. - J. Antibiot. (Tokyo), v. 33, p. 989-997.

Payne N.I., Cosgrove R.F., Green A.P., Liu L. 1987. In vivo studies of amphotericin B liposomes derived from proliposomes: effect of formulation on toxicity and tissue disposition of the drug in mice. - J. Pharm. Pharmacol., v. 39, p. 24-28.

Pearson R., Sousa A. 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. - Clin. Infect. Dis., v. 22, p. 1-11.

Peña A. 1975. Studies on the mechanism of K⁺ transport in yeast. - Arch. Biochem. Biophys., v. 167, p. 397-409.

Perfect J.R., Pickard W.W., Hunt D.L., Palmer B., Schell W.A. 1991. The use of amphotericin B in nosomial fungal infection. - Rev. Infect. Dis., v. 13, p. 474-479.

Perfect J.R., Wright K.A. 1994. Amphotericin B lipid complex in the treatment of experimental cryptococcal meningitis and disseminated candidiasis. - J. Antimicrob. Chemother., v. 33, p. 73-81.

Perkins W.R., Minchey S.R., Boni L.T., Swenson C.E., Popescu M.C., Pasternack R.F., Janoff A.S. 1992. Amphotericin B-phospholipid interactions responsible for reduced mammalian cell toxicity. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1107, p. 271-282.

Perritt A.M., Phillips A.W., Robinson T. 1960. Sterol protection against pimaricin in *Saccharomyces cerevisiae*. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 2, № 6, p. 432-435.

Pesti M., Novak E.K., Ferenczy I., Svoboda A. 1981. Freeze fracture electron microscopical investigation of *Candida albicans* cells sensitive and resistant to nystatin. - Sabouraudia, v. 19, p. 17-26.

Pesti M., Paku S., Novak E.K. 1982. Some characteristics of nystatin-resistant sterol mutants of *Candida albicans*. - Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung., v. 29, p. 55-66.

Petit C., Cheron M., Joly V., Rodrigues J., Bolard J., Gaboriau F. 1998. In-vivo therapeutic efficacy in experimental murine mycoses of a new formulation of deoxycholate-amphotericin B obtained by mild heating. - J. Antimicrob. Chemother., v. 42, p. 779 - 785.

Petit C., Yardley V., Gaborian F., Bolard J., Croft S. 1999. Activity of a heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (Fungizone) against *Leishmania donovani*. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 43, p. 390 - 392.

Pfaller M.A., Krogstad D.J. 1981. Imidazole and polyene activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. - J. Infect. Dis., v. 44, p. 372-375.

Pfaller M.A., Bale M., Buschelman B., Lancaster M., Espinel-Ingroff A., Rex J.H., Rinaldi M.G. 1994. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for in vitro susceptibility testing of yeast isolates by national committee for clinical laboratory standards. Proposed standard methods - J. Clin. Microbiol., v. 32, p. 1650-1653.

Pierce A.M., Pierce H.D., Unrau A.M., Oehlschlager A.C. 1978 a. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants.- Canad. J. Biochem., v. 56, p. 135-142.

Pierce H.D. Jr, Unrau A.M., Oehlschlager A.C. 1978 b. Investigation of polyene macrolide antibiotic-induced permeability changes in vesicles by 31P nuclear magnetic resonance. - Can. J. Biochem., v. 56, p. 801-807.

Pimenta P.F., De Souza W. 1984. Localization of filipin-sterol complexes in cell membranes of eosinophils. - Histochemistry, v. 80, N 6, p. 563-567.

Pisarik L., Jo!y V., Jullien S., Carbon C., Yeni P. 1990. Reduction of free amphotericin B acute toxicity in mice after intravenous administration of empty liposomes. - J. Infect. Dis., v. 161, p. 1042-1044.

Pleskoff O., Seman M., Alizon M. 1995. Amphotericin B derivative blocks human immunodeficiency virus type 1 entry after CD4 binding: effect on virus-cell fusion but not on cell-cell fusion. - J. Virol., v. 69, p. 570-574.

Pocchiari M., Schmittinger S., Masullo C. 1987. Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. - J. Gen. Virol., v. 68, p. 219-223.

Pocchiari M., Casaccia P., Ladogana A. 1989. Amphotericin B: A novel class of anti-scrapie drugs. - J. Infec. Dis., v. 160, № 5, p. 795-802.

Podo F., Di Blasi R., Crifo C., Strom R. 1979. PMR studies of phosphatidylcholine-cholesterol vesicles interacting with lucensomycin. - Physiol. Chem. Phys., v. 11, p. 125-133.

Pontani D.R., Sun D., Brann J.W. 1989. Inhibition of HIV replication by liposomal encapsulated amphotericin B.- Antiviral Research, v. 11, № 3, p. 119-126.

Pooler J.P. 1985. The kinetics of colloid osmotic hemolysis. I. Nystatin-induced ly-

sis. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 812, p. 193-198.

Pourshafie M., Morand S., Virion A., Rakotomanga M., Dupuy C., Loiseau P. 2004. Cloning of S-adenosyl-L-methionine: C-24-{delta}-sterol-methyltransferase (ERG6) from *Leishmania donovani* and characterization of mRNAs in wild-type and amphotericin B-resistant promastigotes. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 2409-2414.

Powderly W.G., Kobayashi G.S., Herzig G.P., Medoff G. 1988. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. - *Am. J. Med.*, v. 84, p. 826-832.

Powell M.J. 1965. - *Computer J.*, v. 7, p. 303-307.

Presant C.A., Carr D. 1980. Amphotericin B (Fungizone) enhancement of nitrogen mustard uptake by human tumor cells. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 93, p. 1067-1073.

Pressman B.C. 1965. Induced active transport of ions in mitochondria. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 53, p. 1076-1083.

Pridham T.G., Shotwell O.L., Stodola F.H., Lindenfelser L.A., Benedict R.G., Jackson R.W. 1956. Antibiotics against plant disease. II. Effective agents produced by *Streptomyces cinnamomeus forma azacoluta f. nov.* - *Phytopathology*, v. 46, p. 575-581.

Prigent Y., Trandinh S., Gary-Bobo C.M. 1980. Proton gradient across membranes of lecithin vesicles as measured by 31P-NMR: asymmetrical behaviour of internal and external layers. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 95, p. 1218-1223.

Proffitt R.T., Satorius A., Chiang S.M., Sullivan L., Adler-Moore J.P. 1991. Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents. - *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 28, p. 49-61.

Prusiner S.B., Scott M.R., DeArmond S.J., Cohen F.E. 1998. Prion protein biology. - *Cell*, v. 93, p. 337-348.

Pugh D., Cawson R.A. 1980. Calcium, sequestering agents and nystatin--interactions on cell wall morphology and fungistasis of *Candida albicans*. - *Sabouraudia*, v. 18, p. 157-159.

Ragni G., Szybalski W., Borowski E., Schaffner C.P. 1961. N-Acetyl candidin, a water-soluble polyene antibiotic for fungal prophylaxis and decontamination of tissue cultures. - *Antibiot. Chemother.*, v. 10, p. 797-799.

Rahalkar A., Rahalkar P.W., Thirumalachar M.J. 1972. Some tetraene antibiotics from *Chinia* species. - *Hindustan Antibiot. Bull.*, v. 15, p. 1.

Ralph E.D., Khazindar A.M., Barber K.R., Grant C.W.M. 1991. Comparative in vitro effects of liposomal amphotericin B, amphotericin B-deoxycholate, and free amphotericin B against fungal strains determined by using MIC and minimal lethal concentration susceptibility studies and time-kill curves. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 188-191.

Ralph E.D., Barber K.R., Grant C.W.M. 1993. Clinical experience with multilamellar liposomal amphotericin B in patients with proven and suspected fungal infections. - *Scand. J. Infect. Dis.*, v. 23, p. 487-496.

Ramachandran S. 1961. Studies on the mode of action of antibiotics. I. Hamycin. - *Hindust. Antibiot. Bull.*, v. 4, № 2, p. 74-79.

Ramachandran C.N., Chandrasekaran R. 1972. Studies on dipeptide conformation and on peptides with sequences of alternating L- and D- residues with special references to antibiotic and ion transport peptides. - *Progress in Peptide Research*. Gordon. New York, v. 2, p. 195-215.

Ramos H., Romero E., Cohen B.E. 1988 The differential effect of liposomal amphotericin B on human erythrocytes and promastigotes of *Leishmania* sp - Acta Cient. Venez., v. 39, p. 135-139.

Ramos H., Attias de Murciano A., Cohen B.E., Bolard J. 1989. The polyene antibiotic amphotericin B acts as a Ca^{2+} ionophore in sterol-containing liposomes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 982, p. 303-306.

Ramos H., Milhaud J., Cohen B., Bolard J. 1990. Enhanced action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* resulting from heat transformation. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 34, № 8, p. 1584-1589.

Ramos H., Saint-Pierre-Chazalet M., Bolard J., Cohen B. 1994. Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 38, p. 1079-1084.

Ramos H., Brajtburg J., Marques V., Cohen B.E. 1995. Comparison of the leishmanicidal activity of Fungizone liposomal AmB and amphotericin B incorporated into egg lecithin bile salt mixed micelles. - Drugs Exp. Clin. Res., v. 21, p. 211-216.

Rang H.P. 1974. Acetylcholine receptors. - Quart. Rev. Biophys., v. 7, p. 283-299.

Rao T.V., Das S., Prasad R. 1985 a. Effect of phospholipid enrichment on nystatin action: differences in antibiotic sensitivity between in vivo and in vitro conditions. - Microbios., v. 42, p. 145-153.

Rao T.V., Trivedi A., Prasad R. 1985 b. Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity. - Can. J. Microbiol., v. 31, p. 322-326.

Rao, M.R., Olinde, K.D., Markov, A.K. 1997. Protection from amphotericin B-induced lipid peroxidation in rats by fructose-1,6-diphosphate. - Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, v. 95, p. 217-220.

Rapi G. Cocchi P., Belgodere E. 1963. Biologically active, water-soluble derivatives of nystatin-chemical studies. - Chemoterapia, v. 5358, p. 326-343.

Rast D.M., Bartnicki-Garcia S. 1981. Effects of amphotericin B, nystatin, and other polyene antibiotics on chitin synthase. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 1233-1236.

Raubitschek F., Acker R.F., Waksman S.A. 1952. Production of an antifungal agent of the fungicidin type by *Streptomyces aureus*. - Antibiot. Chemother., v. 2, p. 179.

Razin S. 1963. Binding of nystatin by *Mycoplasma* (pleuropneumonia-like organisms). - Biochim. Biophys. Acta, v. 78, № 4, p. 771-773.

Razin S., Argaman M., Avigan J. 1963. Chemical composition of *Mycoplasma* cells and membranes. - J. Gen. Microbiol., v. 33, № 3, p. 477-487.

