

УДК 577.352.4:577.164.1

ДІЯ 3-ДЕЦИЛОКСИКАРБОНІЛМЕТИЛ-4-МЕТИЛ-5-(β -ГІДРОКСІЕТИЛ)ТІАЗОЛІЙ ХЛОРИДУ НА СТРУМ K^+ ІОННИМИ КАНАЛАМИ, УТВОРЕНИМИ НІСТАТИНОМ У БІШАРОВІЙ ЛІПІДНІЙ МЕМБРАНІ

О. Я. ШАТУРСЬКИЙ¹, О. В. РОМАНЕНКО², Н. Г. ГІММЕЛЬРЕЙХ¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна;
e-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua;

²Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

Аплікація 0,1 мМ 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(β -гідроксіетил)тіазолій хлориду – структурного аналога вітаміну B_1 (тіаміну) – у цис-відділення комірки з вміщуючою холестерол бішаровою фосфоліпідною мембраною у розчині 100 мМ КСІ спричинює зворотне зменшення струму через утворені ністатином канали, які реконструйовано з того самого боку мембрани, на $67 \pm 3\%$. Провідність таких каналів, вбудованих у ліпідний бішар мембрани з цис-сторони, не змінюється, коли 0,1 мМ тіазолієвий аналог вітаміну B_1 введено у транс-відділення комірки з модифікованою мембраною. Кінетика інгібування цим аналогом за різних концентрацій індукованого ністатином трансмембранного струму не виявляє кооперативності, що свідчить про зв'язування блокатора лише з одним негативно зарядженим центром каналу, а відносно висока рК його дисоціації (5,17) дає можливість зробити висновки, що цей центр здатний забезпечувати специфічну взаємодію з таким хлоридом.

Ключові слова: ністатин, іонні канали, ліпідний бішар, тіазолієвий аналог вітаміну B_1 .

Вітамін B_1 та його похідні є речовинами, які залучено до процесу регуляції синаптичного передавання. Дефіцит вітаміну B_1 може стати причиною порушення координації рухів, рефлекторної діяльності, моторики шлунково-кишкового тракту та розвитку паралічу і атрофії м'язів кінцівок в організмі людини і тварин [1–5]. Показано, що дефіцит тіаміну також спроможний провокувати значне зменшення потенціалокерованого калієвого струму та пригнічення швидкого калієвого струму А-типу у нейронах [6]. Виявлено, що тіамін і його фосфорильовані похідні впливають на проникність іонних каналів збудливих мембран [7].

З огляду на те, що серед ендогенних біологічно активних сполук тіазолієвий цикл є тільки у тіаміну та його метаболітів, можна очікувати, що тіамінчутливі мембранні структури спроможні взаємодіяти з тіазолієм у складі одного з його нещодавно синтезованих похідних – 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(β -гідроксіетил)тіазолій хлориду (ДМГТ) [4–5]. Якщо така взаємодія відбувається з іонним каналом, довголанцюговий вуглецеводневий радикал у позиції 3 тіазолієвого циклу може спричинювати редукцію трансмембранного струму через іонний канал за умови, що блокувальний компаунд щільно

прилягає до внутрішніх стінок отвору каналу [5]. Крім того, зв'язування позитивно зарядженого атому азоту тіазолієвого циклу з протилежно зарядженим центром усередині каналу також необхідне для блокування струму іонів через порожнину каналу.

Враховуючи можливість того, що одним із наслідків взаємодії тіазолієвих похідних вітаміну B_1 зі збудливою мембраною може бути безпосереднє інгібування каналної проникності [4], ми використали штучні бішарові ліпідні мембрани, модифіковані очищеними каналоформуючими токсинами, для перевірки цього припущення. Раніше було показано, що аплікація ДМГТ інгібує Ca^{2+} -струм через катіон-селективні канали, сформовані α -латротоксином із отрути каракурта *Latrodectus mactans* у бішаровій ліпідній мембрані. При цьому введення 0,1 мМ ДМГТ у цис-відділення комірки з бішаровою ліпідною мембраною, яка знаходиться у розчині 10 мМ $CaCl_2$, знижує струм, індукований α -латротоксином на $31,6 \pm 3\%$, а у транс-відділення – на $61,8 \pm 3\%$ [5,8].

У попередніх дослідах додавання 0,1 мМ ДМГТ у цис-відділення комірки з бішаровою ліпідною мембраною, оточеною розчином 10 мМ $CaCl_2$, знижує катіонний струм, індукований ще одним каналоформуючим протеїном з отрути каракурта – α -латроінсектоток-

сином, а також токсином актинії *Radianthus macrodactylus*, який належить до іншої родини тваринних токсинів. Це дозволяє припустити відсутність впливу видової специфічності токсинів різного походження при взаємодії з ДМГТ [8]. Порівняльний аналіз ефективних радіусів каналів α -латротоксину, α -латроінсектотоксину і токсину актинії, утворених цими токсинами із *цис*-сторони бішарової ліпідної мембрани (0,9; 0,53 і 0,55 нм відповідно), та α -латротоксинового каналу з протилежної *транс*-сторони мембрани (0,28 нм) з інгібувальною дією ДМГТ, одержаною на цих каналах, дозволяє зробити висновок про посилення дії ДМГТ на катіон-селективні канали зі зменшенням ефективного розміру їхнього люмена [8]. Тому основний підхід, використаний нами для пошуку іонного каналу, на якому міг би найкраще проявитися блокувальний ефект ДМГТ, базується на концепції, що цей ефект залежить від іонної селективності каналу і розміру його пори, а ступінь блокувального ефекту ДМГТ зростає при збільшенні збігу гідродинамічного розміру блокатора і ефективного радіуса отвору каналу, до якого він прикладений.

