

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»
Кафедра «Биофизика»

Работа допущена к защите

Зав. кафедрой, д.б.н.

_____ Скворцов А.Н.

"__" _____ 2016 г.

ВЫПУСКНАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

по теме:

КАНАЛООБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ
АМФОТЕРИЦИНА

Направление: 03.03.02 – Физика

Профиль: 03.03.02_02 – Биохимическая физика

Выполнил студент гр. 43417

С.Г. Фоменко

(подпись)

Руководитель, к.б.н.

С.С. Ефимова

(подпись)

Рецензент, д.ф-м.н.

Ю.Н. Орлов

(подпись)

Санкт-Петербург 2016

Реферат

с. 29, рис. 12, табл. 2.

ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ, ПРОИЗВОДНЫЕ АМФОТЕРИЦИНА В, ИОННЫЕ КАНАЛЫ

Полиеновый антибиотик амфотерицин В является одним из давно известных и наиболее эффективных противогрибковых агентов. Показано, что образование водных пор лежит в основе фунгицидного действия амфотерицина В. Однако его применимость ограничена выраженными побочными эффектами, такими как нефротоксичность, тошнота, рвота, коликообразная боль в кишечнике, анемия, сердечная аритмия, аллергические реакции и его крайне низкой растворимостью в воде. Поэтому химическая модификация в структуре макролида, которая увеличит каналобразующую активность антибиотика, снижая тем самым риск побочных эффектов, является одной из актуальных задач современной фармакохимии.

Цель работы - выявление каналобразующей активности новых синтетических полиеновых антибиотиков на основе амфотерицина В.

Проведены электрофизиологические измерения проводимости и времени жизни одиночных каналов, образованных амфотерицином В с различными химическими модификациями, в стерин-содержащих липидных мембранах.

В работе получены следующие результаты: исследуемые синтетические производные амфотерицина В (LCTA) с N-ацильными и (или) бензоксобарольными заменами в C₁₆ и C₁₉ положениях, соответственно, способны образовывать одиночные ионные каналы в липидных бислоях. Исследование таких каналов на модельных мембранах показало, что их проводимость больше проводимости каналов, образованных амфотерицином В (AMB). Изучено время жизни каналов и установлено, что LCTA-каналы находятся в открытом состоянии в два-три раза меньше, чем AMB-каналы.

Сделано заключение о том, что проводимость одиночных каналов, образованных амфотерицином В и его синтетическими производными, увеличивается в ряду: LCTA-2255 ≈ LCTA-2451 > LCTA-2440 > AMB, что, скорее всего, свидетельствует о разном размере ионных каналов, образованных этими агентами. Анализ времени жизни полиеновых пор указывает на то, что комплексы LCTA-эргостерин менее стабильны по сравнению с комплексом AMB-эргостерин. Также установлено, что стабильность LCTA-каналов зависит от входящего в их состав стерина.

Abstract

p. 29, fig. 12, tab. 2.

LIPID MEMBRANES, DERIVATIVES OF AMPHOTERICIN B, ION CHANNELS

Polyene macrolide antibiotic amphotericin B is most effective drug against fungal infections. It is shown that the formation of ion channel is the main mechanism of the fungicidal activity of amphotericin B. However, applicability these drugs limited to side effects, such as nephrotoxicity, nausea, vomiting, colicky pain in the intestine, anemia, cardiac arrhythmia, allergic reaction and its extremely low solubility in water. Therefore, chemical modification in the structure of the macrolide that lead to an increase in the channel-forming activity of antibiotics and reduce the risk of side effects is one of the important problems of modern pharmacochemistry.

The aim of our work was identification of channel-forming activity of new synthetic polyene antibiotics based on the amphotericin B.

Using electrophysiological method were measured the conductance and lifetime of single channels formed by amphotericin B with various chemical modifications in sterol-containing lipid membranes.

Our results demonstrated: the synthetic derivatives of amphotericin B (LCTA) with N-acyl and (or) benzoxaborole replacements at positions C₁₆ and C₁₉, respectively, forms a single ion channels in lipid bilayers. The study of conductance single ion channels demonstrated that conductance of LCTA channel more than this parameter in the case of amphotericin B channels. It is shown that the lifetime of the channels formed by LCTA are in two-three time less compared with amphotericin B (AMB)-channels.

It is concluded that the single channel conductance formed by amphotericin B and its synthetic derivatives increased in the following order LCTA-2255 \approx LCTA-2451 > LCTA-2440 > AMB, that probably indicates about different size of single polyene channels. The analysis of the lifetime of polyene channels indicated the less stability of the complex LCTA-ergosterol compared with AMB-ergosterol. It is found that the stability of LCTA-channels depends on the sterol component.

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1. Общая характеристика полиеновых антибиотиков, их классификация и фармакологическая активность.....	6
1.2. Основные природные полиеновые макролидные антибиотики.....	8
1.3. Молекулярные механизмы взаимодействия амфотерицина В с бислойными липидными мембранами.....	9
1.4. Модификация амфотерицина В.....	13
Глава 2. Материалы и методы.....	15
2.1. Материалы.....	15
2.2. Методы исследования.....	16
2.2.1. Формирование липидных бислоев и измерение их характеристик.....	16
2.2.2. Анализ экспериментальных данных.....	18
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	19
3.1. Установление каналобразующей активности синтетических производных амфотерицина В.....	19
3.2. Измерение основных характеристик одиночных ионных каналов.....	20
3.3. Варьирование липидного состава мембран.....	23
3.4. Биологическая активность синтетических производных амфотерицина В.....	24
Выводы.....	26
Список литературы.....	27

Введение

Важнейшей проблемой в изучении мембранного транспорта является установление механизма селективного переноса ионов через биологическую мембрану. Транспорт веществ через плазматическую мембрану происходит в результате простой и облегченной диффузии и активного транспорта. Избирательная проницаемость мембран имеет большое значение для саморегуляции и поддержания постоянного состава клетки. Крупные молекулы и ионы переносятся благодаря работе в мембране ионных каналов или переносчиков.

В настоящее время удобным инструментом для изучения свойств ионных каналов являются модельные липидные мембраны - плоские липидные бислои или липосомы. Причиной выбора таких моделей является возможность контролировать условия эксперимента, в том числе состав мембран и омывающий их раствор. С помощью модельных мембран активно исследуют потенциальные фармакологические агенты, а именно их мембранную активность и структуру образования трансмембранных пор. Одними из наиболее важных соединений являются полиеновые антибиотики, биологическое действие которых основано на увеличении ионной проницаемости мембран путем образования трансмембранных каналов, которые способствуют избирательной утечке ионов из клетки. Последнее приводит к нарушению концентрации ионов между цитоплазмой и внеклеточным пространством, что влечет за собой гибель клеток-мишеней. Однако, применение в современной фармакохимии лекарств на основе полиеновых антибиотиков имеет ряд серьезных побочных эффектов. Поэтому дальнейшее изучение макролидов является актуальной задачей фармакологии и требует применения методов, направленных на химические изменения в структурах полиенов с целью сохранения их терапевтической активности.

Целью работы являлось выявление каналообразующей активности новых синтетических производных полиенового антибиотика амфотерицина В. Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Выявление каналообразующей активности новых синтетических полиеновых антибиотиков на основе амфотерицина В.
- 2) Измерение проводимости одиночных трансмембранных каналов, образованных синтетическими полиенами.
- 3) Анализ полученных данных и сопоставление с биологической активностью потенциальных фармакологических агентов.

Работа выполнена в группе моделирования ионных каналов в Институте цитологии РАН.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Общая характеристика полиеновых антибиотиков, их классификация и фармакологическая активность

Полиеновые антибиотики включают в себя большой класс природных соединений, продуцируемых микроорганизмами *Streptomyces*. В настоящее время известно более 200 видов полиенов. Полиеновые антибиотики проявляют высокую противогрибковую и противовирусную активность [1, 2] и обширно применяются в медицине в течение многих десятилетий для лечения системных или глубоких микозов [3, 4]. Однако, полиеновые антибиотики обладают множеством побочных эффектов, к которым относятся нефротоксичность, сердечная аритмия и анемия [5, 6]. Тем не менее, полиеновые антибиотики остаются незаменимыми препаратами для лечения больных с пониженным иммунитетом [7, 8]. Одним из осложнений химиотерапии является развитие грибковых инфекций, лечение которых является жизненно необходимым для пациентов с ослабленным иммунитетом. Например, антибиотик амфотерицин В используется в химиотерапии, благодаря большему сродству антибиотика к молекулам эргостерина, чем к молекулам холестерина [9].