Readio J.D., Bittman R. 1982. Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester borate complex to sterol. - Biochim. Biophys. Acta, v. 685, p. 219-224.

Resat H, Sungur FA, Baginski M, Borowski E, Aviyente V. 2000. Conformational properties of amphotericin B amide derivatives--impact on selective toxicity. - J. Comput. Aided. Mol. Des., v.14, p. 689-703.

Reuhl K.R., Vapiwala M., Ryzlak M.T., Schaffner C.P. 1993. Comparative neurotoxicities of amphotericin B and its mono-methyl ester derivative in rats. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 37, p. 419-428.

Reusser F. 1967. Biosynthesis of antibiotic U-22,324, a cyclic polypeptide - J. Biol. Chem., v. 242, p. 243-247.

Rhoades E.R., Muchmore H.G. 1960. The effect of amphotericin on respiration of *Cryptococcus*. - Antibiot. Annual., New York, N.Y., Antibiotica, Inc., p. 619-621.

Ribereau-Gayon J., Peyraud E., Lafourcade S., Lafon M. 1958. Mode d'action des antibiotiques sur les levures. - Bull. Soc. Chem. Biol., v. 40, № 1, p. 189-201.

- Ridente Y., Aubard J., Bolard J. 1996. Surface-enhanced resonance Raman and circular dichroism spectra of amphotericin B and its methylester derivative in silver colloidal solutions. - Biospectroscopy, v. 2, p. 1-8.
- Ridente Y., Aubard J., Bolard J. 1999. Absence in amphotericin B-spiked human plasma of the free monomeric drug, as detected by SERS. - FEBS Letters, v. 446, p. 283-286.
- Rinehart K.L., Tucker W.P., Pandey R.C. 1971. Polyene antibiotics. III. The structure of tetrin B. - J. Amer. Chem. Soc., v. 93, p. 3747-3751.
- Ring A. 1986. Brief closures of gramicidin A channels in lipid bilayer membranes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 856, p. 646-653.
- Ringden O., Tollemar J. 1993. Liposomal amphotericin B (AmBisome^R) treatment of invasive fungal infections in immunocompromised children. - Mycoses, v. 36, p. 187-192.
- Ringden O., Andstrom E., Remberger M., Svahn B.M., Tollemar J. 1994. Safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) in 187 transplant recipients treated with cyclosporin. - Bone Marrow Transplant., v. 14, p. 187-192.
- Ristov H., Scharzs Schneider B., Kleinkauf H. 1975. Effect of the peptide antibiotics tyrocidine and the linear gramicidin on RNA synthesis and sporulation of *Bacillus brevis*. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 63, p. 1085-1092.
- Robinson J.M., Karnovsky M.J. 1980. Evaluation of the polyene antibiotic filipin as a cytochemical probe for membrane cholesterol. - J. Histochem. Cytochem., v. 28, p. 161-168.
- Rocheleau H., Saint G., Barwicz J., Gruda I., Therien H.M. 1994. Modulation of amphotericin B activity by association with mannose ester immunopharmacol. - Immunotoxicol., v. 16, p. 419-436.
- Romanini D., Farruggia B., Pico G. 1998. Absorption and fluorescence spectra of polyene antibiotics in the presence of human serum albumin. - Biochem. Mol. Biol. International, v. 44, № 3, p. 595-603.
- Romine W.O., Sherette G.R., Brown G.B., Bradley R.J. 1977. Evidence that nystatin may not form channels in thin lipid membranes. - Biophys. J., v. 17, № 3, p. 269-274.
- Ross J.P. 1959. The effect of the polyene antibiotic fungichromin on the free and combined amino acids of *Verticillium alboatrum*. - Phytopathology, v. 49, № 7, p. 422-425.
- Rosselle G. A., Kaufman C.A. 1978. Amphotericin B and 5-fluorocytosine: in vitro effects on lymphocyte function. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 14, p. 398-402.
- Rozengurt E., Mendoza S. 1980. Monovalent ion fluxes and the control of cell proliferation in cultured fibroblasts. - Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 339, p. 175-190.
- Rubissow J. 1970. Remission of astrocytoma following amphotericin B treatment. - Lancet, v. 1, p. 565.
- Ruckwardt T., Scott A., Scott J., Milulecky P., Hartsel S.C. 1998. Lipid and stress dependence of amphotericin B ion selective channels in sterol-free membranes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1372, p. 283-288.
- Rumler W., Heins S. 1983. Concentration-time relations in the effect of nystatin on *Candida albicans* multiplication. - Mycosen., v. 26, p. 216-220.
- Ruozi P., Siccardi A.G. 1978. Mepartycin, a polyene active on both *Trichomonas* and *Candida*. Lack of mutagenic activity. - Farmaco. Ed. Sci., v. 33, p. 21.
- Russel J.M., Eaton D.C., Brodwick M.S. 1977. Effects of nystatin on membrane

conductance and internal ion activites in Aplysis neurons. – J. Membrane Biol., v. 37, p. 137-156.

Russo R., Nigro L., Minniti S., Montineri A., Gradoni L., Caldeira L., Davidson N. 1996. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). - J. Infect., v. 32, p. 133-137.

Sabra R., Branch R.A. 1990. Amphotericin B nephrotoxicity. - (Review) Drug. Saf., v. 5, p. 94-108.

Saint-Julien L., JoIy V., Seman M., Carbon C., Yeni P. 1992. Activity of MS-8209, a nonester amphotericin B derivative, in treatment of experimental systemic mycoses. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 36, p. 2722-2728.

Saka Y., Mita T. 1998. Interaction of amphotericin B with cholesterol in monolayers, aqueous solutions, and phospholipid bilayers. – J. Biochem., v. 123, p. 798-805.

Sakamoto J.M. 1957. Etude sur antibiotique antifongique. III. La moldcidine A, un nouvel antibiotique produit par les *Streptomyces*. - J. Antibiot., v. 12 A, p. 169-172.

Sakamoto J.M. 1959. Etude sur antibiotique antifongique. II. La cryptocidine A, un nouvel antibiotique produit par les *Streptomyces*. - J. Antibiot., v. 12 A, p. 21.

Salama A., Burger M., Mueller-Eckhardt C. 1989. Acute immune hemolysis induced by a degradation product of amphotericin B. - Blut., v. 58, № 2, p. 59-61.

Sanders S.W., Buchi K.N., Goddard M.S., Lang J.K., Tolman K.G. 1991. Single-dose pharmacokinetics and tolerance of a cholestryl sulfate complex of amphotericin B administered to healthy volunteers. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 35, p. 1029-1034.

Sandman G., Boger P. 1981. Inhibition of photosynthetic electron transport by amphotericin B. - Physiol. Plant., v. 51, № 3, p. 326-328

Santos N., Ter-Ovanesyan E., Zasadzinski J., Prieto M., Castanho M. 1998. Filipin-induced lesions in planar phospholipid bilayers imaged by atomic force microscopy. – Biophys. J., v. 75, p. 1869-1873.

Sarges R., Witkop B. 1964. Gramicidin A. IV. Primary sequence of valine and isoleucine gramicidin A. - J. Amer. Chem. Soc., v. 86, p. 1862-1863.

Sarges R., Witkop B. 1965. Gramicidin A. V. The structure of valine and isoleucine gramicidin A. - J. Amer. Chem. Soc., v. 87, p. 2011-2020.

Sarthou P., Primi D., Cazenave P.A. 1986. B cell triggering properties of a nontoxic derivative of amphotericin B. - J. Immunol., v. 137, p. 2156-2161.

Sauve R., Bamberg E. 1978. I/f noise in black lipid membranes induced by ionic channels formed by chemically dimerized gramicidin A. - J. Membrane Biol., v. 43, p. 317-333.

Schaffner C.P., Borowski E. 1961. Biologically active N-acyl derivatives of polyene macrolide antifungal antibiotics. – Antibiot. Chemother., v. 11, p. 724-732.

Schaffner C.P., Gordon H.W. 1968. The hypocholesterolemic activity of orally administered polyene macrolides. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 61, p. 36.

Schaffner C.P., Mechlinski W. 1972. Polyene macrolide derivatives. II. Physical-chemical properties of polyene macrolide esters and their water-soluble salts. - J. Antibiot., v. 25, p. 259-260.

Schaffner C.P. 1984. Polyene macrolides in clinical practice: pharmacology and other adverse effects. – In: Macrolides antibiotics, chemistry, biology and practice. Omura S (ed) Academic Press, London, p. 457-507.

Schaffner C.P., Plescia O.J., Pontani D., Sun D., Thornton A., Pandey R.C., Sarin P.S. 1986. Anti-viral activity of amphotericin B methyl ester: inhibition of HTLV-III

replication in cell culture. - Biochem. Pharmacol., v. 35, p. 4110-4113.

Schaffner C. 1987. Amphotericin B derivatives. In R.A. Fromling (ed), Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. - J.R. Prous, Barcelona, Spain, p. 595-632.

Schagina L.V., Grinfeldt A.E., Lev A.A. 1978. Interaction of cation fluxes in gramicidin A channels in lipid bilayer membranes. - Nature, v. 273, № 5659, p. 243-245.

Schagina L.V., Grinfeldt A.E., Lev A.A. 1983. Concentration dependence of bidirectional flux ratio as a characteristic of transmembrane ion transporting mechanisms. - J. Membrane Biol., v. 73, p. 203-216.

Schagina L.V., Blasko K., Grinfeldt A.E., Korchev Yu.E., Lev A.A. 1989. Cholesterol-dependent gramicidin A channel inactivation in red blood cell membranes and lipid bilayer membranes. - Biochim. Biophys. Acta, v. 978, p. 145 - 150.

Schell R.E., Tran N.V., Beamhall S. 1989. Amphotericin B-induced changes in renal membrane permeation: a model of nephrotoxicity. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 139, p. 1165-1170.

Schiffman F.J., Klein I. 1977. Rapid induction of amphotericin B sensitivity in L1210 leukaemia cells by liposomes containing ergosterol. - Nature, v. 269, p. 65-66.

Schindler J.J., Warren R.P., Allen S.D., Jackson M.K. 1993. Immunological effects of amphotericin B and liposomal amphotericin B on splenocytes from immune-normal and compromised mice. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 37, p. 2716-2721.

Schlegel R., Thrum H. 1968. Flavomycoin, ein neues antifungales polyen antibioticum. - Experientia, v. 24, p. 11-12.

Schlegel R., Thrum H. 1971 a, b. A new polyene antibiotic, flavomycin. Structural investigations. I. - J. Antibiot., v. 24, p. 360-367, p. 368-374.