Беручи до уваги те, що максимальний інгібувальний ефект ДМГТ на іонну провідність ($61,8 \pm 3\%$) було досягнуто на *транс*-отворі катіон-селективного α -латротоксинового каналу, ефективний радіус якого за нашими даними становить 0,28 нм [5, 8], а за даними інших дослідників 0,5 нм [9], такий самий або вірогідно навіть більший інгібувальний ефект ДМГТ можна було очікувати після його прикладання до катіон-селективних каналів з ефективним радіусом отвору $\sim 0,3$ нм. Раніше таким об'єктом дослідження були канали, утворені амфотерицином В — широко відомим полієновим антибіотиком з протигрибковими властивостями [10] після додавання його у *цис*-відділення комірки з бішаровою ліпідною мембраною. Уведення ДМГТ (0,1 мМ) з того самого боку мембрани блокувало провідність каналів амфотерицину В у розчині 100 мМ КСІ на $84 \pm 2\%$.

Враховуючи високу структурну і функціональну спорідненість, виявлену для всіх полієнових антибіотиків, зроблено припущення, що ДМГТ, прикладений з *цис*-боку бішарової ліпідної мембрани, модифікованої іншим представником цієї родини — ністатином [11–13], заблокує трансмембранний струм K^+ , індукований після додавання цього антибіотика з того самого боку мембрани. Відомо, що ністатин та інші полієнові антибіотики,

додані з одного боку ліпідного бішару, індують катіонну провідність [12, 13], яка блокується тетраметиламонієм, внесеним з того самого боку мембрани [10, 14]. Оскільки тетраметиламоній також блокує аніон-селективні канали ністатину, утворені після симетричного додавання цього антибіотика з протилежних боків бішарової ліпідної мембрани [14], можна припустити, що трансмембранний струм через його катіон-селективні канали, утворені після додавання лише до одного відділення комірки з мембраною, також може бути досить ефективно послаблений за введення тетраметиламонію хоча би з однієї із сторін модифікованої мембрани.

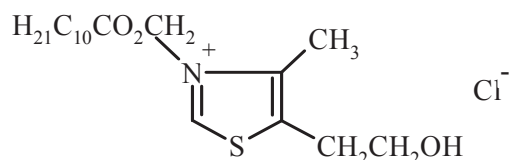
Крім відповідного розміру отвору і катіонної селективності, канали, утворені ністатином лише з однієї сторони мембрани, як і у випадку з амфотерицином В, більш задовольняли умови проведення досліджень, ніж аніон-селективні ністатинутворені канали, тому що за природних умов молекули цих антибіотиків вбудовуються у нативну мембрану лише із зовнішньоклітинного боку. Порівняльний аналіз ефективних радіусів отворів катіон-селективних ністатинутворених каналів із протилежних боків бішарової ліпідної мембрани з інтенсивністю визначеного на них інгібуючого впливу ДМГТ і тетраалкіламоніїв мав надати додаткову інформацію про здатність зазначених сполук до блокування каналних люменів із різних сторін мембрани.

Матеріали і методи

Для дослідження впливу ДМГТ на струм через канали, утворені ністатином у бішаровій ліпідній мембрані, у більшості експериментів ми використовували мембрани із розчину фосфатидилхоліну яєчного жовтка (ФХ) (Харківське ЗАТ «Біолек», Україна; Sigma, США) і холестеролу (Calbiochem, Німеччина; Sigma, США; Serva, Німеччина). У ряді дослідів яєчний жовток замінювали синтетичним 1,2-дифітаноїл-*sn*-гліцери-3-фосфохоліном (ДОФХ) (Avanti Polar Lipids, США). Суміш ФХ : холестерол або ДОФХ : холестерол розчиняли у *n*-гептані за співвідношення 2 : 1 при загальній концентрації ліпідів 20 мг/мл. Мембранну суміш наносили на отвір у тефлоновому стаканчику з діаметром 0,6 мм. Формування ліпідного бішару спостерігали візуально у відображеному світлі за допомогою бінокулярного мікроскопа. Водно-сольовий розчин, який оточував мембрану, містив 10 мМ трис-НСІ (Sigma, США) при рН 7,4 та задану кількість хлориду калію кваліфікації осч. Для вимірів

провідності мембрани використовували хлор-срібні електроди, занурені у розчин 2 М КСІ з агаровими містками. Електроди було розміщено з різних боків мембрани. Потенціал назовні тефлонового стаканчика (*цис*-сторона) задавали відносно потенціалу внутрішнього об'єму (*транс*-сторона), який приймали за 0 мВ. Різниця потенціалів прикладалась до мембрани від джерела напруги, що дозволяло одержувати постійну (від -150 мВ до 150 мВ) або лінійно змінювану напругу зі швидкістю 100 мВ/хв, використовуючи той самий діапазон амплітуд. Напругу, прикладену до мембрани, контролювали за допомогою цифрового вольтметра. Сумарний струм через бішарову ліпідну мембрану реєстрували двокоординатним самописом за допомогою підсилювача з половою пропускання 1 кГц. Розчин, оточуючий мембрану, перемішували магнітною мішалкою.

Для визначення геометричних розмірів каналів у ліпідному бішарі використовували базовий симетричний водно-сольовий розчин, який містив 10 мМ трис-НСІ (рН 7,4) фірми Sigma (США) і 100 мМ КСІ, а також набір неелектролітів різної молекулярної маси. Як неелектроліти з низькою молекулярною масою використано етиленгліколь (Riedel-de Haen, Німеччина), гліцерол (Sigma-Aldrich, США), глюкозу (Fluka, Франція) і сахарозу (Fluka, Німеччина), а як неелектроліти з високою молекулярною масою використано поліетиленгліколи з молекулярною масою 300, 400, 600 (Fluka, Швейцарія). Неелектроліти змішували з базовим розчином і використовували як омиваючий мембрану розчин у кінцевій концентрації 20%. Експерименти проводили при кімнатній температурі (20–24 °С). Для блокування ністатиніндукованої провідності через бішарову ліпідну мембрану брали водний розчин хлориду ДМГТ, синтезований А. І. Вовком в Інституті біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України загальною формулою якого:



і хлориду тетраметиламонію (Aldrich, Німеччина).

Результати та обговорення

Дослідження показали, що введення ністатину у *цис*-відділення комірочки з бішаровою ліпідною мембраною, оточеною базовим

розчином 100 мМ КСІ, спричинює безперешкодне зростання трансмембранного струму (рис. 1, А, вставка а). Зростання інтегрального струму згодом досягає насичення і виходить на плато або його зупиняли промиванням комірочки з мембраною водно-сольовим розчином без ністатину. Визначення стаціонарних вольт-амперних характеристик і/або додавання блокторів проводили після досягнення сталої провідності ліпідного бішару.

