

О. Я. Шатурський, О. В. Романенко, Н. Г. Гіммельрейх

**Структурний аналог вітаміну В₁
3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-
(β-гідроксіетил)тіазолій хлорид (ДМГТ) блокує
трансмембранний струм через іонні канали,
що утворені ністатином у бішаровій ліпідній мембрані**

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костеріним)

Аплікація 0,1 ммоль/л структурного аналога вітаміну В₁ (тіаміну) — 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(β-гідроксіетил)тіазолій хлориду (ДМГТ) з цис-боку холестеролвмісної бішарової фосfolіпідної мембрани в симетричному розчині 100 ммоль/л КСІ викликала зворотнє зменшення провідності ністатинових каналів, реконструйованих з того самого боку мембрани, на (67 ± 3)%. Провідність ністатинових каналів, вбудованих у ліпідний бішар мембрани з цис-боку, не змінювалася, коли ДМГТ був введений з протилежного транс-боку модифікованої мембрани. Кінетикою інгібування ДМГТ односторонніх ністатинових каналів не виявлено кооперативності, отже можна припустити, що ДМГТ зв'язується лише з одним негативно зарядженим центром каналу. Відносно висока рК зв'язування ДМГТ з ністатиновими каналами (4,77) дає змогу зробити висновок, що такий центр здатний забезпечувати специфічну взаємодію з ДМГТ.

Вітамін В₁ та його похідні є речовинами, які залучені до процесу регуляції синаптичної передачі. Дефіцит вітаміну В₁ може стати причиною порушення координації рухів, рефлексорної діяльності, моторики шлунково-кишкового тракту та розвитку паралічу й атрофії м'язів кінцівок в організмі людини і тварин [1–5]. Дефіцит тіаміну також може провокувати значне зменшення потенціалозалежного калієвого струму та пригнічення швидкого калієвого струму А-типу в 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 в тіаміні 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 вуглеводневий радикал в позиції 3 тіазолієвого циклу може зумовлювати редукцію трансмембранного струму через іонний канал за умови, що блокувальний компаунд щільно прилягає до внутрішніх стінок отвору пори [5]. Крім того, зв'язування позитивно зарядженого атома азоту тіазолієвого циклу з протилежно зарядженим центром усередині пори видається необхідним для прояву блокування іонного струму через іонний канал. Враховуючи можливість того, що одним з наслідків взаємодії тіазолієвих похідних вітаміну В₁ зі збудливою мембраною може бути безпосереднє інгібування каналної проникності [4], ми використали штучні бішарові ліпідні мембрани (БЛМ), модифіковані очищеними пороформувальними токсинами, для перевірки цього припущення.

Раніше було показано, що аплікація ДМГТ інгібувала Ca^{2+} -струм через катіонселективні канали, сформовані α -латротоксином із отрути каракурта *Latrodectus mactans* (α -LT) у БЛМ. При цьому, введення 0,1 ммоль/л ДМГТ з *цис*-боку БЛМ, яка знаходилася у симетричному розчині 10 ммоль/л CaCl_2 , знижує струм, індукований α -LT на $(31,6 \pm 3)\%$, а з *транс*-боку БЛМ на $(61,8 \pm 3)\%$ [5, 8]. ДМГТ також знижує струм катіонів, індукований ще одним пороформульвальним білком з отрути актинії *Radianthus macrodactylus* (RTX), який належить до іншої родини тваринних токсинів. Отже, можна припустити відсутність значної видової специфічності токсинів різного походження при взаємодії з ДМГТ [8]. Порівняльний аналіз ефективних радіусів α -LT каналу з *цис*-боку БЛМ (0,9 нм) та з *транс*-боку БЛМ (0,28 нм) з інгібуючою дією ДМГТ, отриманою на цих отворах, дозволяє зробити висновок про посилення інгібуючого ефекту ДМГТ на катіонселективні канали зі зменшенням ефективного розміру їх люмена [8]. Беручи до уваги те, що максимальний інгібуючий ефект ДМГТ був досягнутий на отворі, ефективний радіус якого, за нашими даними, дорівнює 0,28 нм [5, 8], можна очікувати аналогічний інгібувальний ефект ДМГТ після його прикладання до катіонселективних каналів з ефективним радіусом пори $\sim 0,3$ нм. За такий об'єкт дослідження доцільним вважається використання однобічних каналів, утворених у БЛМ широко відомим полієновим антибіотиком з протигрибковими властивостями ністатином [9–11], після додавання цього антибіотика тільки з одного боку мембрани.