Полиеновые антибиотики имеют в своем составе макроциклическое лактонное кольцо, содержащее сопряженные двойные связи. Благодаря жесткости такой структуры, полиены имеют вытянутую палочковидную форму. Макролидное кольцо включает в состав гидрофильную и гептаеновую цепи. Гидрофильная цепь состоит из карбонильных и гидроксильных групп, а гептаеновая является цепью из сопряженных двойных связей. На одном из концов молекулы содержатся две противоположно заряженные группы – карбоксильная группа и аминоксахар.

Водорастворимые полярные группы, содержащиеся в макроциклическом лактонном кольце, имеют высокую биологическую активность [10], а определенное число двойных связей определяет конформационную жесткость всей молекулы.

Полиеновые антибиотики имеют в химической структуре от 20 до 44 атомов углерода и от 3 до 8 сопряженных двойных связей.

С одной стороны, наиболее простой классификацией полиеновых антибиотиков является классификация по числу сопряженных двойных связей. Таким образом, полиеновые антибиотики делятся на триены, тетраены, пентаены, гексаены, гептаены и октаены.

Например, амфотерицин В и нистатин, представленные на рисунке 1.1. А и Б, являются наиболее изученными полиеновыми антибиотиками и относятся к тетраенам и гептаенам, соответственно. Большинство молекул содержат в составе макролидного кольца 38 атомов. Так, филипин, изображенный на рисунке 1.1. В, является пентаеном и по своей структуре считается простейшим полиеном, не содержащим остатка аминокислоты и включающим макролидное кольцо, состоящее из 28 атомов.

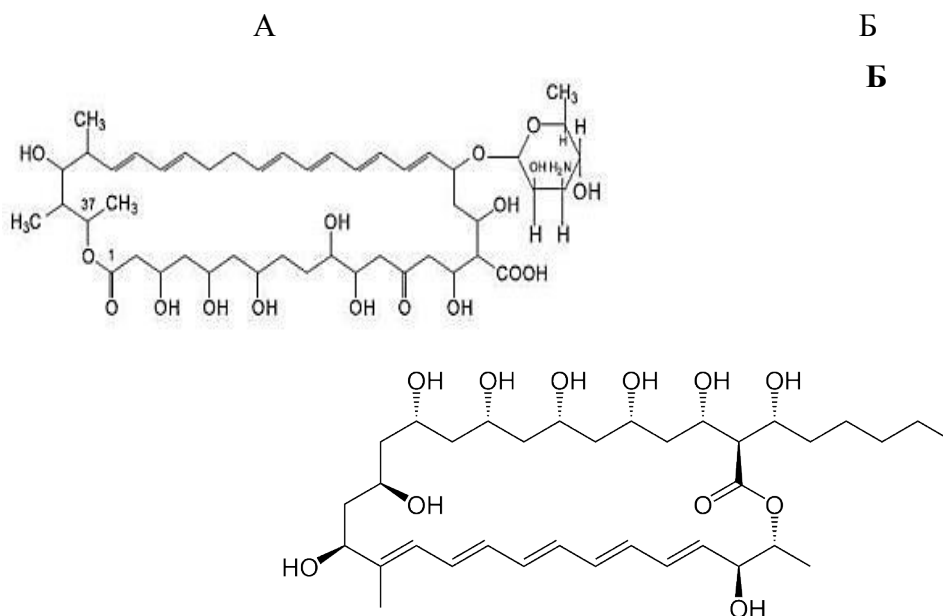


Рисунок 1.1. Структура молекул: А - амфотерицина В, Б - нистатина, В - филипина.

С другой стороны, полиеновые антибиотики можно разделить на две группы: не содержащие ароматическую группировку (например, амфотерицин В, нистатин и филипин) и содержащие, помимо остатка сахара, ароматическую группировку (например, леворин, изображенный на рисунке 1.2.) [10].

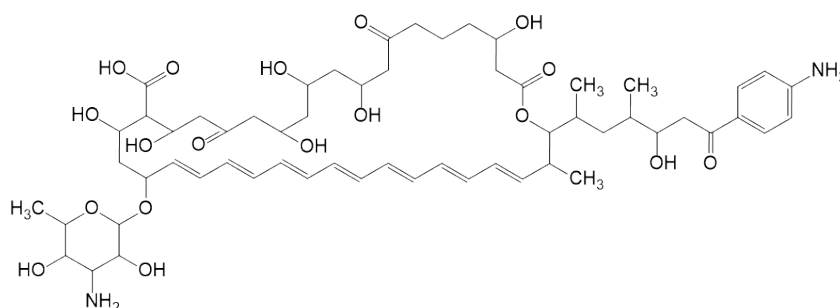


Рисунок 1.2. Структура молекулы леворина.

Гептаеновых полиеновых антибиотиков насчитывается более шестидесяти. Все гептаены разделяют на три группы, в зависимости от присутствия в них аминокислоты и

ароматических аминов: (1) неароматические гептаеновые полиены, содержащие один атом азота, входящий в состав микозамина; (2) ароматические гептаены, содержащие два атома азота, входящие в состав микозамина и *n*-аминоацетофенона; (3) ароматические полиены, содержащие два атома азота, входящие в состав микозамина и *N*-метил-*n*-аминоацетофенона.

Биологическая активность полиеновых антибиотиков зависит от аминной, карбоксильной, гидроксильной и метильной групп, которые присоединены к лактонному кольцу молекулы полиена.

Установлено, что полиеновые антибиотики усиливают действие антигрибковых препаратов и других антибиотиков, а также увеличивают эффективность действия многих соединений, обладающих противоопухолевой активностью [10]. Подобное действие полиенов может являться результатом их стимулирующего действия на иммунную систему организма или усиления цитотоксического действия используемых вместе с ними лекарственных средств. Последнее предположение может быть обусловлено либо индуцированным полиеновыми антибиотиками облегченным транспортом веществ внутрь клеток, либо совместным действием антибиотиков с химическим агентом на клетки-мишени. Известно, что амфотерицин В обладает иммуностимулирующим действием и усиливает иммунный статус [11].

Однако, полиеновые антибиотики обладают рядом побочных эффектов, что требует создания новых лекарственных форм. Исходя из этого, одной из важнейших задач современной фармакохимии является поиск соединений, токсичных для клеток грибов и нетоксичных для клеток млекопитающих.

1.2. Основные природные полиеновые макролидные антибиотики

На сегодняшний день, наиболее изученными полиеновыми макролидными антибиотиками являются амфотерицин В [12, 13], нистатин [14-16] и филипин [16, 17].

Молекула амфотерицина В включает в себя лактонное кольцо, состоящее из 38 углеродных атомов (см. рисунок 1.1. А). Гидрофильная и гептаеновая цепи в молекуле амфотерицина В, представлены углеродными атомами C_1-C_{15} и $C_{20}-C_{33}$, соответственно, и расположены параллельно друг другу. Гептаеновая цепь является жесткой системой, содержащей семь двойных связей. Гидрофильная цепь состоит из карбонильных и гидроксильных групп, лежащих в одной плоскости. Молекула амфотерицина В содержит еще одну гидроксильную группу, которая находится в конце гидрофобной части при положении углеродного атома C_{35} . Карбоксильная группа и остаток микозамина находятся в положениях C_{16} и C_{19} , соответственно. Структура молекулы нистатина отличается от молекулы амфотерицина В отсутствием двойной связи между углеродными атомами $C_{29} - C_{30}$, а также

позициями гидроксильных групп в гидрофильной цепи (см. рисунок 1.1. А и Б). Из рисунка 1.1. В видно, что молекула филипина содержит пять двойных связей, а также в молекуле этого антибиотика отсутствует остаток аминсахара.

Наличие определенного количества двойных связей определяет чувствительность к мембранам, содержащим стеринны. Показано, что чем больше в молекуле двойных связей, тем выше биологическая активность антибиотика [18, 19]. Согласно литературным данным химическая модификация аминной и карбоксильной группировок может приводить к изменению физико-химических свойств и биологической активности полиеновых антибиотиков [20].

В бислойных стерин-содержащих липидных мембранах полиеновые макролидные антибиотики, амфотерицин В, нистатин и филипин, образуют ионные каналы [13, 16]. Однако, ионные каналы, образованные амфотерицином В, имеют один четко выраженный уровень проводимости, в то время как нистатиновые и филипиновые каналы обладают многоуровневой проводимости. Поэтому дальнейший поиск новых антибиотиков на основе природных полиеновых антибиотиков проводился с использованием амфотерицина В.