У разі внесення 0,1 мМ ДМГТ у *цис*-відділення комірочки з модифікованою ністатином мембраною знижується сумарний струм через канали ністатину на $67 \pm 3\%$ (рис. 1, А, Б). Таке блокування трансмембранного струму досягає максимальних показників за 4–7 хв і не виявляє значної залежності від знаку мембранного потенціалу у межах напруг, які було прикладено до мембрани (рис. 1, А). ДМГТ ефективно блокує ністатинутворені канали тільки після додавання з *цис*-сторони мембрани. Внесення ДМГТ у *транс*-відділення комірочки з мембраною, модифікованою ністатином, не впливає на її провідність (рис. 1, Б, вставка б). Ці результати узгоджуються з асиметричним блокувальним ефектом тетраетиламонію на трансмембранний струм через канали, утворені після введення іншого поліенового антибіотика – амфотерицину В у *цис*-відділення комірочки з мембраною [10, 15]. Блокувальна дія ДМГТ з *цис*-сторони бішарової ліпідної мембрани, модифікованої ністатином, зникає після ретельного промивання *цис*-відділення комірочки з використанням 80 мл омиваючого мембрану сольового розчину без ДМГТ. Ністатинутворена провідність, визначена до введення блоктора, цілковито відновлюється за 25–30 хв після промивання.

Блокувальний ефект ДМГТ на ністатиніндукований струм у симетричному розчині 100 мМ КСІ залежить від концентрації ДМГТ і може бути описаний ізотермою Ленгмюра. Зниження ністатиніндукованої провідності відбувається стрімко зі зростанням концентрації ДМГТ і досягає насичення при 0,02 мМ (рис. 2, А). Половини максимального інгібування ністатиніндукований K^+ -струм досягає при концентрації ДМГТ 6,79 мкМ. Визначена у координатах Хілла константа дисоціації ДМГТ становить $10^{-5,17}$ М, а коефіцієнт Хілла – $1,2 \pm 0,2$ (рис. 2, А, вставка а).

Уведення 4,3 мМ тетраетиламонію з *цис*-сторони модифікованої бішарової ліпідної мембрани, оточеної розчином 100 мМ КСІ, блокує ністатинутворений струм K^+ на $93 \pm 2\%$ (рис. 2, Б, вставка б; 3, А), тоді як тетраетиламоній в діапазоні концентрацій 0,1–10 мМ не

