

Улугбек Мирходжаев

Мембраноактивные краун-эфиры

 **LAMBERT**
Academic Publishing

Улугбек Мирходжаев

Мембраноактивные краун-эфиры

Улугбек Мирходжаев

Мембраноактивные краун-эфиры

LAP LAMBERT Academic Publishing

Imprint

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher:

LAP LAMBERT Academic Publishing is a trademark of
International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group
17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius

Printed at: see last page

ISBN: 978-613-9-82419-9

Copyright © Улугбек Мирходжаев

Copyright © 2018 International Book Market Service Ltd., member of
OmniScriptum Publishing Group

All rights reserved. Beau Bassin 2018

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА
ИМЕНИ МИРЗО УЛУГБЕКА

*Посвящается 100-летию
Национального университета Узбекистана
имени Мирзо Улугбека*

У.З.МИРХОДЖАЕВ

МЕМБРАНОАКТИВНЫЕ КРАУН-ЭФИРЫ

Под редакцией академика АН РУз
Б.А.Ташмухамедова

Мирходжаев У.З.

Мембраноактивные краун-эфиры. Монография.

-Beau Bassin, 2018. 216 с.

УДК 541.49:577.352.2

В монографии приведены данные о структуре и свойствах мембраноактивных краун-эфиров, проявляющих комплексонные, ионофорные и каналоформерные свойства. Эти краун-эфиры исследованы на плоских бимолекулярных и мультиламеллярных слоях. Установлены различия во взаимодействии комплексонных, ионофорных и каналоформерных краун-эфиров с мультиламеллярными слоями. Рассматриваются основные принципы организации и функционирования двух типов ионных каналов, индуцированных краун-эфирами на бислоях. На биомембранах изучены ионофорные и каналоформерные свойства краун-эфиров, исследовано биологическое действие и определены некоторые области их использования.

Монография рассчитана на биологов, химиков, физиков, работающих на стыке наук, а также бакалавров, магистров и преподавателей соответствующих специальностей.

ISBN 978-613-9-82419-9

ВВЕДЕНИЕ

После первых публикаций Педерсена, связанных с синтезом и изучением краун-эфиров [216-221], создано большое число соединений этого класса с уникальными характеристиками, различными названиями и конфигурациями. Выявлены необычные свойства краун-эфиров и возможные области их использования. Одними из примечательных свойств краун-эфиров и их аналогов (кроме способности с высокой селективностью образовывать комплексы типа “гость-хозяин”) является проявление ионофорной и каналоформерной активности. Действительно, к настоящему времени среди краун-эфиров и их аналогов открыты избирательные ионофоры и каналообразующие структуры, способные осуществлять трансмембранный перенос ионов, проявлять биологическую активность.

Важнейшей функцией клеточных мембран является поддержание постоянного ионного состава цитоплазмы, что достигается активным транспортом ионов против градиента концентрации и слабой пассивной проницаемостью мембран для этих ионов. Биомембрана является не только структурной основой клетки, но и местом, где сосредоточены важнейшие системы превращения энергии и регуляции клеточных процессов. В результате реакций, протекающих в мембранах, осуществляются такие важные биологические процессы, как: генерация нервного импульса, окислительное фосфорилирование, мышечное сокращение, аккумуляция световой энергии при фотосинтезе, поглощение света сетчаткой, контроль за поступлением веществ в ткани и многие другие процессы.

Ионофорные антибиотики обладают способностью повышать пассивную катионную проницаемость мембран. Среди них особое место занимают природные и синтетические мембраноактивные комплексоны - соединения макроциклического и псевдоциклического строения. Мембранная активность данных соединений, обусловлена их свойством образовывать липофильные комплексы с ионами металлов и встраиваться в гидрофобную среду. Этот научный факт в свое время привел к ускоренному развитию химии макроциклических комплексонов и созданию основ для детального изучения зависимости между молекулярной структурой, мембранной активностью и биологической функцией этих соединений.

Макроциклические полиэфиры или краун-эфирсы представляют собой соединения, которые, с одной стороны, хорошо изучены химиками и могут быть синтезированы с разнообразными модифика-

кациями молекулы, с другой - встраиваются в мембрану и индуцируют ионный транспорт на них.

Описанные к настоящему времени краун-эфиры и их аналоги различаются как в отношении комплексообразующих свойств, так и мембранного действия. Детальное исследование зависимости эффекта краун-эфиров на мембраны от их молекулярного строения служит предпосылкой для выявления закономерностей между структурой и мембранной активностью, обоснования направленного синтеза краун-эфиров с заранее заданными свойствами. Такие исследования являются неизбежным этапом при поисках путей направленного синтеза веществ, индуцирующих в мембранах проницаемость заданного типа.

Краун-эфиры можно рассматривать как макрогетероциклические соединения или кольцевые системы с эндогидрофильной полостью и экзолипофильной внешней оболочкой, которые в состоянии образовывать комплексы с солями различных щелочных и щелочно-земельных металлов, а также с многочисленными ионами переходных металлов. Структурно они содержат, как правило, ряд повторяющихся $(-X-CH_2-CH_2-)_n$ звеньев ($X=O, N, S$), причем способные к комплексообразованию гетероатомы образуют гидрофильные, а алифатические составляющие - липофильные области каркаса лиганда. Символическое название "краун-эфиры" было предложено Педерсеном [216], поскольку пространственные модели молекул похожи на корону, и процесс образования комплексов с катионами можно образно представить как "коронование" ионов.

С обнаружением мембраноактивных краун-эфиров и их аналогов с высокой избирательностью действия резко возрос интерес к этим соединениям. Значительное число публикаций, обстоятельных обзоров и монографий являются очевидным свидетельством этого [78, 79, 84-102, 127-130, 160, 169-172, 249, 253, 261, 263, 295-302, 307-309, 330, 360, 369, 380, 398, 399, 401]. Г.В. Гокель и сотрудники осуществили разносторонний подход к изучению данной проблемы. Работы [82, 89] посвящены изучению лариат-эфиров; работы [84-87, 93, 94, 97, 98, 100] - синтезу и анализу семейства синтетических катионных каналов, так называемым гидрофилам; синтетическим амфифильным пептидным аналогам транспортеров хлоридов [66, 289] и работы [91, 92, 96, 102, 104] посвящены биологическому действию этих соединений.

Включение в мембрану различных краун-эфиров известной структуры и возможность модификации этих молекул позволяют

изучать механизмы ионной проницаемости на молекулярном уровне. Индуцированный ионный транспорт на мембранах представляет собой многостадийный процесс, состоящий из гетерогенной реакции комплексообразования на границе раздела мембрана - водный раствор, липофилизации и экстракции образовавшегося комплекса в мембранную фазу, диффузии комплекса в мембране и диссоциации его с другой стороны мембраны [39, 62-65, 281, 282, 336, 337, 347, 348, 380-382]. По-видимому, эти процессы и определяют, главным образом, основные этапы при взаимодействии краун-эфира, переносимого иона и мембраны, как и процессы, происходящие на границе раздела фаз. Существует строгое взаимодействие термодинамики и кинетики комплексообразования, липофилизации, диффузии и межфазных явлений.

Некоторые дитретбутильные производные краун-эфиров являются эффективными катализаторами фазового переноса ионов. Функционализированные краун-эфиры являются удобными интермедиатами для получения краун-содержащих полимеров [396].

В настоящее время не вызывает сомнения, что специфические транспортные системы - ионные каналы определяют и принимают участие во многих биологических процессах. В исследовании ионных каналов в природных мембранах наибольшие успехи достигнуты с помощью метода локального отведения тока (patch-clamp), который показал реальность существования таких структур и выявил ранее неизвестные стороны их функционирования. К настоящему времени можно сформулировать наиболее общие свойства, присущие ионофорам и каналоформерам [21, 39, 40, 47, 83, 89, 90, 98, 99, 101, 103, 106, 202, 204, 226, 227, 257, 258, 382], которые имеют гидрофобную внешнюю часть и гидрофильную внутреннюю. Подразумевается, что эти молекулы являются прямыми участниками переноса ионов через мембрану, а липиды исполняют роль инертной матрицы. Показано, что такая точка зрения имеет несколько односторонний характер [114, 190, 203, 335, 369, 370, 376, 387, 388]. Это позволяет по-новому оценить роль и состав участников ионопроводящих структур мембран, отнеся к ним липиды, кислород, продукты окисления мембранных липидов и др.

В связи с важностью вышеперечисленных проблем целью настоящей монографии явилось изучение мембраноактивных свойств и биологических эффектов краун-эфиров.

В данной монографии приведены результаты исследований мембраноактивных свойств краун-эфиров, проведенных в лаборато-

рии биофизики мембран кафедры биофизики биологического факультета НУУз им. М.Улугбека.

Первые две главы посвящены изучению комплексонных и ионофорных свойств краун-эфиров, в третьей главе рассматриваются каналоформерные особенности этих соединений, приводятся два типа ионных каналов, обсуждаются возможные принципы их формирования и функционирования. Четвертая глава посвящена изучению взаимодействия краун-эфиров и их аналогов, различающихся механизмами мембранного действия, с мультиламеллярными слоями. В последней главе обсуждаются результаты действия краун-эфиров на биомембраны и их биологические эффекты.

Присуждение Нобелевской премии в 1987г. основоположникам и первооткрывателям химии макроциклов Ч.Педерсену, Д.Краму и Ж.Лену стимулировало интенсивные исследования в этой области.

Руководителем настоящего проекта по изучению краун-эфиров является академик АН РУз Б.А.Ташмухамедов. В 1987г. нами была издана монография “Синтез, мембраноактивные свойства и биологические эффекты краун-эфиров”[395].

Синтез изученных в этой монографии краун-эфиров был начат в 1970 г. д.х.н., профессором Ташмухамедовой А.К. и отличался направленным характером по поиску мембраноактивных соединений, связанных с особенностями их ионофорной и каналоформерной активности, действия на биологические мембраны. На кафедре биофизики НУУз им. М.Улугбека ведется активное изучение мембраноактивных свойств и биологического действия краун-эфиров с перспективой применения их в медицине, сельском хозяйстве, создании новых материалов и технологий.

Основной экспериментальный материал монографии был получен при непосредственном участии сотрудников лаборатории биофизики мембран кафедры биофизики биологического факультета НУУз им. М.Улугбека: к.б.н. Ярышкина О.В., к.б.н. Тариновой М.В. и к.б.н. Шарафутдиновой У.Т. Выражаю благодарность д.б.н., проф. Усманову П.Б., д.б.н., проф. Туйчибаеву М.У., д.б.н. Каликулову Д., д.б.н. Салахутдинову Б.А., д.б.н. Мадьярову Ш., к.б.н. Садыковой К.А., к.б.н. Тонких А., Болдыреву В.А., Абдуллаеву Х.Ф. за совместную работу и ценные замечания при изучении биологических эффектов краун-эфиров, сотрудникам лаборатории химии макроциклических соединений химического факультета НУУз им. М.Улугбека к.х.н. Стемпневской И.А. и к.х.н. Сайфуллиной Н.Ж. Также выражаю благодарность сотрудникам кафедры биофизики Атамуратовой Н.Р.,

Тойирову У.Б., сотрудникам кафедры физиологии и нейробиологии Мирзакулову С.О. и Ниязметову Б.А. за оказанную техническую помощь при подготовке монографии к печати.