1.3. Молекулярные механизмы взаимодействия амфотерицина В с бислойными липидными мембранами

Основным механизмом действия полиеновых антибиотиков в общем и амфотерицина В в частном на мембраны клеток-мишеней является образование в них ионных каналов [3, 9, 12]. Считается, что обязательным условием формирования полиеновых каналов является наличие в мембране молекул стеринов [12], поэтому проявляется противогрибковое действие полиеновых антибиотиков и специфическая токсичность в отношении клеток грибов.

Наиболее известной моделью взаимодействия полиенов с мембранами является стерин-зависимая модель [21]. Схема образования полиенового канала представлена на рисунке 1.3.

В соответствии с данной моделью полиеновый канал образуется при двухсторонней добавке антибиотика относительно мембраны, за счет взаимодействия двух полупор, расположенных в противоположных монослоях [12]. Каждая полупора образована совокупностью комплексов из молекул полиенов и стеринов.

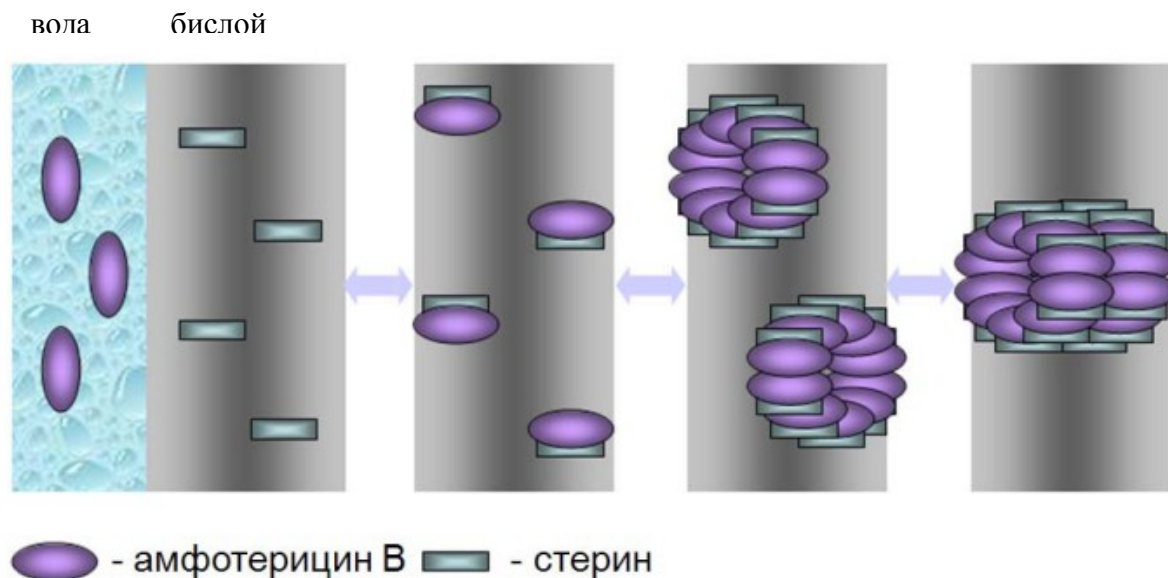


Рисунок 1.3. Стерин-зависимая модель образования ионного АМВ канала.

1 - сорбция АМВ на мембране, *2* - образование комплексов АМВ-стерин, *3* - образование АМВ полупоры, *4* - образование трансмембранной поры. По [22].

Молекулы антибиотика, попадая в водную фазу, стремятся занять наиболее энергетически выгодное положение и образуют в монослое комплексы со стеринами таким образом, что гидрофильные цепи амфотерицина В обращены внутрь поры, а цепи сопряженных двойных связей расположены рядом с мембранными стеринами и липидами. Полярная часть молекулы антибиотика направлена в сторону водной фазы, в то время как лактонное кольцо пронизывает липидную мембрану, то есть находится в гидрофобной среде. В результате образуется цилиндрическая полупора, состоящая из одинакового количества молекул антибиотика и стерина (от 7 до 10), которые ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны. Трансмембранная пора формируется за счет водородных связей между гидроксильными группами молекул амфотерицина В, находящихся во взаимодействующих полупорах [10]. Полость поры выстлана гидрофильными цепями молекул антибиотика, а гидрофобные цепи, взаимодействуя с молекулами стерина, обращаются в сторону липидной фазы.

Симметричный комплекс молекул амфотерицина В и стерина формирует плотно упакованную структуру, которая скреплена множеством водородных связей между соседними молекулами полиена (см. рисунок 1.4. Б). Противоположно заряженные группы соседних молекул антибиотика взаимодействуют друг с другом и формируют кольцо из чередующихся зарядов, которое укрепляет каналный комплекс.

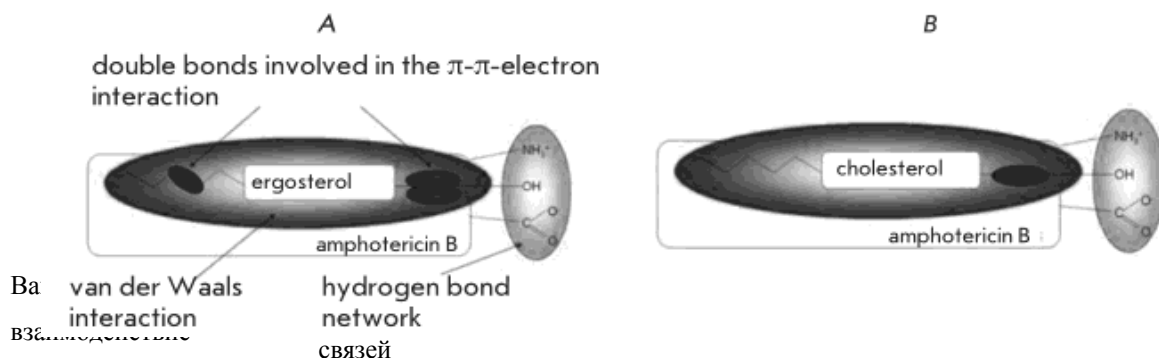


Рисунок 1.4. Схематическое представление взаимодействия комплексов: **А** – АМВ-эргостерин, **Б** – АМВ-холестерин. По [23] с дополнениями.

Можно предположить, что терапевтический эффект амфотерицина **В** в основном связан с его селективностью по отношению к различным стеринам клеточной мембраны.

Известно, что эргостерин является главным стеринем клеток грибов, а холестерин входит в состав мембран клеток млекопитающих. Молекулы эргостерина и холестерина представлены на рисунке 1.5.

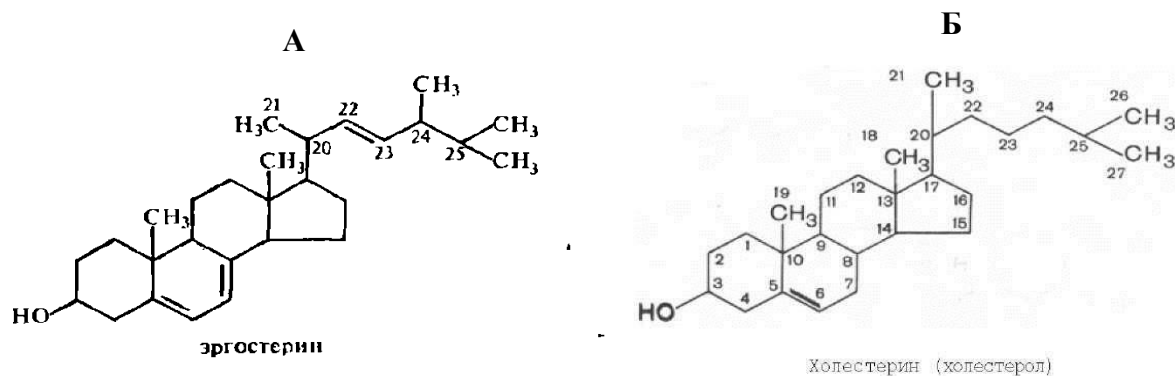


Рисунок 1.5. Молекулы стерина: **А** - эргостерин, **Б** - холестерин.

Из рисунка 1.5. видно, что молекула холестерина содержит три двойных связи, в то время как в молекуле эргостерина отсутствуют двойные связи в C_7 положении стероидного ядра и C_{22} положении хвостовой части молекулы.