Schlegel R., Thrum H., Zielinski J., Borowski E. 1979. The chemical structure of roflamycin, a polyene macrolide antibiotic. - In: International symposium on antibiotics. Abstracts. B-22. Weimar (GDR).

Schlosser E., Gottlieb D. 1966. Sterols and the sensitivity of *Pythium species* to filipin. - J. Bacteriol., v. 91, № 3, p. 1080-1084.

Schmitt H.J., Bernard E.M., Hauser M., Armstrong D. 1988. Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 32, p. 1676-1679.

Schneider E., Haest C.W. M., Plasa G., Deuticke B. 1986. Bacterial cytotoxins, amphotericin B and local anesthetics enhance transbilayer mobility of phospholipids in erythrocyte membranes. Consequences for phospholipid asymmetry. - Biochim. Biophys. Acta, v. 855, p. 325-336.

Schneierson S.S., Amsterdam D., Littman M.L. 1958. Inactivation of amphotericin B, chlorquinaldol, gentian violet and nystatin by bile salts. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., v. 99, № 1, p. 241-244.

Scholer H. J., Polak A. 1984. Antimicrobial Drug Resistanse (Le Brayn, ed.), Academic Press, Orlando, p. 393-459.

Scholz R., Schmitz H., Bucher T., Lampen J.O. 1959. Über die Wirkung von nystatin auf backerhefe. - Biochem. Z., v. 331, p. 71-86.

Schroeder F., Holland J.F., Bieber L.L. 1972. Fluorometric investigations of the interaction of polyene antibiotics with sterols. - Biochemistry, v. 11, p. 3105-3111.

Schroeder F., Holland J.F., Bieber L.L. 1973. Reversible interconversions of sterol-binding and sterol-noubinding forms of filipin as determinated by fluoremetric and light-

- scattering properties. - Biochemistry, v. 12, № 23, p. 4785-4789.
- Schultz S.O., Solomon A.K. 1961. Determination of effective hydrodynamic radius of small molecules by viscometry. - J. Gen. Physiol., v. 44, p. 1189.
- Schwarz G., Stankowski S., Rizzo V. 1986. Thermodynamic analysis of incorporation and aggregation in a membrane: application to the pore-forming peptide alamethicin. - Biochim. Biophys. Acta, v. 861, p. 141-151.
- Sculier J.P., Delcroix C., Brassine C., Ladurant C., Hollaert C. 1989. Pharmacokinetics of amphotericin B in patients receiving repeated intravenous high doses of amphotericin B entrapped into sonicated liposomes. - J. Liposome Res., v. 1, p. 151-166.
- Seaman J., Boer C., Wilkinson R., De Jing J., De Wilde E., Sondrop E., Davidson R. 1995. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. - Clin. Infect. Dis., v. 21, p. 188-193.
- Seay T.E., Inman F.P. 1982. Amphotericin B modifications of peripheral blood lymphocyte and tonsil lymphocyte responses to concanavalin A. - Int. J. Immunopharmacol., v. 4, p. 549-556.
- Sehgal S.N., Baker H., Vezina C. 1975. Rapamycin (AY-22989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. - J. Antibiot., v. 28, p. 727.
- Sehgal S.N., Blazekovic T.M., Vezina C. 1976. Rapamycin and process of preparation. - USA Patent № 616695.
- Seki N., Toyama Y., Naqano T. 1992. Changes in the distribution of filipin-sterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. - Anat. Rec., v. 232, N 2, p. 221-230.
- Sekiya T., Kitajima Y., Nozawa Y. 1979. Effects of lipid-phase separation on the filipin action on membranes of ergosterol-replaced *Tetrahymena cells*, as studied by freeze-fracture electron microscopy. - Biochim. Biophys. Acta, v. 550, p. 269-278.
- Sekiya T., Yano K., Nozawa Y. 1982. Effects of amphotericin B and its methyl ester on plasma membranes of *Candida albicans* and erythrocytes as examined by freeze-fracture electron microscopy. - Sabouraudia, v. 20, p. 303-311.
- Selvam M.P., Bilay R.A., Geyer S., Buck S.M., Pollock L., Mayner R.E., Epstein J.S. 1993. Inhibition of HIV-1 replication in H9 cells by nystatin-A compared with other antiviral agents. - AIDS Res. Hum. Retroviruses, v. 9, p. 475-481.
- Seneca H., Bergendahl E. 1955. Toxicity of antibiotics to snails. - Antibiot. Chemother., v. 5, p. 737-741.
- Sepkowitz K.A. 2002. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. - Clin. Infect. Dis., v. 34, p. 1098-1107.
- Sergeev P.V., Romanenko I.M., Ukhina T.V., Chukaev S.A. 1993. Effects of ultrasound on the polyene antibiotic amphotericin B and their combination on biomembranes of *Yeastlike Candida* fungi. - Bull. Exp. Biol. Med., v. 116, № 10, p. 1248-1250.
- Sessa G., Weismann G. 1966. Effect of polyene antibiotics on artificial liposomes. - Federation Proc., v. 25, № 2, p. 358.
- Sessa G., Weismann G. 1967. Effect of polyene antibiotics on phospholipid spherules containing varying amounts of chared components. - Biochim. Biophys. Acta, v. 135, № 3, p. 416-426.
- Sessa G., Weismann G. 1968. Effect of four components of the polyene antibiotic, filipin, on phospholipid spherules (liposomes) and erythrocytes. - J. Biol. Chem., v. 243, № 16, p. 4364-4371.
- Shapovalov V.L., Kotova E.A., Rokitskaya T.I., Antonenko Y.N. 1999. Effect of gramicidin A on the dipole potential of phospholipid membranes. - Biophys. J., v. 77, p.

- Shaw P.D., Allam A.M., Gottlieb D. 1964. Effect of filipin on the terminal electron transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. – Biochim. Biophys. Acta, v. 89, № 1, p. 33-41.
- Shell R., Tran N., Bamhall J. 1989. Amphotericin B induced changes in renal membrane permeation: A model of nephrotoxicity. - Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 159, № 3, p. 1165 – 1170.
- Shenin Yu.D., Belakhov V. V., Araviiskii R. A. 1993. Nystatin: Methods of preparation, search for derivatives, and prospects for medicinal use (review). – Pharm. Chem. J., v. 27, p. 84-92.
- Shibata M., Honlo M., Tokiu Y., Nakasawa K. 1954. On a new antifungal and anti-yeast substance, candimycin, produced by a *Streptomyces*. - J. Antibiot., v. 7B, p. 168.
- Shirley S.F., Little J.R. 1979 a. Immunopotentiating effects of amphotericin B. I. Enhanced contact sensitivity in mice. – J. Immunol., v. 123, p. 2878-2882.
- Shirley S.F., Little J.R. 1979 b. Immunopotentiating effects of amphotericin B. II. Enhanced in vitro proliferative responses of murine lymphocytes. – J. Immunol., v. 123, p. 2883-2889.
- Shockman G.D., Lampen J.O. 1962. Inhibition by antibiotics of the growth of bacterial and yeast protoplast. - J. Bacteriol., v. 84, № 3, p. 508-512.
- Shvinka N., Caffier G. 1994. Cation conductance and efflux induced by polyene antibiotics in the membrane of skeletal muscle fiber. – Biophys. J., v. 67, p. 143-152.
- Shvinka N., Caffier G. 1995. Nystatin-mycoheptin – and levorin-induced conductance in the membrane of frog skeletal muscle fibres. - Eur. Biophys. J., v. 24, p. 23-30.
- Shvinka N. 2001. Channel-formation in muscle fibre membrane compared to artificial bilayer membranes. - Proc. Latv. Acad. Sci., v. 56. P. 57-60.
- Siegel E.B. 1977. Measurement of polyene antibiotic-mediated erythrocyte damage by release of hemoglobin and radioactive chromium. – Antimicrob. Agents Chemother., v. 11, p. 675-658.
- Silberstein A. 1998. Conformational analysis of amphotericin B – cholesterol channel complex. - J. Membrane Biol., v. 162, p. 117-126.
- Simic M. 1988,. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. - Mutat.Res., v. 202, p. 377-386.
- Singer M.A. 1975. Interaction of amphotericin B and nystatin with phospholipid bilayers membranes: effect of cholesterol. – Can. J. Physiol. Pharmacol., v. 53, p. 1072-1079.
- Singh M., Jayakumar A., Prasad R. 1979. Lipid composition and polyene antibiotic sensitivity in isolates of *Candida albicans*. - Microbios, v. 24, p. 7-17.
- Slayman C.L., Slayman C.W. 1962. Measurement of membrane potentials in *Neurospora*. - Science, v. 136, p. 876-877.
- Smeby R.R., Leben C., Keitt G.W., Strong P.M. 1952. Production and purification of the antibiotic helixin. – Phytopathology, v. 42, p. 506.
- Soeda M., Fujita H. 1959 a. Akitamycin, an antifungal antibiotic. – J. Antibiot., v. 12B, p. 293.
- Soeda M., Fujita H. 1959 b. An antifungal antibiotic, eurotin A. – J. Antibiot., v. 12B, p. 368.
- Sokol-Anderson M., Brajburg J., Medoff G. 1986. Amphotericin B induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. - J. Infect. Dis., v. 154, p. 76-83.
- Soll A.H. 1967. A new approach to molecular configuration applied to aqueous pore transport. - J. Gen. Physiol., v. 50, p. 2565.