Основные условные обозначения

ДПФХ-дипальмитоилфосфатидилхолин
ДМФХ-димиристоилфосфатидилхолин
ВАХ-вольт-амперная характеристика
ЭДТА-этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭГТА-этиленгликоль тетраацетат
МПА-макроциклические полиамины
МПП-мембранный потенциал покоя
МПКП-миниатюрные потенциалы концевых пластинок
ПТГ-паратироидный гормон
БМАК-бромметиладамантилкетон
БЛМ-бислойная липидная мембрана
ФАТ-фактор агрегации тромбоцитов
АКЭ-асцитная карцинома Эрлиха
СА-структура-активность
ПОЛ-перекисное окисление липидов
ИУК-индолилуксусная кислота
МОС-модель описания структуры
АНС⁻ -1-анилинонафталин-8-сульфоната
z-заряд иона
F-постоянная Фарадея
D-коэффициент диффузии иона в мембране
Ψ-мембранный потенциал
δ-толщина мембраны
ξ-ширина потенциальной ямы
 λ_o^{M+L} -предельная подвижность комплексного катиона
r_s, -радиус по "Стоксу" комплексного катиона

Глава I

КОМПЛЕКСОНЫ

Классификация и номенклатура краун-эфиров

Чарльз Педерсен [216-221] впервые описал синтетические макроциклические полиэфиры, обладающие комплексообразующими и ионофорными свойствами, которым он дал названия: 18-корона-6 (18К6) и дибензо-18-корона-6 (ДБ18К6). Такие названия связаны с подобием молекулярных структур этих соединений коронам (crown) и со стремлением автора подчеркнуть способность их “короновать” катионы, подобно реальной короне, венчающей монарха [296,297, 301]. С увеличением количества синтезированных макроциклических полиэфиров термином “краун-эфиры” стали обозначать моноциклические полиэфиры с общей формулой $-(\text{CH}=\text{CH}-\text{O})_n$ с количеством кислородных атомов от 3 до 20 ($n=3-20$), которые связаны между собой этановыми мостиками, конденсированными, как правило, с ароматическим или насыщенным кольцом. Замена одного или нескольких атомов кислорода в молекуле полиэфира на атомы азота или серы приводит, соответственно, к аза-краун-эфирам и тиа-краун-эфирам. Для обозначения циклических полиэфиров, содержащих атомы фосфора, кремния, мышьяка и других элементов, предпочтителен термин краун-соединения [301]. К краун-соединениям также следует относить макроциклические полиэфиры с карбонильными, амидными, сложноэфирными или другими донорными функциональными группами. Помимо моноциклических полиэфиров, описаны краун-эфиры с несколькими сочлененными кольцами, которые получили названия бис-, трис- (и т.д.) краун-эфиров.

В соответствии с номенклатурой IUPAC синтетические макроциклические комплексоны имеют громоздкие неиллюстративные названия [293, 303]. Педерсеном предложена тривиальная номенклатура этих соединений, в основе которой лежит обозначение “краун-эфир”, которая стала общепринятой и служит для нестрогого описания циклических полиэфиров различного строения. Поскольку номенклатура, использованная Педерсеном, даже в простых случаях не определяет однозначно положение донорных атомов, бензольных колец, циклогексановых фрагментов или других компонентов цикла, Вебером и Фегтле была предложена более систематическая номенклатура, описывающая все типы циклических и ациклических лигандов, а также их комплексы [273, 398, 399].

В этой номенклатуре сохраняются, в основном, те же символы, что и у Педерсена, но с дополнениями. Для того чтобы различать свободные краун-эфирные лиганды и их комплексы с ионами металлов и др., были предложены названия “коронанд” для свободного соединения и “коронат” для комплекса. Для открытоцепных аналогов краун-эфиров предложены названия “поданд” для свободного соединения и “подат” для комплекса. Помимо циклических (монокоронандов, дикоронандов, трикоронандов) краун-эфиров описаны и трехмерные олигоциклические сферические соединения, состоящие из нескольких циклов, которые предложено называть “криптан” для свободного соединения и “криптит” для комплекса. В монографии были исследованы простые представители краун-эфиров, поэтому мы будем придерживаться номенклатуры Педерсена.

В работе использовали краун-эфиры и их аналоги, синтезированные Ташмухамедовой А.К., (НУУЗ им. М.Улугбека, Ташкент), Поповой В.П. (ИХ УНЦ АН России, Свердловск), Лукьяненко Н.Г. (Физико-химический институт им. А.В.Богатского АН Украины, Одесса).

В таблице 1 приведены названия, молекулярные веса и формулы радикалов исследованных краун-эфиров.

Синтезированные краун-эфиры охарактеризованы элементным анализом ИК-, ПМР- и масс-спектрами. Некоторые соединения охарактеризованы ЯМР ^{13}C -спектрами [396].

Структурные особенности краун-эфиров, определяющие их комплексообразующие свойства

Краун-эфиры, или иначе коронанды, криптанды и поданды, состоят из ряда липофильных (метиленовые группы, алкильные цепи) и гидрофильных (эфирные атомы кислорода, атомы азота) функциональных групп. В гидрофильной среде краун-эфир можно сравнить с каплей жира в воде, а в липофильной - с каплей воды в масле. В первом случае образуется эндолипофильная полость, во втором - эндогидрофильная [271-273]. Если размеры полости будут соответствовать размерам какого-либо гидрофильного иона (одноатомного или молекулярного), липофильной молекулы или ее участка, то возможно образование комплексов типа “гость-хозяин” между краун-эфиром и этим ионом или молекулой.

Таблица 1

Названия, молекулярные веса и формулы радикалов исследованных краун-эфиров (*1)

№	Формула радикала R	Сокращенное название краун-эфира	Молекулярная масса
I	II	III	IV
1	H	Б15К5	268
2	C ₂ H ₅	4'-этил-Б15К5	296
3	H	ДБ24К8	448
4	C ₂ H ₅	4', 4''(5'')-диэтил-ДБ24К8	504
5	H	ДБ30К10	536
6	C ₂ H ₅	4', 4''(5'')-диэтил-ДБ30К10	592
7	H	ДБ18К6	360
8т ²	C ₂ H ₅	4', 4''-диэтил-ДБ18К6	416
9	C ₃ H ₇	4', 4''-дипропил-ДБ18К6	444
10т	C ₄ H ₉	4', 4''-дибутил-ДБ18К6	472
11т	C ₅ H ₁₁	4', 4''-диамил-ДБ18К6	500
12	C ₆ H ₁₃	4', 4''-дигексил-ДБ18К6	528
13т	C ₇ H ₁₅	4', 4''-дигептил-ДБ18К6	556
14т	C ₈ H ₁₇	4', 4''-диактил-ДБ18К6	584
15ц	C(OH)CH ₃	4', 5''-ди- α -оксиэтил-ДБ18К6	448
16	C(OH)C ₂ H ₅	4', 4''(5'')-ди-α -оксипропил-ДБ18К6	476
17	C(OH)C ₃ H ₇	4', 4''(5'')-ди- α -оксибутил-ДБ18К6	504
18	C(OH)C ₄ H ₉	4', 4''(5'')-ди- α -оксиамил-ДБ18К6	532
19	C(OH)C ₅ H ₁₁	4', 5''-ди- α -оксигексил-ДБ18К6	560
20	C(OH)C ₆ H ₁₃	4', 5''-ди- α -оксигептил-ДБ18К6	588
21т	COCH ₃	4', 4''-диацетил-ДБ18К6	444
22	COC ₂ H ₅	4', 4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6	472
23	COC ₃ H ₇	4', 4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6	500
24	COC ₄ H ₉	4', 4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6	528
25	COC ₅ H ₁₁	4', 4''(5'')-дигексаноил-ДБ18К6	556
26т	COC ₆ H ₁₃	4', 4''-дигептаноил-ДБ18К6	584
27ц	COC ₇ H ₁₅	4', 5''-диоктаноил-ДБ18К6	612
28	COC ₈ H ₁₇	4', 4''(5'')-динонаноил-ДБ18К6	640
29	COC ₉ H ₁₉	4', 4''(5'')-дидеканоил-ДБ18К6	668
30	CH(CH ₃)CH ₃	4', 4''(5'')-диизопропил-ДБ18К6	444
31	CH(CH ₃)CH ₃	3', 4''(5'')-диизопропил-ДБ18К6	444
32	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	4'-вторбутил-ДБ18К6	416
33т	"--"	(80-83)°С 4', 4''-дивторбутил-ДБ18К6	472
34ц	"--"	(90-93)°С 4', 5''-дивторбутил-ДБ18К6	472

I	II	III	IV
35	"--"	(82-87)°С 4', 4"(5")-дивторбутил-ДБ18К6	472
36	"--"	(85-90)°С 4', 4"(5")-дивторбутил-ДБ18К6	472
37	"--"	(87-92)° С 4', 4"(5")-дивторбутил-ДБ18К6	472
38	"--"	4', 5', 4", 5"-тетравторбутил-ДБ18К6	584
39	$C(CH_3)_3$	4'-третбутил-ДБ18К6	416
40	"--"	4', 4"(5")-дитретбутил-ДБ18К6	472
41т	"--"	4', 4"-дитретбутил-ДБ18К6	472
42ц	"--"	4', 5"-дитретбутил-ДБ18К6	472
43	$n-C_4H_9$	4', 4"(5")-ди-н-бутил-ДБ18К6	472
44	"--"	4', 5"-ди-н-бутил-ДБ18К6	472
45	$CH(CH_3)C_3H_7$	4'-вторамил-ДБ18К6	430
46	"--"	3', 4"(5")-дивтораamil-ДБ18К6	500
47	"--"	4', 4"(5")-дивтораamil-ДБ18К6	500
48	$C(CH_3)C_3H_7$	4'-третамил-ДБ18К6	430
49	"--"	4', 4"(5")-дитретамил-ДБ18К6	500
50	$CH_2-NH-(CH_2)_2-OH$	4', 4"(5")-диметиламиноэтанол-ДБ18К6	506
51	CH_3	бис-о-метоксифеноксидиэтиловый эфир	318
52	NH	4', 5"-диамино-ДБ18К6	390
53	$NH-CO-CH_3$	4', 5"-бис(ацетамид)-ДБ18К6	474
54	$N-CH-O-NO$	4', 5"-бис(нитрофурфуриденамин)-ДБ18К6	646
55	$N=CH_2-CH_2=CH_3$	4', 5"-бис(цианамидиленамин)-ДБ18К6	622
56	$R=C(CH_3)R_1=SO_3H$	4' -третбутил-4"(5")-ДБ18К6-сульфо кислота	496
57	$R=COCH_3R_1=SO_3H$	4'-ацетил-4"(5")-ДБ18К6-сульфо кислота	482
58	$R=HR_1=SO_3H$	4'-ДБ18К6-сульфо кислота	440
59	$R=SO_3HR_1=SO_3H$	4', 4"(5")-ДБ18К6-дисульфо кислота	520

*1 Используется номенклатура, предложенная Педерсоном (Pedersen, 1967).

*2 Номер соединения означает смесь изомеров, буквенные индексы -ц и -т, соответственно, “цис” и “транс” изомеры.

Электроотрицательная гидрофильная полость большинства краун-эфиров наилучшим образом подходит по размеру для катионов щелочных и щелочноземельных металлов, а также некоторых молекулярных катионов (например, аммония), и наоборот, образующаяся липофильная полость слишком мала, чтобы принять липофильную молекулу гостя [273].

Сравнение размеров гидрофильных полостей различных краун-эфиров и диаметров несольватированных ионов некоторых щелочных и щелочноземельных металлов показывает, что 12-краун-4 и Li^+ , 15-краун-5 и Na^+ , 18-краун-6 и K^+ , 21-краун-7 и Cs^+ проявляют хорошее соответствие.

С помощью рентгеноструктурного анализа установлены структуры кристаллических комплексов краун-эфиров с некоторыми катионами. Для тонкой структуры классических комплексов краун-эфиров типично симметричное копланарное расположение атомов кислорода. Эти атомы находятся в контакте с катионом, расположенным в центре полости, как показано на примере комплекса K^+ с 18-краун-6. Образование комплекса с катионами, которые в меньшей степени удовлетворяют пространственным требованиям, сопровождается деформацией скелета лиганда или размещением катиона вне полости макроцикла. В случае резкого несоответствия, например, когда диаметр катиона значительно больше диаметра полости или наоборот, образуются, соответственно, сэндвичевые комплексы со стехиометрией 2:1, двухядерные комплексы со стехиометрией 1:2 или кольцеобразные структуры со стехиометрией 1:1 [277-279].

Следует отметить, что изучение кристаллической структуры комплекса дает ограниченные сведения о возможности образования и устойчивости комплексов краун-эфиров, а также о реальной конформации лигандов комплекса в растворе.

