

ЛИХАЦКАЯ Галина Николаевна

**МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ И СТЕРОИДНЫХ
ГЛИКОЗИДОВ С ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ**

Специальность: 03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Владивосток
2006

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН

Научный руководитель: Доктор физико-математических наук
Ермишкин Лев Николаевич

Официальные оппоненты:

Профессор, доктор физико-математических наук
Энно Куставич Рууге

Член-корреспондент РАН,
доктор химических наук
Щипунов Юрий Анатольевич

Ведущая организация: Институт биофизики клетки РАН
(г. Пущино)

Защита состоится 10 ноября 2006 года в 10 часов на заседании диссертационного совета ДМ005.007.03 в Институте автоматики и процессов управления ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Радио, 5, ИАПУ ДВО РАН, ауд. 510 (e-mail: director@iacp.dvo.ru; Факс: (4232) 310452).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института автоматики и процессов управления ДВО РАН.

Автореферат разослан «10» октября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета ДМ 005.007.03, д.м.н.

Черняховская М. Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Тритерпеновые и стероидные гликозиды (сапонины) относятся к классу низкомолекулярных биорегуляторов и обладают широким спектром медико-биологического действия. Они проявляют противоопухолевую, противогрибковую, противовирусную, и иммуномодулирующую активности и перспективны в качестве лекарственных препаратов и как инструменты в научных исследованиях. За последние 30 лет достигнуты значительные успехи в установлении их полной структуры. Накоплен обширный материал по связи между химическим строением и биологической активностью сапонинов. Многие виды биологической активности гликозидов обусловлены взаимодействием их с мембранными стеринами, в результате которого происходит нарушение структуры и избирательной проницаемости клеточных мембран. Для объяснения механизма действия гликозидов была предложена "стериновая" гипотеза. Но в настоящее время растет число фактов, которые не укладываются в рамки предложенной модели. В работах Богатского с соавт. и Корепановой с соавт. впервые было показано, что механизм действия тритерпеновых и стероидных гликозидов на мембраны, содержащие стерин, связан с образованием ионных каналов. К началу нашей работы зависимость параметров каналов от структуры гликозидов и стерина была не изучена. Структура комплексов гликозидов со стеринами и роль углеводной части и агликона молекулы гликозида в образовании комплекса не ясна. Молекулярные механизмы взаимодействия гликозидов с мембранами были изучены недостаточно. Выяснение механизма действия тритерпеновых и стероидных гликозидов необходимо для успешного применения их в научных исследованиях, биотехнологии, медицине и сельском хозяйстве. Поэтому изучение механизмов взаимодействия гликозидов с мембранами актуально как в теоретическом, так и в практическом отношении.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение физико-химических механизмов взаимодействия тритерпеновых и стероидных гликозидов с мембранами, установление общих закономерностей и индивидуальных особенностей действия гликозидов, выяснение различий в мембранотропном действии свободных и гликозилированных тритерпеноидов и стероидов. В задачи нашего исследования входило:

- 1) изучение механизма действия тритерпеновых гликозидов голотурий на ионную проницаемость и термотропное поведение модельных мембран; установление связи структура – активность и калориметрическое изучение комплексообразования тритерпенового гликозида голотурина A_2 и его свободного агликона с мембранным холестерином;
- 2) изучение механизма мембранотропного действия гликозилированных и свободных тритерпеноидов растительного происхождения β -амиринового, даммаранового и лупанового рядов
- 3) изучение механизма действия стероидного гликозида и его агликона на клеточные и модельные мембраны;

Научная новизна.

Впервые изучены ион-селективные каналы и неселективные поры, образованные гликозидами различного строения в стеринсодержащих мембранах. Установлена связь между химическим строением гликозидов, их каналобразующей активностью. Установлено, что каналобразующая активность и устойчивость мембран к действию гликозидов определяются липидным составом мембран, структурой и количественным содержанием стерина в мембранах.

Впервые изучено влияние тритерпеновых гликозидов различного строения на термотропный фазовый переход липидных мембран и калориметрически показано образование комплексов одинаковой стехиометрии для тритерпенового гликозида и его свободного агликона с мембранным холестерином. Показана роль углеводного компонента и агликона в проявлении мембранотропного действия гликозидов.

Впервые показано, что тритерпеновые гликозиды из высших растений (гликозиды хедерагенина, бетулиновая кислота и ее гликозиды, цитотоксические гликозиды женьшеня) образуют ионные каналы в модельных и клеточных мембранах и влияют на физическое состояние липидного бислоя и термотропное поведение мембран. Показано обратимое регулирование проницаемости мембран с помощью рН-управляемых каналов, образованных тритерпеновым гликозидом.

Впервые изучен механизм мембранотропного действия стероидного гликозида и его свободного агликона на клеточные и модельные мембраны. Показано образование ионных каналов, и изменение физического состояния мембран в присутствии стероидного гликозида и отсутствие ионных каналов и стериноподобные эффекты при действии на мембраны его свободного агликона.

Впервые проведено сравнительное изучение мембранотропного действия свободных и гликозидированных тритерпеноидов животного и растительного происхождения и показаны различия в механизмах их действия. Предложены молекулярная модель действия гликозидов на мембраны и мембранный механизм регуляции клеточной активности биорегуляторами тритерпеновой и стероидной природы.

Практическая значимость работы. Полученные результаты вносят вклад в понимание физико-химических механизмов действия тритерпеновых и стероидных гликозидов на клетки, углубляют существующие представления о влиянии низкомолекулярных биорегуляторов на проницаемость мембран.

Установленные закономерности служат основой для прогноза мембранной активности новых соединений или модификации структуры известных соединений для получения заданных свойств.

Предложен новый биохимический инструмент для научных исследований на основе гликозида хедерагенина для регулируемого изменения проницаемости мембран.

Полученные данные по свойствам ионных каналов, образованных тритерпеновыми гликозидами, и по влиянию гликозидов и их генинов на термотропное поведение мембран могут найти применение в научно-исследовательских лабораториях. Результаты диссертационного исследования используются при чтении спецкурса для студентов, а также при выполнении курсовых и дипломных работ.

Обоснованность и достоверность результатов подтверждается использованием современных биофизических методов исследования мембран и способов обработки полученных экспериментальных данных.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на I Всесоюзном биофизическом съезде (Москва, 1982); на II Съезде биофизиков России (Москва, 1999). Сделаны доклады на симпозиуме «Сапонины: Структура и биологическая активность» Американского химического общества (Чикаго, США, 1995); на международных конференциях по сапонидам (Пилава, Польша, 1999 и 2004); на XIII Всемирном конгрессе по токсинам (Париж, 2000); на IX Азиатско-тихоокеанском конгрессе (Тайбей, Тайвань, 1998); на региональных научных конференциях ТИБОХ ДВО РАН Владивосток.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ.

Личный вклад автора состоит в том, что им самостоятельно получены экспериментальные данные по влиянию исследуемых соединений на ионную проницаемость и термотропное поведение мембран, проведена обработка и интерпретация полученных данных и написаны соответствующие разделы статей.

Структура и объем работы Работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, полученных экспериментальных результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 157 цитируемых работ. Работа изложена на 120 страницах, содержит 10 таблиц и 37 рисунков.

Работа проводилась при поддержке грантов РФФИ: № 96-04-51016-а, № 99-04-48058-а, №03-04-49521-а.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

В Главе 1 проведен анализ литературных данных и дана характеристика проблемы связи структура-активность свободных и гликозилированных тритерпеноидов и стероидов.

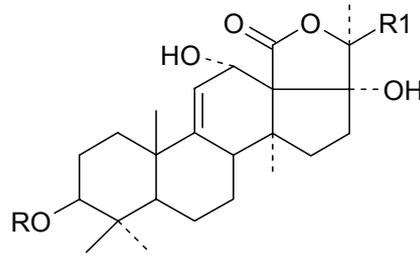
В Главе 2 описаны материалы и методы, используемые в работе. В работе использовались природные и полусинтетические соединения и их производные, идентичность и чистота (>99%) которых подтверждены данными ТСХ, ИК-, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Соединения получены, охарактеризованы и любезно предоставлены для исследований сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН. Активность исследуемых соединений изучена с использованием в качестве моделей бислойных липидных мембран (БЛМ), липосом, клеток опухоли Эрлиха, эритроцитов мыши. БЛМ получали по методу Мюллера (Mueller et al., 1962) из 0,5%-ного раствора 1-олеолилглицерина (моноолеина Sigma, США) в *n*-гептане. Стерины вводили в заданном отношении к липиду в формирующий раствор. Гликозиды добавляли в водную фазу в виде вводно-спиртовых растворов или растворов в диметилсульфоксиде (ДМСО) в заданной концентрации. Липосомы из яичного лецитина или дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ, Sigma, США) получали по методу Бенхэма (Bangham et al., 1965). Ионная проницаемость мембран изучена с помощью методов регистрации интегральных токов и токов одиночных каналов в БЛМ. Электрические измерения проводили вольтметром-электронметром ВК2-16 с сопротивлением обратной связи 10^8Ом в режиме фиксации потенциала на мембране с помощью хлор-серебряных электродов и регистрировали потенциометром КСП-4. Измерительный тракт позволял регистрировать флуктуации тока величиной 10^{-13}А и длительностью 0,5 с. Выход ионов калия из клеток измеряли с помощью K^+ -селективного электрода на биологическом микроанализаторе ОР-263 (Венгрия). Калориметрические измерения проводили на микрокалориметре ДАСМ-1М (ИБП РАН, г. Пущино), объем измерительной ячейки 1 мл, скорость прогрева образцов 1 град/мин, концентрация липида в ячейке $2,6 \cdot 10^{-4}\text{М}$. Калориметрические кривые были идентичны при повторном сканировании образца. Энтальпию фазового перехода определяли по электрической калибровке методом взвешивания пика под кривой, ошибка измерения составляла не более 5%, температуру фазового перехода определяли по максимуму пика с точностью $\pm 0,2^\circ\text{C}$.

В Главе 3 приведены результаты по исследованию молекулярных механизмов мембранотропного действия тритерпеновых и стероидных гликозидов.

Тритерпеновые гликозиды голотурий голотурины имеют агликоны голостанового типа и сульфатную группу в углеводной цепи (рис.1). К началу наших исследований связь структуры голотуринов и их каналобразующей активности была не изучена. В ТИБОХ ДВО РАН были выделены индивидуальные голотурины, их десульфатированные производные и свободные агликоны (голотуриногенины), которые были использованы при исследовании связи структура-активность голотуринов (рис. 1).