Для проведення дослідження впливу ДМГТ на струм через ністатинові канали в БЛМ у більшості експериментів використовували БЛМ, сформовані з розчину фосфатидилхоліну (ФХ) яєчного жовтка (Харківське ЗАТ “Біолек”, Україна; Sigma, США) і холестерину (Calbiochem, Германия; Sigma, США; Serva, Германия). Суміш ФХ : холестерин або ДОФХ (синтетичний 1,2-дифітаноїл-sn-гліцеро-3-фосфохолін) : холестерин розчиняли в *n*-гептані. Співвідношення ФХ : холестерин або ДОФХ : холестерин у розчині становило 2 : 1 при загальній концентрації ліпідів 20 мг/мл. Мембранну суміш наносили на отвір у тefлоновому стаканчику діаметром 0,6 мм. Формування ліпідного бішару спостерігали візуально у відображеному світлі за допомогою біокулярного мікроскопа. Водно-сольовий розчин, який оточував мембрану, містив 10 ммоль/л *Трис*-HCl (Sigma, США) (pH 7,4) та задану кількість хлориду калію кваліфікації о.с.ч. Для вимірів провідності мембрани використовували хлоросрібні електроди з агаровими містками. Потенціал назовні тefлонового стаканчика (*цис*-бік) задавали відносно потенціалу внутрішнього об'єму (*транс*-бік), який приймали рівним віртуальному 0 мВ. Різниця потенціалів прикладалася до мембрани від джерела напруги, що дозволяло отримувати постійну (від -150 до 150 мВ) або лінійно змінювану напругу зі швидкістю 100 мВ/хв, використовуючи той самий діапазон амплітуд. Сумарні струми багатоканальних БЛМ реєстрували за допомогою підсилювача зі смугою пропускання 1 кГц. Розчин, що оточує мембрану, перемішували магнітною мішалкою. Для блокування іонної провідності, утвореної ністатиновими каналами в БЛМ, використовували водний розчин хлориду ДМГТ.

Уведення 0,2 мкг/мл ністатину в *цис*-відділення комірки з БЛМ, оточеної базовим розчином симетричного 100 ммоль/л KCl, викликало безперешкодне зростання трансмембранного струму при нарузі +80 мВ (рис. 1, а, вставка). Зростання макроскопічного струму, що включав у себе від сотень до тисяч струмів через поодинокі канали, згодом досягав насичення і виходив на плато або був зупинений промивкою комірки з мембраною водно-сольовим розчином без ністатину. Визначення стаціонарних вольт-амперних характеристик (ВАХ) і/або додавання блокатора проводили після досягнення сталої провідності БЛМ.