Устойчивость комплексов краун-эфиров с ионами в растворе зависит от вида растворителя и характеризуется понятием “динамическая устойчивость” [173, 273]. Изучение кинетики процессов образования и распада комплексов в системе: лиганд-катион-растворитель позволяет установить время жизни комплексов.

Так, было установлено, что в краун-эфирах с открытоцепной структурой (подандах) - реакция обмена катионов происходит очень быстро, поэтому их можно использовать в качестве переносчиков катионов [269]. Наоборот, самыми стабильными комплексами являются комплексы сферических краун-эфиров с металлами. Они быстро связывают катион металла и очень медленно его отдают [167-

172, 242]. Обычно криптанды являются эффективными рецепторами катионов. Коронанды в зависимости от своей структуры могут быть как рецепторами, так и переносчиками катионов.

Помимо катионов металлов, краун-эфиры могут образовывать комплексы с молекулярными катионами, например аммонием [273, 352], а также формировать комплексы типа “гость-хозяин” с нейтральными молекулами, содержащими NH-связь, например тиомочевинной, бензолсульфамидом, аминокислотами и т.д. [398, 399]. Описаны криптандные системы, селективные к галогенид, азид- и другим анионам [273].

Все известные биологические эффекты краун-эфиров, так или иначе, связаны с их свойствами образовывать комплексы с ионами или молекулами, имеющими полярные группы, а также индуцировать трансмембранный перенос ионов или воздействовать на него опосредованно.

Природные ионофоры, индуцирующие более или менее избирательную мембранную проницаемость для ионов, были существенно дополнены краун-эфирами и их аналогами со сходными свойствами [89, 90, 100-103, 119, 169-171, 183, 191, 227-228, 249-253, 273, 277, 297, 330, 395, 416].

Ранее было установлено, что краун-эфиры отличаются от своих природных прототипов исключительно высокой устойчивостью к термическим и химическим воздействиям [398, 401]. У соединений этого типа путем выбора “химического скелета” можно в широких пределах изменять как катионную избирательность, так и липофильность комплексов. В молекулы циклополиэфиров, особенно тех, которые содержат ароматические остатки, легко могут быть введены практически любые функциональные группы [22, 28, 45, 47-49, 179, 180, 290, 320].

Показано, что многие из соединений этого типа обладают необычными ион-связывающими характеристиками с рядом катионов [223-225, 266, 320].

Наряду с явной способностью связывать широкий ряд катионов, эти соединения во многих случаях испытывают заметные конформационные изменения в процессе связывания, при этом гидрофобная поверхность циклополиэфиров способствует растворению ионных соединений в неводных растворителях и гидрофобной фазе мембраны. Исключительно интересным, как уже отмечалось выше, является сильное сродство, показанное краун-эфирами к ионам щелочных и щелочноземельных металлов. Очевидно, что селектив-

ное связывание определенных катионов обеспечивало перспективу для использования краун-эфиров в качестве индукторов ионного транспорта в мембранах.

Характерная особенность строения нейтральных ионофоров (валиномицина, макротетролидов, эниатинов, антаманидов и краун-эфиров) в отличие от карбоксилатных ионофоров (нигерицина, моненсина, дианмицина, X-537A, A23187 и т.д.), имеющих карбоксильную группу, диссоциирующую при $\text{pH}=7$, - наличие лигандных кислородных групп, ориентированных внутрь “полости” молекулы [226-229, 297, 381, 382]. При формировании комплекса с ионом металла участвуют 6 кислородных групп ионофора в случае валиномицина и эниатинов, 8 - в случае макротетролидов и 10 - в случае краун-эфиров типа 30K10. Другая характерная особенность этих молекул - наличие липофильной наружной поверхности у комплекса ионофор-катион, что является необходимым условием сольбилизации ионного комплекса в гидрофобной среде.

По-видимому, именно структурно-функциональные исследования позволяют понять молекулярные основы функционирования и механизмы мембранной активности краун-эфиров. Комплексообразующая способность краун-эфиров исследовалась различными методами: ядерно-магнитного резонанса, спектральными [74, 116, 271-273], потенциометрическими, pH -метрии [128, 130, 135, 138, 147, 180, 181, 214], кондуктометрии [241, 260, 349, 355, 379, 409, 410], калориметрии [52, 129, 134, 161], по электропроводности и измерениям потенциалов бислойных мембран [181, 182, 376] и т.д. Применение спектральных методов для изучения комплексообразования позволило определить конформационное состояние краун-эфиров, так как эти методы основаны, прежде всего, на существовании различий в конформации и стереоэлектронных характеристиках свободных и связанных с катионом молекул. Поэтому спектральные методы позволяют, наряду с данными о составе и устойчивости комплексов, получать сведения об их структуре, а также о природе металл-лигандных взаимодействий.

Краун соединение дибензо-18-краун-6 (ДБ18К6), было получено в качестве неожиданного побочного продукта при синтезе бис-(2)-о-оксифенокси (этилового) эфира из бис-(2-хлорэтилового) эфира и натриевой соли 2-(о-оксифенокси) тетрогидропирана, который содержал небольшое количество пирокатехина [216-218]. Это соединение было выделено из продуктов реакции в очень незначительном количестве в виде белых волокнистых кристаллов, которые были

совершенно нерастворимы в метаноле, но легко растворялись в нем при добавлении натриевых солей. Указанное явление и привело к открытию комплексообразующей способности и синтезу других краун - эфиров.

Макроциклические полиэферы с боковыми ароматическими кольцами - бесцветные кристаллические соединения. Температура плавления этих соединений повышается с увеличением числа бензольных колец. Данные макроциклические полиэферы, особенно соединения, содержащие более одного бензольного кольца, почти нерастворимы в воде и плохо растворимы в спиртах и многих других обычных растворителях при комнатной температуре. Однако они легко растворимы в хлористом метиле и хлороформе.

Насыщенные макроциклические полиэферы - бесцветные, вязкие жидкости или твердые вещества с низкой температурой плавления. По сравнению со своими ароматическими предшественниками эти соединения лучше растворяются во всех растворителях, а большинство из них проявляют заметную растворимость в воде [90, 101, 383, 398].

Одним из наиболее наглядных явлений, указывающих на комплексообразующую способность макроциклических полиэфиров, является повышение растворимости ионных соединений в органических растворителях. Во многих случаях добавление краун-эфира вызывает растворение солей в растворителях, в которых они практически нерастворимы [90, 105, 381]. Хотя образование комплексного катиона является очевидной предпосылкой для повышения растворимости, существенную роль может играть, и природа аниона [16, 17, 224, 225, 345, 400, 401]. Было также показано, что увеличение размера аниона приводит к возрастанию растворимости ионных соединений и что в некоторых случаях значительную роль оказывает также специфическая сольватация аниона и конкуренция за катион между растворителем и краун-эфиром.

Показано, что стабильность комплексов 18К6 с катионами щелочных металлов увеличивается при переходе от Li^+ к Na^+ и K^+ и далее снижается для Rb^+ и Cs^+ , это можно объяснить конкуренцией между гидратацией и комплексообразованием [383, 399, 403-405, 416]. Катион должен быть, по крайней мере, частично десольватирован для того, чтобы он мог войти в полость полиэфирного кольца. Малые катионы имеют высокую плотность заряда, и их склонность к гидратации чрезвычайно велика, чтобы полиэфир мог успешно десольватировать катион. Большие катионы имеют сравни-

тельно низкую плотность заряда и слабо взаимодействуют с краун-эфиром и водой.

Ионы Rb^+ и Cs^+ слишком велики, чтобы они могли войти в полость кольца 18К6 и занять положение в плоскости эфирных атомов кислорода, которому соответствует максимальная плотность заряда. В связи с этим способность указанных катионов к образованию комплексов уменьшается.

Установлено, что метанол является наиболее удачным растворителем для изучения комплексообразования и позволяет провести детальное изучение влияния размера кольца макроцикла и заместителей на комплексообразующую способность [74, 400]. Константы устойчивости в метаноле на 3, 4 порядка выше, чем в воде, очевидно, вследствие того, что метанол является намного более слабой сольватирующей средой и потому в меньшей степени конкурирует с краун-эфиром за катион.

Для растворителей, менее полярных, чем метанол, конкурентная сольватация катиона этими растворителями должна становиться меньше. Следует ожидать, что константы устойчивости комплексов будут выше, особенно для малых катионов. В этом случае более заметным станет влияние аниона на более или менее интенсивное образование ионных пар [224-225]. Буш и сотрудники [29], используя метод дифракции рентгеновских лучей, установили структуру нескольких кристаллических комплексов: $\text{NaBr} \cdot (\text{H}_2\text{O})_2 \cdot \text{ДБ18К6}$, $\text{NaI} \cdot (\text{H}_2\text{O}) \cdot \text{Б15К5}$, $(\text{RbSCN})_2 \cdot \text{ДБ30К10}$ [35]. Было определено, что в натриевых комплексах катион находится в центре почти плоского кольца, образованного эфирными атомами кислорода. Вода и бромид-ион координированы с натрием в направлении перпендикулярном полиэфирному кольцу, но йодид-ион непосредственно с ионом натрия не взаимодействует [29].

Для комплекса $\text{RbSCN} \cdot \text{ДБ18К6}$ 3:2, “сэндвич” не постулируется, так как элементарная ячейка содержит 4 молекулы $\text{RbSCN} \cdot \text{ДБ18К6}$ состава 1:1 две кристаллизационных молекулы полиэфира. Ион Rb^+ находится в центре приблизительно на 1 \AA ниже плоскости эфирных атомов кислорода, а SCN^- группа расположена примерно перпендикулярно эфирному кольцу (рис.1). Комплексы краун-эфиров с очень большим размером колец представляют особый интерес, так как будучи более гибкими и имея достаточное количество атомов кислорода, они могут полностью окружать катионы, как это наблюдается у ионофорных антибиотиков и их комплексов. Рентгено-структурный анализ одного из таких

комплексов - КJ-ДБ30К10 показал, что этот комплекс действительно обладает структурой, где катион полностью “окутан” молекулой циклополиэфира за счет координации его с десятью атомами кислорода (рис.1) [383,405].

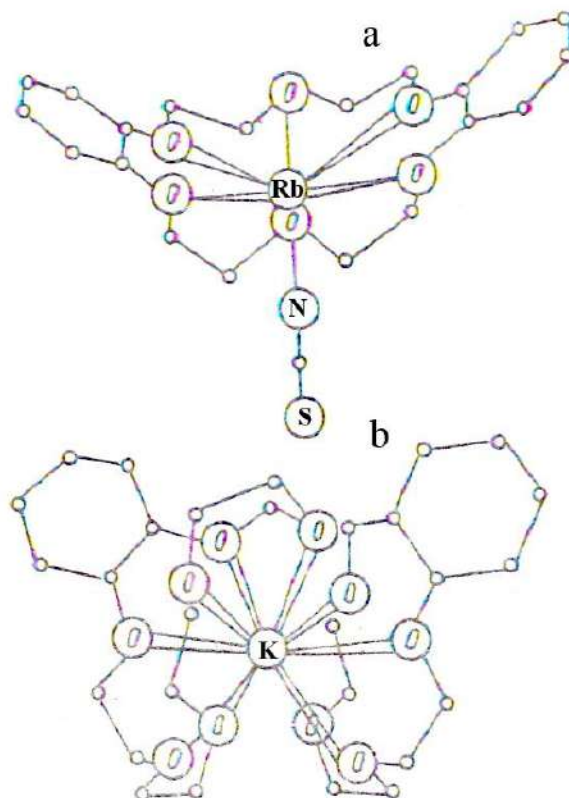


Рис.1. Структуры комплексов: а) тиоцианат рубидия-ДБ18К6, б) йодистый калий-ДБ30К6

В ряде работ показано, что макроциклические полиэфиры образуют преимущественно комплексы краун-эфир: катион с соотношением 1:1 для большого количества ионов металлов [24, 35, 47, 48, 399, 401, 405]. Однако была также найдена способность краун-эфиров образовывать комплексы краун-эфир: катион с соотношением 2:1 и 3:1 в зависимости от диаметра полости макроцикла и размера катиона [266, 268]. Предполагают, что комплексы с соотношением 1:1 обычно состоят из иона, связанного в полости полиэфирного кольца. Эта картина “ион в отверстии” была доказана рентгеноструктурным анализом некоторых комплексов краун-эфиров с катионами [398, 404].