- Souza L.C., Maranhao R.C., Schreier S., Campa A. 1993. In vitro and in vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with triglyceride-rich emulsion. - J. Antimicrob. Chemother., v. 32, p. 123-132.
- Sowiński P., Gariboldi P., Czerwiński A., Borowski E. 1989. The structure of vacidin A, an aromatic heptaene macrolide antibiotic. I. Complete assignment of the 1H NMR spectrum and geometry of the polyene chromophore. - J Antibiot. (Tokyo), v. 42, p. 1631-1638.
- Speller D.C.E., Warnock D.D. 1991. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of systemic fungal infection, Based on paper presented at a symposium in Stratford-on-Avon, UK, March. - J. Antimicrob. Chemother., p. 28, Suppl. B.
- Srivastava R.C., Sharma R.K., Tandon A., Bhise S.B. 1985. Transport through liquid membrane bilayers generated by lecithin, cholesterol, and lecithin-cholesterol mixtures-studies in the presence of polyene antibiotics. - J. Coll. Interf. Sci., v. 108, p. 249.
- Stachiewicz E., Quastel J.H. 1963. Amino acid transport in yeast and effects of nystatin. - Canad. J. Biochem., v. 41, p. 397-407.
- Stanley I.C., English M.P. 1965. Some effects of nystatin on the growth of four *Aspergillus* species. - J. Gen. Microbiol., v. 40, p. 107-118.
- Stark G., Strassle M., Takacz Z. 1986. Temperature-jump and voltage-jump experiments at planar lipid membranes support an aggregational (micellar) model of the gramicidin A ion channel. - J. Membrane Biol., v. 89, № 1, p. 23-37.
- Stein S.H., Plut E.J., Shine T.E., Little J.R. 1978. The importance of different murine cell types in the immunopotentiation produced by amphotericin methyl ester. - Cell Immunol., v. 40, p. 211-221.
- Stein S.H., Little J.R., Little K.D. 1987. Parallel inheritance of tissue catalase activity and immunostimulatory action of amphotericin B in inbred mouse strains. - Cell Immunol., v. 105, p. 99-109.
- Stern J.C., Shah M.K., Lucente F.E. 1988. In vitro effectiveness of 13 agents in otomycosis and review of the literature. - Laryngoscope, v. 98, p. 1173-1177.
- Stephens R.E., Good M. J. 1990. Filipin-sterol complexes in molluscan gill ciliated epithelial cell membranes: intercalation into ciliary necklaces necklaces and induction of gap junctional particle arrays. - Cell Tissue Res., v. 262, N 2, p. 301-306.
- Stevens N.M., Engle C.G., Fisher P.B., Mechlinski W., Schaffner C.P. 1975. In vitro antiherpetic activity of water-soluble amphotericin B methyl ester. - Arch. Virol., v. 48, p. 391-394.
- Stevens C.F. 1984. And now the sodium channel. - Nature, v. 312 (5990), p. 98-99.
- Stevens D.A. 1994. Overview of amphotericin B colloidal dispersion (Amphotericin B). - J. Infect., v. 28 (Suppl. 1), p. 45-49.
- Stewart S.J., Spagnuolo P.J., Ellner J.J. 1981. Generation of suppressor T lymphocytes and monocytes by amphotericin B. - J. Immunol., v. 127, p. 135-139.
- Straub F.B. 1965. - In book: Biochemistry-Budapest. p. 621-625.
- Strauss G. 1981. The interaction of amphotericin B with lipid bilayer vesicles. Determination of binding constants by absorption and fluorescence spectroscopy. - Can. J. Spectrosc., v. 26, p. 95-107.
- Strauss G., Cral F. 1982. Borate complexes of amphotericin B: Polymeric species and aggregates in aqueous solutions. - Biopolymers, v. 21, p. 459-470.
- Strom R., Crifo C., Bozzi A. 1973 a. The interaction of the polyene antibiotic *lucensomycin* with cholesterol in erythrocyte membranes and in model system. I. A fluorometric and spectrophotometric study. - Biophys. J., v. 13, p. 568-580.

- Strom R., Crifo C., Santoro A.S. 1973 b. The interaction of the polyene antibiotic lucensomycin with cholesterol in erythrocyte membranes and in model system. II. Cooperative effects in erythrocyte membranes. - Biophys. J., v. 13, p. 581.
- Strom R., Blumberg W.E., Dale R.E., Crifo C. 1976 a. The interaction of the polyene antibiotic lucensomycin with cholesterol in erythrocyte membranes and in model systems. III. Characterization of spectral parameters. - Biophys. J., v. 16, p. 1297-1314.
- Strom R., Crifo C., Eusebi F., Sabetta F., Oratore A. 1976 b. Stoichiometry of hemolysis by the polyene antibiotic lucensomycin. - Biochim. Biophys. Acta, v. 455, p. 961-972.
- Strom R., Crifo C., Bozzi A. 1979. A comparative study of the hemolytic effect of polyenic antibiotics and of other cholesterol-binding agents. - Biochem. Pharmacol., v. 28, p. 2427-2432.
- Struyk A.P., Hoette I., Drost G., Waisvaz J.M., Van Eek T., Hoogerheide J.C. 1957/1958. Pimaricin, a new antifungal antibiotic. - Antibiot. Ann., p. 878-884.
- Sy M.S., Gambetti P., Wong B.S. 2002. Human prion diseases. - Med. Clin. North Am., v. 86, p. 551-571.
- Sullivan G.W., Carper H.T., Mandell G.L. 1992 a. Lipid complexing decreases amphotericin B inflammatory activation of human neutrophils compared with that of a deoxycholate-suspended preparation of amphotericin B (Fungizone). - Antimicrob. Agents Chemother., v. 36, p. 39-45.
- Sullivan G.W., Carper H.T., Mandell G.L. 1992 b. Pentoxifylline modulates activation of human neutrophils by amphotericin B in vitro. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 36, p. 408-418.
- Sundar S., Murray H.W. 1996. Cure of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with amphotericin B lipid complex. - J. Infect. Dis., v. 173, p. 762-765.
- Sundar S., Agrawal N.K., Sinha P.R., Horwith G.S., Murray H.W. 1997. Short-course, low dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. - Ann. Intern. Med., v. 127, p. 133-137.
- Surarit R., Shepherd M.G. 1987. The effects of azole and polyene antifungals on the plasma membrane enzymes of *Candida albicans*. - J. Med. Vet. Mycol., v. 25, p. 403-412.
- Sutton D., Marini F., Lampen J.O. 1960. Yeast glycolysis: enzyme localization and the site of nystatin action. - Bacteriol. Proc., v. 60, p. 160.
- Sutton D.D., Arnow P.M., Lampen J.O. 1961. Effect of high concentrations of nystatin upon glycolysis and cellular permeability in yeast. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., v. 108, № 1, p. 170-175.
- Suzuki F. 1988. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes during epididymal maturation of golden hamster spermatozoa. - J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res., v. 100, N 1, p. 39-54.
- Swanson B. 1985. Medical use of dimethyl sulphoxide (DMSO). Rev. Clin. Basic Pharm., v. 5, p. 1-33.
- Swart E.A., Romano H.H., Waksman S.A. 1950. Fradicin, an antifungal agent produced by *Streptomyces fradiae*. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 73, p. 376.
- Swenson C., Perkins W., Roberts P., Ahmad I., Stevens R., Stevens D., Janoff A. 1998. In vitro and in vivo antifungal activity of amphotericin B lipid complex: are phospholipases important? - Antimicrob. Agents Chemother., v. 42, № 4, p. 767-771.
- Synak R., Zielinski J., Golik J., Borowski E. 1983. The structure of candidoin a

- component of the candidin antibiotic complex. - J. Antibiot., v. 36, p. 1415-1417.
- Szoka F.C., Milholland D., Barza M. 1987. Effect of lipid composition and liposome size on toxicity and in vitro fungicidal activity of liposomal-intercalated amphotericin B. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 31, p. 421-429.
- Szponarski W., Bolard J. 1987. Temperature-dependent modes for the binding of the polyene antibiotic amphotericin B to human erythrocyte membranes. A circular dichroism study. - Biochim. Biophys. Acta, v. 897, p. 229-237.
- Szponarski W., Wietzerbin J., Borowski E., Gary-Bobo C.M. 1988. Interaction of ¹⁴C labelled amphotericin B derivatives with human erythrocytes: relationship between binding and induced K⁺ leak. - Biochim. Biophys. Acta, v. 938, p. 97-106.
- Taber W.A., Vining L.C., Waksman S.A. 1954. Candidin, a new antifungal antibiotic produced by *Streptomyces viridoflavus*. - Antibiot. Chemother., v. 4, p. 455-461.
- Tabosa do Egito E.S., Fessi H., Appel M., Puisieux F., Bolard J., Devissaguet J.P. 1994. New techniques for preparing submicronic emulsions: Application to amphotericin B. S.T.P. - Pharma. Sci., v. 4, p. 155-162.
- Tabosa do Egito E.S., Appel M., Fessi H., Barratt G., Puisieux F., Devissaguet J-P. 1995. In-vitro and in-vivo evaluation of a new amphotericin B emulsion-based delivery system. - J. Antimicrob. Chemother., v. 38, p. 485-497.
- Tabosa do Egito E.S., Fessi H., Appel M., Barratt G., Legrand P., Bolard J., Devissaguet J.P. 1996. A morphological study of an amphotericin B emulsion-based delivery system. - Int. J. Pharm., v. 145, p. 17-27.
- Taguchi H., Nakano A. 1957. (Kakko karakyguuem). - J. Ferm. Technol., № 35, p. 145.
- Takahashi I. 1953. A new antifungal substance "flavacid". Studies on the antibiotic substances from *Actinomycetes*. XXVII. - J. Antibiot., v. A6, p. 117.
- Takemoto et al. 1964. - Japanese Patent № 7394.
- Takeo K. 1985. Resistance of the stationary-phase plasma membrane of *Candida albicans* to filipin-induced deformation. - FEMS Microbiol. Lett., v. 27, p. 73-77.
- Tanaka R., Teruya A., Morita H. 1973. Isolation and properties of 5'-mononucleotidase from a membrane fraction of bovine cerebral cortex. - Biochim. Biophys. Acta., v. 293, p. 842-849.
- Tanaka M., Takahashi M., Kuwahara E., Koyama O., Ohkubo K., Yotsuyanagi T. 1992. Effect of glycyrrhizinate on dissolution behavior and rectal absorption of amphotericin B in rabbits. - Chem. Pharm. Bull., v. 40, p. 1559-1562.
- Tancrede P., Barwicz J., Jutras S., Gruda I. 1990. The effect of surfactants on the aggregation state of amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1030, p. 289-295.
- Tärnvik A., Ansehn S. 1974. Effect of amphotericin B and clotrimazole on lymphocyte stimulation. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 6, p. 529-533.
- Tasset C., Goethals F., Preat V., Roland M. 1989. Effect of ployoxyethyleneglycol (24) cholesterol on the solubility, toxicity and activity of amphotericin B. - Int. J. Pharm., v. 58, p. 41-48.
- Tasset C., Preat V., Roland M. 1991. The influence of Myrj 59 on the solubility, toxicity and activity of amphotericin B. - J. Pharm. Pharmacol., v. 43, p. 297-302.
- Tasset C., Preat V., Roland M. 1992. Formulations galéniques d'amphotéricine B. - J. Pharm. Belg., v. 47, p. 523-536.
- Taylor R. E. 1974. Exitable membranes. - Ann. Rev. Phys. Chem., v. 25, p. 387-405.
- Taylor R.L., Williams D.M., Craven P.C., Graybil J.R., Drutz D.J., Magee W.E.

1982. Amphotericin B in liposomes: a novel therapy for histoplasmosis. - Annu. Rev. Respir. Dis., v. 125, p. 610-611.

Taylor M. 1987. Physico-chemical principles in low temperature biology. - In: The Effects of low temperatures on biological systems (Grout B. and Morris G.), Edward Arnold.

Taylor A.W., Costello B.J., Hunter P.A., Maclanand W.S., Shanks C.T. 1993. Synthesis and antifungal selectivity of new derivatives of amphotericin B modified at C, 13 position. - J. Antobiot., v. 46, p. 486-493.