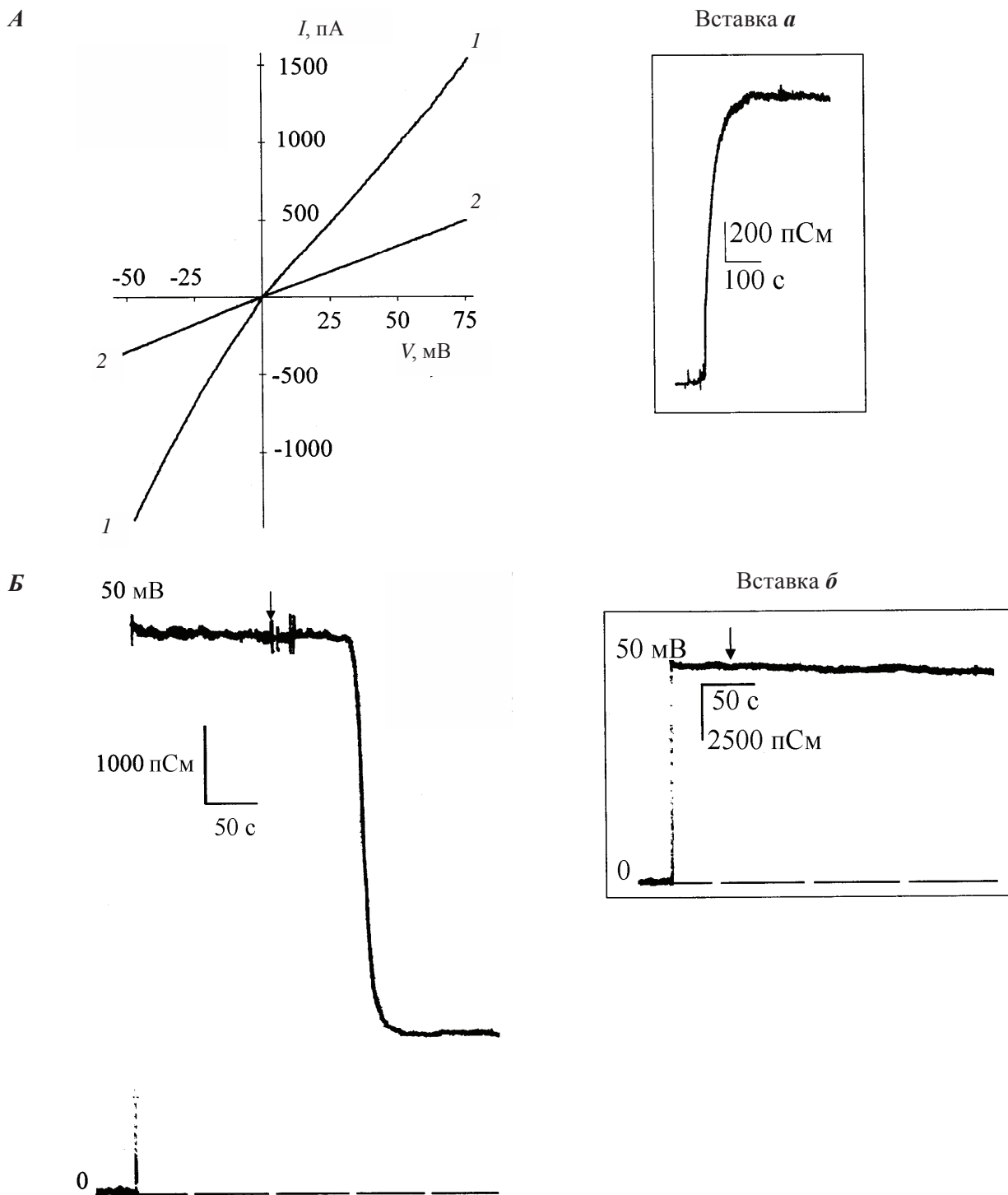


Рис. 1. Блокування 0,1 мМ ДМГТ стаціонарного струму, індукованого ністатинутвореними каналами у бішаровій ліпідній мембрані. Омиваючий мембрану розчин вміщує 100 мМ КСІ. Графік А – вольт-амперна характеристика сумарної ністатинутвореної провідності, визначена до (крива 1), і після додавання ДМГТ у цис-відділення комірки з мембраною (крива 2). Вставка а – запис зростання струму після аплікації ністатину у примембранну область цис-відділення комірки у кінцевій концентрації 0,2 мкг/мл при напрузі +80 мВ. Графік Б – запис стаціонарного ністатиніндукованого струму, зроблений після введення ДМГТ у цис-відділення комірки з мембраною при +50 мВ. Вставка б – запис стаціонарного ністатиніндукованого струму, зроблений після введення ДМГТ у транс-відділення комірки з мембраною при напрузі +50 мВ. Стрілками показано додавання ДМГТ у комірку. Переривчаста лінія позначає нульовий струм

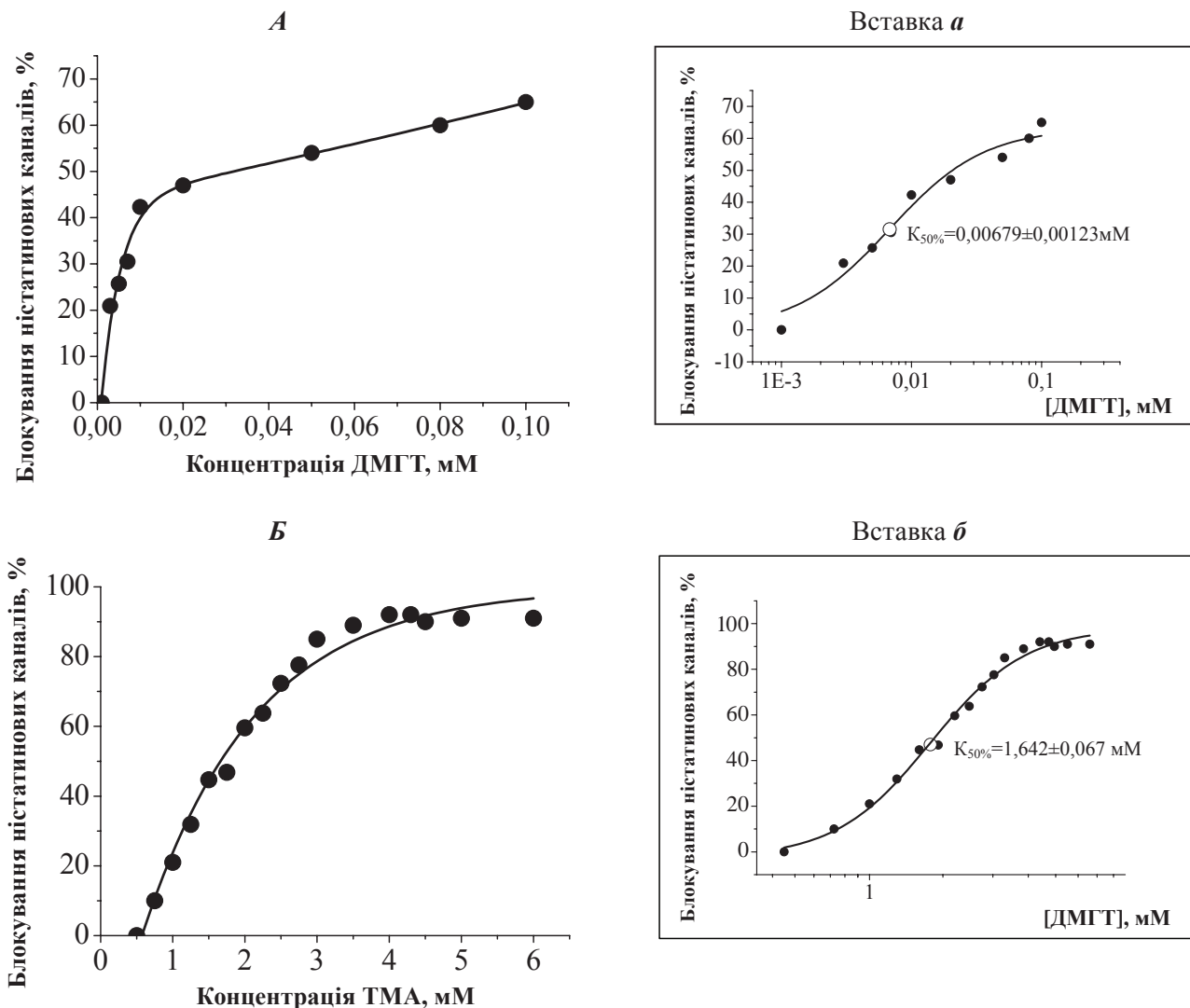


Рис. 2. Типові криві блокувального впливу різних концентрацій ДМГТ (А) і тетраметиламонію (Б), уведених у цис-відділення комірки з мембраною на сумарну ністатиніндуковану провідність бішарової ліпідної мембрани. Водно-сольовий розчин назовні мембрани вміщує 100 мМ КСІ і зазначені концентрації блокувальників. Кожний чорний кружок (●) на панелі є показником послідовного додавання блокувальника, проведеного у цис-відділення комірки з модифікованою ністатином мембраною. Мембранний потенціал становить +50 мВ. Ступінь блокування, виражена у відсотках, визначалась після досягнення незмінного рівня провідності. Ністатин добавляли у цис-відділення комірки з мембраною у кінцевій концентрації 20 мкг/мл. На вставках показано константи інгібування ДМГТ (а) і тетраметиламонієм (б) утвореної ністатином провідності, розраховані у координатах Хілла

впливає на утворену ністатином провідність з будь-якої із сторін ліпідного бішару. Титрування ністатиніндукованої провідності різними концентраціями тетраметиламонію також виявляє схожу на описану для ДМГТ залежність ністатиніндукованої провідності від концентрації блокувальника, що насичувалась при концентрації тетраметиламонію 3 мМ. Половина максимального блокувального ефекту досягається при концентрації тетраметиламонію 1,64 мМ.