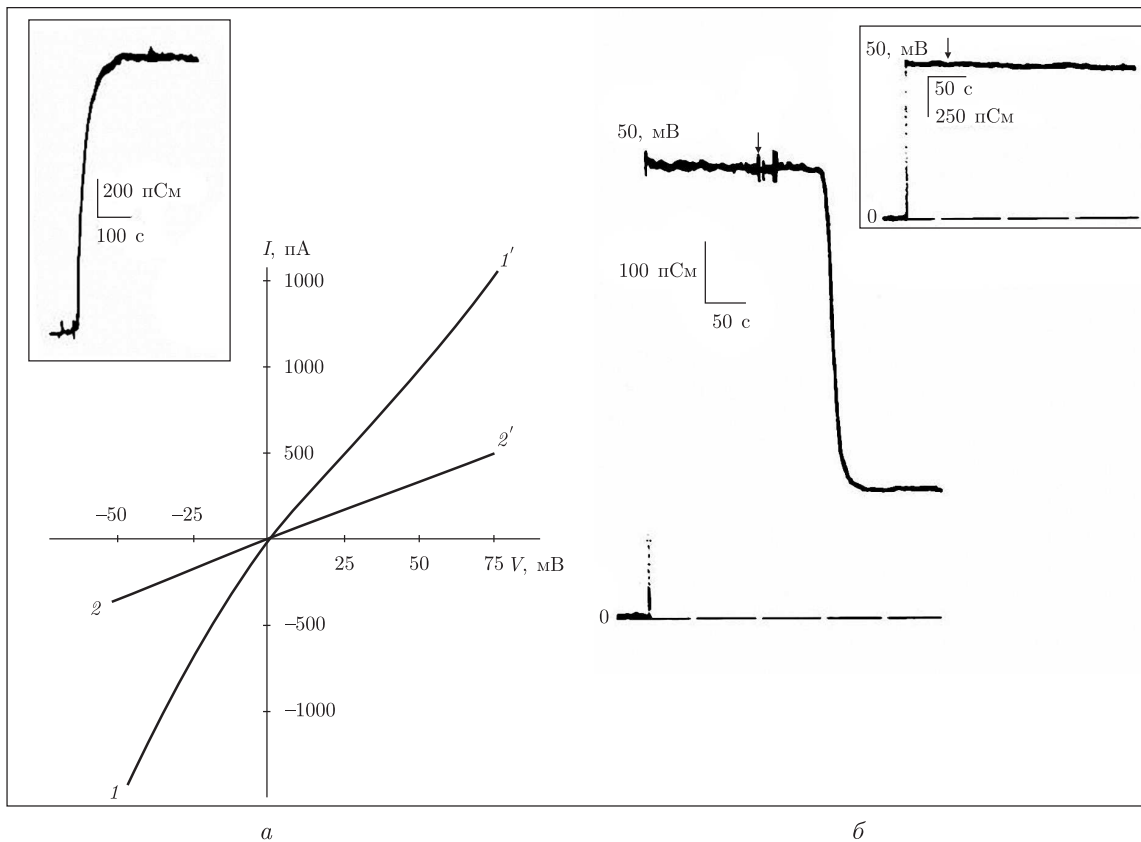


Рис. 1. Блокування 0,1 ммоль/л ДМГТ макроскопічного стаціонарного струму, утвореного однобічними ністатиновими каналами в БЛМ.

a: ВАХ ністатинових каналів визначена до ($1, 1'$) і після додавання ДМГТ з *цис*-боку мембрани ($2, 2'$); *вставка* — запис макроскопічного струму, зроблений після аплікації ністатину.

б: Запис стаціонарного струму через ністатинові канали, зроблений після введення ДМГТ з *цис*-боку мембрани; *вставка* — запис стаціонарного струму через ністатинові канали, зроблений після введення ДМГТ з *транс*-боку мембрани. Стрілками показано додавання ДМГТ в комірку з БЛМ

Уведення 0,1 ммоль/л ДМГТ з *цис*-боку модифікованої ністатином мембрани, що знаходилася у симетричному розчині 100 ммоль/л КСІ, знижувало сумарний струм через однобічні канали ністатину на $(67 \pm 3)\%$ (див. рис. 1). Викликане ДМГТ блокування трансмембранного струму досягало максимальних значень за 4–7 хв і не виявляло значної залежності від знаку мембранного потенціалу в межах напруг, які були прикладені до мембрани (див. рис. 1, *a*). ДМГТ ефективно блокував однобічні ністатинові канали тільки після прикладання з *цис*-боку мембрани. Додавання ДМГТ з протилежного *транс*-боку БЛМ, модифікованої ністатином, не впливало на її провідність (див. рис. 1, *б*, *вставка*). Блокувальна дія ДМГТ, що досягнута з *цис*-боку БЛМ, модифікованої однобічними ністатиновими каналами, зникала після ретельної промивки *цис*-відділення розчином без ДМГТ. Провідність ністатинових каналів, що визначена до введення блокатора, цілковито відновлювалася за 25–30 хв після промивки.

Блокувальний ефект ДМГТ на струм через однобічні ністатинові канали, індукований в симетричному розчині 100 ммоль КСІ, залежав від концентрації ДМГТ і міг бути описаний кривою насичення Ленгмюра. Половина максимального інгібування K^+ -струму через

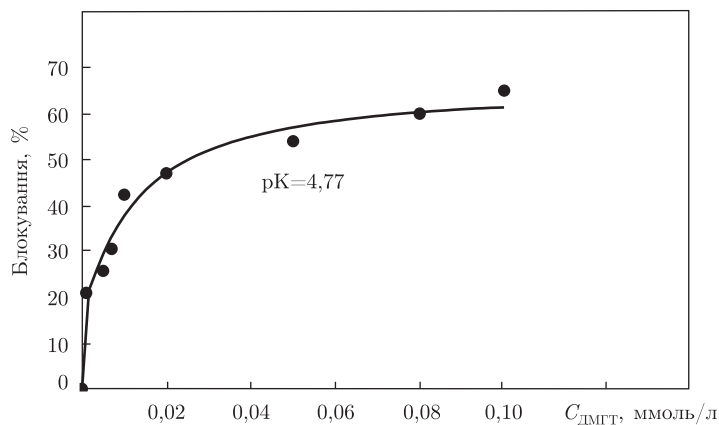


Рис. 2. Блокувальний вплив різних концентрацій ДМГТ, прикладених з *цис*-боку мембрани на макроскопічну провідність, індуковану однобічними ністатиновими каналами. Оточуючий мембрану розчин містив симетричний 100 ммоль/л КСІ і вказані концентрації блокаторів. Мембранна провідність постійно спостерігалась при потенціалі +50 мВ. Ністатин додавали з *цис*-боку мембрани в кінцевій концентрації 20 мкг/мл