Существуют сведения о том, что причиной селективности АМВ по отношению к стеринам в мембране клеток-мишеней является большая стабильность комплекса амфотерицин-эргостерин (см. рисунок 1.4. А) по сравнению с комплексом амфотерицин-холестерин (см. рисунок 1.4. Б) [24, 25]. Эргостерин является более жесткой молекулой, в отличие от холестерина, поэтому комплекс АМВ-эргостерин является более стабильным по сравнению с АМВ-холестериновым комплексом. Помимо Ван-дер-Ваальсовых сил, обусловленных взаимной ориентацией молекул и достигающих максимума, когда молекулы располагаются в одной плоскости параллельно друг к другу, π - π -электронное взаимодействие

между двойными связями эргостерина и амфотерицина В (рисунок 1.4.) приводит к дополнительной стабилизации комплекса эргостерин-амфотерицин, чего не происходит в случае с комплексом холестерин-амфотерицин, и, как следствие, стабильность последнего ниже [23].

Остроумова с соавторами [13] исследовали проводимость АМВ-каналов в мембранах, содержащих эргостерин и холестерин. При трансмембранном напряжении 200 мВ, проводимость АМВ-каналов составляет 9 ± 1 пСм в холестерин-содержащих мембранах и 11 ± 1 пСм в бислоях с участием эргостерина. Использование набора стеринов позволило авторам показать, что проводимость АМВ-каналов практически не зависит от вида молекулы стерина, а зависит от процентного содержания этой компоненты. Кроме того, расчет времени нахождения амфотерициновых каналов в открытом состоянии показал, что в холестерин-содержащих мембранах канал живет в 1.5 раза дольше (47 ± 2 мс), чем в эргостерин-содержащих бислоях (32 ± 2 мс) [13]. АМВ-каналы в мембранах клеток грибов находятся в открытом состоянии дольше, чем в мембранах клеток млекопитающих, так как молекулы эргостерина содержат три двойных связи, что способствует более прочному π - π -электронному взаимодействию с молекулами антибиотика. Молекула холестерина содержит одну двойную связь, что приводит к меньшей стабильности комплекса АМВ с холестерином. Однако, в молекуле амфотерицина В одновременно присутствуют заряды противоположных знаков, вследствие чего канал может находиться в открытом состоянии длительное время. Предполагается, что замена одного из зарядов полярных групп должна приводить к уменьшению времени жизни канала, образованного амфотерицином В. Также считается, что электростатические взаимодействия между карбоксильной группой одной молекулы и аминогруппой соседней молекулы АМВ влияют на стабильность открытого состояния канала [26].

Амфотерицин В является хорошо изученным антибиотиком, применяемым в терапевтических целях десятки лет. Однако, как отмечалось ранее, терапия с использованием амфотерицина В имеет ряд серьезных побочных эффектов, что приводит к необходимости изыскания новых форм антибиотика, улучшению его фармакологической активности и устранению нежелательных побочных эффектов. В настоящее время основным способом получения улучшенной формы антибиотика является образование химерных (гибридных) структур, то есть получение антибиотиков двойного действия.

1.4. Модификация амфотерицина В

Долгое время считалось, что использование одновременно двух полиеновых антибиотиков (создание гибридов на их основе) является перспективным методом создания новых лекарственных форм противогрибковых препаратов. Касумов [27] исследовал свойства химерных каналов, образованных двумя различными антибиотиками при их добавлении с разных сторон мембраны. Образование одиночного канала из смеси двух полиеновых антибиотиков дает очень широкий спектр значений проводимости. Согласно Касумову [27] проводимость гибридных каналов, образованных амфотерицином В и микогептином, в высоких концентрациях электролита (2 М раствор КСl) составляет величину 0.8 пСм при $V = +150$ мВ и 1.8 пСм при $V = -150$ мВ. При этом, в тех же экспериментальных условиях, проводимость АМВ-канала равна 4.5 ± 0.3 пСм при $V = \pm 150$ мВ, а микогептиновой поры – 0.3 ± 0.1 пСм. Сопоставление указанных результатов позволило авторам сделать заключение о том, что небольшие различия гидрофильной цепи молекул антибиотиков, выстилающих полость канала, существенно влияют на величину проводимости и избирательности таких каналов.

Для определения селективности комбинированных каналов Касумовым [27] были выбраны полиеновые антибиотики амфотерицин В, микогептин и леворин. Анионная селективность каналов, образованных этими агентами, уменьшается в ряду амфотерицин В > микогептин > леворин. Число переноса анионов системе 2 М:0.2 М КСl для амфотерицина В, микогептина и леворина составляет величину 0.9, 0.7 и 0.0, соответственно. Леворин обладает идеальной катионной селективностью. Для каналов, сформированных из амфотерицина В и микогептина число переноса анионов 0.8, а для леворин-амфотерициновых каналов эта величина равняется 0.7. Таким образом, при добавке с разных сторон мембраны антибиотиков различной селективности, наблюдается их взаимодействие и образование гибридных каналов, проницаемость для ионов которых определяется молекулами АМВ.

Амфотерицин В, нистатин и микогептин, добавленные только с одной стороны мембраны в концентрации 10^{-5} М, не увеличивали проводимости мембран, а при добавлении любого из указанных антибиотиков в концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ с другой стороны мембраны образуются комбинированные каналы. Проводимость таких гибридных каналов зависит от знака потенциала и находится между значениями проводимости обоих «чистых» каналов. Таким образом, образование гибридных каналов подтверждает гипотезу о том, что структура полиенового канала образована из двух полупор, расположенных в разных монослоях [28].

В настоящее время изыскание новых форм антибиотика осуществляется с использованием метода модификации молекулы природного антибиотика и создании, таким

образом, полусинтетических антибиотиков на их основе. Так, наиболее перспективным является создание химерных структур на основе амфотерицина В и бензоксаборолов.

Под химической трансформацией (созданием химерной структуры) понимают модификацию функциональных групп исходной молекулы амфотерицина В без изменения структурных компонентов, необходимых для проявления биологической активности. В результате такой работы можно получить улучшенные препараты, обладающие преимуществами перед исходными антибиотиками. Таким образом, изменение структуры антибиотиков может приводить к расширению спектра действия, а также снижению токсичности и устранению побочных эффектов.

В молекуле амфотерицина В функциональными группами являются карбоксильная группа, находящаяся в положении углеродного атома C_{16} и аминогруппа остатка микозамина в положении C_{19} . Оба радикала отвечают за взаимодействие между соседними молекулами амфотерицина В в комплексах, формирующих трансмембранную пору.

Особый интерес представляют борсодержащие молекулы, которые в настоящее время, применяются в качестве противовоспалительных средств, а также для лечения инфекций, вызванных дрожжами, грибами или бактериями [29-31]. Стоит отметить, что использование амидных групп является актуальным, поскольку уменьшает накопление антибиотика в клетках [32].

В настоящей работе использовали природный полиеновый антибиотик амфотерицин В и химерные структуры на его основе.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

В работе были использованы следующие реактивы:

- 1) Мембраны формировали из смеси ДФФХ(дифитаноил-глицеро-фосфохолин):эргостерин в молярном соотношении 67:33 моль % и ДФФХ:холестерин в молярном соотношении 67:33 моль %;
- 2) Мембраноомывающий раствор: 2 М КСl, 5мМ Hepes, pH 7.0;
- 3) Каналообразующие агенты: синтетические производные амфотерицина В - LСТА-2255, LСТА-2451 и LСТА-2440;
- 4) Органические растворители: пентан, хлороформ, гексадекан, гексан, этанол, ДМСО (диметилсульфоксид).

Замена карбоксильной группы в молекуле амфотерицина В была произведена на N-(2-диметиламиноэтил)амид (рисунок 2.1., радикал R), а аминогруппа остатка микозамина – на N-[3-(1-гидрокси-1,3-дегидробензо[1,2]оксисборол-7)-пропанол] (рисунок 2.1., радикал R'R"). Химическая трансформация была проведена д.х.н. Тевяшовой Анной Николаевной в лаборатории химической трансформации антибиотиков в НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе либо в одном из указанных выше положениях, либо одновременно в двух. Соответствующие использованные при химической трансформации радикалы R и R'R" в синтетических производных амфотерицина В представлены в таблице 2.1.

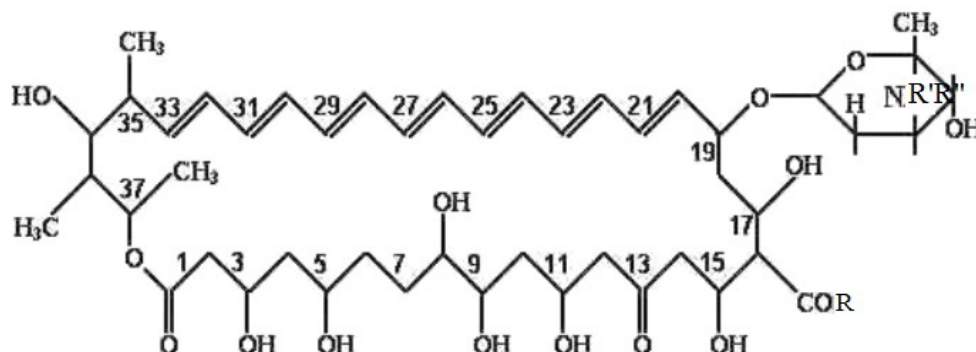


Рисунок 2.1. Химическая структура молекулы амфотерицина В с заменами карбоксильной группы в положении углеродного атома C₁₆ (R) и аминогруппы остатка микозамина в положении C₁₉(R'R").