Константа дисоціації тетраметиламонію становить $10^{-2,78}$ М (рис. 2, Б, вставка б).

Слід зазначити, що у той час як ДМГТ і тетраметиламоній досить ефективно блокують індуковану ністатином провідність з цис-сторони бішарової мембрани, протилежна частина утворених ністатином каналів, локалізована з іншої сторони мембрани, залишається абсолютно нечутливою до будь-якого з цих блокувальників, оскільки жоден з них не змінює

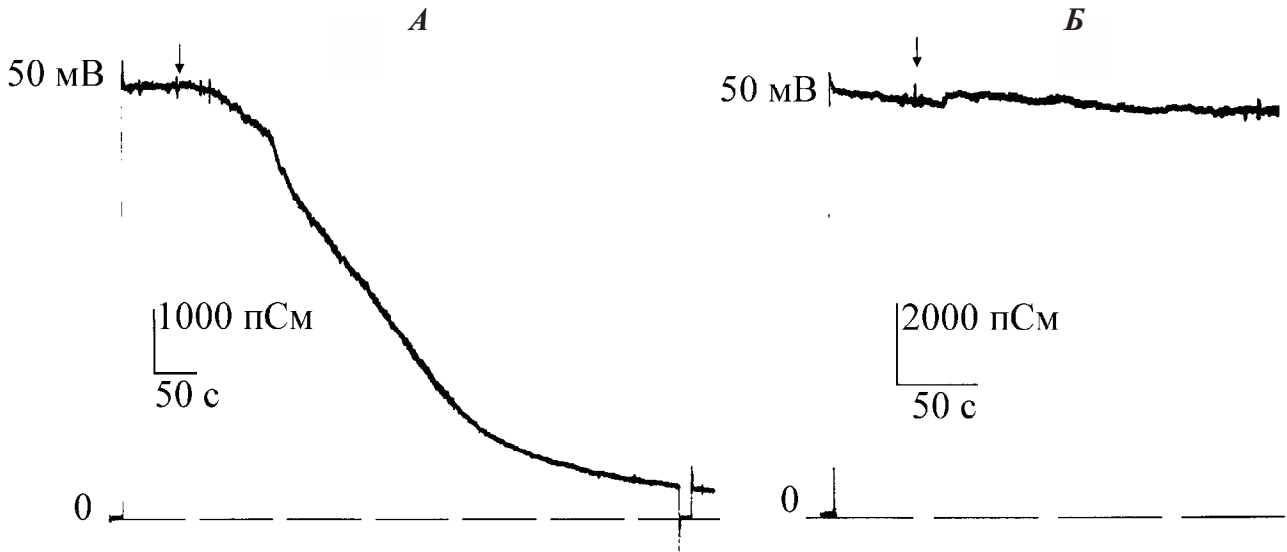


Рис. 3. Блокування стаціонарного ністатиніндукованого струму через бішарову ліпідну мембрану після додавання 4,3 мМ тетраметиламонію у цис-відділення комірки з мембраною. Оточуючий мембрану розчин вміщує 100 мМ КСІ. Графік А — запис сумарного струму через мембрану, модифіковану ністатином, після введення тетраметиламонію у цис-відділення комірки з мембраною при потенціалі +50 мВ. Графік Б — запис сумарного струму через модифіковану ністатином мембрану після введення тетраметиламонію у транс-відділення комірки з мембраною при потенціалі +50 мВ. Кожна панель представляє результати, одержані на окремій мембрані. У всіх експериментах ністатин додавали у цис-відділення комірки з мембраною у кінцевій концентрації 20 мкг/мл. Стрілками показано введення тетраметиламонію. Переривчаста пряма позначає ізоелектричну лінію

сумарну провідність каналів антибіотика після прикладання з *транс*-боку мембрани (рис. 1, Б, вставка б; 3, Б). Це надає подальші докази для припущення, зробленого в роботі [14] про те, що отвори утворених ністатином каналів із протилежних боків мембрани відрізняються. При цьому лише *цис*-вхід цих каналів ідентичний входам до симетричного утвореного ністатином каналу у ліпідному бішарі за присутності антибіотика з обох боків ліпідного бішару [12–15].

З огляду на те, що блокування молекулами тетраметиламонію струму через канали, утворені ністатином з *цис*-боку мембрани, було можливим тільки з того самого боку модифікованої мембрани, існувала вірогідність того, що на заваді могла стояти геометрична асиметрія розмірів люмена каналу, яка перешкождала взаємодії з блокатором на протилежному боці мембрани. Тому за допомогою різних неелектролітів було проведено визначення розмірів отвору пори ністатинутвореного каналу з *транс*-сторони бішарової ліпідної мембрани. За даними літератури, молекули з радіусом Стокса, більшим за 0,4 нм, виявилися непроникними через канали, утворені після додавання ністатину з *цис*-сторони мембрани [13]. Цей тип каналів має ефективний розмір

канального люмена, який виключає будь-яку можливість проникнення молекул з гідродинамічним радіусом, більшим за радіус глюкози (0,37 нм), через вхідний отвір каналу з *цис*-сторони мембрани [12–14]. Виходячи з цього, можна вважати молекулу сахарози, гідродинамічний радіус якої дорівнює 0,467 нм, першим непроникним неелектролітом серед інших, які ми використали в цій роботі (таблиця).