ністатинові канали досягались при концентрації ДМГТ 17 мкмоль/л (рис. 2). Константа зв'язування ДМГТ становила $10^{4,77}$ моль⁻¹. Наявність блокувального ефекту ДМГТ лише з *цис*-боку БЛМ надає подальші докази для припущення про те, що отвори пор однобічних каналів ністатину з протилежних боків мембрани відрізняються. Причому, лише *цис*-вхід цих каналів ідентичний до входів симетричної двобічної пори, яка утворюється в ліпідному бішарі в присутності антибіотика з обох боків БЛМ [10–13]. Можливо, що на заваді могла стояти геометрична асиметрія розмірів люмена однобічного каналу, яка перешкоджала взаємодії з блокатором на протилежному боці мембрани. Тому за допомогою різних неелектролітів (НЕ) було проведено визначення розмірів отвору пори ністатинового каналу з *транс*-боку БЛМ. За даними статті [11], молекули з радіусом Стокса, більшим за 0,4 нм, виявилися непроникними через однобічні ністатинові канали. Цей тип ністатинових каналів має ефективний розмір каналного люмена, який виключає будь-яку можливість проникнення молекул з гідродинамічним радіусом, більшим за радіус глюкози (0,37 нм), через вхідний отвір каналу з *цис*-боку БЛМ [10–12]. Отже, можна вважати молекулу сахарози, гідродинамічний радіус якої дорівнює 0,467 нм, першим непроникним НЕ серед інших, які було використано в цій роботі (табл. 1). Згідно з методом, описаним в [14], розміщення непроникної сахарози з *цис*-боку мембрани проти випробуваного НЕ з *транс*-боку дозволило окремо визначати ступінь заповнення однобічних каналів антибіотика різними НЕ тільки з *транс*-входу в канал. Показано, що після заміни початкового симетричного вод-

Таблиця 1. Блокування трансмембранного струму через однобічні ністатинові канали після введення різних НЕ з *транс*-боку мембрани

Неелектроліт	r_h , нм	Блокування, % ністатинових каналів
Етиленгліколь	$0,262 \pm 0,003$	$67,9 \pm 6,8$
Гліцерин	$0,308 \pm 0,002$	$13,3 \pm 3,3$
Глюкоза	$0,370 \pm 0,010$	$2,0 \pm 2,0$
Сахароза	$0,467 \pm 0,005$	—
ПЕГ 300	$0,6 \pm 0,02$	$0,0 \pm 2,0$

Примітка. r_h — гідродинамічні радіуси НЕ, за [14].