При добавлении 0,1 нг/мл (0,08 нМ) голотурина A_2 в водную фазу моноолеиновых БЛМ, содержащих 10% стерина, обнаружены дискретные флуктуации тока через БЛМ (рис. 2, А и В). Величина проводимости и время флуктуаций свидетельствует об образовании одиночных ионных каналов в БЛМ. Распределение каналов по величине проводимости имеет максимум в области (28 ± 4) пСм для БЛМ, содержащих холестерин (рис. 2, Ж). Время жизни ионных каналов в открытом состоянии подчиняется одноэкспоненциальному распределению (рис. 2, З) и среднестатистическое время жизни каналов в открытом состоянии в моноолеин-холестериновых БЛМ составляет 17 секунд. Ионные каналы, образованные голотурином A_2 в БЛМ, содержащих холестерин, имели наиболее вероятную проводимость в 2 раза меньше, чем типичные грамицидиновые каналы (Hladky and Haydon, 1972) и почти в 10 раз больше, чем проводимость ионных каналов, образованных полиеновым антибиотиком амфотерицином В (Ermishkin et al., 1976). При действии 0,1 нг/мл голотурина A_2 на моноолеин-эргостериновые бислои образуются одиночные каналы (рис. 2, В), проводимость которых в 2 раза меньше, а среднее время жизни в открытом состоянии в 2 раза больше, чем соответствующие параметры голотурин-холестериновых одиночных каналов. Вольт-

амперная характеристика одиночного канала линейна. С увеличением концентрации гликозида до 1 нг/мл (0,8 нМ) наблюдается увеличение частоты включения каналов в БЛМ, содержащих холестерин, и независимое функционирование каналов с наиболее вероятной проводимостью (28±4) пСм.



№	Соединение	R	R ₁
1	Голотурин А ₂	3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Quin-(1→2)-4-OSO ₃ Na-Xyl	
2	Голотурин DsA ₂	3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Quin-(1→2)-Xyl	
3	Голотурин В ₁	Quin-(1→2)-4-OSO ₃ Na-Xyl	
4	Голотуриногенин А ₂	H	
5	Голотурин А	3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Quin-(1→2)-4-OSO ₃ Na-Xyl	
6	Голотурин DsA	3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Quin-(1→2)-Xyl	
7	Голотуриногенин А	H	

Рис. 1. Структура тритерпеновых гликозидов голотурий (голотуринов), их десульфатированных производных и голотуриногенинов А₂ и А.

При создании градиента концентрации KCl с одной стороны БЛМ знак и величина мембранного потенциала указывают на слабую катионную селективность голотуриновых каналов. Увеличение концентрации гликозида выше 10 нг/мл вызывает флуктуации проводимости, величина которых увеличивается с ростом концентрации голотурина А₂. Регистрируемые каналы большой проводимости (неселективные водонаполненные поры) образуются за счет включения большего числа субъединичных комплексов в структуру голотуриновых каналов. При действии голотурина А₂ на БЛМ, содержащих эргостерин, наблюдается резкий переход к спонтанным флуктуациям тока большой проводимости с увеличением концентрации с 0,1 до 1,0 нг/мл (рис. 2, Г). Действие гликозида на проводимость БЛМ, содержащих разные стеринны, коррелирует с действием этого гликозида на проницаемость клеточных мембран, содержащих холестерин и эргостерин.

Гликозид голотурин В₁ при добавлении в водную фазу БЛМ, содержащих холестерин или эргостерин, вызывает дискретные флуктуации тока канального типа (рис. 2, Д и Е). Обнаружено, что параметры одиночных ионных каналов голотуринов А₂ и В₁ близки. Величина наиболее вероятной проводимости каналов составляет для голотурина (28 ±4) пСм в БЛМ, содержащих холестерин, и (14 ±4) пСм в БЛМ, содержащих эргостерин. Вид стерина влияет как на величину проводимости одиночных каналов, так и на среднее время жизни каналов в открытом состоянии. В мембранах, содержащих 10% эргостерина, проводимость голотуриновых каналов уменьшается, а среднее время жизни в открытом состоянии увеличивается.

В присутствии в водной фазе 100 нг/мл голотуринов, величина тока через БЛМ выше у гликозида с большим размером углеводной части молекулы (рис.3, А). Показано, что гликозиды имеют одинаковый наклон (n=4) линейного участка зависимости интегральной проводимости от концентрации гликозидов и разные действующие концентрации.

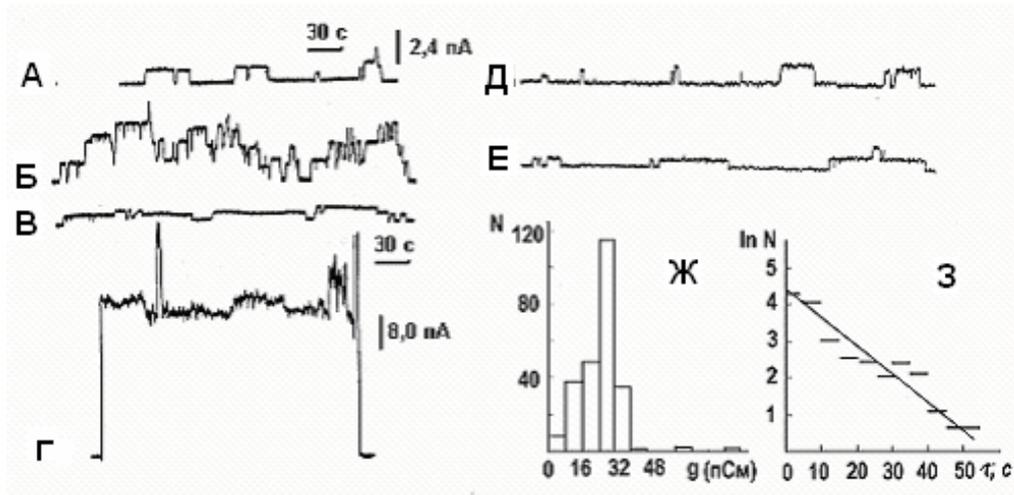


Рис. 2. Флуктуации тока через БЛМ из 0,5%-ного раствора моноолеина в н-гептане, содержащем 10% холестерина (а,б) или эргостерина (в,г) в присутствии голотурина A_2 . Водная фаза 1 М КСl, 5 mM Tris-HCl, pH 7,2, температура 23-25°C; мембранный потенциал 50 мВ. Концентрация гликозида 0,1 нг/мл (а,в) и 1,0 нг/мл (б,г). Гистограмма проводимости (ж) одиночных ионных каналов, образованных 0,1 нг/мл голотурином A_2 в моноолеиновых БЛМ, содержащих 10% холестерина и распределение времени жизни каналов в открытом состоянии (з).

При введении голотуриногена до концентрации 10^{-4} М как в водную фазу, так и в липидный раствор для формирования БЛМ, не наблюдается увеличение проводимости мембран (рис. 3, Б). Проведена оценка размеров формируемых голотуринами ионных каналов и пор по ингибированию голотуринового гемолиза молекулами полиэтиленгликолей с определенной молекулярной массой (рис. 3, В и Г). Показано, что в присутствии голотурина A_2 образуются поры большего размера, чем в присутствии голотурина B_1 (рис.3, Г). Обнаружено, что маннитол практически полностью блокирует выход калия из клеток до концентрации голотуринов 15 нг/мл. С увеличением концентрации до 40 нг/мл наблюдается частичное блокирование индуцированной проницаемости. Полученные данные свидетельствуют о корреляции действия голотуринов на модельные и клеточные мембраны, содержащие холестерин.

Таким образом, для голотуринов A_2 и B_1 показано, что механизм изменения ионной проницаемости в присутствии этих гликозидов состоит при низких концентрациях в образовании ион-селективных одиночных каналов, а при высоких концентрациях в образовании неселективных водонаполненных пор, размер которых определяется размером углеводной части молекул голотуринов. Отсутствие углеводной цепи у голотуриногена приводит к потере каналаобразующей активности и отсутствию дестабилизирующего действия на мембраны.

Изучено влияние голотурина A_2 , голотурина А и их десульфатированных производных на выход ионов K^+ из эритроцитов мыши. Обнаружено, что десульфатирование оказывает незначительное влияние на активность гликозида с линейной тетрасахаридной углеводной частью и открытой боковой цепью в агликоне (рис. 4, кривые 1 и 2). Активность голотурина А, с окисленной и замкнутой боковой цепью в агликоне, ниже, чем у голотурина A_2 , и существенно снижается при отсутствии сульфогруппы в углеводной цепи (рис. 4, кривые 3 и 4). Замкнутая боковая цепь приводит к увеличению действующей концентрации и изменению параметров ионных каналов в БЛМ. Взаимодействие голотуринов различного строения с липидными мембранами изучено высокочувствительным методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК), который позволяет определить природу возмущений в липидном бислое, локализацию и характер взаимодействия молекул в

мембране по изменению параметров фазового перехода ДПФХ, термотропное поведение которого наиболее изучено.

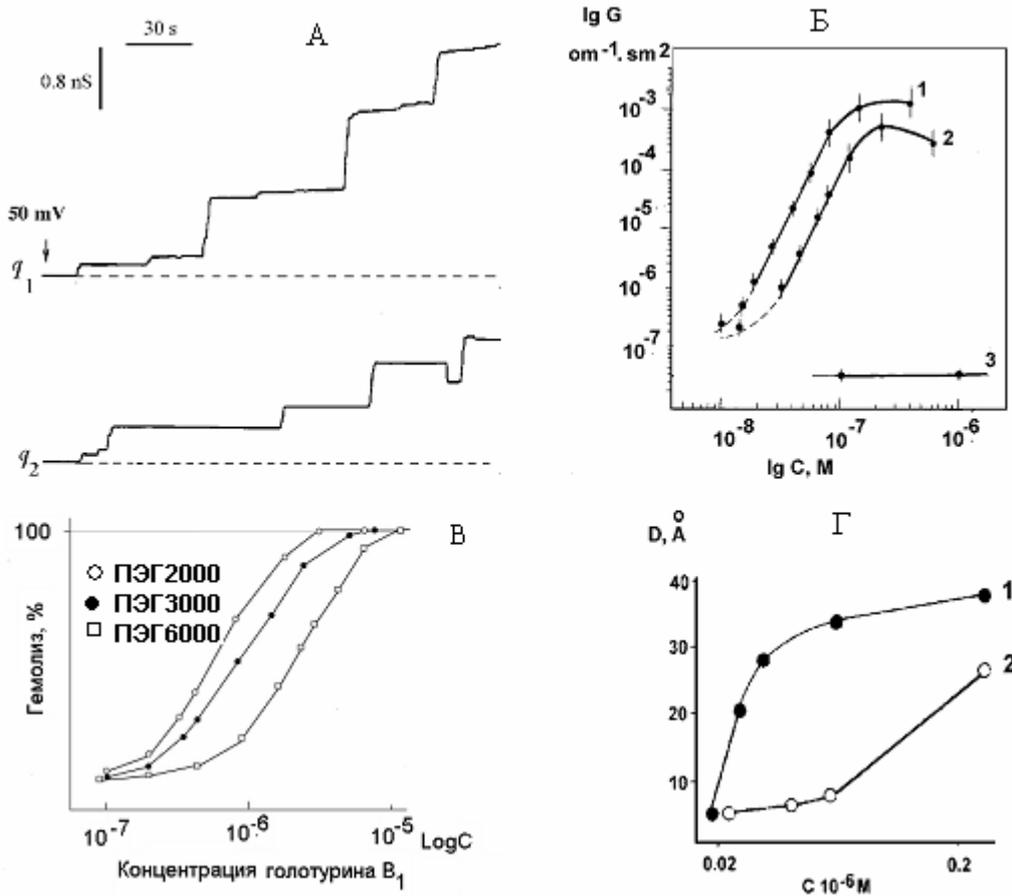


Рис. 3. (А) - записи тока через моноолеиновые БЛМ, содержащие 10% холестерина, в присутствии 100 нг/мл голотуринов A_2 (J_1) и B_1 (J_2), водная фаза 0,1 М КСl, рН 7,2, мембранный потенциал 50 мВ; (Б) – зависимость интегральной проводимости моноолеин-холестериновых БЛМ в 0,1 М КСl от концентрации голотуринов A_2 , B_1 в водной фазе и голотуриногена в липидной фазе; (В) – голотуриновый гемолиз в присутствии полиэтиленгликолей; (Г) - зависимость диаметра пор в клеточных мембранах от концентрации голотуринов. Диаметр определен по ингибированию голотуринового гемолиза полиэтиленгликолями разного размера.