Згідно з методом, описаним в роботі [16], розміщення непроникної сахарози з *цис*-сторони мембрани проти випробуваного неелектроліту з *транс*-сторони дозволило окремо визначати ступінь заповнення ністатинутворених каналів різними неелектролітами тільки з *транс*-входу у канал. Оскільки через технічні труднощі більша частина попередніх досліджень розміру отворів каналу, утвореного після додавання ністатину тільки з одного боку мембрани, була проведена з використанням неелектролітів тільки з *цис*-сторони мембрани [12–14], ми провели визначення розміру отворів цих каналів із *транс*-сторони. Крім визначення розміру отворів пор з будь-якого боку мембрани, окреме заповнення неелектролітами канального люмена лише з однієї сторони також надає можливість вимірювати розмір звуження, навіть якщо воно існує усередині каналу [16].

Показано, що після заміни початкового симетричного водно-сольового розчину сахарози на етиленгліколь у *транс*-відділенні комірки з бішаровою ліпідною мембраною відбувається зменшення величини провідності ністатинутворених каналів. Подальша послідовна заміна етиленгліколю у *транс*-відділенні комірки із мембраною на більші за розміром молекули неелектролітів відновлює провідність каналів, визначену на початку експерименту в 100 мМ КСІ з непроникною сахарозою (таблиця).

Максимальне заповнення ністатинутвореного каналу неелектролітами із *транс*-сторони мембрани одержано для етиленгліколю, який заблокував K^+ -струм на 67,9%. Заміна сахарози на більшу за етиленгліколь молекулу гліцеролу зменшує трансмембранний струм лише на 13,3%, що є результатом меншої проникності гліцеролу, порівняно з етиленгліколем, через *транс*-вхід ністатинутвореного каналу. Найщільніше заповнення каналної порожнини незарядженими молекулами етиленгліколю залишає найменшу кількість іонів калію, які протікають через ністатинутворені канали, що знижує їхню провідність до мінімуму, доступного серед інших неелектролітів, використаних у роботі (таблиця). Тому, можна вважати, що тільки молекули етиленгліколю з гідродинамічним радіусом 0,262 нм можуть вільно проходити через водний люмен ністатинутвореного каналу. Розміщення гліцеролу у *транс*-відділення комірки з модифікованою мембраною призвело тільки до 13,3% зниження K^+ -струму через ністатинутворені канали,

а подальша заміна сахарози на більші за розміром молекули глюкози та поліетиленгліколі 300, 400 або 600 майже не змінює K^+ -провідності утворених ністатином каналів, що дозволяє вважати не тільки молекули сахарози, але й більші за розміром молекули поліетиленгліколю непроникними для *транс*-входу каналів цього антибіотика.

Одностороння дія блокувальних сполук (ДМГТ і тетраметиламонію) визначена на ністатинутворених каналах, дозволяє вважати, що ці канали вбудовуються у ліпідний бішар таким чином, що більшість каналів обернена у *цис*-відділення боком, доступним для блокторів, тоді як протилежний бік у *транс*-відділенні недосяжний для них. При цьому можна припустити, що *цис*- і *транс*-форми утворених ністатином каналів мають різні розміри, як відзначено у роботах [12, 13]. Отже, незважаючи на певне розташування заряду вздовж ністатинутворених каналів, згідно з яким більшість негативного потенціалу сконцентровано біля його ширшого отвору [15], звуження каналів зі *транс*-сторони також може запобігати взаємодії ністатину з полярною голівкою блоктора. Особливо, якщо заряджений негативно катіон-селективний сайт, з яким блоктор потенційно може зв'язуватись, знаходиться у середині каналного люмена, як передбачали автори комп'ютерної моделі каналу, утвореного схожим на ністатин амфотерицином В [17].

Відомо, що ністатин належить до великої родини полієнових антибіотиків, які використовують як ефективний засіб для лікування

Блокування трансмембранного ністатиніндукованого струму після введення різних неелектролітів зі транс-сторони мембрани

Неелектроліт	r_h , нм	Блокування, %
Етиленгліколь	0,262 ± 0,003	67,9 ± 6,8
Гліцерол	0,308 ± 0,002	13,3 ± 3,3
Глюкоза	0,370 ± 0,010	2,0 ± 2,0
Сахароза	0,467 ± 0,005	—
Поліетиленгліколь 300	0,600 ± 0,020	0,0 ± 2,0

Примітка. Всі неелектроліти використано в концентрації 20% в омиваючому мембрану розчині, який вміщує 100 мМ КСІ і 10 мМ трис-НСІ (рН 7,4). Показник r_h представляє гідродинамічні радіуси молекул неелектролітів, як показано в роботі [16]. Початкова провідність ністатинутворених каналів, визначена як стаціонарна інтегральна провідність модифікованої ністатином бішарової ліпідної мембрани, одержана після введення 20 мкг/мл антибіотика у *цис*-відділення комірки, що вміщує водно-сольовий розчин з сахарозою з обох боків мембрани. Заміна сахарози на розчин іншого неелектроліту у *транс*-відділенні комірки з мембраною проведена ретельним промиванням 10 мл випробуваного розчину з урахуванням того, що об'єм водного розчину у *транс*-відділенні тефлонового стаканчика становить 1 мл. Блокування в % ністатиніндукованої провідності представлено як середня арифметична величина ± стандартна похибка, одержаних із 10–20 окремих експериментів. Кожен експеримент проводили на новій мембрані.

грибкових захворювань [11]. Основна причина цитотоксичності ністатину та інших полієнових антибіотиків полягає в утворенні ними каналів у плазматичних мембранах клітин-мішеней.

Незважаючи на суттєву специфічність до клітин-мішеней, яка може залежати від ліпідного складу їхніх плазматичних мембран [15], трансмембранні канали полієнових антибіотиків формуються як у нативних, так і у штучних мембранах. Тому, утворення каналів у ліпідному бішарі може бути одним із спільних етапів у механізмах дії цих антибіотиків, що не обов'язково потребує наявності тих факторів, які зазвичай визначають високу тканинну й видову специфічність зазначених сполук. Однак можливо, що геометрія їхніх каналних люменів і суцільна структура мембранозв'язаних олігомерів відрізняються, що може призводити до певних розбіжностей іон-провідних властивостей і різної спроможності полієнових антибіотиків до взаємодії з фізіологічно важливими речовинами, які впливають на процес перерозподілу іонів через мембрану клітин-мішеней [12, 15].