но-сольового розчину сахарози на етиленгліколь з *транс*-боку БЛМ відбувається зменшення величини провідності ністатинових каналів. Подальша послідовна заміна етиленгліколю з *транс*-боку БЛМ на більші за розміром молекули НЕ відновлює провідність ністатинових каналів, визначену на початку експерименту в 100 ммоль/л КСІ з непроникною сахарозою (див. табл. 1). Максимальне заповнення одnobічного ністатинного каналу НЕ, прикладеними з *транс*-боку, було отримано для етиленгліколю, який заблокував K^+ -струм на 67,9%. Заміна сахарози з *транс*-боку на більшу за етиленгліколь молекулу гліцерину знижувала мембранний струм лише на 13,3%, що є результатом меншої проникності гліцерину, порівняно з етиленгліколем, через *транс*-вхід одnobічного каналу ністатину. Найщільніше заповнення каналної порожнини незарядженими молекулами етиленгліколю залишало найменшу кількість іонів калію, які проходять через одnobічні ністатинні канали, що знижувало їх провідність до мінімуму, доступного серед інших НЕ, використаних в роботі (див. табл. 1). Тому, можна вважати, що тільки молекули етиленгліколю з гідродинамічним радіусом 0,262 нм можуть вільно проходити через водний люмен одnobічного ністатинного каналу. Розміщення гліцерину з *транс*-боку призвело тільки до 13,3% зниження K^+ -струму через одnobічні ністатинні канали, а подальша заміна сахарози з *транс*-боку на більші за розміром молекули глюкози та ПЕГ 300, 400 або 600 майже не змінювала K^+ -провідності ністатинових каналів, що дозволяє вважати не тільки молекули сахарози, а й більші за розміром НЕГ непроникними через канали цього антибіотика з *транс*-боку БЛМ. Одnobічна дія іншої блокувальної сполуки — тетраметиламонію (ТМА), визначена на ністатинних каналах з *цис*-боку, дозволяє вважати, що ці канали вбудовуються в БЛМ таким чином, що більшість каналів обернена в *цис*-відділення боком, доступним для ТМА й ДМГТ, тоді як протилежний бік у *транс*-відділенні недосяжний для них. При цьому можна припустити, що *цис*- і *транс*-отвори пор одnobічних ністатинних каналів мають різні розміри, як відзначено в статтях [10, 11]. Отже, незважаючи на певне розташування заряду вздовж одnobічних ністатинхолестеринних пор, згідно з яким більшість негативного потенціалу сконцентровано біля більш широкого отвору каналу [13], звуження ністатинних каналів з *транс*-боку також може запобігати взаємодії ністатину з полярною голівкою блокатора. Особливо, якщо негативно заряджений катіонселективний сайт, з яким блокатор потенційно може зв'язуватись, знаходиться всередині каналного люмена.

Відомо, що ністатин належить до великої родини полієнових антибіотиків, які використовуються як ефективний засіб для лікування грибкових захворювань [9]. Основна причина цитотоксичності ністатину та інших полієнових антибіотиків полягає в утворенні ними пор у плазматичних мембранах клітин-мішеней. Незважаючи на істотну специфічність до клітин-мішеней, яка може залежати від ліпідного складу їх плазматичних мембран [13], трансмембранні пори полієнових антибіотиків формуються як у нативних, так і в 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 і видову специфічність зазначених сполук. Однак можливо, що геометрія їх каналних люменів і суцільна структура мембранозв'язаних олігомерів відрізняються, що може приводити 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 [10, 13]. Проміжний 13,3% інгібуючий ефект на іонну провідність, визначений в присутності гліцерину з *транс*-боку одnobічних каналів ністатину (див. табл. 1), може відбуватися завдяки неповному заповненню НЕ каналної порожнини, причиною якого є зву-

ження *транс*-входу, оскільки водна пора ідеально циліндричної форми з однаковими *цис*- і *транс*-отворами має бути повністю проникною для НЕ або непроникною взагалі. Виходячи з припущення, що найвужча ділянка каналу близька за розміром до найменшої частково проникної молекули НЕ [14], очевидний радіус звуження однобічного ністатинного каналу має бути приблизно таким самим як гідродинамічний радіус гліцерину (0,308 нм).

Кінетикою зв'язування ДМГТ з однобічними ністатинними каналами не виявлено кооперативності, що дало змогу припустити таке: цей блокатор зв'язується лише з одним негативно зарядженим центром каналу (див. рис. 2). Причому, зв'язування з ДМГТ виявилось досить специфічним ($pK = 4,77$). Таким чином, ДМГТ, який на відміну від ТМА належить до гетероциклічних сполук, був значно ефективнішим блокатором провідності ністатинних каналів [12]. Прикладання тетраетиламонію (ТЕА) до *цис*-входу ністатинного каналу в діапазоні концентрацій 0,1–10,0 ммоль/л не змінювало трансмембранного струму в базовому розчині хлориду калію, тоді як ТМА викликав істотне зниження цього струму [12]. Тому можна припустити, що ефективний радіус *цис*-входу до однобічного ністатинхолестеринного каналного комплексу краще збігається з радіусом молекули ТМА (0,322 нм), порівняно з більшою за розміром молекулою ТЕА (0,385 нм). Це дало змогу вважати люмен ністатинного 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 однобічного ністатинхолестеринного каналного комплексу, запропонованою раніше [10, 11]. Незначні розбіжності між розмірами отворів пор однобічних ністатинних каналів з протилежних боків мембрани, майже не дають підстав припускати, що однобічний блокувальний ефект ТМА або ДМГТ опосередкований наявністю звуження з *транс*-боку каналного люмена. Це свідчить на користь класичної моделі однобічного ністатинхолестеринного комплексу, згідно з якою негативний потенціал катіонселективного центра локалізовано в *цис*-отворі пори, що створює сприятливі умови для зв'язування ДМГТ або ТМА тільки з *цис*-боку модифікованої БЛМ [10, 11].