Teerlink T., De Kruyff B., Demel R. 1980. The action of pimaricin, etruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content. - Biochim. Biophys. Acta, v. 599, № 2, p. 484-492.

Thadee A.S., Faivre-Amiot. 1960. Isolement et proprietes physico-chimiques d'un nouvel antibiotique antifongique. - C. R. Acad. Sci., v. 250, p. 1730.

Thakur C.P., Pandey A.K., Sinha G.P., Roy S., Behbehani K., Olliario P. 1996. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. - Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 90, p. 319-322.

Thirumalachar M., Menon S.K., Bhatt V.V. 1961. Hamycin. I. Discovery and biological studies. - Hindustan Antibiot. Bull., v. 3, p. 136-138.

Thirumalachar M., Menon S.K. 1962. Dermostatin, a new antifungal antibiotic. I. Microbiological studies. - Hindustan Antibiot. Bull., v. 4, p. 106.

Thirumalachar M., Rahalkar P.W., Sukapure R.S., Gopalkrishnan K.S. 1964. Aureofungin, a new heptaene antibiotic. I. Microbiological studies. - Hindustan Antibiot. Bull., v. 6, p. 108-111.

Thirumalachar M. 1971. A new antifungal-antiprotozoal, antibiotic. - Hindustan Antibiot. Bull., v. 13, p. 98.

Thirumalachar M., Rahalkar P.W. 1971. Hexin, an undescribed hexaene antibiotic. - Hindustan Antibiot. Bull., v. 14, p. 75.

Thirumalachar M., Rahalkar P.W., Deshmukh P.V. 1971. Two amphoteric tetraenes with broad-spectrum antimicrobial activity. - Hindustan Antibiot. Bull., v. 13, p. 67.

Thomas A.H. 1976. Analysis and assay of polyene antifungal antibiotics. - Analyst., v. 101, p. 321-340.

Thomas A.H., Newland P., Sharma N.R. 1982. The heterogeneous composition of pharmaceutical-grade nystatin. - Analyst., v. 107, p. 849-854.

Thomas A.H. 1986. Suggested mechanisms for the antimycotic activity of the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. - J. Antimicrob. Chemother., v. 17, p. 269-279.

Thrum H. 1960 a. Die Antibiotika 2814 P und 2814 H, zwei neue antifungale Polyen-Antibiotika. - Naturwissenschaften. Bd. 47, № 20, S. 474.

Thrum H. 1960 b. Stoffwechselprodukte und Antibiotika von *Streptomyces* IA 2814, einem *Streptomyces-netropsis*-stamm. - Planta Med., Bd. 8, S. 376.

Thrum H., Kleinwachter W., Bradler G., Fugner R. 1976. Verfahren zur Gewinnung eines Antibiotikagemisches. - Pat. DDR № 120663.

Tien H.T., Carbone S., Dawisowicz E.A. 1966. Formation of "black" lipid membranes by oxidation products of cholesterol. - Nature, v. 212, № 5063, p. 718-719.

Tien H.T., Diana A.L. 1967. Some properties of bimolecular lipid membranes produced from new lipid solutions. - Nature, v. 215, № 5106, p. 119-120.

Tillack T.W., Kinsky S.C. 1973. A freeze-etch study of the effects of filipin on li-

posomes and human erythrocyte membranes. - *Biochim. Biophys. Acta*, v. 323, p. 43-54.

Tobosa do Egito E., Fessi H., Appel M., Puisieux F., Bolard J., Devissaguet J. 1994. New techniques for preparing submicronic emulsions: application to amphotericin B. - *S.T.P. Pharma – Sciences*, v. 4 (2), p. 155-162.

Tobosa do Egito E., Fessi H., Appel M., Barratt G., Legrand P., Bolard J., Devissaguet J. 1996. A morphological study of an amphotericin B emulsion-based delivery system. - *Internat. J. Pharm.*, v. 145, p. 17-27.

Tollemar J., Ringden O., Tyden G. 1990 a. Liposomal amphotericin B (AmBisome)^R treatment in solid organ and bone marrow transplant recipients. Efficacy and safety evaluation. - *Clin. Transplantation*, v. 4, p. 167-175.

Tollemar J., Duraj R., Ericzon B.G. 1990 b. Liposomal amphotericin B treatment in a 9-month-old liver recipient. - *Mycoses*, v. 33, p. 251-252.

Toshimori K., Higashi R., Oura C. 1985. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in mouse sperm membranes: polyene antibiotic filipin treatment. - *Am. J. Anat.*, v. 174, N 4, p. 455-470.

Toshimori K., Higashi R., Oura C. 1987. Filipin-sterol complexes in golden hamster sperm membranes with special reference to epididymal maturation. - *Cell Tissue Res.*, v. 250, N 3, p. 673-680.

Tosteson D.C., Andreoli T.E., Tieffenberg M., Cook P. 1968. The effect of macrocyclic compounds on cation transport in sheep red cells and thin lipid membranes. - *J. Gen. Physiol.*, v. 51, p. 3739-3849.

Trauble H. 1971. The movement of molecules across lipid membranes: a molecular theory. - *J. Membrane Biol.*, v. 4, p. 193-208.

Tremblay C., Barza M., Fiore C., Szoka F. 1984. Efficacy of liposome-intercalated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. - *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 26, p. 170-173.

Tresner H.D., Backus H.J. 1956. A broadend concept of the characteristics of *Streptomyces hygroscopicus*. - *Appl. Microbiol.*, v. 4, p. 243.

Tsukahara A. 1958. Effect of trichomycin on the respiration of *Candida albicans*. IV. Aminoacid oxidation. - *J. Antibiotics*, v. 11, № 4, p. 169-176.

Tsukahara A., Saito T., Hayashi K. 1959. On growth promoting action of antibiotics on *Candida albicans*, specially on manometrical observation. I. Internal respiration of *Candida albicans* and effect of antibiotics on maltose oxidation. - *J. Antibiotics*, v. 12, № 4, p. 278-285.

Tsukahara T. 1960. Effect of trichomycin on the respiration of *Candida albicans*. VI. The antagonism between riboflavin and trichomycin on the respiratory metabolism of *Candida albicans*. - *J. Antibiotics*, v. 13, № 3, p. 103-107.

Tsukahara T. 1961. Mode of action of trichomycin. III. Antagonistic relationship between riboflavin and trichomycin inhibition on the respiratory metabolism of *Candida albicans*. - *Japan. J. Microbiol.*, v. 5, № 1, p. 41-49.

Twentyman P.R. 1976. The effect of bleomycin and pentamycin in combination on the survival of EMT6 mouse tumour cells in vitro and in vivo. - *Br. J. Cancer*, v. 33, p. 459-464.

Tytell A.A., McCarthy F.J., Fisher W.P., Bolhofer W.A., Charney J. 1955. Funlichromin and fungichromatin: new polyene antifungal agents. - *Antibiot. Ann.*, 1954-1955, p. 716-718.

Umezawa S., Tanaka Y., Ooka M., Shiotsu S. 1958. A new antifungal antibiotic pentamycin. - *J. Antibiot.*, v. 118, p. 26-29.

- Umezawa S., Ooka M., Shiotsu S. 1959. Pentamycin, a new antibiotic. - Japanese Patent 6000 (69).
- Umezawa H. 1967. Index of antibiotics from actinomycetes. Tokyo. Pennsylvania.
- Urban B.W., Hladky S.B. 1979. Ion transport in the simplaest single sile pore. - Biochim. Biophys. Acta, v. 554, p. 410-429.
- Urban B.W., Hladky S.B. 1980. Ion movements in gramicidin pores. An example of single sile transport. - Biochim. Biophys. Acta, v. 602, p. 331-354.
- Uri J., Szilagyi I., Bekesi I. 1959. Grubilin, a new heptaene antifungal antibiotic. - In: Abstr. Communs. Symposium on Antibiotics. Prague, p.40.
- Urry D.W. 1971. The gramicidin A transmembrane channel: on proposed (LD) helix. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA., v. 68, p. 672-676.
- Urry D.W., Goodal M.C., Clickson J.D., Mayers D.F. 1971. The gramicidin A transmembrane channel: characteristics of head-to head dimerized (LD) helices. - Nat. Acad. Sci. USA., v. 68, p. 1907-1911.
- Urry D.W. 1972. A molecular theory of ion-conducting channels: a field dependent transition between conducting and nonconducting conformations. - Nat. Acad. Sci. USA., v. 69, p. 1610-1614.
- Ushakova T.A., Frolova V.I., Kuzovkov A.D. 1970. The structure of aurenin. - Proc. 7th Int. Symp. Chem. Nat. Prod., p. 638.
- US Patent № 2723216 (C.A. 1956, v. 50, 4463).
- US Patent № 2748053 (1958, 26224).
- Utahara R., Okami Y., Nakamura S., Umezawa H. 1954. On a new antifungal substance, mediocidin, and other antifungal substances of *Streptomyces* with three characteristic absorption maxima. - J. Antibiot., v. A7, p. 120.
- Utahara R., Yamazaki H., Okami Y., Umezawa H. 1959. A new source of fradicin-mycelin like antifungal antibiotic. - J. Antibiot., v. 12 A, p. 73.
- Valeriote F., Medoff G., Dieckman J. 1984. Potentiation of cytotoxicity of anticancer agents by several different polyene antibiotics. - J. Natl. Cancer Inst., v. 72, p. 435-439.
- Valero G., Graybill J.R. 1995. Successful treatment of cryptococcal meningitis with amphotericin B colloidal dispersion: report of four cases. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 39, p. 2588-2590.
- Van Etten E.W.M., Van Den Heuvel-de Groot C., Bakker-Woudenberg I.A.J.M. 1993. Efficacies of amphotericin B-deoxycholate (Fungizone) liposomal amphotericin B (AmBisome) and fluconazole in the treatment of systemic candidosis in immunocompetent and leucopenic mice. - J. Antimicrob. Chemother., v. 32, p. 723-739.
- Van Etten E.W.M., Tan Kate M.T., Stearn L.E.T., Bakker-Woudenberg I.A.J.M. 1995. Amphotericin B liposomes with prolonged circulation in blood: in vitro antifungal activity, toxicity, and efficacy in systemic candidiasis in leucopenic mice. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 39, p. 1954-1958.
- Vanden Bossche H., Marichal P., Odds F. 1994. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. - Trends Microbiol., v. 10, p. 393-400.
- Vandeputte J., Wachtel J.L., Stiller E.T. 1955/1956. Amphotericins A and B, anti-fungal antibiotics produced by a *Streptomycte*. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins. - Antibiot. Ann., p. 587-591.
- Van Hoogevest P., De Kruyff B. 1978. Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoyl phosphatidylcholine. A refinement of the model for the formation of pores by amphotericin B in membranes. -

Biochim. Biophys. Acta, v. 511, № 3, p. 397-407.