Действие голотурина A_2 на фазовый переход ДПФХ в низких концентрациях проявляется в изменении параметров предперехода, снижении температуры, отвечающей пику предперехода, и уменьшении его энтальпии, что свидетельствует об изменении наклона жирнокислотных цепей ДПФХ по отношению к плоскости бислоя в присутствии голотурина. С увеличением концентрации голотурина A_2 (рис. 5) изменяются параметры основного фазового перехода ДПФХ гель-жидкий кристалл: уменьшается энтальпия и кооперативность этого перехода, появляется дополнительный пик с максимумом в области низких температур. Температурный диапазон фазового перехода в присутствии голотурина A_2 увеличивается и сдвигается в низкотемпературную область (рис. 5). Характер изменений термограмм ДПФХ свидетельствует о выраженном взаимодействии голотурина с липидным бислоем и о латеральном разделении фаз в липидном бислое. Латеральное разделение фаз может приводить к возникновению на границах доменов зон с нарушенной упаковкой молекул и к появлению различного рода “дефектов”, ответственных за изменение ионной проницаемости липидных бислоев. Голотурин B_1 оказывает аналогичное действие, вызывая

латеральное разделение фаз в мембране, но в меньшей степени сдвигает фазовый переход в низкотемпературную область, чем голотурин A_2 . Голотуриногенин A_2 изменяет энтальпию и кооперативность основного фазового перехода ДПФХ и оказывает стериноподобный эффект. Обнаружено, что голотуриногенин А с окисленной и замкнутой боковой цепью влияет на термотропный фазовый переход при более высоких концентрациях и слабее взаимодействует с гидрофобной областью мембран, по сравнению с голотуриногенином A_2 .

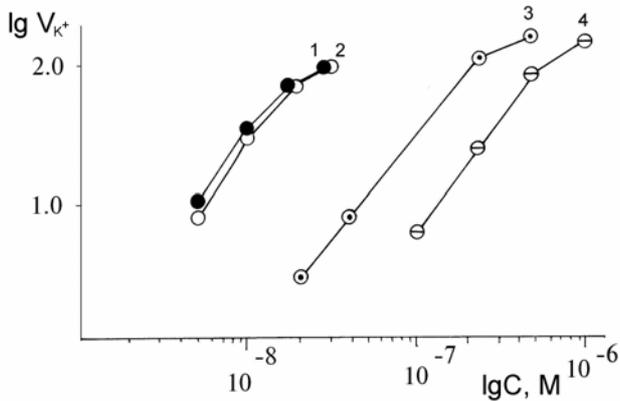


Рис. 4. Зависимость скорости выхода ионов калия из эритроцитов мыши от концентрации голотуринов с различным строением боковой цепи агликона и их десульфатированных производных: голотурины A_2 (1), DsA_2 (2), А (3), DsA (4). Данные приведены в двойном логарифмическом масштабе.

Анализ зависимости изменения относительной энтальпии фазового перехода ДПФХ от концентрации исследуемых соединений показал, что для голотуринов с тетрасахаридной углеводной частью наблюдается более резкое уменьшение относительной энтальпии, чем для гликозида с дисахаридной углеводной частью. В присутствии голотурина А изменение энтальпии и температуры фазового перехода (рис. 5, Б и В) происходят при более высокой концентрации гликозида. Калориметрические данные коррелируют с меньшей активностью голотурина А и стериноподобным стабилизирующим действием голотуриногенинов на проницаемость мембран. При действии на БЛМ, не содержащие стерина, голотурины проявляют детергентный тип действия на ионную проницаемость мембран при концентрации 1 мкг/мл. Введение стерина в мембраны снижает действующую концентрацию гликозида в 10^4 раз. Калориметрическое исследование комплексообразования голотурина A_2 и его свободного агликона с мембранным холестерином показало, что в присутствии исследуемых соединений при одинаковом мольном соотношении с холестерином наблюдается восстановление пика основного фазового перехода липосом из ДПФХ, содержащих 5% холестерина (рис. 6, А и Б). Стехиометрия комплексов голотурина A_2 :холестерин и голотуриногенин: холестерин равна 1:2. Показано, что в мембране образуются комплексы холестерина с агликонной частью молекул гликозидов и комплексы остаются в мембране. Доказано, что ионпроводящие свойства комплексов свободного и гликозилированного тритерпеноидов различны. При реконструкции в БЛМ из ДПФХ комплексы гликозилированного тритерпеноида увеличивают ионную проницаемость мембран, а комплексы свободного тритерпеноида нет (рис. 6, В и Г). По-видимому, различное действие гликозида и его генина на свойства мембран обусловлено разной формой образуемых комплексов. В случае гликозида комплекс имеет форму, увеличивающую положительную кривизну липидного бислоя, а комплекс свободного агликона нет (рис. 6, В и Г). На основании полученных данных можно сделать вывод, что главную роль в комплексообразовании голотуринов с холестерином играет гидрофобное взаимодействие агликонной части молекулы гликозида и циклопентанпергидрофенантренового цикла холестерина.

Изучена мембранная активность серии тритерпеновых гликозидов голотурий (кукумариозидов), которые отличаются количеством моносахаридных остатков, количеством и местом присоединения сульфатных групп, строением агликона и наличием 3-О-метильной группы в конечном моносахаридном остатке (табл.1). Показано, что свободный агликон не

активен до концентрации 10^{-4} М, а гликозид с одним моносахаридным остатком при С-3 агликона увеличивает скорость выхода ионов K^{+} в 100 раз (рис.7, А).

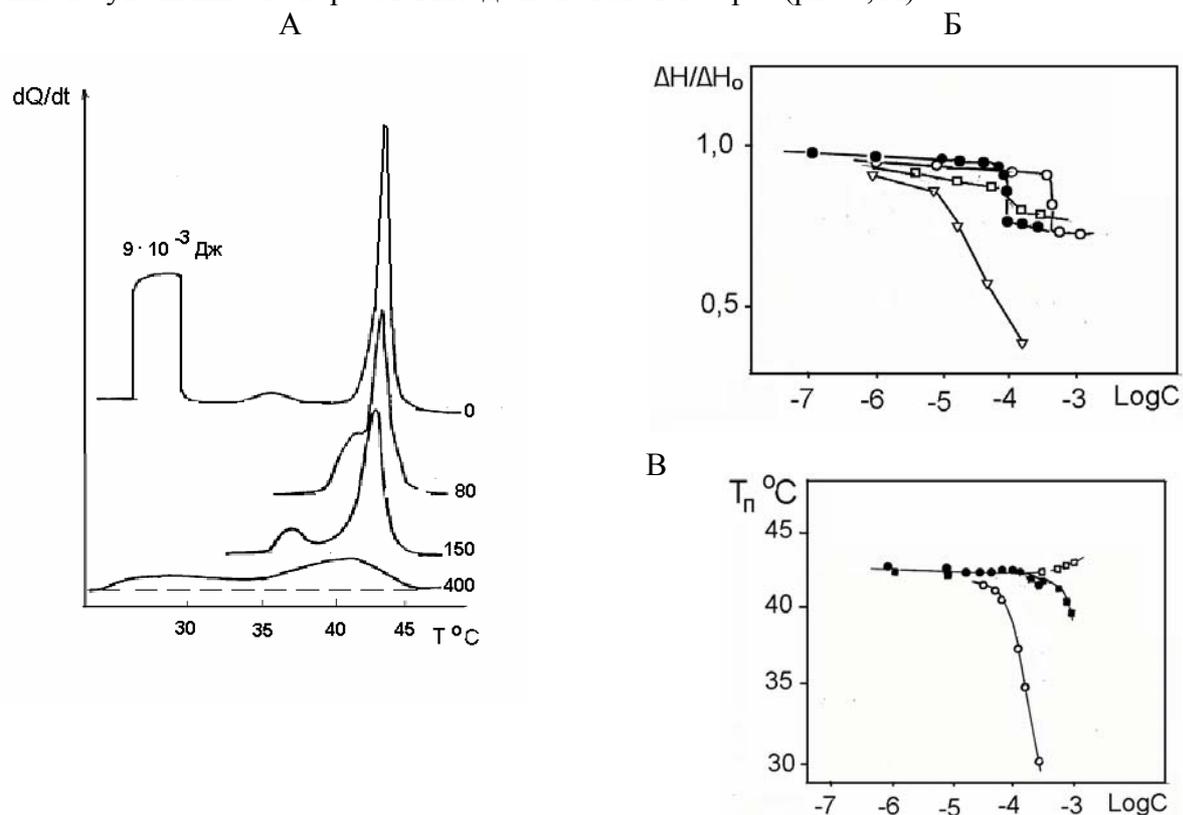


Рис.5. Термограммы липосом из ДПФХ в присутствии голотурин A_2 в водной фазе (А). Концентрация липида в ячейке $2,6 \cdot 10^{-6}$ М, концентрации гликозида (мкг/мл) приведены на рисунке. Ось ординат dQ/dt – скорость теплопоглощения. Изменение относительной энтальпии (Б) и температуры (В) основного фазового перехода ДПФХ от концентрации голотуринов (Б - ● голотурин A_2 ; ○ голотурин А; □ голотурин B_1 ; Δ - голотуриногенин) и (В - ●, ○ голотурин A_2 ; □, ■ голотурин А)

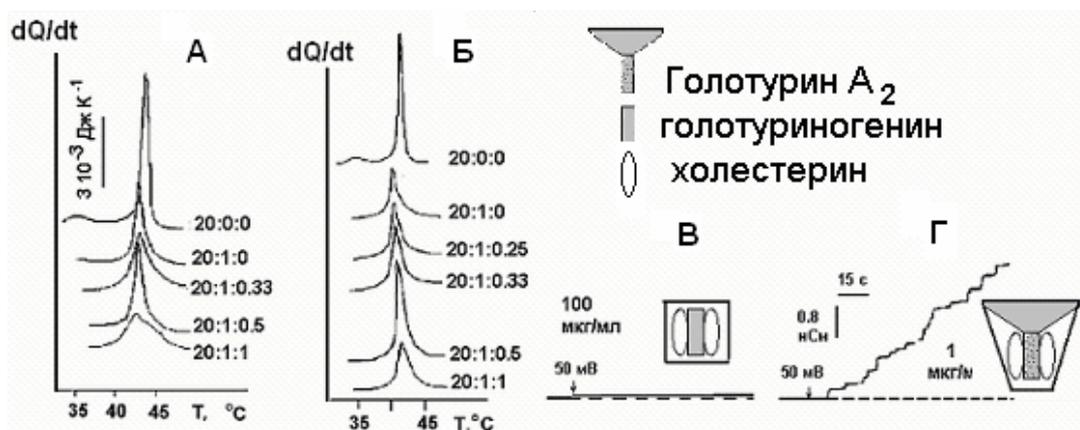
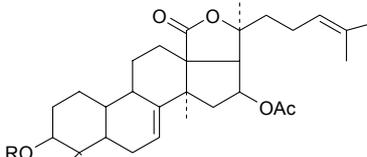
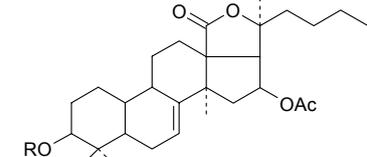
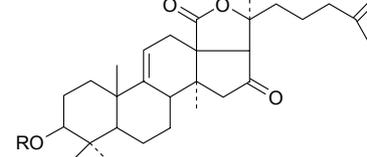
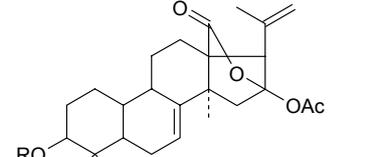