Проміжний 13,3% інгібуючий ефект на іонну провідність, що визначено у присутності гліцеролу зі *транс*-сторони ністатинутворених каналів (таблиця), може відбуватись завдяки неповному заповненню неелектролітами каналної порожнини, причиною якого є звуження *транс*-входу, оскільки водна пора ідеально циліндричної форми з однаковими *цис*- і *транс*-отворами має бути повністю проникною для неелектролітів або є непроникною взагалі. Виходячи з припущення, що найвужча ділянка каналу близька за розміром до найменшої частково проникаючої молекули неелектроліту [16], очевидний радіус звуження ністатинутвореного каналу має бути приблизно таким же, як гідродинамічний радіус гліцеролу (0,308 нм).

З огляду на те, що жоден з використаних у роботі блокаторів не змінює трансмембранний струм через отвір *транс*-входу в ністатинутворені канали, порівняльний аналіз їхньої спроможності блокувати ці канали можна було проводити тільки після внесення блокаторів у *цис*-відділення комірки з бішаровою ліпідною мембраною. Кінетика зв'язування ДМГТ із ністатинутвореними каналами не виявляє кооперативності і дозволяє припустити, що цей блокатор зв'язується лише з одним негативно зарядженим центром каналу (рис. 2, А). Незважаючи на те, що зменшення ністатиніндукованого трансмембранного струму 100 мМ

K⁺, що досягнуто за впливу ДМГТ і тетраметиламонію, є досить суттєвим для обох блокаторів (~70–90%), зв'язування з ДМГТ виявляється більш специфічним (рК = 5,17), ніж з тетраметиламонієм (рК = 2,78). Таким чином, ДМГТ, який на відміну від тетраметиламонію належить до гетероциклічних сполук, значно ефективніший блокатор ністатиніндукованої провідності [18].

Прикладання тетраетиламонію до *цис*-входу ністатинутвореного каналу у діапазоні концентрацій 0,1–10 мМ не змінює трансмембранного струму в базовому розчині хлориду калію, тоді як 4,3 мМ тетраметиламоній спричинює 93% зниження цього струму (рис. 3, А). Можливим є припущення, що ефективний радіус *цис*-входу до ністатинутвореного каналного комплексу краще співпадає із радіусом молекули тетраметиламонію (0,322 нм), порівняно з більшою за розміром молекулою тетраетиламонію (0,385 нм). Це дозволяє вважати люмен ністатинутвореного каналу майже циліндричним, оскільки різниця між ширшим ефективним радіусом *цис*-входу (0,322 нм) і трохи вужчим очевидним радіусом *транс*-входу (0,308 нм) забезпечує дуже малий кут нахилу внутрішніх стінок каналу. Такий висновок добре узгоджується з будовою ністатинутвореного каналу, запропонованою раніше [12, 13].

Незначні розбіжності, виявлені між розмірами отворів ністатинутворених каналів із протилежних боків мембрани, майже не дають підстав допускати, що односторонній блокувальний ефект тетраметиламонію опосередкованою наявністю звуження з *транс*-сторони каналного люмена. Такий висновок підтверджується і односторонньою дією ДМГТ на іонну провідність ністатинутворених каналів. Це свідчить на користь класичної моделі ністатинутвореного каналу, відповідно до якої негативний потенціал локалізовано у *цис*-отворі каналу, що створює сприятливі умови для зв'язування ДМГТ або тетраметиламонію з *цис*-сторони модифікованої мембрани [12, 13]. Причому негативно заряджений центр настільки віддалений від *транс*-входу ністатинутворених каналів, що блокатори можуть досягти його тільки з *цис*-сторони.

Вважається, що спроможність тетраалкіламоніїв до блокування іонних каналів із відповідним розміром люмена реалізується завдяки зарядженій голівці молекули блокатора, яка просувається у глибину порожнини каналу, зв'язуючись там із протилежно зарядженими групами, в той час як алкільний хвіст може взаємодіяти з гідрофобними

ділянками каналних стінок, чим забезпечує молекулі блокатора можливість займати більше місця, ніж це необхідно для проникнення через канал іонам базового сольового розчину назовні мембрани. Інтенсивність редукції трансмембранного струму зростає зі збільшенням збігу між молекулярним розміром блокатора і ефективним радіусом отвору каналу [18]. Аплікація 0,1 мМ ДМГТ з боку *цис*-входу до катіон-селективних каналів актинії *Radianthus macrodactylus*, амфотерицин В- і ністатинутворених каналів з ефективними радіусами отворів 0,55; 0,385 і 0,322 нм зменшує їхню провідність у 100 мМ КСІ на 50, 84 і 67% відповідно. Одержаний результат надає додаткові свідчення на користь припущення про залежність інгібуючої спроможності ДМГТ від розміру отвору каналу, до якого прикладено цю сполуку [8, 10], що робить індуковане ДМГТ інгібування схожим на дію пробкових блокаторів, таких як тетраетиламоній і тетраметиламоній. Згідно з ефектом блокування провідності, *цис*-отвір утвореного амфотерицином В каналу, виміряний нами раніше [10], є більш відповідним за розміром ДМГТ, порівняно з тим, що визначено в цій роботі для ністатину. Половина максимального блокувального ефекту досягнута при концентрації ДМГТ 7,5 мкМ для утворених амфотерицином В каналів [10] і 6,79 мкМ для ністатинутворених каналів, тоді як для напівмаксимального блокування амфотерицин В- або ністатинутворених каналів тетраалкіламонієм необхідно було 3 або 1,64 мМ тетраметиламонію відповідно. Беручи до уваги те, що наявність тiazолієвого циклу є найбільш важливою різницею між ДМГТ і тетраалкіламоніями, можна припустити, що ця відмінність могла стати найвірогіднішою причиною високої афінності зв'язування для ДМГТ, разом із деякими іншими факторами, такими як довжина вуглецеводневого ланцюга в позиції 3 тiazолієвого циклу, збіг розмірів отворів каналів і блокатора, тощо [4, 5].