Образование комплекса краун-эфир: катион с соотношением 1:1 не всегда означает, что ион локализован в полости макроцикла. Ион может иметь направленную валентность, которая мешает связыванию со всеми атомами кислорода или же он может быть несколько меньше того диаметра, который “точно” подходит к отверстию.

Имеются структурные доказательства того, что во многих случаях относительные размеры полости макроцикла и иона определяют стехиометрию получающихся комплексов [131, 132-136].

“Сэндвич”- структура, в которой ион расположен между двумя молекулами краун-эфира, была предложена как наиболее вероятная для комплекса с соотношением катион: краун-эфир равный 1:2.

Структура “сложного сэндвича” была постулирована для комплекса 2:3, где три молекулы краун-эфира ориентируются “плашмя” по одной оси, при этом каждая отделена от следующей ионом.

Вместе с тем возможен вариант, когда диаметр катиона слишком мал по сравнению с диаметром макроцикла, и тогда в отверстие кольца может входить более одного катиона. С помощью рентгеноструктурного анализа Фентон и сотр. [68] получили и исследовали комплекс состава катион: краун-эфир равный 2:1. В этом комплексе два иона калия размещаются в полости одной молекулы ДБ24К8.

Несмотря на то, что относительный размер полости макроцикла и иона имеет большое значение для определения стехиометрии комплекса, было найдено также, что эти параметры не являются единственными, влияющими на конфигурацию комплекса [35, 273]. Действительно, хотя диаметр иона серебра больше, чем диаметр полости Б15К5, было установлено, что серебро образует комплекс состава 1:1 с данным краун-эфиром [130, 131, 133]. В то же время ион калия образует с ДБ30К10 комплекс состава 1:1, в котором лиганд “окутывает” ион за счет координации его с десятью атомами кислорода.

В работе [267] подчеркивается, что комплексообразующие свойства краун-эфиров достаточно понятны, исходя из концепции соответствия размеров ион - полость. Наиболее наглядно эта концепция иллюстрируется на примере зависимости константы устойчивости комплексообразования от отношения радиуса катиона к радиусу полости макроцикла [35, 37]. Поэтому общую тенденцию можно сформулировать следующим образом: чем ближе отношение радиуса катиона к радиусу полости макроцикла к 1, тем более устойчив комплекс. Но здесь возникает ряд затруднений, связанных с тем, что далеко не всегда для катионов с близким радиусом наблюдаются близкие или пропорциональные заряду константы устойчивости (например, несоответствие в случае ионов натрия и кальция) [121].

Несоответствия этого типа были объяснены некорректностью использованных ионных радиусов и размеров полости, определенных из моделей с использованием Ван-Дер-Ваальсовых размеров атомов [401]. Так как ионный радиус зависит от ионного окружения,

и в случае радиусов по Полингу он определен, исходя из модели кристаллической решетки типа “NaCl”, то было предложено использовать координационный радиус, рассчитанный из предположения, что заряд на атоме кислорода макроцикла равен 0,15 заряда электрона. Кроме того, поскольку Ван-Дер-Ваальсовый размер атома также зависит от степени окружения, то и размер полости также будет отличаться, при этом он будет большим, чем рассчитано, исходя из моделей Полинга. На основании этих данных показано сходное поведение пар литий-кальций, калий-барий.

Конформационные изменения, происходящие при комплексообразовании краун-эфиров, исследовались во многих работах. Наиболее точным является определение конформации краун-эфира на основании рентгеноструктурного анализа. Такого рода сведения рассматриваются в работах [117, 118, 121, 186]. Главная трудность в интерпретации таких данных в том, что при переходе из кристалла в раствор конформация меняется и довольно значительно.

При интерпретации селективности комплексообразования краун-эфиров широко используются так называемые ряды селективности. В работах разных авторов эти ряды заметно варьируют. В работе [225] отмечается, что растворитель оказывает сильное, а иногда и кардинальное влияние на эти ряды в результате конкуренции за катион растворителя, краун-эфира и аниона, при этом важным фактором является донорность растворителя.

Так как по заряду и размеру ион аммония сходен с ионом калия, то не удивительно, что аммоний образует комплексы с макроциклическими полиэфирами. С другой стороны, аммиак и неионизированная гидроокись аммония не образуют комплексов, поскольку они не несут заряда. Было установлено, что соединения, содержащие группу RNH_3 , образуют комплексы, тогда как соединения, содержащие группы R_2NH_2^+ , R_3NH^+ и R_4N , их не образуют [37, 352, 381, 383, 395].

На основе молекулярных моделей (Кори, Полинга и Колтуна) была определена структура комплекса аммонийной соли с 18К6. Примеры использования моделей для представления взаимоотношений комплексона с ионом иллюстрируются возможностью конструирования различных комплексонов, что показано Крамом [330].

Авторами был осуществлен направленный синтез ряда мультигетеромакроциклов и модельных соединений с открытой цепью с

целью определения структурных особенностей молекул комплексонов, необходимых для эффективного связывания с солями первичных алкиламинов.

Для краун-эфиров установлено, что устойчивые комплексы этих соединений с катионами растворимы в малополярных средах, в которых сами полиэфиры нерастворимы. Выраженной способностью к комплексообразованию с катионами обладают циклические полиэфиры, содержащие от 5 до 10 атомов кислорода в макроцикле. Комплексообразование, как уже отмечалось, зависит от относительных размеров катиона и “полости” макроцикла; с увеличением числа звеньев в полиэфирных кольцах для каждого из катионов константы стабильности комплексов проходят через максимум. Включение различных заместителей в полиэфирные кольца значительно меньше сказываются на константах устойчивости комплексов, чем размер самого полиэфирного кольца.

Краун-эфиры образуют комплексы не только с катионами щелочных металлов и с ионами аммония, но также с катионами щелочноземельных металлов и ионами Hg^+ , Ag^+ , Tl^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , La^{3+} [381]. На структуру находящегося в неполярной или малополярной фазе комплекса существенно влияет вид сопутствующего аниона. Комплексы краун-эфиров с малыми по размерам кристаллических радиусов катионами (например, с ионами натрия) включают молекулы воды, указывающее на то, что образуемые полиэфиром сольватные оболочки вокруг катионов могут завершаться за счет включения молекул воды [273, 383, 405].

Одной из отличительных черт этого класса соединений является то, что константы устойчивости комплексов, находящихся в водных растворах, на несколько порядков выше установленных для природных ионофорных антибиотиков. Например, константа стабильности 18К6 с ионами калия равна 100 M^{-1} [178], тогда как константа стабильности для валиномицина и монактина меньше или равна $0,1 \text{ M}^{-1}$ [381]. Особенностью краун-эфиров является также их способность образовывать комплексы катион: краун-эфир состава равного 1:2, 2:1, 2:3, 2:2 и даже 3:1. По-видимому, для таких сложных ассоциатов катион находится не в центре образуемого полиэфиром кольца, а за пределами его “полости”, в частности, как уже отмечалось выше, возможны “сэндвичеподобные” комплексы.

Таким образом, открыта и изучена способность краун-эфиров формировать комплексы с одно-, двух- и трех- валентными ионами металлов, включая серебро, золото, свинец, никель, кадмий и т.д. [381, 398, 401]. Кроме того, установлено, что краун - эфиры эффективно взаимодействуют еще и с ионами водорода [241].

Тиомочевина и родственные соединения, такие как тиобензамид, а также некоторые их производные образуют с краун-эфирами комплексы, имеющие четкие температуры плавления. По-видимому, их не следует считать комплексами включения вследствие того, что соотношение тиосоединение: краун-эфир мало и составляет от 1:1 до 6:1 [381, 383]. В целом краун-эфиры заметно превосходят ионофорные антибиотики по устойчивости комплексов с ионами щелочных металлов в метаноле и воде. Среди них имеются соединения, комплексирующие предпочтительно как ионы калия, так и ионы натрия.

Как уже отмечалось, наблюдается значительная зависимость селективности комплексообразования от природы аниона, растворителя и структурных особенностей краун-эфиров. Электростатические и термодинамические параметры комплексообразования вследствие взаимодействия катиона с краун-эфиром, растворителем и анионом, а также краун-эфира с растворителем претерпевают такие изменения, что трактовка полученных результатов усложняется. Например, для ДБ27К9 ряд избирательности комплексообразования в среде метанол - вода (7:3) имеет вид: $K^+ > Na^+ > Cs^+$, в то время как в соответствии с концепцией “ион-полость”, последовательность для ДБ24К8 в той же среде должна быть следующей: $Cs^+ > K^+ > Na^+$ [138].

Кристаллографические исследования дали возможность не только определить молекулярную структуру комплекса $Mg(SCN)_2$, NaI и пикрата лития с Б15К5, но и позволили установить, что конформация приведенных комплексов схожа [205, 206]. На основе этого было сделано предположение, что конформация краун-эфира не зависит от электронной плотности вокруг металлического иона, как сообщалось ранее [176, 177].

Для объяснения комплексообразующих свойств краун-эфиров и выяснения механизма их функционирования в роли мембраноактивных соединений, необходимо установить природу металл-лигандного взаимодействия и доминирующую конформацию самого краун-эфира и его комплексов. Проблема пространственного строения полиэфирных циклов в первом приближении сводится к определению характера поворотной изометрии вдоль связей С-С и С-О основной цепи [381, 405]. Возможности спектральных методов при изуче-

нии пространственного строения краун-эфиров и некоторых ионофорных антибиотиков более ограничены, поэтому большинство имеющихся в этой области данных получено с помощью рентгеноструктурного анализа.

В комплексе (Б15К5) NaJ атомы кислорода почти копланарны и образуют с катионом пентагональную пирамиду, в которой катион смещен от плоскости атомов кислорода на $0,75\text{\AA}$. В кристаллической ячейке комплексной соли присутствует также молекула воды, взаимодействующая со связанным катионом и анионом. В комплексе (Б15К5) $_2\text{K}^+$ десять лигандных атомов кислорода образуют несколько искаженную пентагональную антипризму [224, 225]. Расположенный в ее центре катион не взаимодействует с анионом J, статически распределенным в пустотах кристаллической ячейки.

24-членные циклополиэфиры, кроме эквимольных комплексов, способны образовывать двудерные комплексы, характеризующиеся присутствием двух катионов в полости макроцикла. В кристаллическом комплексе (ДБ24К8) (KNCS) $_2$ эфирные атомы кислорода и ионы калия приблизительно копланарны; каждый катион координирует по пять атомов кислорода, по два атома азота и, по-видимому, еще ароматические кольца соседних молекул. При этом два атома кислорода из восьми и оба атома азота одновременно взаимодействуют с двумя ионами калия [175].

Увеличение размеров полиэфирного цикла и числа кислородных лигандов приводит к существенному изменению строения комплекса, поскольку в этом случае катион оказывается эффективно экранированным от взаимодействия с анионом и растворителем. При этом общая форма макроциклического остова комплекса (ДБ30К10) K^+J , весьма близко напоминает конформацию “бороздки теннисного мяча” нонактиновых комплексов [395].

Краун-эфир ДБ30К10 имеет достаточно свободную структуру, и найденные для него в кристалле конформационные параметры, по-видимому, в значительной мере определяются особенностями кристаллической упаковки [381, 398].

С другой стороны, 1, 7, 10, 16-тетраокса-4, 13-диазациклооктадека-18К6 практически не меняет своей конформации при образова-

нии калиевого комплекса [122]. Следует отметить, что столь близкое совпадение конформационных параметров свободного макроцикла и его комплекса пока не имеет аналогий среди макроциклических ионофорных антибиотиков.