Van Marle J., Vrensen G.F.J.M. 2000. Cholesterol content of focal opacities and multimellar bodies in the human lens: filipin cytochemistry and freeze fracture. - Ophthalmic Research, v. 32, p. 285-291.

Van Zutphen H., Van Deenen L.L.M., Kinsky S.C. 1969. The action of polyene antibiotics on bilayer lipid membranes. - Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 22, № 4, p. 393-398.

Van Zutphen H., Demel R.A., Norman A.W., Van Deenen L.L.M. 1971. The action of polyene antibiotics on lipid bilayer membranes in the presence of several cations and anions. - Biochim. Biophys. Acta, v. 241, p. 310-330.

Veatch W.R., Fossel E.T., Blout E.R. 1974. The conformation of gramicidin A. - Biochemistry, v. 13, p. 5249-5256.

Veatch W.R., Blout E.R. 1974. The aggregation of gramicidin A in solution. - Biochemistry, v. 13, p. 5257-5264.

Veatch W.R., Stryer L. 1974. The dimeric nature of the gramicidin A transmembrane channel: conductance and fluorescence energy transfer studies of hybrid channels. - J. Mol. Biol., v. 113, p. 89-102.

Veatch W.R. 1976. The structure of the gramicidin A transmembrane channel. - J. Supramol. Struct., v. 5, p. 431-451.

Vecchiarelli A., Verducci G., Perito S., Pucetti P., Marconi P., Bistoni F. 1986. Involvement of host macrophages in the immunoadjuvant activity of amphotericin B in a mouse fungal infection model. - J. Antibiot., v. 39, p. 846-850.

Verkleij A.J., De Kruyff B., Gerritsen W.F., Demel R.A., Van Deenen L.L.M., Vervegaert P.H.J. 1973. Freeze-etch microscopy of erythrocytes, *Acholeplasma laidlawii* cells and liposomal membranes after the action of filipin and amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 291, p. 577-581.

Vertut-Croquin A., Bolard J., Chabbert M., Gary-Bobo C.M. 1983. Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study. - Biochemistry, v. 22, p. 2939-2944.

Vertut-Croquin A., Bolard J., Garry-Bobo C. 1984. Enhancement of amphotericin B selectivity by antibiotic incorporation into gel state vesicles. A circular dichroism and permeability study. - Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 125, p. 360-366.

Vertut-Croquin A., Bolard J., Garry-Bobo C. 1985. Transfer of amphotericin B from gel state vesicles to *Mycoplasma* cells: biphasic action on potassium transport and permeability. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 28, p. 167-171.

Vertut-Croquin A., Brajtburg J., Medoff G. 1986. Two mechanisms of synergism when amphotericin B is used to combination with actinomycin D or 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea against to human promyelocytic leukemia cell line HL-60. - Cancer Res., v. 46, p. 6054-6058.

Vertut-Doi A., Hannaert P., Bolard J. 1988. The polyene antibiotic amphotericin B inhibits the Na^+/K^+ pump of human erythrocytes. - Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 157, p. 692-697.

Vertut-Doi A., Ohnishi S., Bolard J. 1994. The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 38, p. 2373 - 2379.

Vezina C., Kudelski A., Sehgal S.N. 1975. Rapamycin (AY-22, 989), a new anti-fungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active

principle. – J. Antibiot., v. 28, p. 721.

Vilchez R.A., Fung J., Kusne S. 2002. Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview. - Am. J. Transplant., v. 2, p. 575-580.

Vining L.C., Taber W.A. 1957. Separation of endomycins A and B and their identification as members of polyene groups of antifungal antibiotics. – Canadian J. Chem., v. 35, p. 1461.

Viviani M., Rizzardini G., Tortorano A., Fasan M., Capetti A., Roverselli A., Gringeri A., Suter F. 1994. Lipid-based amphotericin B in the treatment of cryptococcoses. - Infection, v. 22, № 2, p. 137-142.

Volpon L., Lancelin J. 2002. Solution NMR structure of five representative glycosylated polyene macrolide antibiotics with a sterol-dependent antifungal activity. - Eur. J. Biochem., v. 269, p. 4533-4541.

Von Saltza M.H., Reid I., Dutcher I.D., Wintersteiner O. 1961. - J. Am. Chem. Soc., v. 83, p. 2785.

Wakaki S., Akanabe S., Hamada K., Asashina T. 1952. Antifungal substances produced by *Actinomyces*: antibiotics from strain C-6. – J. Antibiot., v. B5, p. 680.

Wakaki S., Hamada K., Akanabe S., Asashina T. 1953. Studies on the antifungal antibiotic from *Streptomyces*. IV. On the physico-chemical properties of chromin. – J. Antibiot., v. A6, p. 145.

Waksman S.A., Romano A.N., Lechevalier H., Raubitschek F. 1952. Antifungal antibiotics. – Bull. World Health Organiz., v. 6, p. 163.

Waksman S.A. 1961. The Actinomycetes. V. 1. Nature, occurrence and activities, v. 2. Classification, Identification and description of genera and species. Baltimore.

Waksman S., Lechevalier H. 1962. The Actinomycetes. - Antibiotics of Actinomycetes. Williams and Wilkins, Baltimore, v. 3, p. 53.

Waksman S.A., Lechevalier H.A., Schaffner C.P. 1965. Candicidin and other polyenic antifungal antibiotics. - Bull. W.H.O., v. 33, p. 219-226.

Walker S., Tailor S., Lee M., Louie L., Louie M., Simor A. 1998. Amphotericin B in lipid emulsion: stability, compatibility, and in vitro antifungal activity. – Antimicrob. Agents Chemother., v. 42, № 4, p. 762-766.

Walls E.V., Kay J.E. 1982. Inhibition of proliferation of a murine myeloma cell line and mitogen-stimulated B lymphocytes by the antibiotic amphotericin B (Fungizone). - Immunology, v. 47, p. 115-21.

Walsh T., Yeldandi V., McEvoy M., Gonzalez C., Chanock S., Freifeld A., Seibel N., Whitcomb P., Jarosinski P., Boswell G., Bakersky I., Alak A., Buell D., Barret J., Wilson W. 1998. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. – Antimicrob. Agents Chemother., v. 42, № 9, p. 2391-2398.

Walters D.P., Dutcher I.D., Wintersteiner O. 1957. - J. Am. Chem. Soc., v. 79, p. 5076-5079.

Wang L.H., Fielding R.M., Smith P.C., Guo L.S.S. 1995. Comparative tissue distribution and elimination of amphotericin B colloidal dispersion (Amphotericin B) and Fungizone after repeated dosing in rats. – Pharm. Res., v. 12, p. 275-283.

Wasan K.M., Vadiei K., Lopez-Berestein G., Luke D.R. 1990. Pharmacokinetics, tissue distribution, and toxicity of free and liposomal amphotericin B in diabetic rats. - J. Infect. Dis., v. 161, p. 562-566.

Wasan K.M., Brazeau G., Keyhani A., Hayman A., Lopez-Berestein G. 1993. Roles of liposome composition and temperature in distribution of amphotericin B in serum

lipoproteins. – Antimicrob. Agents Chemother., v. 37, № 2, p. 246-250.

Wasan K.M., Lopez-Berestein G. 1993. The influence of serum lipoproteins on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipophilic drugs and drug carriers. - Arch. Med. Res., v. 24, p. 395-401.

Wasan K.M., Lopez-Berestein G. 1994. Modification of amphotericin B's therapeutic index by increasing its association with serum high-density lipoproteins. - Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 730, p. 93-106.

Wasan K.M., Morton R.E., Rosenblum M.G., Lopez-Berestein G. 1994 a. Decreased toxicity of liposomal amphotericin B due to association of amphotericin B with high-density lipoproteins: role of lipid transfer protein. - J. Pharm. Sci., v. 83, p. 1006-1010.

Wasan K.M., Rosenblum M., Cheung L., Lopez-Berestein G. 1994 b. Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 38, № 2, p. 223-227.

Wasan K. M., Conklin J. S. 1996. Evalution of renal toxicity and antifungal activity of free and liposomal amphotericin B following a single intravenous dose to diabetic rats with systemic candidiasis. – Antimicrob. Agents Chemother., v. 40. p. 1806-1810.

Wasan K.M., Lopez-Berestein G. 1997. Diversity of lipid-based polyene formulations and their behavior in biological systems. – Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v. 16, p. 81-92.

Wasan K.M., Ramaswamy M., Ng S., Wong W., Parrott S., Ojwang J., Wallance T., Cossom P. 1998. Differences in the lipoprotein distribution of free and liposome-associated all-trans-retinoic acid in human, dog, and rat plasma are due to variations in lipoprotein lipid and protein content. – Antimicrob. Agents Chemother., v. 42, № 7, p. 1646-1653.

Washington C., Taylor S.J., Davis S.S. 1988. The structure of colloidal formulations of amphotericin B. - Int. J. Pharm., v. 46, p. 25-30.

Washington C., Lance M., Davis S.S. 1993. Toxicity of amphotericin B emulsion formulations. - J. Antimicrob. Chemother., v. 31, p. 806-808.

Wasserman H.H., Van Verth J.E., Mc Caustland D.J., Borowitz I.J., Kamber B. 1967. The mycotins, polyene macrolides from *Streptomyces ruber*. - J. Amer. Chem. Soc., v. 89, p. 1535-1536.

Weakliem C.L., Fujii G., Chang J.E., Ben-Shaul A., Gelbart W.M. 1995. Effect of tension on pore formation in drug-containing vesicles. – J. Am. Chem. Soc., v. 99, p. 7694-7697.

Weber M.M., Kinsky S.C. 1965. Effect of cholesterol on the sensitivity of *Mycoplasma laidlawii* to the polyene antibiotic filipin.- J. Bacteriol., v. 89, № 2, p. 306-312.

Weinstein M., Wagman G., Marquez J., Patel M.G. 1977. Antibiotic 67-121, a polyene antifungal antibiotic produced by *Actinoplanes caeruleus*. – US Patent № 4027015.

Weinstein A., Berman B. 2002. Topical treatment of common superficial tinea infections. - Am. Fam. Physician, v. 65, p. 2095-2102.

Weismann G., Hirschorn R., Pras M., Bevans V. 1966. Effect of polyene antibiotics on lysosomes. - Federation Proc., v. 25, № 2, p. 358.

Weismann G., Sessa G. 1967. The action of polyene antibiotics on phospholipid-cholesterol structures. - J. Biol. Chem., v. 242, p. 616-625.

Weiss M.R., Levine H.B. 1972. Inactivation of amphotericin B by reducing agents: influences on growth inhibition of *Candida albicans* and lysis of erythrocytes. –

Sabouraudia., v. 10, p. 132-142.