Таким чином, на моделі ністатинутвореного каналу у бішаровій ліпідній мембрані показано, що ДМГТ є специфічним блокатором ністатиніндукованого трансмембранного струму іонів калію, який може стати ефективним замінником добре відомого блокатора тетраетиламонію. За допомогою порівняльного аналізу встановлено, що блокувальний ефект ДМГТ K^+ -струму катіонселективними канала-

ми найкраще проявляється на отворах каналів із внутрішнім радіусом 0,385 нм.

Автори висловлюють глибоку вдячність М. В. Кустову з Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за допомогу у використанні програмного забезпечення, надану для оброблення результатів дослідів.

ДЕЙСТВИЕ 3-ДЕЦИЛОКСИКАРБОНИЛМЕТИЛ- 4-МЕТИЛ-5-(β -ГИДРОКСИ- ЭТИЛ)ТИАЗОЛИЙ ХЛОРИДА НА ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ТОК K^+ ЧЕРЕЗ ИОННЫЕ КАНАЛЫ, ОБРАЗОВАННЫЕ НИСТАТИНОМ В БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ

О. Я. Шатурский¹, А. В. Романенко²,
Н. Г. Гиммельрейх¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua;

²Национальный медицинский университет
имени А. А. Богомольца, Киев, Украина

Аплікація 0,1 мМ структурного аналога вітаміна B_1 (тіамина) – 3-децилоксикарбонилметил-4-метил-5-(β -гідроксиетил)тіазолий хлорида (ДМГТ) з *цис*-сторони, що містить холестерол біслоюної фосфоліпідної мембрани в симетричному розстворі 100 мМ КСІ викликає оборотиме зменшення провідності ністатинових каналів, реконструйованих з той же сторони мембрани, на $67 \pm 3\%$. Провідність ністатинових каналів, встроєних в ліпідний біслою мембрани з *цис*-сторони, не змінюється, коли ДМГТ вводили з протилежної (*транс*-сторони) модифікованої мембрани. Кінетика інгібування ДМГТ односторонніх ністатинових каналів не проявляє кооперативності і дозволяє передположити, що ДМГТ зв'язується тільки з одним отрицательно зарядженим центром каналу. Относно высокая рК диссоциации ДМГТ (5,17) дает возможность заключить, что такой центр способен специфически взаимодействовать с ДМГТ.

Ключевые слова: нистатин, ионные каналы, липидный бислою, тiazолиевый аналог вітаміна B_1 .

EFFECT OF 3-DECYLOXYCARBONYLMETHYL-4-METHYL-5-(β -HYDROXYETHYL)THIAZOLE CHLORIDE ON NYSTATIN-CREATED K^+ -CURRENT ACROSS BILAYER LIPID MEMBRANE

O. Ya. Shatursky¹, O. V. Romanenko²,
N. H. Himmelreich¹

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua;

²Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

S u m m a r y

The application of 0.1 mM of vitamin B₁ (thiamine) structural analogue, 3-decyloxy carbonylmethyl-4-methyl-5-(β -hydroxyethyl)thiazole chloride (DMHT) from the cis-side of cholesterol-containing phospholipid bilayer membrane in symmetric solution of 100 mM KCl reversibly reduced the conductance of nystatin channels, reconstituted from the same side of membrane, by $67 \pm 3\%$. The conductance of nystatin channels applied to the cis-side of bilayer membrane remained unaffected, when DMHT was introduced separately to the opposite trans-side of modified membrane. The kinetics of nystatin channels inhibition with DMHT showed no cooperativity allowing to expect that negatively charged ionogenic groups of these channels formed one DMHT binding site per channel. Relatively high pK of binding with nystatin channels (5,17) suggests that this site provides specific interaction with DMHT.

Key words: nystatin, ionic channels, lipid bilayer; vitamin B₁ thiazole analogue.

1. Романенко О. В., Шепелев С. Е. // Нейрофизиология. — 2007. — **39**, № 4/5. — С. 416–418.
2. Романенко О. В., Шепелев С. Е. // Там же. — 2008. — **40**, № 4. — С. 322–330.
3. Романенко О. В., Шепелев С. Е. // Клін. та експерим. патол. — 2008. — **7**, № 1. — С. 92–97.
4. Романенко А. В., Гнатенко В. М., Владимірова І. А., Вовк А. І. // Нейрофизиология. — 1995. — **27**, № 5/6. — С. 375–386.
5. Романенко А. В., Вовк А. І., Шатурський О. Я. // Там же. — С. 368–374.
6. Oliveira F. A., Galan D. T., Ribeiro A. M., Cruz J. S. // Brain Res. — 2007. — **1134**. — P. 79–86.
7. Bettendorff L. // Arch. Physiol. Biochem. — 1996. — **104**. — P. 745–751.
8. Shatursky O. Ya., Volkova T. M., Romanenko O. V. et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 2007. — **1768**. — P. 207–217.
9. Orlova E. V., Rahman M. A., Gowen B. et al. // Nature Struct. Biol. — 2000. — **7**, N 1. — P. 48–53.
10. Шатурський О. Я., Романенко О. В., Гіммельрейх Н. Г. // Укр. біохім. журн. — 2009. — **81**, № 2. — С. 57–67.
11. Baas B., Kindt K., Scott A. et al. // AAPS Pharmsci. — 1999. — **1**, N 3. — P. 10–12.
12. Marty A., Finkelstein A. // J. Gen. Physiol. — 1975. — **65**. — P. 515–526.
13. Holz R., Finkelstein A. // Ibid. — 1970. — **56**. — P. 515–526.
14. Борисова М. П., Ермишкин Л. Н., Зильберштейн А. Я. // Биофизика. — 1978. — **23**, № 7. — С. 1093–1094.
15. Brutyan R. A., McPhie P. // J. Gen. Physiol. — 1996. — **107**. — P. 69–78.
16. Krasilnikov O. V., DaCruz J. B., Yuldasheva L. N. et al. // J. Membrane Biol. — 1998. — **161**, N 1. — P. 83–92.
17. Khutorsky V. // Biophys. J. — 1996. — **71**. — P. 2984–2995.
18. Blaustein R. O., Finkelstein A. // J. Gen. Physiol. — 1990. — **96**. — P. 905–919.

Отримано 13.10.2009