Особое значение имеет тот факт, что если в кристаллических комплексах ионофорных антибиотиков катионы эффективно экранированы от взаимодействия с анионами, то, например, у комплекса (ДБ18К6) RbNCS анион пространственно сближен с Rb^+ и образует контактную ионную пару [225].

Наряду со способностью краун-эфиров образовывать комплексы с соотношением катион: краун-эфир, равным 1:1, 1:2, 2:3 и 2:1, было установлено также, что они образуют комплексы с соотношением 2:2. Например, $[RbNCS(18K6)]_2$, $[CsNCS(18K6)]_2$, $[RbNCS(B18K6)]_2$ характеризуются “сэндвич” комплексами состава 2:2 [55]. Эти комплексы образуются с NCS-солями ионов низкой плотности заряда (рубидия или цезия) с 18-членными краун-эфиром, хотя соотношение размеров ион-полость позволяет предполагать образование “сэндвичевых” комплексов катион: краун-эфир состава 1:2 (рис.2).

К факторам, влияющим на образование и термодинамическую устойчивость комплексов катион: краун-эфир, относятся число и типы связывающих участков в цикле, соотношение размеров иона и макроциклической полости, пространственные препятствия в кольце, вид растворителя и степень растворимости иона, электрический заряд иона и т.д. Это указывает на существование широких возможностей для варьирования селективности комплексообразования и избирательного мембранного транспорта ионов.

Стехиометрия комплексообразования при этом может претерпевать существенные изменения. Например, при исследовании двух изомеров, полученных метилированием ДБ18К6, на комплексообразование с CsNCS в метаноле было обнаружено, что “цис” изомер соединения образовывал “сэндвич” комплекс состава 2:2, в то время как “транс” изомер образовывал комплексы состава 1:2 катион: краун-эфир [224].

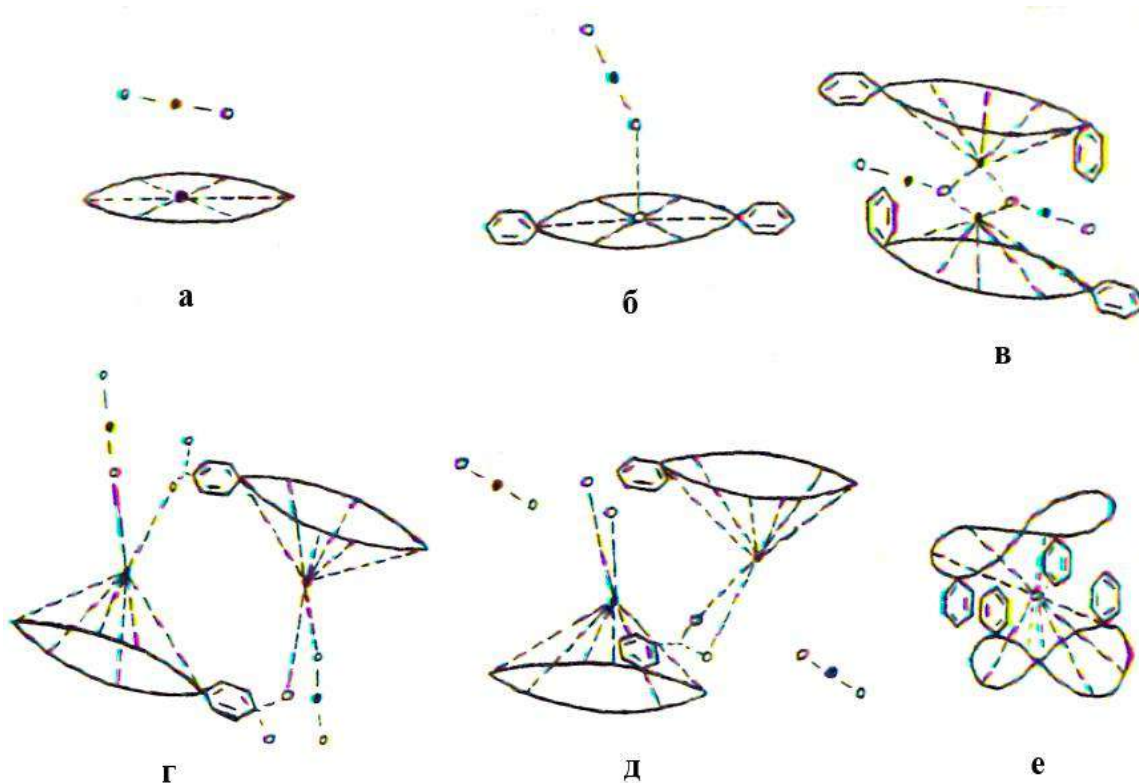


Рис.2. Схематическое изображение комплексов 18-членных краун-эфиров с одновалентными катионами [267]:

- а) комплекс KNCS , в котором NCS^- находится не в связанном состоянии;
- б) комплекс RbNCS-ДБ18К6 , в котором NCS^- действует как моноден-тант;
- в) комплекс $\text{CsNCS-метил-ДБ18К6}$ (цис изомер), в котором NCS^- действует как соединяющий анион;
- г) комплекс $\text{RbNCS-NO}_2\text{-Б18К6}$ состава 2:2;
- д) комплекс $\text{CsNCS-NO}_2\text{-Б18К6}$ состава 2:2, образующийся за счет хелатирующего действия азота;
- е) комплекс $\text{CsNCS-метил-ДБ18К6}$ (транс изомер).

Были установлены также другие комплексообразующие макроциклы отличающиеся тем, что один или более донорных участков в цикле являются некислородными [24, 37], как, например, сульфиды эфиров Педерсена. Другой случай, когда один или более кислородных или некислородных гетероциклических ядер образуют часть полиэфирного цикла [131, 132], как, например, основанные на фуране макроциклы Крама [330]. Иногда углероды цикла краун-соединения заменяются электроотрицательными атомами [55, 377].

Краун-соединения группы Кристенсен-Изатта или краун-лактоны Вогтла [35,37], краун-соединения группы Шмидта [241], полиэфирные соединения Парсона или папавериновые краун-эфирные соединения группы Вогтла дополняют перечень макроциклических полиэфиров, родственных краун-эфирам Педерсена.

Большими потенциальными возможностями обладают циклические мультидентантные бициклические и трициклические лиганды, которые в целом называются криптандами. Синтез и комплексообразующая способность этих лигандов исследовалась в деталях Леном [171, 172] и другими исследователями [47, 48, 225]. Криптанды проявляют хорошую селективность, хотя по отношению к стехиометрии комплексообразования результаты являются сравнительно близкими. Комплексы ионов с криптандами называются криптатами. Устойчивость комплексообразования для криптатного эффекта выше, чем для макроциклического, например, в метаноле калиевый комплекс [2.2.2] в 10^4 раз более стабилен, чем комплекс (ДБ18К6) K^+ [171]. Однако в отличие от краун-эфиров, криптанды более селективны в отношении двухвалентных катионов, чем одновалентных схожего размера [86].

Леном [167-172] были сделаны выводы относительно механизма селективности и стабильности комплексообразования макроциклических полиэфиров и криптандов с катионами щелочных и щелочноземельных металлов:

- жесткие лиганды проявляют значительно лучшую селективность комплексообразования по сравнению с гибкими лигандами;
- в то время как жесткие лиганды способны дискриминировать как малые, так и большие катионы, гибкие лиганды, главным образом, дискриминируют малые катионы;
- калий-натриевая селективность известных природных лигандов ниже, чем селективность синтетических полиэфиров, особенно ДБ30К10 и криптандов [3.2.2.]-[3.3.3.];
- величины селективности лигандов могут быть сравнимы только в одном растворителе;
- замена атомов кислорода в криптандах [2.1.1]-[2.2.2] на атомы азота или серы приводит к ослаблению электростатических взаимодействий между донорными гетероатомами и ионами щелочных металлов, являющимися “жесткими” катионами. Это взаимодействие уменьшается в порядке $O > N > S$ [171].

Помимо термодинамических параметров комплексообразования важной характеристикой является скорость образования и

распада комплексов [168]. Из вышеизложенного следует, что наряду с липофильностью молекулы краун-эфира и его комплекса с ионом, кинетика обмена при комплексообразовании и диссоциации должны играть заметную роль в трансмембранном переносе ионов. Именно эти процессы и определяют, главным образом, основные этапы при взаимодействии мембраноактивной молекулы и переносимого иона, так же как процессы, происходящие на границе раздела фаз.

Влияние природы растворителя на комплексообразующую способность диацетилпроизводных-ДБ18К6

Характерная особенность комплексов краун-эфиров заключается в том, что координационная сфера катионов в них заполнена эфирными или другими полярными группами, как в растворах при сольватации катионов молекулами, содержащими одну или несколько подобных групп. Тогда можно уподобить образование таких комплексов смене сольватной оболочки катиона при переносе его из одного растворителя в другой, обладающий большей сольватирующей способностью. Взаимодействие растворителя с катионами может вызвать направленные изменения конформации молекул краун-эфиров [381, 382].

Растворитель вносит существенные коррективы не только в абсолютные значения констант устойчивости комплексов, но и в характер их изменения. Для выявления роли растворителя удобно использование избыточных термодинамических функций реакции комплексообразования. Следует иметь в виду, что растворитель смещает равновесие реакции комплексообразования, сильно влияет на механизм реакции, выступает как катализатор и т.п.

Для анализа влияния природы растворителя на устойчивость комплексов целесообразно рассмотреть следующую классификацию:

- класс А: неполярные и слабополярные растворители, практически не сольватирующие катионы и анионы (бензол, метиленхлорид, хлороформ и т.д.);
- класс В: малополярные растворители, слабосольватирующие катионы (ТГФ, диметоксиэтан, ди-, три-, тетраглимы, алифатические четвертичные амины и другие);
- класс С: полярные апротонные растворители, хорошо сольватирующие катионы, но не способные прямо сольватировать анионы (ДМСО, ДМФА, ацетон, ацетонитрил и другие);

- класс D: полярные протонные растворители, хорошо сольватирующие как анионы посредством образования водородных связей, так и катионы (вода, метанол, этанол, аммиак).

Структура комплексов и характер комплексообразования заметно определяется классом растворителя. Так, было исследовано взаимодействие 18К6 с катионами щелочных металлов в водно-метанольных растворах с различным процентным составом компонентов [131]. С увеличением процентного содержания метанола в смеси константа устойчивости комплекса возрастает, причем это возрастание имеет энтальпийную природу.

При переходе от одного растворителя к другому, даже в рамках одного класса, структура сольватной оболочки катиона и комплекса изменяется. Приведенные в работе [4] исследования комплексообразования ДБ18К6 с ионами натрия, калия и цезия в спиртах (метаноле, этаноле и пропаноле) и сопоставление полученных данных с константами устойчивости комплексов в водной фазе показали, что существует линейная эмпирическая зависимость между $\lg K$ и диэлектрической проницаемостью, свидетельствующая о понижении устойчивости комплекса при возрастании диэлектрической проницаемости растворителя.

Для аполлярных протонных растворителей качественная связь между устойчивостью комплексов и полярностью среды нарушается. Однако эффекты объясняются соответствующими изменениями донорных чисел Гутмана, характеризующих электронодонорную способность растворителя.

В частности, показана корреляция между донорными числами Гутмана для растворителя и комплексообразующей способностью криптанов. Стрессер и сотрудники [256], изучая кинетику комплексообразования натрия с 18К6 в метаноле и пропиленкарбонате, установили корреляцию между донорными числами Гутмана для растворителя и свободной энергией активации для ступеней диссоциации в системах, где имел место обменный механизм комплексообразования.

Нами проведено исследование комплексообразующих свойств диацилпроизводных-ДБ18К6 в различных растворителях. Оценены константы комплексообразования, предельные подвижности и радиусы по “Стоксу” гомологического ряда диацилпроизводных-ДБ18К6 в метаноле, этаноле, изопропаноле и ацетоне [395].

Характер комплексообразования диацилпроизводных-ДБ18К6 (соединения 21г-27ц) с ионом Ca^{2+} приведен на рис.3. Анализируя

экспериментальные данные (табл.2), можно отметить, что наиболее высокие значения констант устойчивости наблюдаются в метаноле и изопропаноле, тогда как в этаноле и ацетоне они несколько ниже.