Таблица 2.1. Химическая структура радикалов R и R'R'', использованных в синтетических производных амфотерицина В.

<i>Соединение</i>	<i>R</i>	<i>R'R''</i>
AMB	-ОН	-NH ₂
LСТА-2451	N-(2-диметиламиноэтил)амид	-NH ₂
LСТА-2255	-ОН	N-[3-(1-гидрокси-1,3-дегидробензо[1,2]оксиборол-7)-пропанол]
LСТА-2440	N-(2-диметиламиноэтил)амид	N-[3-(1-гидрокси-1,3-дегидробензо[1,2]оксиборол-7)-пропанол]

2.2. Методы исследования

2.2.1. Формирование липидных бислоев и измерение их характеристик

Бислойные липидные мембраны формировали по методу Монталя и Мюллера [33] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстия в тефлоновой пленке (рисунок 2.2.). Экспериментальная камера состоит из двух отсеков, разделяемых тефлоновой пленкой с маленьким отверстием посередине. Отверстие предварительно обрабатывали гексадеканом с обеих сторон для лучшего формирования липидного бислоя. 2 М раствор KCl добавляли в оба отсека камеры. На водной поверхности предварительно формировали конденсированные липидные монослои, путем добавления в оба отсека одинакового количества смеси липида ДФФХ:стерин (67:33 моль %) из раствора 2 мг/мл липида в пентане. После этого сводили монослои на отверстия в тефлоновой пленке с помощью последовательного опускания/поднимания раствора, что приводило к образованию бислойной липидной мембраны в отверстиях на тефлоновой пленке. Объем каждого отсека – 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки – 10 мкм, диаметр отверстия – 50 мкм.

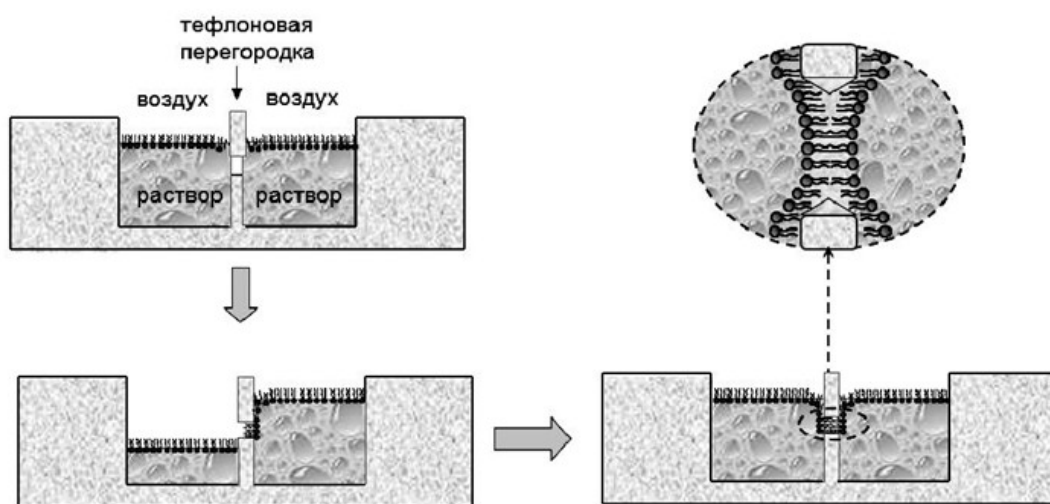


Рисунок 2.2. Формирование липидного бислоя. По [33].

Синтетические производные амфотерицина В - LCTA-2451, LCTA-2440 и LCTA-2550 добавляли из раствора 4 мг/мл, 2 мг/мл и 4 мг/мл в ДМСО, соответственно. Каждый агент вводили в оба отсека камеры до конечной концентрации в диапазоне от $2 \cdot 10^{-4}$ мг/мл до $8 \cdot 10^{-4}$ мг/мл. Для каждого из модифицированных производных амфотерицина В было проведено по 3-4 независимых эксперимента. Результаты таких измерений хорошо воспроизводились.

Для подачи трансмембранного напряжения и измерения протекающего через мембрану тока были использованы хлор-серебряные электроды, которые соединялись с растворами камеры через мостики с 1.5 % агарозой в растворе 2 М КСl. Положительным считали потенциал, вызывающий поток катионов из *цис*- в *транс*- отделение камеры. Подаваемое на мембрану трансмембранное напряжение изменяли в диапазоне от -200 мВ до +200 мВ с шагом 50 мВ.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments). Для обработки данных использовали 8-полярный фильтр Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) и частоту фильтрации 1 кГц.

2.2.2. Анализ экспериментальных данных

Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 ("Axon Instruments", США). Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 ("Origin Lab", США).

Проводимость каналов (G) определяли как отношение протекающего через одиночный канал тока (I) к трансмембранной разности потенциалов (V).

Для построения гистограмм флуктуаций тока использовали значения, определяемые по амплитуде тока при открывании/закрывании одиночного канала. Общее число событий (N), использовавшихся для анализа при фиксированном значении трансмембранного напряжения, было от 100 до 2000 для одиночных ЛСТА-каналов. По оси ординат откладывали число событий, соответствующих определенному значению тока, протекающему через одиночный ЛСТА-канал. Гистограммы флуктуаций трансмембранного тока аппроксимировали нормальным распределением (распределением Гаусса).

Для определения времени жизни канала (времени нахождения в открытом состоянии) анализировали записи флуктуаций тока, соответствующие функционированию одного канала в мембране. Общее число измерений, использовавшихся для построения временных гистограмм, было от 100 до 1500. По оси ординат откладывали относительные частоты n/N . Распределения времени жизни каналов аппроксимировали плотностью показательного распределения с параметром τ_{on} , соответствующим среднему времени жизни канала.

В качестве критерия проверки гипотезы о законе распределения использовали критерий χ^2 ($P < 0.05$). Число промежутков разбиения для построения гистограмм определяли по формуле Старджесса: $k = 1 + 3.3 \log(N)$, где N – общее число событий.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Установление каналобразующей активности синтетических производных амфотерицина В

Все эксперименты с синтетическими полиеновыми антибиотиками, как и ранее для амфотерицина В, выполнены с использованием стерин-содержащих мембран, поскольку наличие стерина в мембране является необходимым условием формирования трансмембранных пор, и высоких концентрациях электролита, поскольку в разбавленных растворах электролита проводимость АМВ-каналов мала.

После добавки синтетических производных амфотерицина В в оба отсека камеры наблюдали открывание/закрывание одиночных каналов. На рисунке 3.1. показаны примеры записей флуктуаций токов, протекающих через одиночные гибридные каналы, встроенные в ДФФХ:эргостерин (67:33 моль %) мембрану.

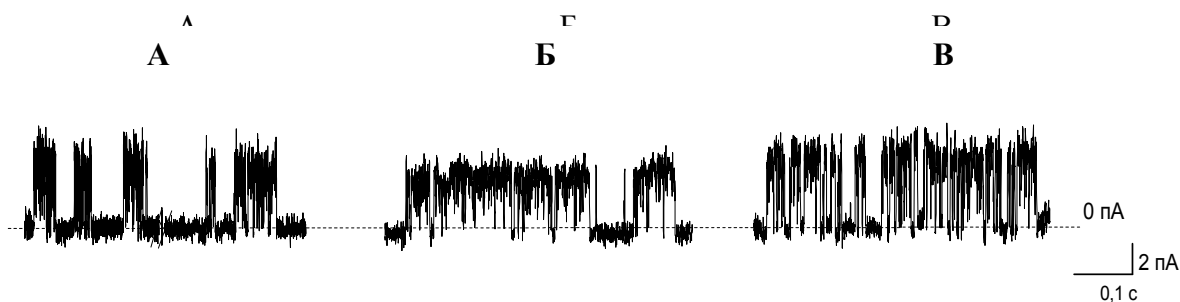


Рисунок 3.1. Записи флуктуаций трансмембранных токов, протекающих через одиночные каналы, образованные LCTA, в бислойных липидных ДФФХ:эргостерин (67:33 моль %) мембранах. Мембраноомывающий раствор 2 М КСl, 5 мМ Hepes, рН 7.0. $V = +200$ мВ. А –LCTA-2451, Б –LCTA-2440, В –LCTA-2255.