White T. 1997. Increased mRNA levels of ERG 16, CDR, and MDR1 correlate with increased azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 41, p. 1482-1487.

Whitefield G.B., Brock T.D., Amman A., Gottlieb D., Carter H.E. 1955. Filipin, an antifungal antibiotic: isolation and properties. - J. Amer. Chem. Soc., v. 77, p. 4799-4801.

Whyte B.S., Peterson R.P., Hartsel S.C. 1989. Amphotericin B and nystatin show different activities on sterol free vesicles. - Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 164, № 2, p. 609-614.

Wietzerbin J., Szponharski W., Borowski E., Gary-Bobo C.M. 1990. Kinetic of interaction between C-AB derivatives and human erythrocytes: relationship between binding and induced K⁺ leak. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1026, № 1, p. 93-98.

Wilfred G., Selvakumar D. 1983. Nystatin increases hepatic alkaline phosphatase activity. - Biochim. Biophys. Acta, v. 758, p. 191-193.

Winston D.J., Gale R.P., Meyer D.V., Yuong, L.S. 1979. Infectious complications of human bone marrow transplantation. - Medicine (Baltimore), v. 58, p. 1-31.

Witzke N.M., Bittman R. 1984. Dissociation kinetics and equilibrium binding properties of polyene antibiotic complexes with phosphatidylcholine/sterol vesicles. - Biochemistry, v. 23, p. 1668-1674.

Wolf J.E., Massof S.E. 1990. In vivo activation of macrophage oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. - Infect. Immun., v. 58, p. 1296-1300.

Wolf B.D., Hartsel S.C. 1995. Osmotic stress sensitizes sterol-free phospholipid bilayers to the action of amphotericin B. - Biochim. Biophys. Acta, v. 1238, p. 156-162.

Woods R.A. 1971. Nystatin-resistant mutants of yeast: alterations on sterol content. - J. Bacteriol., v. 108, № 1, p. 69-73.

Woods R.A., Bard M., Jackson I.R., Druts D.J. 1974. Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B – resistant funguria. - J. Infect. Dis., v. 129, № 1, p. 53-58.

Wooldridge W.E. 1960. Английский патент № 828792.

Xi Y.G., Ingrosso L., Ladogana A., Masullo C., Pocchiari M. 1992. Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. - Nature, v. 356, p. 219-223.

Yamaguchi H., Abe S., Tokuda Y. 1993. Immunomodulating activity of antifungal drugs. - Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 685, p. 447-457.

Yardley V., Croft S. 1997. Activity of liposomal amphotericin B against experimental *Cutaneous Leishmaniasis*. - Antimicrob. Agents Chemother., v. 41, № 4, p. 752-756.

Yeagle P.L. 1985. Cholesterol and the cell membrane. - Biochim. Biophys. Acta, v. 822, p. 267-287.

Yoshikawa K., Fujimoto T., Shimooka T., Terada H., Kumazawa N., Ishii T. 1988. Electrical ascillation and fluctuation in phospholipid membranes. Phospholipids can form a channel without protein. - Biophys. Chem., v. 29, p. 293-299.

Yu B.G., Okano T., Kataoka K., Sardari S., Kwon G.S. 1998. In vitro dissociation of antifungal efficacy and toxicity for amphotericin B-loaded poly (ethylene oxide)-block-poly (beta benzyl L aspartate) micelles. - J. Control. Release, v. 56, p. 285-291.

Zager RA. 2000. Polyene antibiotics: relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content. - Am. J. Kidney Dis., v.

36, p. 238-249.

Zagransky Y., Jard S. 1981. The effect of amphotericin B on lectin-induced aggregation of cell surface receptors. – *Exp. Cell Res.*, v. 132, p. 387-397.

Zaremba M., Borowski J., Zaremba K., Borowski E., Grzybowska J. 1988. – Proceedings of the 8th International Symposium on Future Trends in Chemotherapy, Tirrenia, p. 54.

Zhubanova A.A., Irashchenko A.T., Sarmurzina R.G., Chernykh A.B., Balmukharov S.B. 1975. The damaging effect of the sodium salt of nystatin on ascitic tumor cells. – *Vopr. Onkol.(Russia)*, v. 21, p. 112-118.

Zielinski J., Borowy-Borowski H., Golik J., Gumieniak J., Ziminski T., Kolodziejczyk P., Pawlak J., Borowski E., Shenin Yu., Filipova A.I. 1979 a. The structure of levorin A₂ and candididin D. - *Tetrahedron Letters*, № 20, p. 1791-1794.

Zielinski J., Gumieniak J., Golik J., Borowski E., Shenin Yu. 1979 b. The chemical structure of the components of the antibiotic complex – levorin. – In: International Symposium on Antibiotics. Weimar (GDR), p. B16.

Zielinski J., Kolodziejczyk P., Gumieniak J., Golik J., Borowski E., Shenin Yu., Filippova A.I. 1979 c. Structural elucidation of antibiotic levorin A₂. Part 1. Structure of aglycone moiety. – *Polish J. of Chemistry*, v. 53, p. 297.

Ziminski T., Zielinski J., Golik J., Gumieniak J., Borowski E., Rinehart K.L. 1979. The structure of vacidin A – a main component of an antifungal antibiotic aureofacin. – In: International Symposium on Antibiotics. Weimar (GDR).

Zotchev S.B. 2003. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. - *Curr. Med. Chem.*, v. 10, p. 211-223.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ОТ АВТОРА	5
ВВЕДЕНИЕ	19
ГЛАВА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПА И ИХ ДЕЙСТВИЕ НА КЛЕТКИ	27
1.1. Классификация и химическое строение ПА	27
1.2. Физико-химические и биологические свойства леворина А	57
1.3. Типовой состав леворина А и свойства составляющих его компонентов	63
1.4. Производные леворина А	68
1.5. Физико-химические и биологические свойства микогептина.....	73
1.6. Производные микогептина.	86
1.7. Действие ПА на проницаемость клеточных мембран и связывание ПА цитоплазматическими мембранами клеток	96
ГЛАВА 2. «СТЕРИНОВАЯ» ГИПОТЕЗА МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПА	107
2.1. Взаимодействие ПА со стериновым рецептором клеток.	107
2.2. Взаимодействие ПА с чувствительными и резистентными к ним штаммами грибов.....	112
2.3. Изучение комплексообразования ПА со стеринами методом электронной микроскопии.....	117
2.4. Исследование комплексообразования полиенов с холестерином методом УФ спектроскопии.....	120
2.5. Изучение комплексообразования ПА с холестерином методами дифференциальной сканирующей калориметрии, флуоресценции и кругового дихроизма	123
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ВЗАИ- МОДЕЙСТВИЯ ПА С МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАННЫМИ СИСТЕМАМИ.....	128
3.1. Мономолекулярные слои	128
3.2. Липидные везикулы (липосомы).....	130
3.3. Плоские бислойные липидные мембранны.....	136
ГЛАВА 4. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ НЕАРОМАТИЧЕСКИХ ПА: НИСТАТИН, АМФОТЕРИЦИН В, МИКОГЕПТИН.....	142

4.1. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации холестерина и антибиотиков.....	142
4.2. Избирательная проницаемость мембран в присутствии неароматических антибиотиков	145
4.3. Особенности изменения проводимости мембран неароматическими ПА	148
4.4. Исследование взаимодействия производных амфотерицина В с БЛМ	154
4.5. Исследование катионной избирательности бимолекулярных мембран с эргостерином и 7-дегидрохолестерином в присутствии нистатина, амфотерицина В и его производных, Na-соли микогептина	159

ГЛАВА 5. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ ПА С АРОМАТИЧЕСКОЙ ГРУППИРОВКОЙ: ЛЕВОРИН А₂, ТРИХОМИЦИН, КАНДИЦИДИН.....

5.1. Зависимость проводимости мембран от концентрации ароматических антибиотиков.....	166
5.2. Избирательная проницаемость мембран в присутствии ароматических антибиотиков.....	168
5.3. Особенности изменения проводимости мембран ароматическими антибиотиками.....	170
5.4. Исследование зависимости проводимости бимолекулярных мембран от липидного состава при постоянной концентрации ПА	178

ГЛАВА 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СУЩЕСТВОВАНИЯ ОДНОЧНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ И ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

6.1. Гипотеза водных пор. Гипотетическая молекулярная модель канала, образуемого ПА в комплексе с холестерином	183
6.2. Определение условий регистрации одиночных ионных каналов, образованных в липидных мембранах ПА	188
6.3. Экспериментальное обнаружение и доказательство существования полиен-холестериновых ионных каналов малой проводимости	195
6.4. Основные свойства одиночных каналов	202
6.5. Вольтамперные характеристики и избирательность одиночного канала.....	212
6.6. Функционирование одиночных каналов во времени. Типы состояний полиеновых каналов. Переходы между открытым и закрытым состояниями в амфотерициновом канале	215
6.7. Сборка полиеновых каналов и проницаемость мембран для антибиотиков	222

6.8. Свойства ионных каналов в присутствии производных амфотерицина В, модифицированных по полярным группам. "Запертое" состояние амфотерицинового канала	226
6.9. Свойства амфотерициновых каналов в зависимости от структуры стерина	234
6.10. Свойства ионных каналов в зависимости от структуры лактонного кольца молекул ПА. Гибридные каналы.....	239
ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПРОВОДИМОСТИ БИСЛОЙНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ ЛЕВОРИНА А₂ И ЕГО АЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ, И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЛЕВОРИНА А	248
7.1. Методические требования к исследованию кинетики проводимости и канального шума мембран, модифицированных леворином и его алкильными производными.....	248
7.2. Кинетика проводимости БЛМ в присутствии леворина А ₂ при варьировании состава мембраноформирующих компонентов, температуры, вида и концентрации электролитов	253
7.3. Кинетика проводимости БЛМ в зависимости от концентрации леворина А ₂ и длины его алкильной цепи.....	265
7.4. Флуктуационная спектроскопия леворина А ₂	267
7.5. Действие индивидуальных компонентов леворина А на проводимость бислойных мембран. Эффект леворина А ₂ , вводимого с одной стороны мембрани	280
ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПРОВОДИМОСТИ БИСЛОЙНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ АМФОТЕРИЦИНА В И ЕГО АЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ. СВОЙСТВА МЕМБРАН, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПА С РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ МОЛЕКУЛ.....	295
8.1. Методические требования к исследованию кинетики проводимости мембран, модифицированных амфотерицином В и его алкильными производными	295
8.2. Исследование кинетики проводимости бислойных мембран в присутствии амфотерицина В и его алкильных производных.....	297
8.3. Граф состояний ионного канала. Механизм немонотонной кинетики проводимости мембран	303
8.4. Исследование эффекта амфотерицина В и его производного метамфоцина, вводимого с одной стороны мембрани	325
8.5. Исследование интегральной проводимости и избирательности бислойных мембран, модифицированных ПА с различной структурой молекул.....	331
ГЛАВА 9. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА СБОРКИ И РАЗБОРКИ ПОЛИЕНОВЫХ КАНАЛОВ	341