Таблица 2

Константы устойчивости (lgK) комплексов диацилпроизводных-ДБ18К6 в различных растворителях

Краун-эфиры	lgK			
	метанол	этанол	пропанол-2	ацетон
4',4''-диацетил-	-	6.83	6.09	5.89
4',4''(5'')- дипропионил-	7.09	6.89	6.78	6.25
4',4''(5'')-дибутирил-	7.30	6.87	7.20	6.42
4',4''(5'')-дивалерил-	6.82	6.74	6.83	6.61
4',4''(5'')-дигексаноил-	6.74	6.31	6.22	6.11
4',4''- дигептаноил-	6.69	5.72	6.08	5.48
4',5''-диооктаноил-	6.18	5.36	6.06	5.64

Хираока [401], сравнивая данные по константам устойчивости комплексов краун-эфиров, полученных разными исследователями, отмечает, что величины констант устойчивости в метаноле, например, выше, чем в водном растворе в 10^3 - 10^4 раз. Метанол слабо влияет на координирование катиона краун-эфиром, т.к. он обладает меньшей, чем вода, способностью сольватировать катионы. Очевидно, у изопропанола сольватирующая способность еще менее выражена. Следует отметить, что наиболее высокие значения констант устойчивости комплексов во всех растворителях наблюдаются для диацилпроизводных-ДБ18К6, с длиной углеводородной цепи в 3-5 атомов углерода. Наиболее эффективные мембранотропные краун-эфиры: 4',4''(5'')-дибутирил- и -дивалерил -ДБ18К6, обладают более выраженной способностью образовывать комплексы с ионами кальция [376, 395].

Сольватирующая способность зависит от характера самого процесса и свойств растворенного вещества; эффективная сольватирующая способность является суммой различных видов взаимодействий, в первую очередь, специфического (химического) и неспецифического (физического и универсального). Для данного процесса отдельные виды взаимодействия суммируются и являются независимыми друг от друга. Этот подход для растворов был теоретически обоснован Пальмом [158] в виде так называемого принципа линейности свободной энергии.

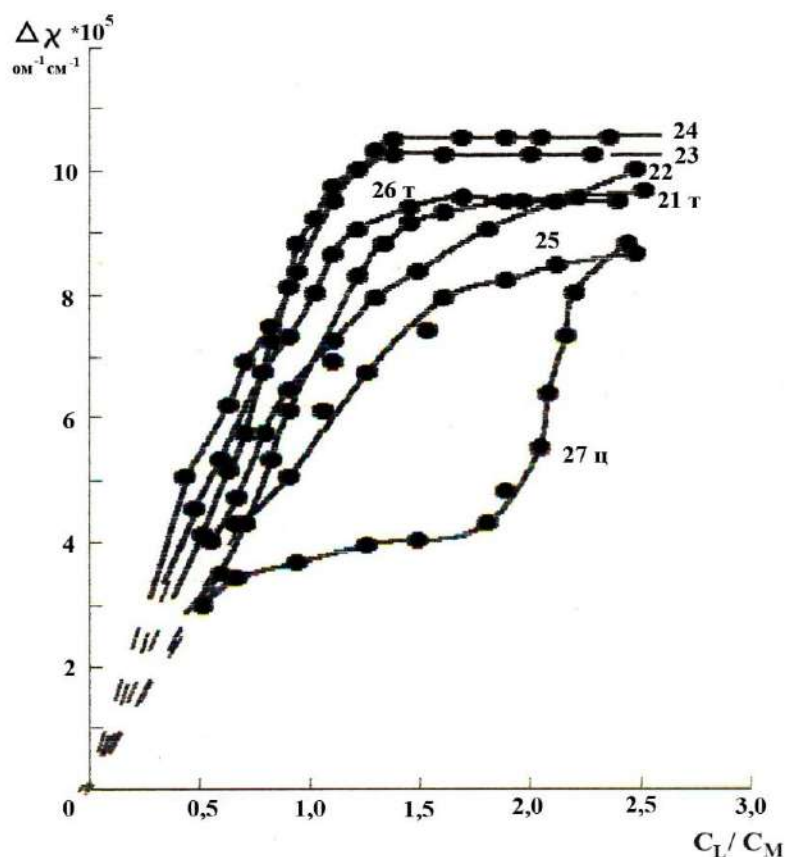


Рис.3. Изменение удельной электропроводности раствора CaCl_2 в этаноле в присутствии диацилпроизводных-ДБ18К6 (где χ – удельная электропроводность, C_M – молярная концентрация соли, C_L – концентрация лиганда)

Используя базу данных по комплексообразованию различных краун-эфиров, с привлечением программы для построения корреляционных характеристик, были построены зависимости констант устойчивости натриевых комплексов с 18К6 от различных параметров растворителей. Наиболее эффективным оценочным фактором оказалось донорное число Гутмана для растворителя (коэффициент корреляции составил 0,953). Графическая зависимость $\lg K$ от донорного числа Гутмана приведена на рис.4 [394].

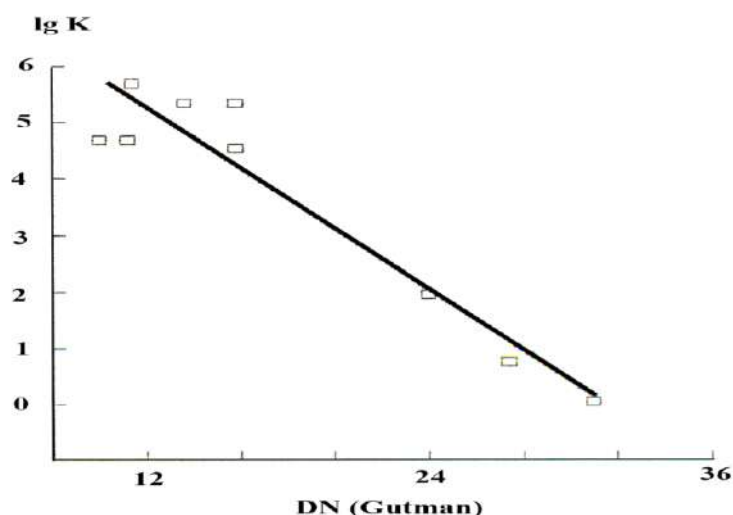


Рис.4. Зависимость устойчивости комплексов Na^+ с 18K6 от донорности (DN_G) растворителя

Аналогичные расчеты были произведены для Ca^{2+} -комплексов 4',4''(5'')-дибутирил- и - дивалерил- ДБ18К6. Здесь также наиболее корректной является оценка влияния растворителя на процессы комплексообразования донорным числом Гутмана (рис.5). Из представленных данных следует, что с увеличением донорности растворителя устойчивость комплексов диацилпроизводных-ДБ18К6 возрастает.

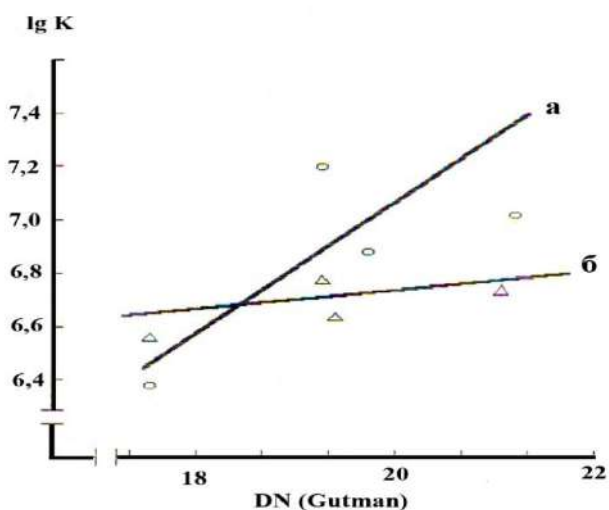


Рис.5. Зависимость устойчивости комплексов 4',4''(5'')- дибутирил- (а) и 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 (б), соответственно, от донорного числа Гутмана

Исследовано комплексообразование производных ДБ18К6, различающихся строением боковых радикалов и механизмом мембранного действия. Установлено, что селективность комплексообразования и ионофорная активность зависят от природы боковых заместителей в бензольных кольцах макроцикла.

В одном гомологическом ряду стабильность образующихся комплексов определяется длиной углеводородных заместителей. Для диацилпроизводных-ДБ18К6 наибольшее значение константы устойчивости имеют 4',4''(5'')-дibuтирил- и -дивалерил- ДБ18К6, обладая при этом наибольшей ионофорной активностью по Ca^{2+} .

4',4''(5'')-дипропионил-, 4',4''-дигептаноил- и 4',5''-диооктаноил-ДБ18К6 в этом ряду проявляют низкую ионофорную активность по Ca^{2+} , демонстрируя при этом явные комплексонные свойства.

Исследование этанольных и метанольных растворов хлоридов щелочных металлов в присутствии вышеуказанных краун-эфиров, в основном, подтвердило установившееся мнение об определяющем влиянии соотношения размеров внутренней полости полиэфира и кристаллографического радиуса катиона на процесс комплексообразования. Образование комплексов состава ML в случае, когда размеры полости краун-эфиров значительно больше кристаллографических размеров вышеуказанных катионов, обусловлено относительно низкими значениями энергий конформационных перестроек и, как следствие, свободной и гибкой структурой их молекул, что позволяет молекулам названных лигандов значительно перестраивать конформацию при комплексообразовании.

Диалкилпроизводные-ДБ18К6 (соединения 8т-14т) образуют с ионами калия и рубидия, размеры которых близки к радиусу полости ДБ18К6, комплексы состава ML. Наличие диалкильного заместителя, содержащего свыше пяти CH_2 -групп в бензольных кольцах, вызывает стерические затруднения при комплексообразовании и способствует образованию с этими же катионами комплексов состава ML. Экспериментально найденные значения констант устойчивости комплексов с различными катионами свидетельствуют о высокой избирательности комплексообразования исследованных краун-эфиров. Возрастание количества CH_2 -групп у диалкилпроизводных-ДБ18К6 и увеличение радиуса полости полиэфиров в ряду: 4',4''-диэтил-ДБ18К6, 4',4''(5'')-диэтил-ДБ24К8, 4',4''(5'')-диэтил-ДБ30К10 обуславливает монотонное уменьшение значений констант устойчи-

востей их комплексов с ионами натрия, что объясняется стерическими факторами в случае увеличения CH_2 -групп и ослаблением ион-дипольного взаимодействия при увеличении размеров полости макроцикла. Аналогичное изменение констант устойчивостей обнаруживается для комплексов состава ML с ионами калия, рубидия и цезия, за исключением комплексов с 4',4''(5'')-диэтил-ДБ30К10 в качестве лиганда. Последнее обусловлено, по-видимому, малой энергией конформации этого краун-эфира, позволяющей ему достаточно прочно "обертывать" комплексируемый катион с образованием устойчивой конформации [376, 380, 396].

При исследовании экстракции ионов щелочных металлов в системе хлороформный раствор краун-эфира - водный раствор роданида щелочного металла наблюдается, что роданиды всех исследованных металлов экстрагируются в органическую фазу, в основном, в виде ионных пар ML^+SCN^- (L-диэтил-ДБ18К6 или диэтил-ДБ24К8), что согласуется с составом образующихся комплексов в метаноле и этаноле. Изменение коэффициентов распределения концентрационных констант экстракции роданидов натрия, калия, рубидия и цезия хлороформными растворами ДБ18К6 и его диалкилпроизводными (от C_2H_5 до C_8H_{17}), диэтил-ДБ24К8 и диэтил-ДБ30К10 согласуется с изменениями констант устойчивости образуемых ими комплексов в метаноле. Это обстоятельство указывает на то, что при экстракции значительную роль играют процессы комплексообразования на границе раздела водной и органической фаз. Также необходимо учитывать поверхностно-активные свойства краун-эфиров и их мицеллообразование, за счет которого может также осуществляться часть экстракции ионов (эту часть необходимо исключать из общей картины, которая происходит за счет комплексообразования на границе раздела фаз). Значительные величины коэффициентов распределения, констант экстракции в хлороформный раствор ДБ18К6 и его диалкилпроизводных в сравнении с соответствующими значениями для роданидов натрия, рубидия и цезия подтверждают установившееся мнение об определяющем влиянии соответствия размеров катиона и полости лиганда в случае, когда последний имеет высокую энергию конформационных перестроек [376, 379].