Рис. 6. Фазовый переход в липосомах из ДПФХ, содержащих холестерин, в присутствии голотуриногенина (а) и голотурина A_2 . Мольное отношение липид:холестерин:тритерпеноид указано на рисунке. Ось ординат dQ/dt – скорость теплопоглощения. Условная схема комплексов с холестерином и запись тока через БЛМ из ДПФХ в присутствии комплексов голотуриногенин:холестерин (в) и голотурина A_2 :холестерин (г). Водная фаза 0,1 М КСl, 5 мМ Tris-НСl, рН 7,2

Гликозид с двумя моносахаридными остатками при С-3 агликона оказывает действие на ионную проницаемость при более низких концентрациях, чем монозид. Присоединение сульфатной группы к первому моносахаридному остатку биозида снижает действующую концентрацию на порядок и повышает активность гликозида. Увеличение активности происходит в такой же мере, как и присоединение к углеводной цепи биозида дополнительно двух моносахаридов или в тетразиде. Вклад сульфатной группы при первом моносахариде уменьшается с увеличением размера углеводной цепи. Сульфатная группа усиливает действие малоактивных гликозидов голотурий в большей степени, чем активных гликозидов. Обнаружено, что отсутствие метильной группы в конечном моносахаридном остатке гликозидов и наличие двух сульфатных групп в углеводной цепи снижает активность гликозидов, но причины такого изменения активности молекул были не ясны. Поэтому мы изучили влияние серии гликозидов (табл. 2) с различными функциональными группами в конечном моносахариде как содержащие, так и не содержащие сульфатные группы, на выход K^+ из эритроцитов (рис.7, Б) и термотропное поведение липосом из ДПФХ (рис. 8). Обнаружено, что активность десульфатированных гликозидов, молекулы которых отличаются только наличием или отсутствием метильной или ацетатной групп в конечном моносахаридном остатке углеводной цепи, изменяется в ряду: Ds A₇₋₃ > Ds A₄₋₂ > Ds A₂₋₂ > Ds A₁₋₂ (рис.7, Б; рис. 8, В).

Таблица 1

Структура кукумариозидов, их производных и начальная скорость выхода K^+ из эритроцитов мыши в присутствии $10^{-6}M$ исследуемых соединений

N	R	Агликон	V_{K^+} , мкМ/мин
1	H		0,5
2	Xyl		3
3	Quin (1→2)-Xyl		6
4	Quin (1→2)-4-O-SO ₃ Na-Xyl		150
5	3-O-Me-Xyl(1→3)-Glc(1→4)-Quin (1→2)-Xyl		120
6	3-O-Me-Xyl(1→3)-Glc(1→4)- 4-O-SO ₃ Na-Xyl		140
7	3-O-Me-Xyl(1→3)-Glc(1→4)-Quin (1→2)-Xyl		60
8	3-O-Me-Xyl(1→3)-Glc(1→4)- 4-O-SO ₃ Na-Xyl		100
9	[3-O-Me-Xyl(1→3)-Glc(1→4)]-[Xyl(1→2)]-Quin (1→2)-Xyl		30
10	[3-O-Me-Xyl(1→3)-Glc(1→4)]-[Xyl(1→2)]-Quin (1→2)- 4-O-SO ₃ Na-Xyl		35
11	[3-O-Me- Glc (1→3)- Xyl (1→4)]-[Xyl(1→2)]-Quin (1→2)- 4-O-SO ₃ Na-Xyl		24
12	[Glc (1→3)- Glc(1→4)]-[Xyl(1→2)]-Quin (1→2)- 4-O-SO ₃ Na-Xyl		3
13	Xyl(1→2)-Quin (1→2)-4-O-SO ₃ Na-Xyl		2
14	3-O-Me-Xyl(1→3)-Glc(1→4)- 4-O-SO ₃ Na-Xyl		0,5

Показано, что кукумариозид A₂₋₂ активнее кукумариозида A₄₋₂. При наличии сульфатной группы в первом моносахаридном остатке гликозид с 3-О-метильной группой в

холестерина. Действие гликозида на проводимость БЛМ в концентрации 0,5 нМ проявляется в образовании каналов с проводимостью 8-16 пСм. При изменении концентрации холестерина в мембране, как в большую (33%), так и в меньшую сторону (2%, 10%), наблюдается увеличение концентрации гликозида, при которой происходит формирование каналов и изменяется величина проводимости каналов (рис.9, Б). При концентрации кукумариозида А2-2 $5 \cdot 10^{-6}$ М наблюдается структурный переход бислоевых мембран в небислоевые структуры, который более эффективен для мембран с большим содержанием холестерина.

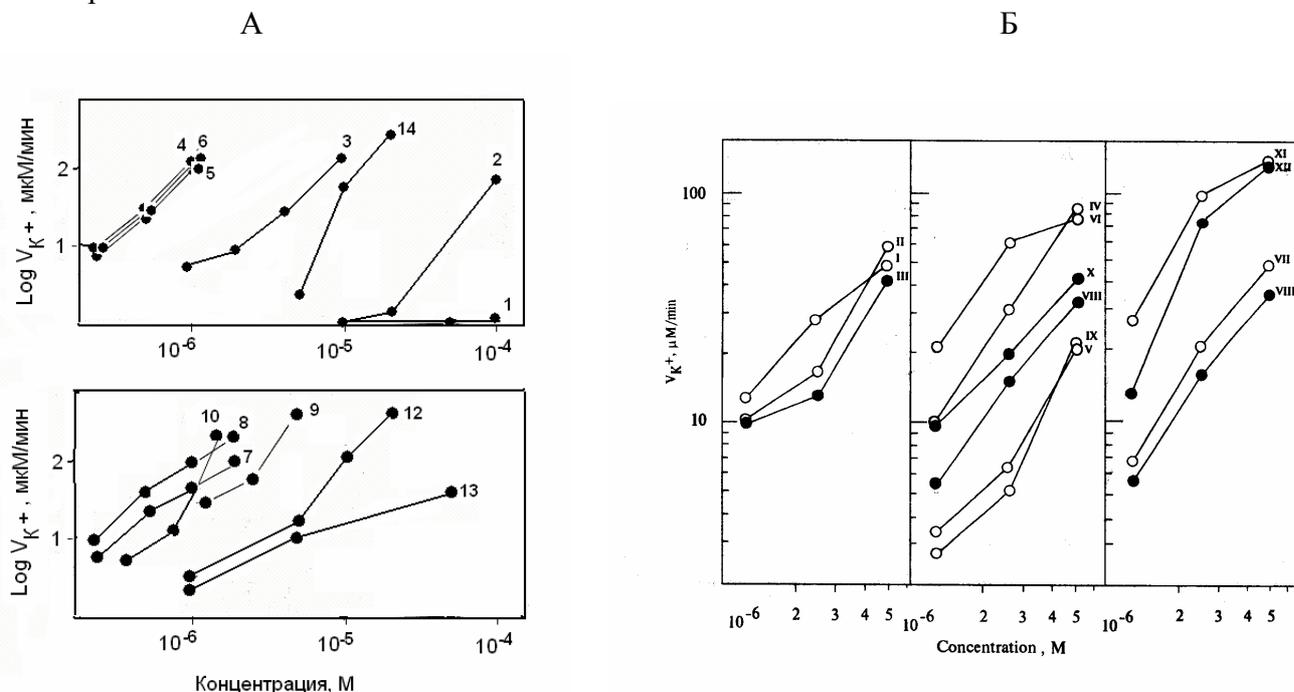


Рис 7. Зависимость скорости выхода K^+ от концентрации кукумариозидов и их производных. Структуры соединений представлены: (А) в таблице 1 и (Б) в таблице 2. Данные приведены в двойном логарифмическом масштабе.

Таким образом, показано, что исследованные тритерпеновые гликозиды голотурий образуют ионные каналы и поры в мембранах, содержащих стерина, изменяют физическое состояние липидного бислоя и вызывают латеральное разделение фаз в мембранах. Поэтому при действии на клетки эти соединения могут регулировать клеточную активность, изменяя как ионный гомеостаз клеток, так и физическое состояние клеточных мембран.

Тритерпеновые гликозиды хедерагения широко распространены в высших растениях. Из дальневосточного растения *Caulophyllum robustum* Max. были выделены хедерагенин и его гликозиды каулозид С и каулозид А. Изучена каналообразующая активность этих гликозидов и их действие на термотропное поведение липидных мембран. При введении каулозида С в водную фазу наблюдаются дискретные флуктуации тока через БЛМ (рис.10). Проводимость мембран зависит от концентрации гликозида, липидного состава мембран и рН среды. В кислой среде (рН 5,6) в присутствии 0,5 мкг/мл каулозида С регистрируются одиночные каналы в моноолеиновых БЛМ, проводимость которых кратна 6 пСм. Времена жизни одиночных каналов распределены по одноэкспотенциальному закону, а среднее время жизни каналов равно 20 секундам. При введении холестерина в мембраны проводимость мембран увеличивается на 2-3 порядка по сравнению с БЛМ без стерина (рис.10, 1-5). Гликозид с меньшим размером углеводной части (каулозид А) также формирует ионные каналы в мембранах (рис.10, 6 и 10,7). Мембранная активность гликозидов хедерагения зависит от строения агликона и углеводной части молекул, структуры и содержания мембранного стерина и рН среды. Обнаружено, что гидрофобное взаимодействие гликозидов

с липидным бислоем и их каналообразующая активность увеличиваются, когда карбоксильная группа при С-17 агликона протонирована или метилирована, и гликозид с большим размером углеводной части проявляет более эффективное действие на проницаемость мембран (рис.12).