Из рисунка 3.1. видно, что амплитуда трансмембранного тока, протекающего через LCTA-2440 каналы несколько меньше амплитуды тока, протекающего через LCTA-2451 и LCTA-2255 каналы. При этом видно, что амплитуды флуктуаций LCTA-2451 и LCTA-2255 каналов близки.

Анализ большого числа аналогичных рисунку 3.1. треков позволил построить гистограммы трансмембранных токов (I), протекающих через ионные каналы, образованные LCTA, в бислойных липидных мембранах. На рисунке 3.2. представлены гистограммы распределения токов, протекающих через каналы в эргостерин-содержащих мембранах, в

результате объединения данных независимых экспериментов для LСТА-2440 при трансмембранном напряжении -200 мВ и +200 мВ. При аппроксимации гистограмм плотностью нормального распределения были получены средние значения трансмембранных токов, протекающих через одиночные LСТА-каналы.

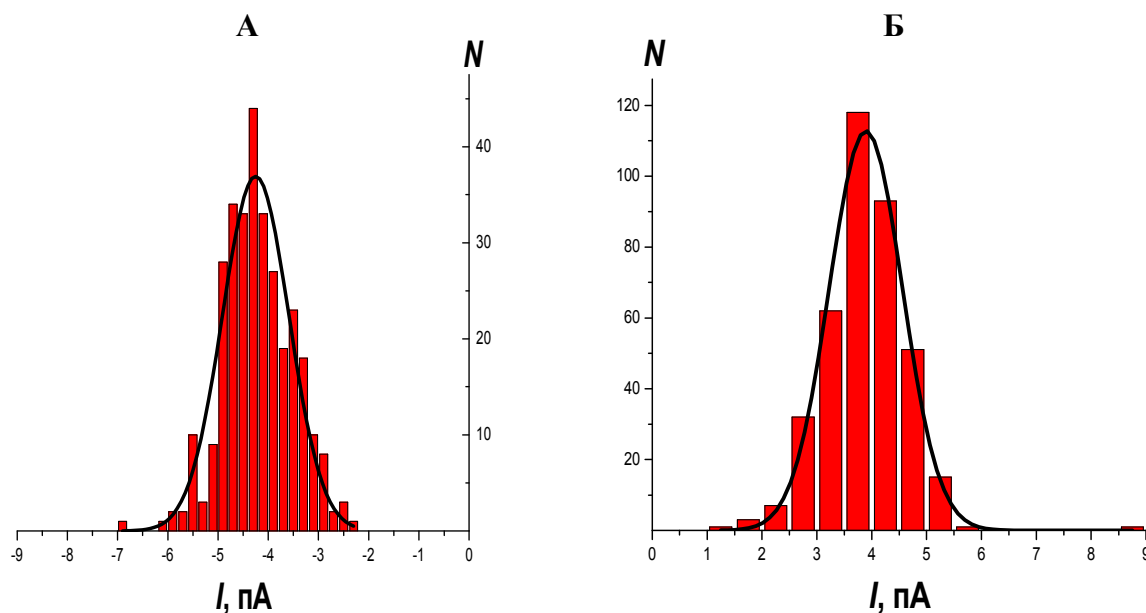


Рисунок 3.2. Гистограммы распределения трансмембранных токов, протекающих через каналы, образованные LСТА-2440 в ДФФХ:эргостерин (67:33 моль %) мембранах, омываемых 2 М раствором KCl, 5мМ Hерес, pH7.0.

А – $V = -200$ мВ ($I = -4.3 \pm 1.3$ пА), **Б** – $V = +200$ мВ ($I = 3.9 \pm 1.3$ пА).

Аналогичным образом были получены величины I для других измеренных значений трансмембранного напряжения и синтетических производных LСТА. Полученные результаты позволили построить вольт-амперные характеристики одиночных LСТА-каналов в мембранах, сформированных из смеси ДФФХ:эргостерин (67:33 моль %).

Поскольку все изученные в работе синтетические производные проявляют мембранную активность и образуют ионные каналы, аналогично природному антибиотику амфотерицину В, далее была измерена проводимость реконструированных LСТА-каналов в стерин-содержащие липидные мембраны.

3.2. Измерение основных характеристик одиночных ионных каналов

Как описано в п. 2.2.2. гл. 2, проводимость одиночных каналов рассчитывали как отношение протекающего через одиночный канал тока (I) к трансмембранной разности

потенциалов (V) и строили зависимости проводимости от трансмембранного напряжения для LCTA-каналов. Результаты представлены на рисунке 3.3.

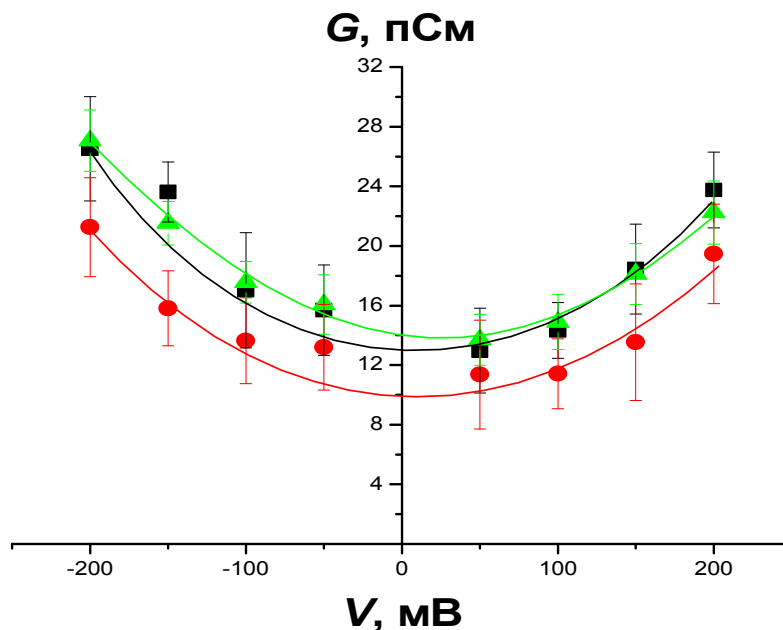


Рисунок 3.3. Зависимость проводимости (G) от трансмембранного потенциала (V) для LCTA-каналов в ДФФХ:эргостерин (67:33 моль %) мембранах, омываемых 2 М раствором KCl, 5мМ Hesper, pH7.0.

■ –LCTA-2255; ● –LCTA-2440; ▲ –LCTA-2451.

Из рисунка 3.3. видно, что проводимость ионных каналов, сформированных различными LCTA, увеличивается при увеличении трансмембранного потенциала по абсолютному значению. Проводимость каналов, сформированных LCTA-2255 и LCTA-2451, совпадает в пределах погрешности и превышает проводимость LCTA-2440 каналов.

Для анализа полученных результатов провели сравнение проводимости LCTA-каналов с проводимостью АМВ-пор из литературных данных. Результаты представлены на рисунке 3.4.

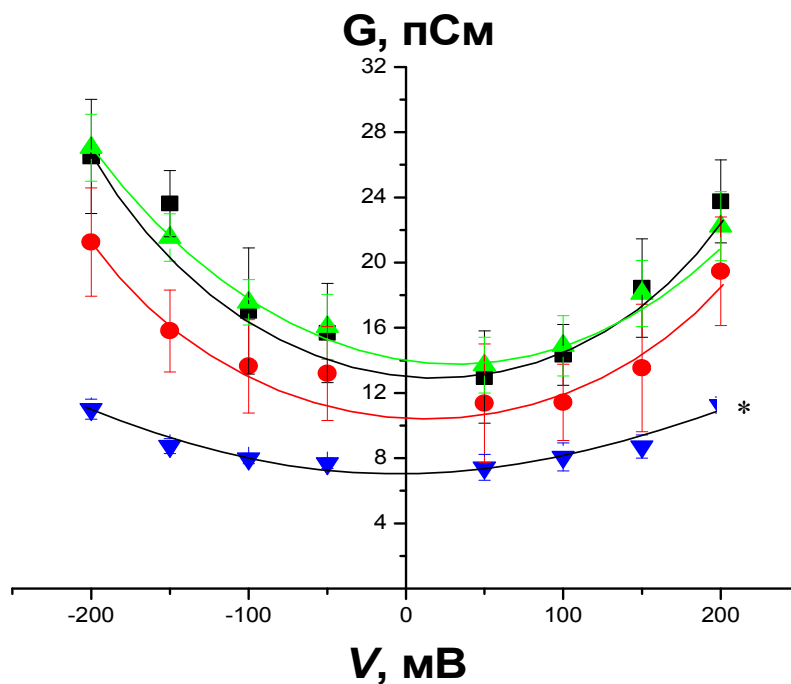


Рисунок 3.4. Зависимость проводимости от трансмембранного потенциала для АМВ-каналов (\blacktriangledown) и LCTA-каналов (\blacksquare , \blacktriangle , \bullet) в ДФФХ:эргостерин (67:33 моль %) мембранах омываемых 2 Мраствором KCl, 5мМ Hepes, pH7.0. * – По [13].