На основе анализа литературных данных и собственных экспериментов, принимая во внимание различие строения конформационных возможностей и свойств относительно небольших молекул

краун-эфиров, можно предположить, что ионная избирательность мембран, модифицированных макроциклическими полиэфирами, зависит не только от отношения констант устойчивости комплексных катионов, коэффициентов распределения в системе мембрана-водный раствор, но также от процессов, связанных с поверхностно-активными свойствами краун-эфиров (процесс мицеллообразования самими краун-эфирами). Анализ полученных экспериментальных данных показал, что измеренный коэффициент избирательности мембран даже приближенно не равен отношению соответствующих констант устойчивости [337, 376], т.е. мембранная селективность лишь качественно совпадает с избирательностью комплексообразования краун-эфиров. Катионная избирательность мембран, модифицированных краун-эфирами, определяется, видимо, стадией переноса (экстракции) катионов через границу раздела мембрана - водный раствор. Избирательность же гетерогенной реакции комплексообразования краун-эфиров с катионами на границе раздела фаз является необходимым условием селективного транспорта этого катиона через мембрану, но не определяющим величину коэффициента мембранной избирательности.

Корреляционный анализ констант комплексообразования краун-эфиров

Реакции комплексообразования краун-эфиров и неорганических солей являются равновесными процессами:



где: K_f и K_d – константы скорости комплексообразования и диссоциации, соответственно, mS -молекулы сольвента

Термодинамическая константа этого суммарного процесса:

$$K = f [LM^+] / f [L] \cdot f [M^+]$$

показывает степень комплексообразования и характеризует устойчивость полученного комплекса в растворе.

С точки зрения термодинамики константа устойчивости может быть представлена как мера теплотворной способности и изменения энтропии реакции комплексообразования, потому что устойчивость комплекса увеличивается с повышением теплотворной способности и энтропии реакции. Следовательно, наиболее полно процесс комплексообразования можно охарактеризовать, используя следующие термодинамические функции:

- изменение свободной энергии (ΔG_f^0). Свободная энергия комплексообразования складывается, в основном, из энергии взаимодействия иона с комплексом, энергии десольватации, изменения

внутримолекулярной энергии комплексона после взаимодействия с ионом и из энергии сольватации комплекса [107];

- изменение энтальпии (ΔH_f^0), которое включает как энергию связи между катионом и донорными атомами, так и энергию сольватации;

- изменение энтропии (ΔS_f^0) определяется, главным образом, электростатическими факторами, сольватацией, числом продуктов и природой реагентов, вклад S_f^0 невелик, если не происходит заметных конформационных изменений [398, 401], поскольку образование краун-эфиров комплексов обусловлено электростатическим взаимодействием между диполем и ионом;

- изменение удельной теплоемкости (C_p), величина которой также связана с изменением конформации молекулы.

Возрастание энергии взаимодействия катион-лиганд (при изменении числа и типа донорных атомов, введении заместителей и др.) приводит к увеличению жесткости системы, а значит, к “вымораживанию” некоторых степеней свободы лиганда и к уменьшению энтропии системы. И, наоборот, увеличение энтальпии комплексообразования, как правило, соответствует большей конформационной подвижности лиганда в комплексе, и следовательно, к положительному изменению энтропии [401].

Ациклические молекулы при комплексообразовании структурируются, что значительно понижает ΔS_f^0 , тогда как циклические и еще в большей степени бициклические молекулы имеют достаточно жесткий каркас, заранее подготовленный к взаимодействию с катионом.

Сравнение комплексообразования циклического 18К6 и его открытоцепочного аналога - пентаглима с ионами калия- показало, что устойчивость комплекса пентаглима с этим ионом уменьшается в 10^4 раза [128], хотя число донорных атомов в обоих лигандах одинаково. Повышенная устойчивость комплексов циклических полиэфиров по сравнению с их линейными аналогами (подандами) объясняют макроциклическим эффектом, имеющим, вероятно, энтропийное происхождение [115, 116].

Об энтальпийной природе макроциклического эффекта свидетельствуют данные, полученные при сопоставлении энергии взаимодействия катионов Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ с 18К6 и пентаглимом [285].

Анализ и систематизация количественных термодинамических данных о комплексообразовании ионов с новыми комплексонами необходимы для выявления закономерностей в зависимости от типов

лигандов, ионов и растворителей; для поиска лигандов, обеспечивающих высокие значения констант устойчивости и селективности комплексообразования; для использования в разделении веществ; для построения моделей взаимосвязи “структура-комплексобразующая способность” и т.д.

Структура молекулы позволяет рассчитать значения ее термодинамических функций: ΔG^0_f , ΔH^0_f , ΔS^0_f , C_p , кроме того, оценить вклад в каждую из этих функций любой химической связи [389, 393].

Поэтому нами была предпринята попытка оценить термодинамические вклады различных заместителей в макроциклическом кольце 18К6 в константу устойчивости комплексов производных 18-членных краун-эфиров с ионами одно- и двухвалентных металлов, влияние термодинамических характеристик заместителей на комплексообразующую способность краун-эфиров. Для выполнения поставленной задачи нами была проанализирована комплексообразующая способность и константы комплексообразования гомологических рядов диалкил- и диацилпроизводных-ДБ18К6, полученная ранее [376, 395].

Значения термодинамических функций параметров соединения по групповым составляющим, основанных на анализе структуры молекулы, алкильных и ацильных заместителей макроциклического кольца, были рассчитаны по методу Бенсона [389, 393] (табл.3). Затем, используя программу для построения корреляционных зависимостей, были получены уравнения корреляций, отражающие количественную зависимость константы устойчивости комплексов от значений термодинамических параметров заместителей в макроцикле. Для уравнений с максимальным коэффициентом корреляции были построены графические зависимости (рис.6-10). В целом установлена хорошая корреляция констант устойчивости комплексов с термодинамическими параметрами:

$$\begin{aligned} \text{NaCl} + \text{dialkyl-DB18C6:} \\ \lg K = 4,25 + 0,00900 \Delta H^0_f(\text{RPh}) \\ r = 0,992, \text{ sd} = 0,013 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{RbCl} + \text{dialkyl-DB18C6:} \\ \lg K = 4,47 + 0,008011 \Delta H^0_f(\text{RPh}) \\ r = 0,9967, \text{ sd} = 0,005247 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KCl} + \text{dialkyl-DB18C6:} \\ \lg K = 4,89 + 0,00803 \Delta H^0_f(\text{RPh}) \\ r = 0,955, \text{ sd} = 0,02021 \end{aligned}$$

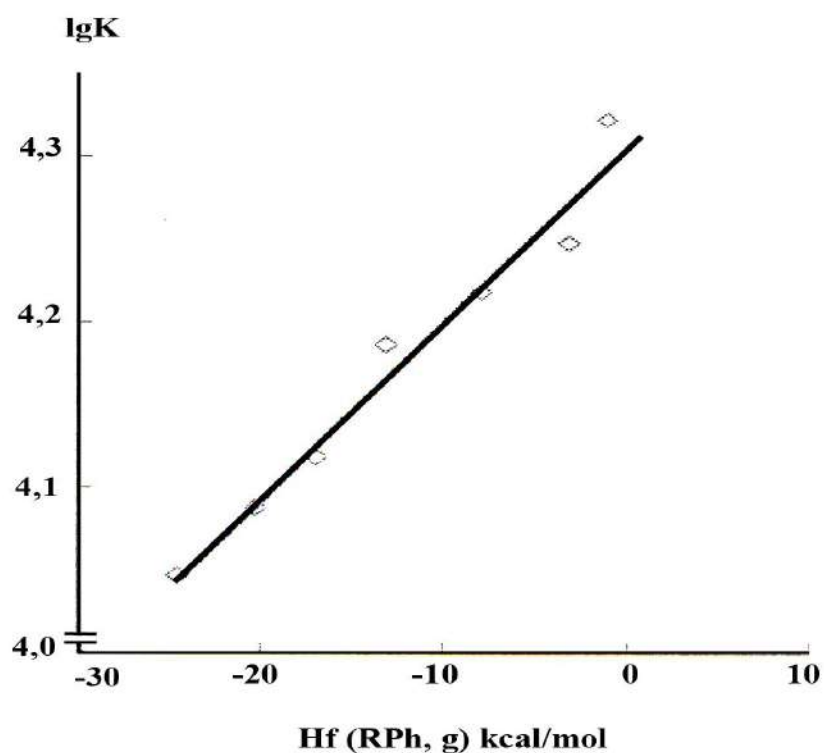
$$\begin{aligned} \text{CsCl} + \text{dialkyl-DB18C6:} \\ \lg K = 3,52 + 0,00986 \Delta H^0_f(\text{RPh}) \\ r = 0,9851, \text{ sd} = 0,02092 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CaCl}_2 + \text{diacyl-DB18C6:} \\ \lg K = 5,49 - 0,104 \Delta H^0_f - 0,00193 (\Delta H^0_f)^2 \\ r = 0,9958, F(2,4) = 239,0, \text{ sd} = 0,06856 \end{aligned}$$

Таблица 3

**Термодинамические параметры боковых заместителей
макроцикла 18К6**

заместители	C (kal/MK)	S (kal/MK)	H (kcal/M)	G (kcal/M)
C ₂ H ₅	30.69	86.15	7.12	31.21
C ₃ H ₇	36.41	95.76	1.87	32.80
C ₄ H ₉	41.85	105.04	-3.30	34.58
C ₅ H ₁₁	47.32	114.47	-8.23	36.55
C ₆ H ₁₃	52.79	123.78	-13.15	38.56
C ₇ H ₁₅	58.25	133.09	-18.08	40.57
C ₈ H ₁₇	63.72	142.40	-23.00	42.59
COCH ₃	14.54	89.12	-20.76	0.43
COC ₂ H ₅	20.74	98.72	-25.96	2.06
COC ₃ H ₇	26.24	108.14	-30.91	4.03
COC ₄ H ₉	31.74	117.55	-35.86	5.96
COC ₆ H ₁₃	42.74	136.39	-45.75	9.89
COC ₇ H ₁₅	48.24	145.81	-50.71	11.83
COC ₈ H ₁₇	53.74	155.23	-55.65	12.51



**Рис.6. Зависимость устойчивости комплекса Na⁺ с
диалкилпроизводными-ДБ18К6 от свойств заместителя**

При этом наибольший коэффициент корреляций наблюдается для изменения стандартных значений энтальпий (ΔH_f^0) радикалов заместителей. С увеличением ΔH_f^0 фенил-радикала 18-членного цикла константа устойчивости монотонно изменяется. Причем для диалкилпроизводных-ДБ18К6 зависимость линейная, тогда как для диацилпроизводных-ДБ18К6 она имеет квадратичный характер.

Возможно, комплексообразующая способность изменяется в зависимости от изменения энергии взаимодействия между катионом и донорными атомами кислорода макроцикла, поскольку заместители в боковых бензольных кольцах оказывают несомненное влияние на зарядовое распределение в кольце, а следовательно и на электростатические взаимодействия катиона с лигандом.

Свой вклад вносят и процессы сольватации исходных реагентов и комплексов. Очевидно, нельзя пренебрегать и возможными конформационными изменениями в молекуле краун-эфира в зависимости от природы заместителей.