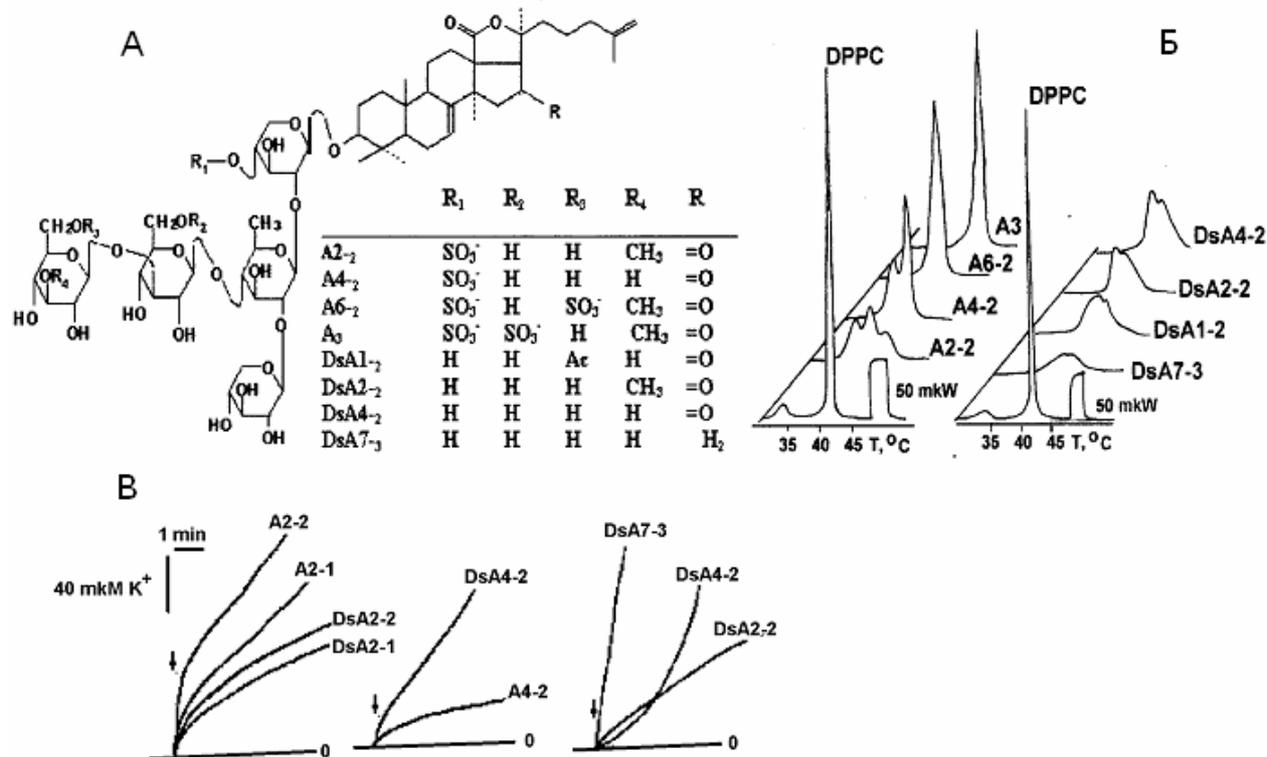


Рис. 8. Структура кукумариозидов и их производных (А), термотропный фазовый переход липосом из ДПФХ в присутствии гликозидов (Б) и на выход K⁺ из эритроцитов мыши (В), индуцированный гликозидами.

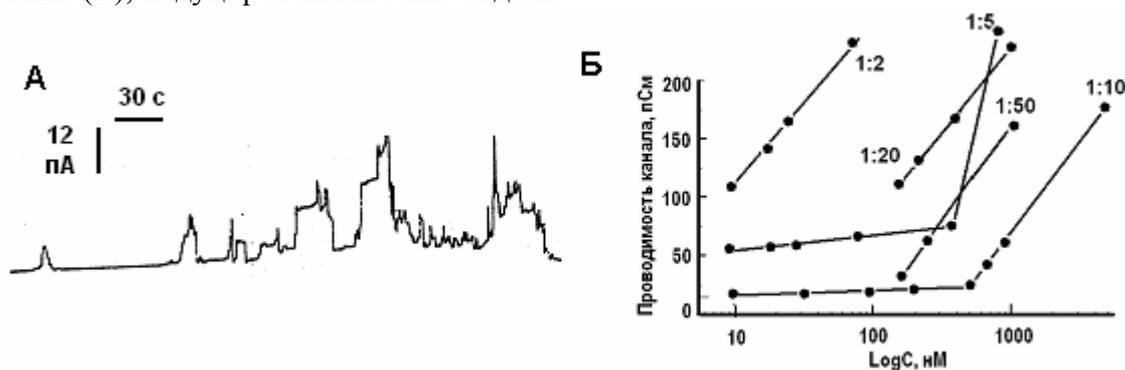


Рис. 9. Запись флуктуаций тока через БЛМ, содержащих 10% холестерина, в присутствии 10⁻⁶ М кукумариозида А₂-2 (А) и зависимость от концентрации гликозида наиболее вероятной проводимости каналов кукумариозида А₂-2 в мембранах с различным содержанием стерина (Б).

Гликозиды хедерагенина увеличивают проницаемость клеточных и модельных мембран, образуя в низких концентрациях ион-селективные каналы, а в высоких концентрациях неселективные водонаполненные поры. В результате этого гликозиды в низких концентрациях оказывают стимулирующее действие на клетки, а в высоких - могут ингибировать пролиферацию клеток.

Методом ДСК показано, что взаимодействие гликозидов хедерагенина с липидным бислоем зависит от pH водной фазы (рис. 11, А и Б). В нейтральной среде гликозиды слабее взаимодействуют с гидрофобной областью мембран. Показано, что открыванием и закрыванием каулозидных пор можно управлять с помощью pH среды (рис 11, В).

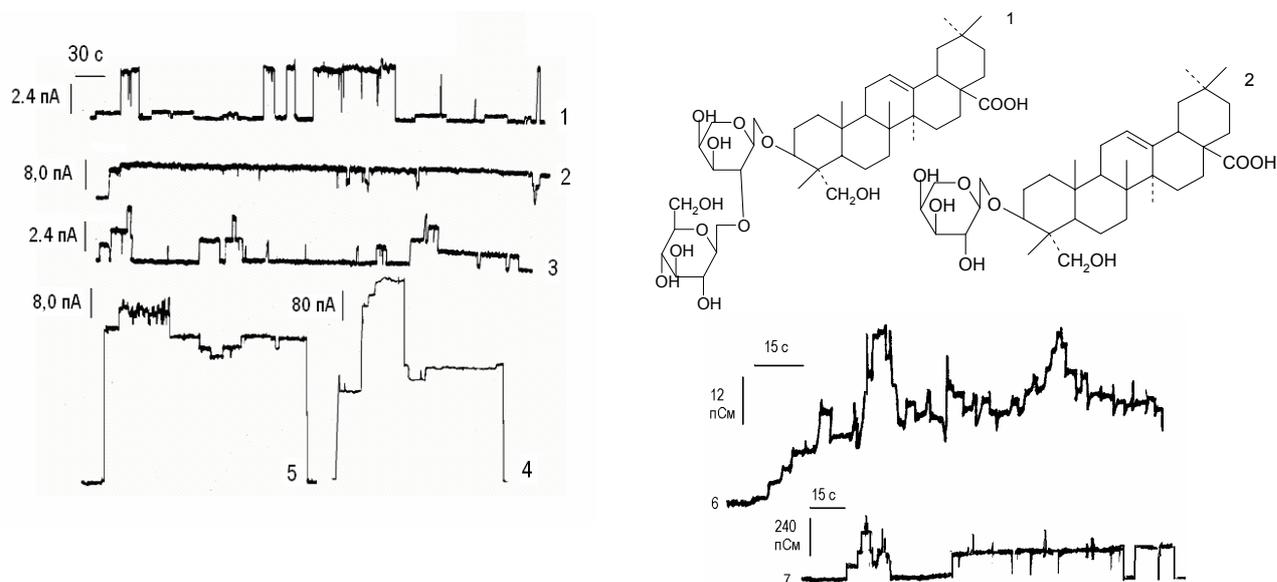


Рис 10. Структура гликозида каулозида С (1) и каулозида А (2) и записи тока через БЛМ в их присутствии. Липидный состав БЛМ: моноолеин (1-3,6), моноолеин-холестерин (4,7) и моноолеин-эргостерин (5), отношение липид-стерин в БЛМ составляло 10:1 по весу. Водная фаза 1М КСl, 5mM фосфатного буфера, pH 5,6 (1,2,5) и pH 7,2 (3,4). Концентрация гликозида (мкг/мл): (1,6) – 0,5 и (2-5,7) – 1,0.

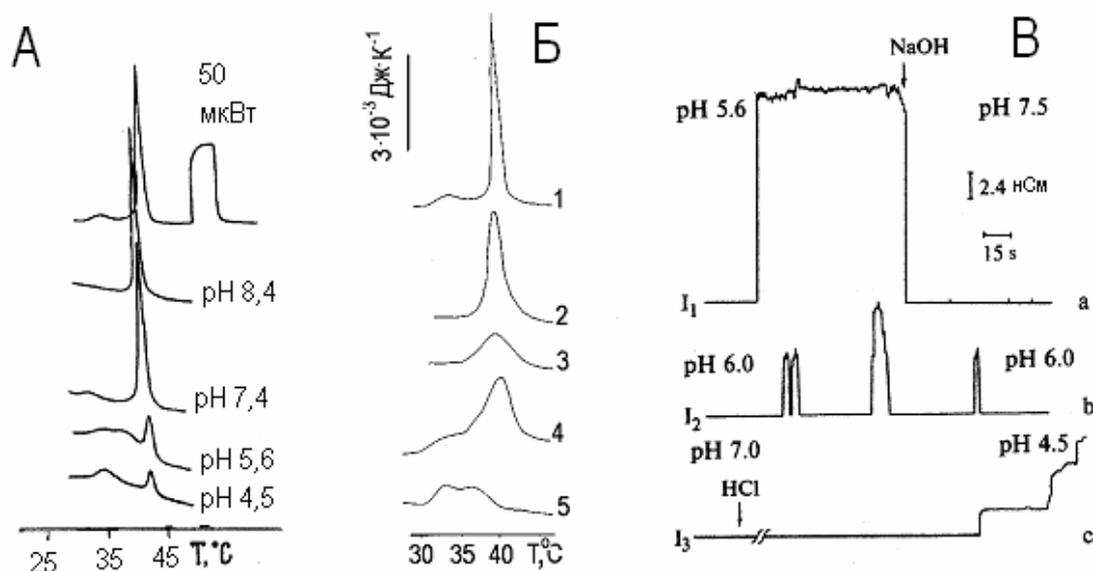


Рис. 11. (А) –термограммы липосом из ДПФХ в присутствии 100 мкг/мл каулозида С при разных значения pH водной фазы. (Б) - термограммы липосом из ДПФХ при введении каулозидов С (4,5) или А (2,3) в липидную фазу, концентрация гликозидов 50 мкг/мл (2,4) и 100 мкг/мл (3,5). (В) – управление работой пор, образованных каулозидом С в моноолеин-холестериновых мембранах, при изменении pH водной фазы: а – закрывание пор при изменении pH с 5,6 до 7,8; б- частичное открывание пор при pH 6,0; в –повторное открывание пор при снижении pH до 4,5.