Из рисунка 3.4. видно, что при $V = +200$ мВ проводимость АМВ-каналов составляет величину 11 ± 1 пСм, проводимость LCTA-2440-каналов - 19 ± 3 пСм, а проводимость LCTA-2451- и LCTA-2255-каналов совпадает в пределах погрешности и равна 22 ± 4 пСм. Сходство формы вольт-амперных кривых различных каналов указывает на близость их геометрии.

Анализ полученных данных позволяет составить ряд уменьшения проводимости каналов: LCTA-2255 \approx LCTA-2451 > LCTA-2440 > АМВ. Можно предположить, что такие результаты являются следствием различия размеров полиеновых каналов. Например, карбоксильная группа и аминогруппа в молекуле амфотерицина В имеют противоположный заряд, что приводит к их взаимному притяжению и, вероятно, обеспечивает стабильность олигомеров из АМВ-эргостериновых комплексов, формирующих трансмембранные поры. В составе полярной головы LCTA-2451 имеется две положительно заряженные группы (см. таблицу 2.1.), следовательно, в олигомерной структуре происходит отталкивание комплексов друг от друга, что приводит к увеличению диаметра канала и, как следствие, выражается в его большей проводимости. Аналогичное предположение можно сделать и в случае LCTA-2255. Другим фактором, способствующим ослаблению взаимодействий между комплексами, образующими поры, является больший по сравнению с исходными группами размер заместительных радикалов в случаях указанных синтетических производных. Две

разноименно заряженные группы в составе полярной части LCTA-2440 притягиваются друг к другу, что обуславливает снижение проводимости этих каналов относительно проводимости пор, формируемых двумя другими синтетическими производными амфотерицина В. Однако, размер функциональных радикалов LCTA-2440 превышает размер исходных групп амфотерицина В, что может приводить к увеличению диаметра LCTA-каналов и определять большую проводимость LCTA-2440 каналов по сравнению с АМВ-порами.

Увеличение проводимости полиеновых каналов, образованных синтетическими производными амфотерицина В, по сравнению с *G* природного АМВ может влиять на стабильность проводящего комплекса. Для проверки последнего предположения были проведены измерения времени жизни одиночных каналов. Результаты представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1. Время жизни АМВ- и LCTA-каналов при $V = +200$ мВ в мембранах, сформированных из ДФФХ:эргостерин (67:33 моль %) и омываемых 2 М раствором KCl, 5мМ Hepes, pH7.0. * – По [13].

Соединение	τ , мс
АМВ	$32 \pm 2^*$
LCTA-2451	10 ± 1
LCTA-2255	14 ± 1
LCTA-2440	13 ± 1

Анализируя результаты, представленные в таблице 3.1, можно заметить, что каналы, образованные амфотерицином В, находятся в открытом состоянии в 2.5 раза дольше по сравнению с LCTA-порами. Таким образом, полученные результаты согласуются с предположением о разной стабильности LCTA-каналов и АМВ-пор.

3.3. Варьирование липидного состава мембран

Для изучения зависимости проводимости LCTA-каналов от входящего в состав мембран стерина в мембранообразующем растворе эргостерин заменили холестерином.

Результат измерения проводимости ионных каналов, образованных LCTA-2541, в мембранах различного состава представлены на рисунке 3.5. Для сравнения с АМВ-порами на рисунке 3.5 также приведены литературные данные.

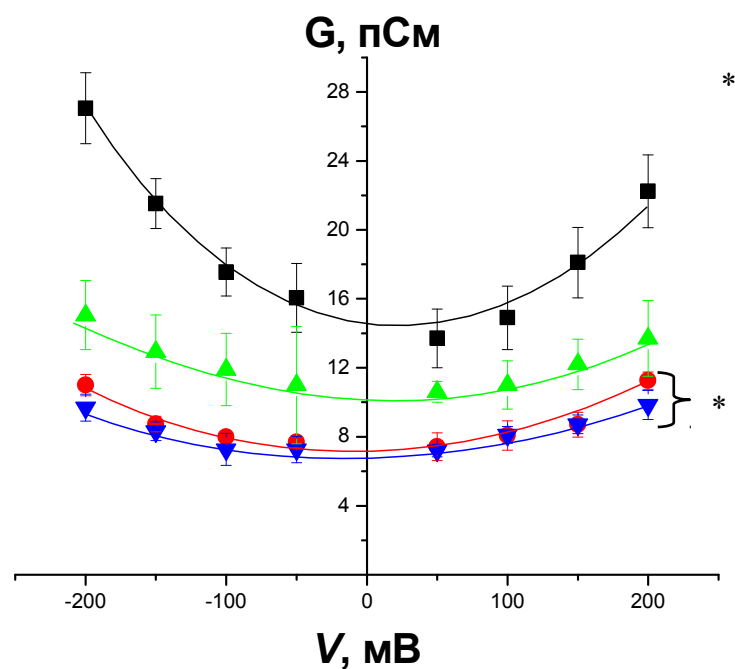


Рисунок 3.5. Зависимость проводимости от трансмембранного напряжения для АМВ-каналов* и LCTA-2451-каналов в мембранах, сформированных из смеси ДФФХ:эргостерин (67:33 моль %) или ДФФХ:холестерин (67:33 моль %) и омываемых 2 М раствором KCl, 5мМ Hepes, pH 7.0.* – По [13].

■ – LCTA-2451 в ДФФХ:Эрг (67:33 моль %); ■ – LCTA-2451 в ДФФХ:Хол (67:33 моль %); ● – АМВ в ДФФХ:Эрг (67:33 моль %); ▼ – АМВ в ДФФХ:Хол (67:33 моль %)

Согласно данным Остроумовой с соавторами [13] проводимость АМВ каналов не зависит от стериновой компоненты мембраны. При этом из рисунка 3.5. видно, что проводимость LCTA-пор зависит от вида стерина, входящего в структуру трансмембранной поры. Это свидетельствует о влиянии взаимодействия LCTA со стеринном на стабильность проводящих олигомеров. Можно подозревать, что комплексы LCTA/Эрг и LCTA/Хол сильнее отличаются между собой, чем АМВ/Эрг и АМВ/Хол структуры.

3.4. Биологическая активность синтетических производных амфотерицина В

Согласно группе авторов [34, 35] модификация карбоксильной группы в молекуле АМВ не приводит к потере активности антибиотика. Напротив, присутствие аминокислотной группы в сахарном остатке полиеновых антибиотиков этой группы является критичным для проявления противогрибковой активности.

Тевяшова с соавторами [35] показали, что АМВ проявляет высокую противогрибковую активность (минимальная ингибирующая концентрация антибиотика (МИК) = 0.5 – 1 мкг/мл). Введение в молекулу АМВ группировки, содержащей

дополнительную аминную функцию только при C₁₆ (LСТА-2451) или одновременно с заменой в C₁₉ на бензоксаборольный заместитель (LСТА-2440) демонстрирует близкую к АМВ противогрибковую активность (МИК = 0.5 – 1 мкг/мл). Подавление аминной функции микозамина в молекуле АМВ путем введения бензоксаборол-содержащих ацильных заместителей в C₁₉ положение (LСТА-2255) приводит к уменьшению противогрибковой активности (МИК = 4 мкг/мл). Сопоставление результатов измерения каналобразующей активности синтетических производных АМВ и их противогрибковой активности указывает на отсутствие корреляции между измеряемыми величинами.

Необходимость и достаточность присутствия хотя бы одной аминогруппы в составе полярной головы полиенового антибиотика для проявления им противогрибковой активности может указывать на влияние отрицательно заряженных липидов мембран клеток-мишеней на взаимодействия в системах «полиен-полиен» и «полиен-стерин». О существенном вкладе фосфолипидной составляющей в стабильность полиен-стериновых комплексов свидетельствуют результаты изучения каналобразующей активности АМВ в модельных липидных мембранах различного состава [36]. Для проверки выдвинутого предположения в ходе дальнейших экспериментов на модельных системах планируется проанализировать вклад в наблюдаемые эффекты фосфолипидов, имеющих различный заряд.