9.1. Кинетическая модель сборки и разборки полиеновых каналов в липидных мембранах	341
9.2. О кинетических свойствах полиеновых каналов в условиях инактивации	352
9.3. Доказательство существования четвертого состояния амфотерицинового канала	358
ГЛАВА 10. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ ПА НА КЛЕТОЧНЫЕ И ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ.....	374
ГЛАВА 11. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПОЛИЕНОВЫХ МАКРОЛИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ	386
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	398
ЛИТЕРАТУРА.....	413
ОГЛАВЛЕНИЕ.....	503

TABLE OF CONTENTS

PREFACE	3
ON BEHALF OF AUTHOR.....	5
INTRODUCTION	19
CHAPTER 1. THE GENERAL DESCRIPTION OF POLYENE ANTIBIOTICS AND THEIRS ACTION ON THE CELLS	
1.1. Classification and chemical structure of polyene antibiotics.....	27
1.2. Physico-chemical and biological properties of levorin A.....	57
1.3. Type composition of levorin A and properties of its compounds	63
1.4. Physico-chemical characteristics of levorin A.derivatives.....	68
1.5. Physico-chemical and biological properties of mycoheptin	73
1.6. Physico-chemical characteristics of mycoheptin derivatives	86
1.7. Study of the action of polyene antibiotics on the cell membrane permeability. Binding of polyene antibiotics to cytoplasmic cell membranes	96
CHAPTER 2. "STEROL" HYPOTHESIS IN THE MECHANISM OF POLYENE ANTIBIOTICS ACTION ON MEMBRANES	
2.1. Biological studies to the interaction of polyene antibiotics with sterol receptor of the cells.....	107
2.2. Experimental study of polyene antibiotics interaction with sensitive and resistance cultures of fungi	112
2.3. Experimental study of polyene antibiotics complexation with membrane sterols by electron microscopy method.....	117
2.4. Experimental study of polyene antibiotics complexation with membrane sterols by UV-spectroscopy method	120
2.5. Experimental study of polyene antibiotics complexation with membrane sterols by differential scanning calorimetry, fluorescence and circular dichroism methods	123
CHAPTER 3. THE INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISM OF INTERACTION BETWEEN POLYENE ANTIBIOTICS AND ARTIFICIAL MEMBRANES	
3.1 Monolayers	128
3.2. Lipid vesicles (liposomes)	130
3.3. Planar bilayer lipid membranes	136
CHAPTER 4. INTEGRAL CHARACTERISTICS OF BILAYER LIPID MEMBRANES IN THE PRESENCE OF NONAROMATIC POLYENE ANTIBIOTICS: NYSTATIN, AMPHOTERICIN B, MYCOHEPTIN.....	
4.1. The conductance dependence of bilayer lipid membranes on the cholesterol and antibiotics concentration.....	142

4.2. The ion selective permeability induced in bilayer lipid membranes by nonaromatic polyene antibiotics	145
4.3. The characteristic properties of the conductivity change induced in lipid membranes by nonaromatic polyene antibiotics	148
4.4. The research of amphotericin B derivatives in the process of interaction with bilayer lipid membranes.....	154
4.5. The investigation of cationic permeability of ergosterol- and 7-dehydrocholesterol-containing bilayer lipid membranes at the presence of nystatin, amphotericin B, mycoheptin and their derivatives	159
CHAPTER 5. INTEGRAL CHARACTERISTICS OF BILAYER LIPID MEMBRANES IN THE PRESENCE OF AROMATIC POLYENE ANTIBIOTICS: LEVORIN A₂, TRICHOMYCIN, CANDICIDIN	166
5.1. The dependence of bilayer lipid membranes conductivity of the aromatic antibiotics concentration	166
5.2. The selective permeability of lipid membranes in the presence aromatic polyene antibiotics	168
5.3. The characteristic properties change of membrane conductivity induced by aromatic polyene antibiotics	170
5.4. The dependence of bilayer membranes conductivity of the lipid composition at the constant of polyene antibiotic concentration.....	178
CHAPTER 6. THE EXPERIMENTAL PROOF OF EXISTENCE SINGLE IONIC CHANNELS IN BILAYER LIPID MEMBRANES AND ITS PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS	183
6.1. Hypothesis of aqueous pores. Hypothetical molecular model of polyene channel created in bilayer lipid membranes by a complex of polyene antibiotic to cholesterol	183
6.2. Definition of conditions of single ionic channels registration formed by polyene antibiotics in lipid membranes.....	188
6.3. The experimental discovery and proof of the existence of polyene-cholesterol single ionic channels at the low conductance in bilayer lipid membranes.....	195
6.4. A basic properties of single polyene channels.....	202
6.5. Voltage-current characteristics and selectivity of the single amphotericin B channel	212
6.6. The functioning of single polyene channels in time. Type states of polyene channels. Transitions between open and closed states in amphotericin B channel.....	215
6.7. Assembling of polyene channels and membrane permeability to antibiotics	222
6.8. The ionic channel properties at the presence of amphotericin B derivatives modified by polar groups. “Closed” state of amphotericin B channels	226

6.9. Electrical properties of amphotericin B channels of the dependence on sterol structure in membranes	234
6.10. The properties of ionic channels formed in lipid membranes by polyene antibiotics with different structure of lactone ring. Hybrid polyene channels	239
CHAPTER 7. THE RESEARCH OF CONDUCTIVITY KINETICS OF BILAYER LIPID MEMBRANES IN THE PRESENCE OF LEVORIN A₂ ITS ALKYL DERIVATIVES AND INDIVIDUAL COMPOUNDS OF LEVORIN A	248
7.1. Technical requirements to study of membrane conductivity kinetics and channel noise in the membranes modified by levorin A ₂ and its alkyl derivatives.....	248
7.2. Effects of levorin A ₂ on bilayer lipid membrane. The conductivity kinetics at the variation composition of membrane-forming compounds and aqueous solutions– temperature, type and electrolyte concentration.....	253
7.3. The study of bilayer lipid membrane conductivity kinetics on the dependence of levorin A ₂ concentration and its alkyl chain length.....	265
7.4. The fluctuating spectroscopy of levorin A ₂	267
7.5. The influence of individual levorin A components on the conductivity of bilayer lipid membranes. The effect one-sided action of levorin A ₂ on cholesterol-containing membranes.....	280
CHAPTER 8. THE STUDY OF BILAYER LIPID MEMBRANE CONDUCTIVITY KINETICS IN THE PRESENCE OF AMPHOTERICIN B AND ITS ALKYL DERIVATIVES. THE MEMBRANE PROPERTIES OF MODIFIED MOLEKULE POLYENE ANTIBIOTICS WITH A DIFFERENT CHEMICAL STRUCTURE	295
8.1. Technical requirements to study of membrane conductivity kinetics of modified molecule of amphotericin B and its alkyl derivatives	295
8.2. The study of conductivity-kinetics of bilayer lipid membranes in the presence of levorin A ₂ and its alkyl derivatives	297
8.3. State graph of ionic channel. The mechanism of nonmonotonic membrane conductivity-kinetics.....	303
8.4. The effect one-sided action of amphotericin B and its derivative metamphocin on cholesterol-containing membranes	325
8.5. The study of bilayer lipid membranes integral conductivity and selectivity modified by a different of polyene antibiotic molecule structure.....	331
CHAPTER 9. THE STUDY OF MECHANISM ASSEMBLAGE AND DISASSEMBLAGE OF POLYENE CHANNELS IN BILAYER LIPID MEMBRANES	341

9.1. Kinetic model assembling-disassembling of polyene channels in bilayer lipid membranes.....	341
9.2. The study of kinetic properties polyene channels in inactivation	352
9.3. The existence proof of fourth state of amphotericin B channel.....	358
CHAPTER 10. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF POLYENE ANTIBIOTICS AT THE ACTION ON THE CELL AND LIPID MEMBRANES	374
CHAPTER 11. PRACTICAL VALUE OF POLYENE MACROLIDE ANTIBIOTICS	386
CONCLUSION.....	398
LITERATURE.....	413
TABLE OF CONTENTS.....	507

ISBN 978-5-02-037023-4

Editor: J.A.Aliyev, academician

Kasumov Kh.M.

The structure and membrane function of polyene macrolide antibiotics

A modern data about the structure, properties and biological action of membrane-active polyene antibiotics (PA) and their derivatives are represented in this monograph. The role of bilayer lipid membranes (BLM) in the decoding of molecular mechanism of interaction between PA and membranes and the relationship between structure and function of this group compounds is shown. In the base of PA-action there is the formation in lipid membranes structural ionic channels by PA and sterols in the molecular-size complexes that are selective permeable for ions and organic substances. Large life-times of polyene channels in conducting state and the accessibility of their molecules to transformations open more perspectives for elucidation of molecular mechanism of ion's transport through the channels. The research of kinetics of multi-channel membrane conductance at the presence of PA and their derivatives with the established structure of molecules have opened the way to study the selective permeability of membranes and the main principles of assembling-disassembling of channels in lipid membranes. The practical aspects of using the PA in medicine are showed in the monograph. The urgency of these researches is that PA are one of most effective drugs in medical practice for fungous diseases treatment. The purposeful PA-synthesis by chemical modification of different parts in the molecule's lacton ring and study of their physico-chemical properties on the BLM makes possible to formulate the theoretical conclusions for synthesis of new PA-drugs with the necessary therapeutic properties.

This book is dedicated for working in the field of biophysics, chemistry, biochemistry, pharmacology, microbiology.

E-mail: khalil_gasimov@azeurotel.com

© MOSCOW•«NAUKA»

2009

BAKU•«ELM»

Научное издание

Касумов Халил Мамедали оглу

**Структура и мембранные функции полиеновых
макролидных антибиотиков**

**Москва – «Наука» • Баку – «Элм»
2009**

*Утверждено к печати Учеными советами:
Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Института цитологии РАН,
Института ботаники НАН Азербайджана*

**Оригинал-макет подготовлен в Институте ботаники
НАН Азербайджана**

Подписано к печати 12.12.2008
Формат 70x100 $\frac{1}{16}$. Тираж 500.
Усл. печ. л. 41,99.
Тип. зак. № 44.

Издательство «НАУКА»
117997 Москва, Профсоюзная ул. 90

Издательство «ЭЛМ»
AZ-1001 Баку, ул. Истиглалийят, 10

Типография РИПЦ «Элм»
AZ-1001 Баку, ул. Истиглалийят, 8