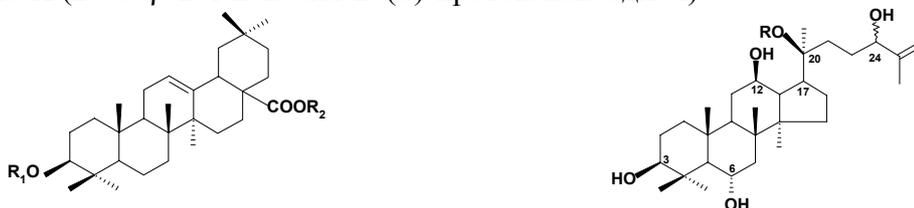
При добавлении гликозида в слабокислой среде с одной стороны БЛМ, функционирующие поры практически мгновенно закрываются при изменении рН водной фазы до 7,4 с этой стороны БЛМ. В экспериментах на БЛМ показана обратимость порообразующего действия каулозида С в зависимости от рН среды. Поры, образованные гликозидом в БЛМ в слабокислой среде, закрываются при изменении рН среды до 7,4 и открываются при повторном сдвиге рН в слабокислую область. Обнаружено, что процесс открывания пор при переходе из нейтральной в кислую среду имеет латентный период, в отличие от процесса закрывания пор, который происходит очень быстро. Выключение пор в нейтральной среде происходит мгновенно, возможно, из-за вытеснения пор, имеющих заряд, из гидрофобной области мембран. Полученные данные являются прямым экспериментальным подтверждением возможности управления работой сапониновых пор в мембранах с помощью рН среды в физиологическом диапазоне изменения рН. Каулозид С предложен в качестве нового биохимического инструмента для регуляции проницаемости клеток с целью введения или выведения из клеток веществ с сохранением жизнеспособности клеток. Проведена оценка размеров пор, образованных каулозидом С в клеточных мембранах, по ингибированию гемолиза различными полиэтиленгликолями в зависимости от рН среды и концентрации гликозида. Показано, что размер пор составляет приблизительно 34 Å при рН 5,6 и концентрации гликозида 6 мкг/мл. С помощью этих пор удается провести нагрузку клеток такими вторичными посредниками как ионы кальция и циклический аденозинмонофосфат.

Изучено влияние гликозидов женьшеня, структура которых приведена на рис. 12, на



	R ₁	R ₂		R ₁	R ₂
I	-H	-H	II	-H	-H
III Rh ₂	-glc	-H	XI F1	-H	-glc
IV K*	-H	-glc	XII Rg ₁	-glc	-glc
V F2	-glc	-glc	XIII Rf	-glc ² -glc	-H
VI Rg ₃	-glc ² -glc	-H	XIV Rg ₂	-glc ² -rha	-H
VII Rd	-glc ² -glc	-glc	XV NG-R2	-glc ² -xyl	-H
VIII Rc	-glc ² -glc	-glc ⁶ -ara (fur)	XVI Re	-glc ² -rha	-glc
IX Rb ₂	-glc ² -glc	-glc ⁶ -ara (pyr)	XVII Rh ₁	-glc	-H
X Rb ₁	-glc ² -glc	-glc ⁶ -glc			

*-compound K (20-O-β-D-глюкозил-20(S)-протопанаксадиол)



	R ₁	R ₂		R
XIX	-H	-H	XVIII M7cd	-glc
XX Ro	-glcUA ² -glc	-glc		
XXI Z-R ₁	-glcUA ² -glc	-H		
XXII MeRo	-glcUA ^(6Me) ² -glc	-glc		
XXIII MeZ-R ₁	-glcUA ^(6Me) ² -glc	-H		

Рис. 12. Структурные формулы гинзенозидов *Panax ginseng* C. A Meyer.

ионную проницаемость эритроцитарных мембран и на термотропный фазовый переход липосомальных мембран. Обнаружено, что нецитотоксичные или с самой низкой цитотоксической активностью гинзенозиды Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Ro, F-1, M7-cd и NG-R2 увеличивают скорость выхода ионов калия в 1,5-5 раз по сравнению со скоростью выхода из интактных клеток. Умеренно цитотоксические соединения протопанаксадиол и его гликозиды Rh2, соединение K, F-2 и Rg3 увеличивают скорость выхода калия в 19, 66, 200, 59 и 24 раз, соответственно. Цитотоксические гликозиды зингеброзид со свободной карбоксильной группой в агликоне, и его монометилловый эфир проявляют pH-зависимое действие на ионную проницаемость клеточных мембран. В присутствии зингебброзида скорость выхода K^+ из клеток увеличивается в 400 раз по сравнению с контролем при изменении pH среды с 7.0 до 5.5. В нейтральной среде монометилловый эфир зингебброзида проявляет более высокую активность, чем зингеброзид.

Методом ДСК изучено влияние гинзенозидов на термотропный фазовый переход ДПФХ. Обнаружено, что цитотоксические гинзенозиды Rh2 и соединение K сильнее взаимодействуют с гидрофобной областью липидного бислоя, чем нецитотоксические гликозиды Re и Rg2. Эти гликозиды вызывают разделение фаз и образование новых низкотемпературных фаз в липидном бислое (рис. 13, А).

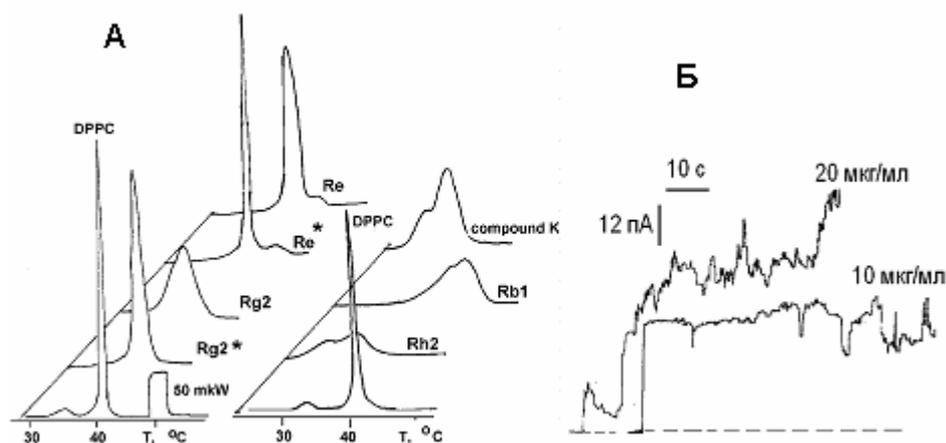


Рис. 13. (А) - Влияние цитотоксических и не цитотоксических гинзенозидов на термотропный фазовый переход дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). концентрация гинзенозидов 100 мкг/мл и 50 мкг/мл для отмеченных (*)

(Б) - Влияние 20(S)- β -D-глюкопиранозид протопанаксадиола на ионную проницаемость моноолеин-холестериновых БЛМ. Водная фаза: 1М NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7.3, потенциал на мембране 10 мВ

Действие нецитотоксических гинзенозидов Re и Rb1 на термотропный фазовый переход проявляется в образовании дополнительной более высокотемпературной фазы и соответствует увеличению термостабильности липидных бислоев. В последнее время внимание исследователей привлекают минорные компоненты женьшеня. Обнаружено, что под действием микрофлоры кишечника из основных компонентов экстракта женьшеня Rb1, Rb2 и Rc образуется минорный компонент с высокой биологической активностью 20(S)- β -D-глюкопиранозид протопанаксадиол (Lee S.J. et al, 2000). Но механизмы действия этого гликозида на мембраны изучены недостаточно. При добавлении 20(S)- β -D-глюкопиранозид протопанаксадиола в водную фазу, омывающую БЛМ, наблюдаются дискретные флуктуации тока (рис. 13, Б), свидетельствующие об образовании ионпроводящих структур в липидном бислое. Величина и длительность флуктуаций тока указывают на образование ионных каналов в липидном бислое. Увеличение мембранного потенциала изменяет проводимость каналов, частоту встраивания и кооперативность работы каналов. В области концентраций

гинзенозида 5-20 мкг/мл наблюдается дозозависимое увеличение ионной проницаемости мембран. Анализ флуктуаций тока через БЛМ показал, что функционирует большое число кооперативно работающих пор. Особенностью действия исследуемого даммаранового гликозида на структуру липидного бислоя является отсутствие структурирования холестеринсодержащих мембран, которое характерно для гликозидов голостанового и спиранового рядов.

Таким образом, впервые показано, что механизм ионной проницаемости, индуцируемой даммарановым гликозидом 20(S)- β -D-глюкопиранозидом протопанаксадиола, состоит в образовании ионных каналов в липидных бислоях. При связывании даммаранового гликозида с мембраной изменяется ионный состав внутри клетки за счет образования ионных каналов, что приводит к активации сигнальных систем в клетке и к регуляторному действию гликозида на клетки. Обнаруженная каналообразующая активность может лежать в основе регуляторного и цитотоксического действия гинзенозида.

Характерной особенностью гликозидов лупанового ряда является низкая гемолитическая и цитотоксическая активности. Изучено действие гликозидов бетулиновой кислоты на ионную проницаемость модельных и эритроцитарных мембран (рис. 14). Показано, что гликозиды увеличивают ионную проницаемость мембран, формируя ионные каналы в липидном бислое.

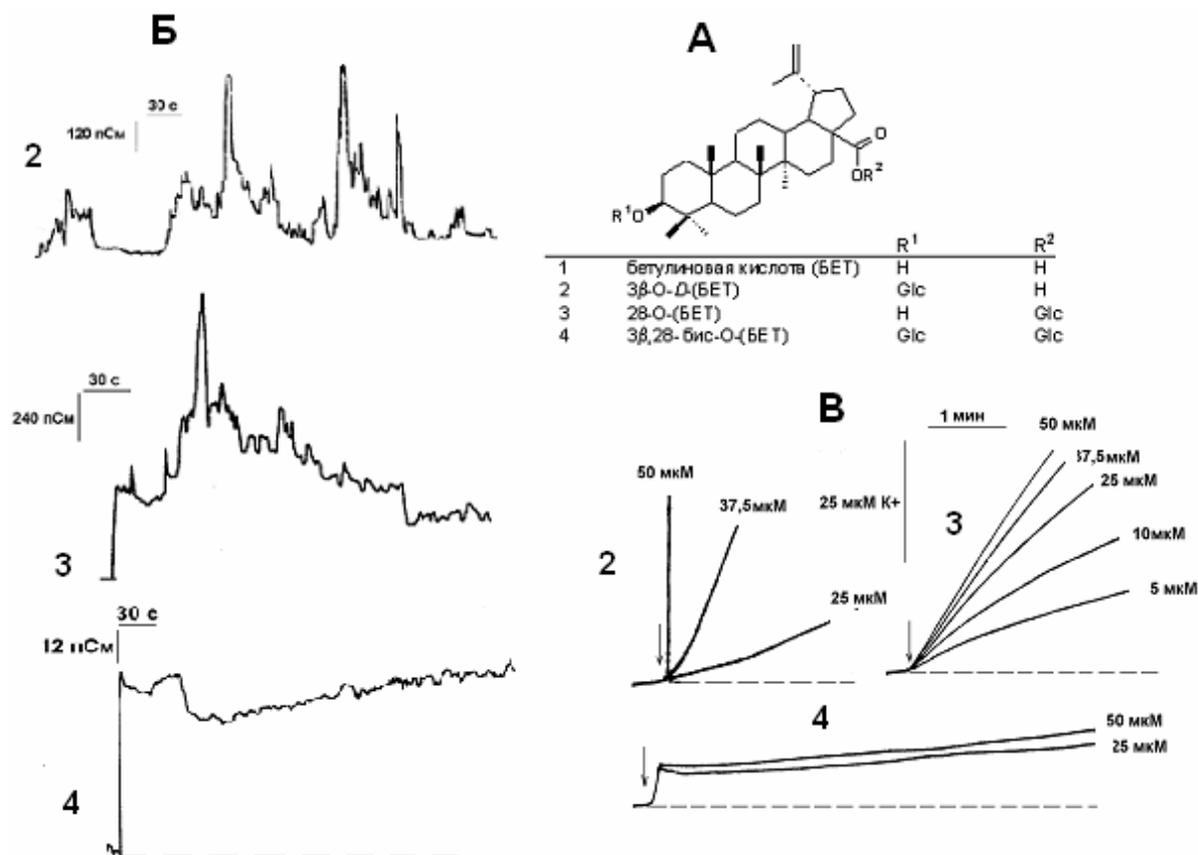


Рис. 14. А - Структура бетулиновой кислоты (1) и ее гликозидов 3 β -O-D-глюкозида (2), 28-O-глюкозида (3) и 3 β ,28- бис-O-диглюкозида (4) бетулиновой кислоты.