Выводы

1) Синтетические производные амфотерицина В образуют одиночные каналы в модельных стерин-содержащих мембранах.

2) Проводимость амфотерицина В и его синтетических производных увеличивается в ряду $LSTA-2255 \approx LSTA-2451 > LSTA-2440 > AMB$. Полученные результаты могут указывать на разный размер полиеновых пор.

3) Время жизни каналов, образованных синтетическими антибиотиками, в два раза меньше времени жизни амфотерициновых каналов. Последнее может свидетельствовать о меньшей стабильности комплексов LSTA-эргостерин по сравнению с AMB-эргостерин.

4) Сопоставление каналообразующей и противогрибковой активности амфотерицина В и его синтетических производных требует учета влияния других мембранных компонентов на взаимодействия «полиен-полиен» и «полиен-стерин».

Список литературы

1. Medoff G., Kwan C.N., Schlessinger D., Kobayashi G. S. Potentiation of rifampicin, rifampicin analogs, and tetracycline against animal cells by amphotericin B and polymyxin B // *Cancer Research*. 1973. Vol. 33(6). P. 1146-1149.
2. Malewicz B., Momsen M., Jenkin H.M. Combined effect of acyclovir and amphotericin B on the replication of pseudorabies virus in BHK-21 cells // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1983. Vol. 23(1). P. 119-124.
3. Brajtburg J, Powderly W.G., Kobayashi G.S., Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990. Vol. 34(2). P. 183-188.
4. Wong-Beringer A., Jacobs R.A., Guglielmo B.J. Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities // *Clinical Infectious Diseases*. 1998. Vol. 27(3). P. 603-618.
5. Craven P.C., Gremillion D.H. Risk factors of ventricular fibrillation during rapid amphotericin B infusion // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985. Vol. 27(5). P. 868-871.
6. Mora-Duarte J., Betts R., Rotstein C., Colombo A.L., Thompson-Moya L., Smietana J., Lupinacci R., Sable C., Kartsonis N., Perfect J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis // *The New England Journal of Medicine*. 2002. Vol. 347(25). P. 2020-2029.
7. Guinet R., Chanas J., Goullier A., Bonnefoy G., Ambroise-Thomas P.J. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae* // *Journal of Clinical Microbiology*. 1983. Vol. 18(2). P. 443-444.
8. Hawkins J.L., Baddour L.M. *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability // *Clinical Infectious Diseases*. 2003. Vol. 36(2). P. 14-18.
9. De Kruffy B., Demel R. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene-antibiotic-cholesterol complexes // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1974. Vol. 339(1). P. 57-70.
10. Касумов Х.М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука, 2009. 512 с.
11. Brajtburg J., Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B // *Clinical Microbiology Reviews*. 1996. Vol. 9(4). P. 512-531.
12. Andreoli T.E. The structure and function of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1974. Vol. 235(0). P. 448-468.
13. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. Probing Amphotericin B Single Channel Activity by Membrane Dipole Modifiers // *PLOS ONE*. 2012. Vol. 7(1).
14. Gonzalez-Damian J., Ortega-Blake I. Effect of membrane structure on the action of polyenes II: nystatin activity along the phase diagram of ergosterol- and cholesterol-containing POPC membranes // *The Journal of Membrane Biology*. 2010. Vol. 237(1). P. 41-49.

15. Recamier K.S., Hernandez-Gomez A., Gonzalez-Damian J., Ortega-Blake I. Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes // *The Journal of Membrane Biology*. 2010. Vol. 237(1). P. 31-40
16. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Chulkov E.G., Schagina L.V. The Interaction of Dipole Modifiers with Polyene-Sterol Complexes // *PLOS ONE*. 2012. Vol. 7(9).
17. Samedova A.A., Kasumov Kh.M. Mechanism of action of macrolide antibiotic filipin on cell and lipid membranes // *Antibiotiki i Khimioterapiya*. 2009. Vol. 54(11-12). P. 44-52.
18. Joly V., Bolard J., Saint-Julien L., Carbon C., Yeni P. Influence of phospholipid/amphotericin B ratio and phospholipid type on in vitro renal cell toxicities and fungicidal activities of lipid-associated amphotericin B formulations // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992. Vol. 36(2). P. 262-266.
19. Joly V., Bolard J., Yeni P. In vitro models for studying toxicity of antifungal agents // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992. Vol. 36(9). P. 1799-1804.
20. Gary-Boho C.M. Polyene-sterol interaction and selective toxicity // *Biochimie*. 1989. Vol. 7(1). P. 37-47.
21. Baginski M., Resat H., McCammon J. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: molecular dynamics simulation // *Molecular Pharmacology*. 1997. Vol. 52(4). P. 560-570.
22. Остроумова О.С., Ефимова С.С., Малев В.В., Щагина Л.В. Ионные каналы в модельных липидных мембранах. СПб.: Издательство Политехнического университета, 2013. 122 с.
23. Baran M., Borowski E., Mazerski J. Molecular modeling of amphotericin B–ergosterol primary complex in water II // *Biophysical Chemistry*. 2009. V. 141(2-3). P. 162-168.
24. Neumann A., Czub J., Baginski M. On the Possibility of the Amphotericin B-Sterol Complex Formation in Cholesterol- and Ergosterol-Containing Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009. Vol. 113(48). P. 15875-15885.
25. Neumann A., Baginski M., Czub J. How Do Sterols Determine the Antifungal Activity of Amphotericin B? Free Energy of Binding between the Drug and Its Membrane Targets // *Journal of the American Chemical Society*. 2010. Vol. 132(51). P. 18266-18272.
26. Kasumov Kh.M., Borisova M.P., Ermishkin L.N., Potseluyev V.M., Silberstein A.Y., Vainshtein V.A. How do ionic channel properties depend on the structure of polyene antibiotic molecules? // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1979. Vol. 551(2). P. 229-237.
27. Касумов Х.М. Молекулярный механизм взаимодействия полиеновых антибиотиков с липидными мембранами. Баку: Элм, 1986. С. 1-233.
28. Cass A., Finkelstein A., Krespi V. The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B // *The Journal of General Physiology*. 1970. Vol. 56(1). P. 100-124.
29. Akama T., Dong C., Virtucio C., Freund Y.R., Chen D., Orr M.D., Jacobs R.T., Zhang Y.K., Hernandez V., Liu Y., Wu A., Bu W., Liu L., Jarnagin K., Plattner J.J. Discovery and structure-

- activity relationships of 6-(benzoylamino)benzoxaboroles as orally active anti-inflammatory agents // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013. Vol. 23(21). P. 5870-5873.
30. Hu Q.H., Liu R.J., Fang Z.P., Zhang J., Ding Y.Y., Tan M., Wang M., Pan W., Zhou H.C., Wang E.D. Discovery of a potent benzoxaborole-based anti-pneumococcal agent targeting leucyl-tRNA synthetase // *Scientific Reports*. 2013. Vol. 3(2475).
31. Zhang Y.K., Plattner J.J., Easom E.E., Jacobs R.T., Guo D., Sanders V., Freund Y.R., Campo B., Rosenthal P.J., Bu W., Gamo F.J., Sanz L.M., Ge M., Li L., Ding J., Yang Y. Benzoxaborole antimalarial agents. Part 4. Discovery of potent 6-(2-(alkoxycarbonyl)pyrazinyl-5-oxy)-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaboroles // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. Vol. 58(13). P. 5344-5354.
32. Kos V.M., Koštrun S., Fajdetic A., Bosnar M., Kelneric Z., Stepanic V., Haber V.E. Structure–property relationship for cellular accumulation of macrolones in human polymorphonuclear leukocytes (PMNs) // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013. Vol. 49(2). P. 206–219.
33. Montal M., Mueller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties // *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1972. Vol. 69(12). P. 3561-3566.
34. Borowski E. Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity // *Il Farmaco*. 2000. Vol. 55(3). P. 206–208.
35. Tevyashova A.N., Korolev A.M., Trenin A.S., Dezhenkova L.G., Shtil A.A., Polshakov V.I., Savelyev O.Y., Olsufyeva E.N. New conjugates of polyene macrolide Amphotericin B with benzoxaboroles: synthesis and properties // *The Journal of Antibiotics*. 2016. Vol. 6.
36. Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. Investigation of Channel-Forming Activity of Polyene Macrolide Antibiotics in Planar Lipid Bilayers in the Presence of Dipole Modifiers // *Acta Naturae*. 2014. Vol. 4(23). P. 67-79.