Таким чином, згідно з результатами дослідження, найсприятливіші умови для використання ДМГТ як новітнього блокатора іонних каналів були підібрані на катіонселективних каналах з приблизним розміром отвору пори 0,3 нм.

1. Романенко А. В., Шепелев С. Е. Влияние В₁-гиповитаминоза на эффективность нервно-мышечной передачи в диафрагме мыши // Нейрофизиология. – 2007. – **39**, № 4./5. – С. 416–418.
2. Романенко О. В., Шепелев С. Е. Влияние алиментарного дефицита витамина В₁ на спонтанное та викликане вивільнення трансмітера в нервово-м'язевих синапсах миші // Там же. – 2008. – **40**, № 4. – С. 322–330.
3. Романенко О. В., Шепелев С. Е. Корегування тіаміном нервово-м'язевої передачі при В₁-гіповітамінозі // Клін. та експерим. патологія. – 2008. – **7**, № 1. – С. 92–97.
4. Романенко А. В., Гнатенко В. М., Владимірова І. А., Вовк А. І. Пре- и постсинаптическая модуляция нейромышечной передачи тиазольевым аналогом витамина В₁ в гладких мышцах // Нейрофизиология. – 1995. – **27**, № 5./6. – С. 375–386.
5. Романенко А. В., Вовк А. І., Шатурский О. Я. Эффекты тиазольевых аналогов витамина В₁ на нейро-мышечную передачу и индуцированное α -латротоксином высвобождение трансмиттера в скелетных мышцах // Там же. – С. 368–374.
6. Oliveira F. A., Galan D. T., Ribeiro A. M., Cruz J. S. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: role of voltage-dependent K⁺ channels // Brain Res. – 2007. – **1134**. – P. 79–86.
7. Bettendorff L. A non-cofactor role of thiamine derivatives in excitable cells? // Arch. Phys. Biochem. – 1996. – **104**. – P. 745–751.

8. *Shatursky O. Ya., Volkova T. M., Romanenko O. V., Himmelreich N. H., Grishin E. V.* Vitamin B₁ thiazole derivative reduces transmembrane current through ionic channels formed by toxins from black widow spider venom and sea anemone in planar phospholipid membranes // *Biochim. et biophys. acta.* – 2007. – **1768**. – P. 207–217.
9. *Baas B., Kindt K., Scott A. et al.* Activity and kinetics of dissociation and transfer of amphotericin B from a novel delivery form // *AAAPS Pharmsci.* – 1999. – **1**, No 3. – P. 10–12.
10. *Marty A., Finkelstein A.* Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin // *J. Gen. Physiol.* – 1975. – **65**. – P. 515–526.
11. *Holz R., Finkelstein A.* The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B // *Ibid.* – 1970. – **56**. – P. 515–526.
12. *Борисова М. П., Ермишкин Л. Н., Зильберштейн А. Я.* Блокаторы полиеновых каналов в липидном бислое // *Биофизика.* – 1978. – **23**, № 7. – С. 1093–1094.
13. *Brutyan R. A., McPhie P.* On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1996. – **107**. – P. 69–78.
14. *Krasilnikov O. V., DaCruz J. B., Yuldasheva L. N. et al.* A novel approach to study the geometry of the water lumen of ion channels: Colicin Ia channels in planar lipid bilayers // *J. Membrane Biol.* – 1998. – **161**, No 1. – P. 83–92.

*Інститут біохімії ім. О. В. Паладіна
НАН України, Київ
Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ*

Надійшло до редакції 03.03.2009

O. Ya. Shatursky, O. V. Romanenko, N. H. Himmelreich

**The vitamin B₁ structural analogue
3-decyloxy carbonylmethyl-4-methyl-5-(β -hydroxyethyl)thiazole chloride
(DMHT) blocks transmembrane current through ionic channels created
by nystatin in bilayer lipid membranes**

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 a cholesterol-containing phospholipid bilayer membrane in a symmetric solution of 100 mM KCl reversibly reduced the conductance of nystatin channels reconstituted from the same side of the membrane by (67 \pm 3)%. The conductance of nystatin channels applied to the cis-side of the bilayer membrane remained unaffected, when DMHT was introduced separately to the opposite trans-side of the modified membrane. The inhibition kinetics for nystatin channels 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 (4.77) suggests that this site provides a specific interaction with DMHT.