Б - Дискретные флуктуации проводимости БЛМ, индуцированные гликозидами (2) - (4) в мембранах из 1%-ного моноолеина в н-гептане, содержащих 20% холестерина. Водная фаза: 1M NaCl, 10 mM HEPES, pH 5.4 (для соединения 2) и 7.4 (для соединений 3 и 4).

В - Выход ионов калия из эритроцитов мыши в присутствии гликозидов бетулиновой (2)-(4)

Увеличение числа ионных каналов в мембране приводит к ее дестабилизации и разрушению. Изучено влияние бетулиновой кислоты и ее гликозидов на ионную проницаемость мембран эритроцитов. Показано, что соединения со свободной карбоксильной группой проявляют рН-зависимое мембранотропное действие. Бетулин при добавлении его в водную фазу не увеличивает ионную проницаемость БЛМ в диапазоне концентраций 1-20 мкг/мл. При добавлении 10 мкг/мл гликозида бетулина по СЗ в водную фазу, омывающую БЛМ, наблюдаются дискретные флуктуации тока, свидетельствующие об образовании ионпроводящих структур в липидном бислое. Величина и длительность флуктуаций тока указывают на образование ионных каналов в липидном бислое. При концентрации гликозида 20 мкг/мл и выше наблюдалось структурирование в водной фазе и не было увеличения действия на проводимость модельных мембран. Гликозид по положению С-28 не вызывает увеличения проводимости мембран в диапазоне концентраций от 1 до 20 мкг/мл. В присутствии диглюкозида бетулина резко увеличивается проводимость мембран. Увеличение мембранного потенциала изменяет частоту встраивания каналов и увеличивает интегральную проводимость мембран. Стабильность мембран зависит от мембранного потенциала и снижается при мембранном потенциале 50 мВ. В области концентраций диглюкозида 5-20 мкг/мл наблюдалось дозозависимое увеличение ионной проницаемости мембран. Анализ флуктуаций тока через БЛМ показал, что функционирует большое число кооперативно работающих пор.

Тритерпеноиды встречаются в природе, как в свободном виде, так и в виде сложных эфиров и гликозидов. Литическое действие тритерпеновых гликозидов на мембраны зависит от строения, как углеводной, так и тритерпеновой части молекул. Свободные тритерпеноиды в отличие от гликозидов обнаружены в составе клеточных мембран организмов-продуцентов, где они выполняют, как предполагается, структурную и регуляторную роль, аналогичную роли стеролов в мембранах. Свойства тритерпеноидов как мембранных компонентов изучены недостаточно. Поэтому было изучено влияние свободных тритерпеноидов различных рядов (β -амиринового, голостанового, даммаранового и лупанового) на проницаемость и термотропное поведение модельных мембран. Обнаружено, что бетулин и голотуриногенин уменьшают проницаемость фосфатидилхолиновых липосом для глюкозы, но менее эффективно, чем холестерин. Нативный генин гликозидов женьшеня 3-эпибетулафолиентриол не изменяет выход глюкозы из липосом, а при введении олеаноловой кислоты наблюдается увеличение выхода глюкозы из липосом. При введении тритерпеноидов в формирующий раствор образуются БЛМ состава липид:тритерпен, равном 1:1, или липид:тритерпен:холестерин, равном 1:1:1. Бетулин и голотуриногенин вызывают уменьшение фоновой проводимости моноолеиновых БЛМ и повышение в 1,5-2 раза напряжения их электрического пробоя. Наблюдаемое повышение стабильности и улучшение электрических свойств липидных бислоев в присутствии этих тритерпеноидов коррелирует с их действием на липосомы. В области концентраций диглюкозида 5-20 мкг/мл наблюдается дозозависимое увеличение ионной проницаемости мембран. Анализ флуктуаций тока через БЛМ показал, что функционирует большое число кооперативно работающих пор. Голотуриногенин в отличие от его гликозидов не проявляет стеринзависимого литического действия на БЛМ. Нативный генин женьшеня увеличивает фоновую проводимость БЛМ, что свидетельствует о возрастании числа дефектов в липидных бислоях (рис. 15, А), с наличием которых связана фоновая проводимость БЛМ. В присутствии олеаноловой кислоты наблюдаются дискретные флуктуации тока через БЛМ (рис. 15, Б). Проводимость БЛМ, содержащих олеаноловую кислоту, увеличивается в 40-50 раз при понижении рН водной фазы с 7,2 до 5,8 по сравнению с проводимостью немодифицированных БЛМ, что обусловлено уменьшением степени ионизации COOH -группы. Действие олеаноловой кислоты на проводимость БЛМ менее эффективно, по сравнению с действием гликозидов β -амиринового ряда, активность которых также зависит от рН среды. Действие тритерпеноидов на термотропный фазовый переход ДПФХ проявляется в исчезновении предперехода и изменении параметров основного фазового перехода (рис 15, В).

Голотуриногенин, бетулин и олеаноловая кислота не влияют на температуру основного фазового перехода ДПФХ, уменьшают энтальпию и кооперативность фазового перехода. Действие тритерпеноидов на энтальпию перехода различно: при соотношении тритерпен:липид, равном 1:1, голотуриногенин полностью снимает фазовый переход, олеаноловая кислота в меньшей степени уменьшает энтальпию перехода, а бетулин не уменьшает энтальпию перехода ДПФХ. Тритерпеноид даммаранового ряда вызывает расщепление пика основного фазового перехода на компоненты, что свидетельствует о латеральном разделении фаз в присутствии этого тритерпеноида. Калориметрические данные позволяют предположить, что функциональная роль свободных тритерпеноидов в мембранах может быть связана с регулированием физического состояния мембран

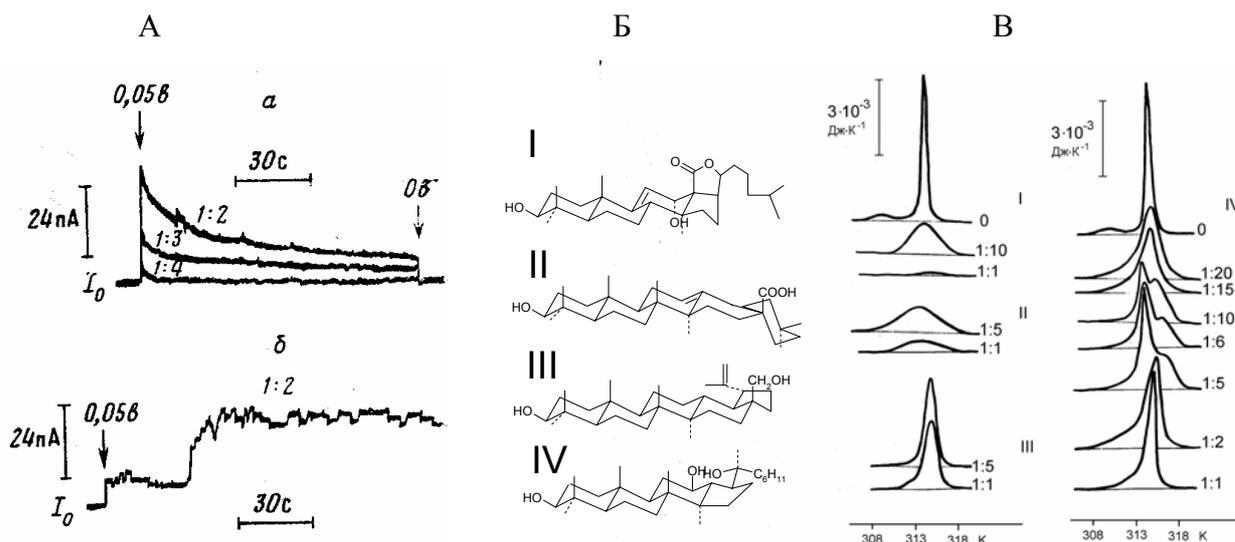


Рис. 15. (А) - Запись тока через моноолеиновые БЛМ в присутствии 3-эпибетулафолиентриола (а) или олеаноловой кислоты (б). Водная фаза: 1М КСl, 10 мМ Tris-HCl, рН 7,2 мольное отношение тритерпеноид:липид указано на рисунке. (Б) – Структура тритерпеноидов голотуриногенина (I), олеаноловой кислоты (II), бетулина (III) и 3-эпибетулафолиентриола (IV). (В)- Термограммы ДПФХ в присутствии голотуриногенина (I), олеаноловой кислоты (II), бетулина (III) и 3-эпибетулафолиентриола (IV)

Стероидные гликозиды обнаружены во многих лекарственных растениях и действуют на уровне клеточных мембран. Не ясно, какую роль в проявлении биологической активности гликозида играют отдельные элементы его структуры – агликон и углеводная цепь. Изучено влияние стероидного гликозида полигонатозида С¹ и его свободного агликона пенногенина на пролиферацию опухолевых клеток. Обнаружено, что в области концентраций 0,1-1,0 мкг/мл гликозид оказывает стимулирующее действие на пролиферацию клеток, а в дозах более 2 мкг/мл ингибирует рост клеток и вызывает их лизис. Пенногенин в отличие от гликозида не проявляет активности в отношении опухолевых клеток. Отсутствие активности у свободного агликона позволяет предположить, что связанная с агликоном по С3 углеводная цепь необходима для проявления биологической активности. Полигонатозид С¹ вызывает нарушения барьерной функции мембран опухолевых клеток, индуцируя в низких концентрациях выход ионов К⁺ и нуклеотидного пула. При действии гликозида и его агликона на мембраны наблюдается изменение параметров термотропного фазового перехода липосомальных мембран (рис. 16). Полигонатозид С¹ уменьшает энтальпию и кооперативность основного фазового перехода ДПФХ, вызывает расщепление пика на компоненты и сдвиг термограммы в низкотемпературную область. В случае пенногенина расщепления пика на компоненты не происходит. Пенногенин в отличие от холестерина не снимает полностью фазовый переход ДПФХ при мольном отношении липид:пенногенин,

равном 1:1. Это связано, по-видимому, с дополнительной ОН-группой при С17. Сопоставление полученных термограмм с литературными данными позволяет предположить, что пенногенин и агликонный фрагмент полигонатозида С¹ локализованы в области С1-С8-метиленовых групп углеводородных цепей ДПФХ. Изменение физического состояния липидных мембран в присутствии стероидного гликозида и его агликона позволяет предположить, что эти соединения могут опосредованно влиять на протекание мембранных процессов и метаболизм клетки в целом. При введении пенногенина в липосомы и БЛМ уменьшается проницаемость мембран и повышается их стабильность. Стероидный гликозид увеличивал проницаемость липосомальных мембран и БЛМ, содержащих холестерин. При добавлении гликозида в водную фазу БЛМ наблюдаются дискретные флуктуации тока через БЛМ (рис.16, В). Действующие концентрации гликозида снижаются на 3 порядка в присутствии холестерина в БЛМ и интегральная проводимость возрастает на 3-4 порядка по сравнению с БЛМ, не содержащими холестерин. Величина и характер флуктуаций тока в присутствии стероидного гликозида свидетельствуют об образовании ионных каналов в БЛМ. Знак и величина потенциала нулевого тока при создании градиента КСl через БЛМ указывают на преимущественное прохождение анионов через каналы, образованные полигонатозидом. При увеличении концентрации гликозида повышается уровень флуктуаций тока и исчезает ионная селективность, однако омический характер проводимости БЛМ сохраняется. Это свидетельствует об образовании больших неселективных водонаполненных пор в мембране в результате объединения большого числа гликозид-холестериновых комплексов.

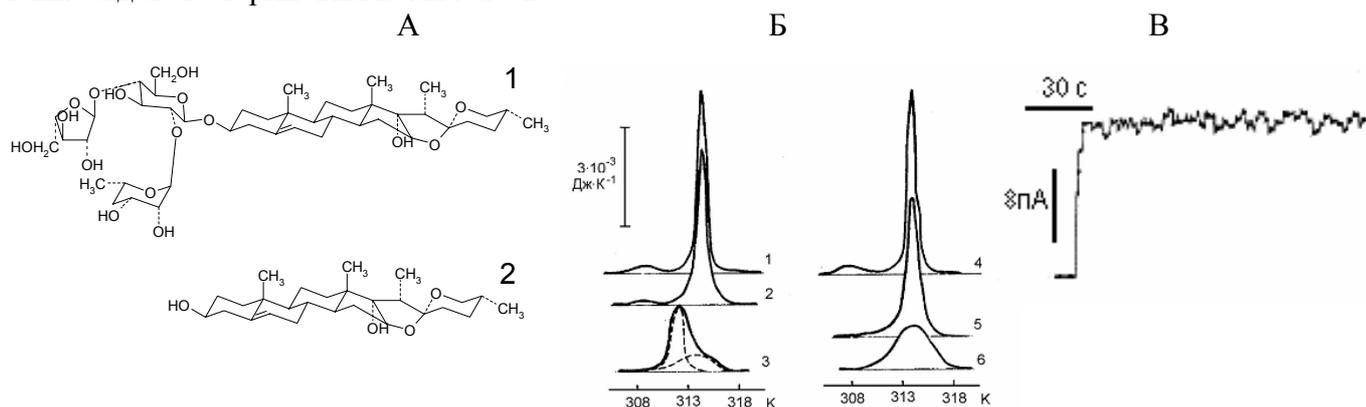


Рис. 16. Структура полигонатозида С¹ (1) и его свободного агликона (2) пенногенина (А), влияние соединений 1 и 2 на термотропный фазовый переход ДПФХ и влияние полигонатозида С¹ на проводимость моноолеин-холестериновых БЛМ (В).

Стимулирующее действие низких концентраций стероидного гликозида на пролиферацию клеток может быть связано с образованием дополнительных ионных каналов в мембранах и с иммобилизацией холестерина за счет образования гликозид-стериновых комплексов. Ингибирующий эффект связан с образованием больших водонаполненных пор. Действие стероидного гликозида и его свободного агликона на мембраны различно.

Проведенные исследования позволяют предложить молекулярную модель действия сапонинов на проницаемость стеринсодержащих мембран, объясняющую особенности действия низких и высоких концентраций гликозидов. Согласно этой модели гликозиды, сорбируясь на мембране, образуют в ней двумерные смешанные сапонин-стериновые мицеллы таким образом, что агликон взаимодействует с молекулами стерина, а углеводная цепь направлена в водную фазу. Проводящая ионы структура состоит из комплексов, образованных агликонной частью сапонины с мембранным стеринном. С увеличением концентрации сапонины увеличивается число субъединиц в мицелле или канале, селективность исчезает и ион-селективный канал превращается в неселективную водную пору. При дальнейшем увеличении концентрации сапонины наблюдается структурный

переход бислойных мембран в небислойные структуры с высокой проницаемостью. При действии на клетки сапонины в низких концентрациях образуют ионные каналы, проницаемые в основном для K^+ , Na^+ и Cl^- , которые близки по свойствам к природным ионным каналам и могут служить сигналом к запуску и стимуляции различных клеточных процессов. При более высоких концентрациях сапонины образуют каналы, проницаемые для ионов кальция, и в зависимости от интенсивности входа ионов кальция в клетку, могут приводить как стимулирующему, так и к ингибирующему действию на клетки. Дальнейшее увеличение концентрации гликозидов приводит к нарушению барьерных свойств плазматических мембран для неэлектролитов, ингибированию внутриклеточных процессов и коллоидно-осмотическому лизису клеток.

Основные научные результаты

1. Проведено систематическое исследование влияния гликозидов голотурий и их производных, природных и полусинтетических гликозидов женьшеня, гликозидов хедерагенина, бетулина и бетулиновой кислоты на термотропное поведение модельных мембран и ионную проницаемость клеточных и модельных мембран. Установлена связь между химическим строением и мембранной исследуемых соединений. Показана роль структуры агликона (строения и степени окисленности боковой цепи, карбоксильной группы), роль размера и строения углеводного компонента (сульфатной, метильной и ацетатной групп в углеводной цепи) в проявлении мембранной активности морских и растительных тритерпеновых гликозидов

2. Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии показано, что взаимодействие гликозидов с мембранами, локализация и ориентация молекул в мембране определяются структурными особенностями агликона, строением углеводных цепей, их количеством и местом присоединения к агликону. Калориметрически показано образование комплексов одинаковой стехиометрии тритерпенового гликозида и его свободного агликона с мембранным холестерином. Показаны различия в механизмах действия гликозилированных и свободных тритерпеноидов и стероидов.

3. Показано, что механизм изменения проницаемости клеточных и модельных мембран состоит в образовании ион-селективных каналов при действии низких концентраций гликозидов и неселективных водонаполненных пор при действии высоких концентраций. Свойства ионных каналов и пор, образованных в мембранах тритерпеновыми и стероидными гликозидами, зависят от структуры гликозидов и структуры стероидов. Предложены молекулярные модели действия тритерпеновых гликозидов на мембраны и мембранные механизмы регуляции клеточной активности сапонидами. Предложен способ обратимого изменения проницаемости мембран и регуляции клеточной активности с использованием сапонида. Тритерпеновый гликозид предложен в качестве биохимического инструмента формирования в биомембранах рН-управляемых каналов и пор.

Основные публикации по теме диссертации:

1. Попов А.М., Ровин Ю.Г., Лихацкая Г.Н., Руднев В.С., Анисимов М.М. Особенности действия тритерпенового гликозида голотурина А на бислойные липид-стериновые мембраны // Доклады АН СССР. Т. 264. № 4. 1982. 987-990
2. Лихацкая Г.Н., Яровая Т.П., Руднев В.С., Попов А.М., Анисимов М.М., Ровин Ю.Г. Образование комплекса тритерпенового гликозида голотурина А с холестерином в липосомальных мембранах // Биофизика. 1985. Т. 30, вып. 2. С. 358-359.
3. Попов А.М., Лихацкая Г.Н., Ровин Ю.Г., Анисимов М.М., Стригина Л.И. Дискретный характер проводимости бислойных липидных мембран в присутствии тритерпенового гликозида каулозида С // Биофизика. 1983. Т. 28. Вып. 2. С. 351 (деп. ВИНТИ 30 дек. 1982. №6516-82)

4. Лихацкая Г.Н., Стригина Л.И., Попов А.М., Прокофьева Н.Г., Киселева М.И., Анисимов М.М. Действие стероидного гликозида полигонатозида С¹ и его агликона пенногенина на опухолевые клетки, липосомы и бислойные липидные мембраны // Биол. мембраны. 1987. Т. 4, N 3. С. 290-297
5. Лихацкая Г.Н., Попов А.М., Одинокова Л.Э., Атопкина Л.И., Уварова Н.И., Кузнецова Т.А., Анисимов М.М. Влияние свободных тритерпеноидов на свойства модельных липидных мембран // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1990, N 6. С. 942-946
6. Прокофьева Н.Г., Лихацкая Г.Н., Аминин Д.Л., Гафуров Ю.М., Сасункевич В.А., Стригина Л.И., Анисимов М.М. Механизм взаимодействия рН-зависимого цитостатика каулозида С с мембранами опухолевых клеток и липосом // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1990, N 3. С. 338-342
7. Анисимов М.М., Лихацкая Г.Н., Прокофьева Н.Г., Стехова С.И., Шенцова Е.Б., Стригина Л.И. Свободные и гликозилированные тритерпеноиды как модификаторы структурно-функциональных свойств биологических и модельных мембран // Успехи в изучении природных соединений. Владивосток: Дальнаука, 1999. С. 124-140
8. Лихацкая Г.Н., Анисимов М.М. Молекулярные механизмы мембранотропного действия сапонинов // II Съезд биофизиков России, 23-25 авг. 1999 г., Москва: Тез. докл. М., 1999. Т. 2. С. 532-533.
9. Стригина Л.И., Лихацкая Г.Н., Горовой П.Г. Стероидные гликозиды видов рода *Polygonatum* Mill. // Растительные ресурсы 2003, № 3. С. 1-29
10. Kalinin V.I., Volkova O.V., Likhatskaya G.N., Prokofieva N.G., Agafonova I.G., Anisimov M.M., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Stonik V.A. Hemolytic activity of triterpene glycosides from the Cucumariidae family holothurians and evolution of this group of toxins // J. Natural Toxins. 1992. Vol. 1, N 2. P. 17-30
11. Likhatskaya G.N., Anisimov M.M. Structure and channel-forming activity of triterpene and steroid glycosides // Division of agricultural and food chemistry: 210th Amer. Chem. Soc. National meet., Chicago, Aug. 20-24, 1995. Chicago, 1995. P. 177
12. Kalinin V.I., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N., Shentsova E.B., Agafonova I.G., Avilov S.A., Drozdova O.A. Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order Dendrochirotida: some trends in the evolution of this group of toxins // Toxicon. 1996. Vol. 34. N 4. P. 475-483
13. Likhatskaya G.N., Aminin D.L., Agafonova I.G., Gnedoi S.N., Shentsova E.B., Strigina L.I., Anisimov M.M. The pH-dependent channels formed by cauloside C // Adv. Exp. Medicine and Biology. 1996. Vol. 404. P. 239-249
14. Kalinin V.I., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N., Shentsova E.B., Agafonova I.G., Avilov S.A., Drozdova O.A. Hemolytic activity of triterpene glycosides from the Dendrochirotida order Holothurian // Adv. Exp. Medicine and Biology. 1996. Vol. 404. P. 557-564
15. Likhatskaya G.N., Anisimov M.M. Molecular mechanisms of cell regulation by saponins // Saponins in food feedstuffs and medicinal plants: Book abstrs, Pulawy, Poland, 6-8 Sept., 1999. Pulawy, 1999. P. 75.
16. Anisimov M.M., Likhatskaya G.N., Shentsova E.B., Prokofieva N.G., Shevchenko L.S., Nurminski E.A., Trifonov E.V., Samoshina N.F., Denisenko M.V., Uvarova N.I. Biological activities and mechanisms of action of betulin glycosides // Intern. conf. on saponins "Phytochemistry and Application of Plant Saponins", Pulawy, Poland, 8-10 Sept. 2004: Book abstrs. Pulawy, 2004. P. 35