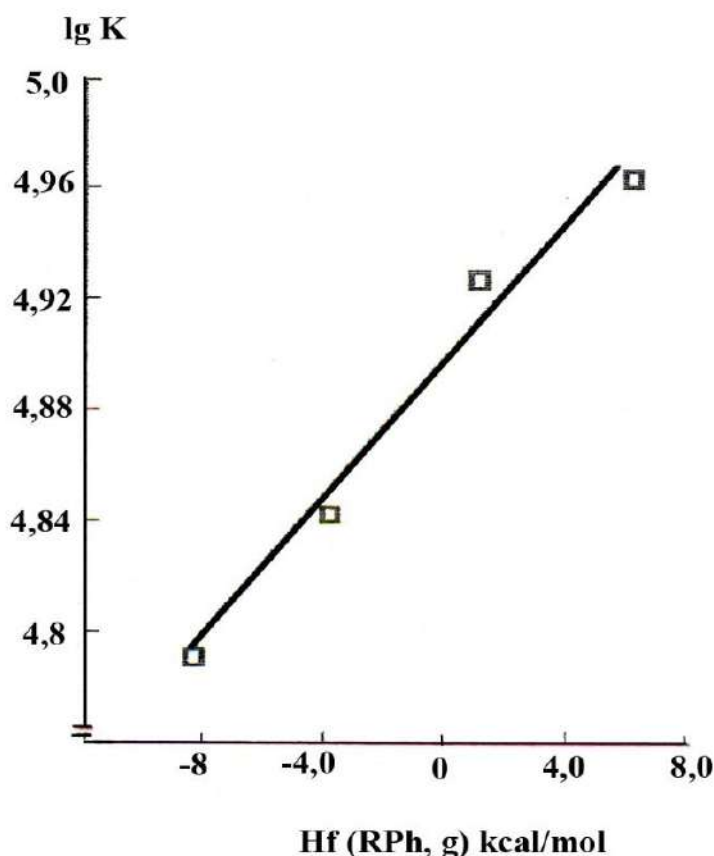


Рис.7. Зависимость устойчивости комплекса K^+ с диалкилпроизводными-ДБ18К6 от свойств заместителя

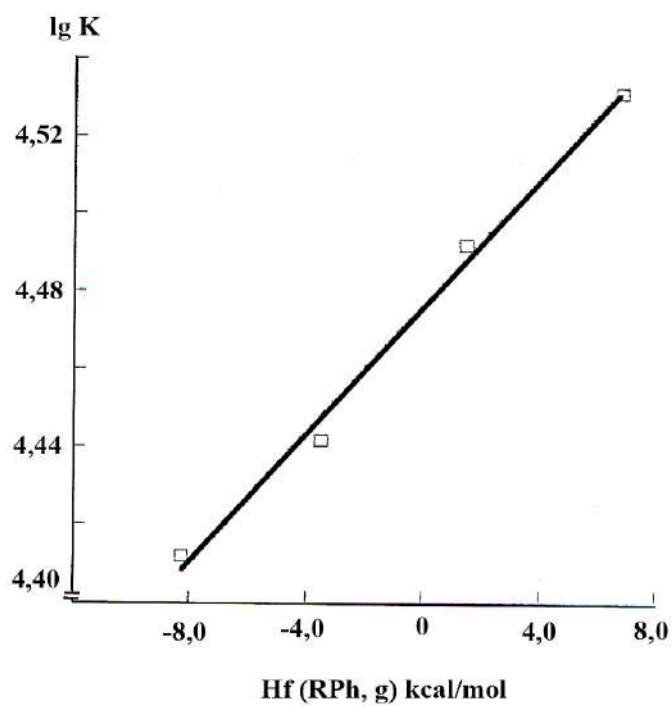


Рис.8. Зависимость устойчивости комплекса Rb^+ с диалкилпроизводными-ДБ18К6 от свойств заместителя

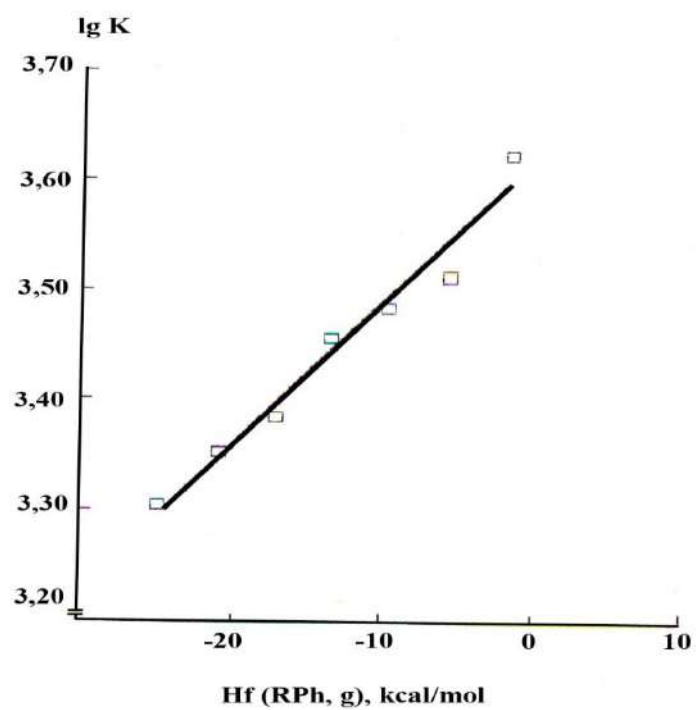


Рис.9. Зависимость устойчивости комплекса Cs^+ с диалкилпроизводными-ДБ18К6 от свойств заместителя

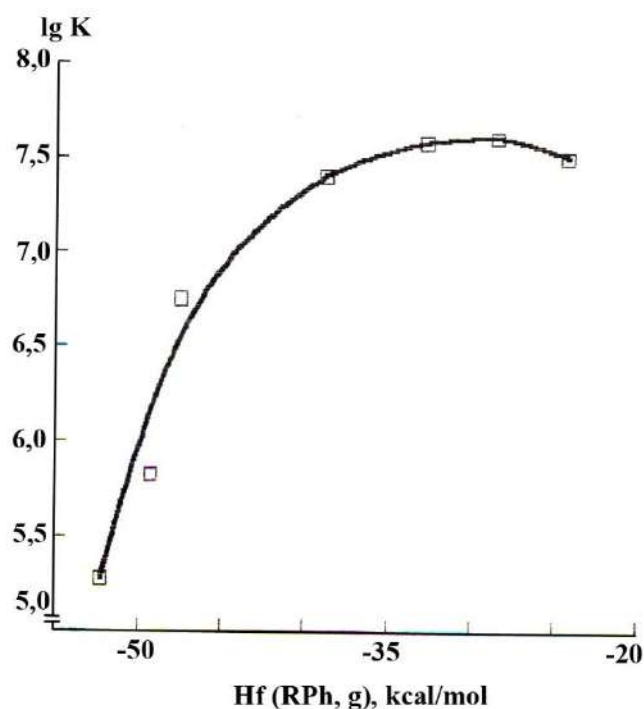


Рис.10. Зависимость устойчивости комплекса Ca^{2+} с диацилпроизводными-ДБ18К6 от свойств заместителя

Этим, вероятно, объясняется столь очевидная зависимость комплексообразования в растворе от изменения энтальпии, термодинамической функции, которая наиболее полно отражает процессы сольватации исходных реагентов и образующихся комплексов, а также энергию связи с донорными атомами макроцикла.

Таким образом, использование в анализе данных по комплексообразованию термодинамических характеристик позволяет придать обнаруженным закономерностям вполне определенное физико-химическое толкование.

Проведенные нами исследования дают возможность оценить комплексообразующие способности краун-эфиров, провести анализ “структура-функция” с заданной достоверностью. Эти экспериментальные данные по термодинамическим, физико-химическим и другим характеристикам краун-эфиров позволяют прогнозировать свойства вновь синтезированных или, возможно, только еще “сконструированных” соединений.

Глава II

ИОНОФОРЫ

Достижения и перспективы в химии макроциклов, связанные с мембранным транспортом ионов

Краун-эфиры с простыми эфирными связями на модельных и биологических мембранах обладают низкой ионофорной активностью [62-64, 261-263, 349-351, 376, 396]. Известно, что вероятной причиной относительно малой ионофорной активности большинства краун-эфиров, криптандов и их аналогов является низкая растворимость в липидном матриксе и большая константа устойчивости катионных комплексов этих соединений. Введением алкильных и ацильных заместителей в бензольные кольца краун-эфиров, различающихся размером полости макроцикла, можно существенно повысить их катион-транспортирующие свойства и изменить ионную избирательность мембран [8, 345, 362, 375, 395]. Целый ряд работ посвящен исследованию различных заместителей на комплексообразующие и ионофорные свойства краун-эфиров [376, 379, 380, 395, 396, 398]. Исследование комплексообразования хлоридов щелочных металлов с алкилпроизводными-ДБ18К6 показало, что увеличение длины цепи заместителя приводит к монотонному уменьшению константы устойчивости комплексов. Авторы объясняют это стерическими ограничениями связывания катиона краун-эфиром. Уменьшение константы устойчивости комплекса само по себе способствует улучшению катион-транспортных свойств комплексона. Дополнительное улучшение ионофорных свойств краун-эфиров при введении в них алкильных заместителей достигается в результате повышения растворимости в гидрофобной части липидного матрикса мембраны.

Изменением типа заместителей в молекулах краун-эфиров можно управлять селективностью катионного транспорта [376, 396]. В экспериментах на бислойных мембранах, митохондриях и на других типах биомембран установлено, что дибутирил- и дивалерил-ДБ18К6 индуцируют преимущественно кальциевую проводимость [318, 349, 363, 366, 373]. Дивторбутильные производные-ДБ18К6 на модельных и биологических мембранах проявляют выраженную магниевую избирательность [297, 350, 366, 368, 395].

Еще один путь увеличения ионофорной активности заключается во введении молекул краун-эфиров в другие молекулы, в частности Б15К5 в карбоциклическую часть порфиринов. Изучение влияния

краун-порфиринов на митохондрии показало [46], что они разобщают окислительное фосфорилирование сильнее, чем отдельно взятые Б15К5 и порфирины. Такой синергизм, вероятно, объясняется большей липофильностью краун-порфирина, чем составляющих его компонентов.

Изучение ионофорных свойств краун-эфиров на митохондриальных и бислойных липидных мембранах позволило выявить ряд фундаментальных особенностей взаимодействия этих соединений с биологическими мембранами. Так, было обнаружено, что ДБ18К6, не обладающий ионофорными свойствами, предотвращает перенос валиномицином катионов калия через митохондриальную мембрану. Аналогичное заключение было сделано при исследовании совместного действия валиномицина и дициклогексил-18К6 на мембраны эритроцитов и ретикулоцитов [395]. Выяснено, что причиной антагонизма этих соединений является образование комплексов краун-эфир-катион-валиномицин на границе раздела фаз мембрана-внеклеточный электролит. Образование одинарных или двойных комплексов краун-эфиров с катионами на поверхности мембраны существенно изменяет ее поверхностное натяжение [317], что сказывается на активности ее ферментных и транспортных систем. Это положение, а также изменение ионной селективности комплексообразования краун-эфиров необходимо учитывать при анализе механизма их мембранной и биологической активности.

Лариат-эфиры

Синтез и изучение краун-эфиров [216-220] расширились до области краун-эфиров и криптанов [89, 90, 105, 145, 146] и, наконец, до области отношений “хозяин-гость” [271-273, 399], для которой было предложено название супрамолекулярная химия. На протяжении этого эволюционного процесса возникло огромное число различных исследовательских направлений, создано множество истинно новых молекул и материалов с крайне удивительными и полезными свойствами [11-13, 84, 87, 88, 92, 97, 99, 101, 103, 104, 124, 125, 143].

Лариат-эфиры [89, 111] получили свое название из-за сходства их молекулярной модели с лассо, которым они захватывают и связывают катион (рис.11).



Рис.11. Модель комплексообразования лариат-эфирами

Основу лариат-эфиров составляет макроцикл краун-эфира. Как правило, лариат-эфиры наследуют селективность краун-эфира, на основе которого они синтезированы. За период развития направления лариат-эфиров был создан широкий круг разнообразных структур [56, 246]. Например, в работе [89] были синтезированы лариат-эфиры на основе 18К6 с “рукой”, содержащей одну или более донорных групп (рис.12).

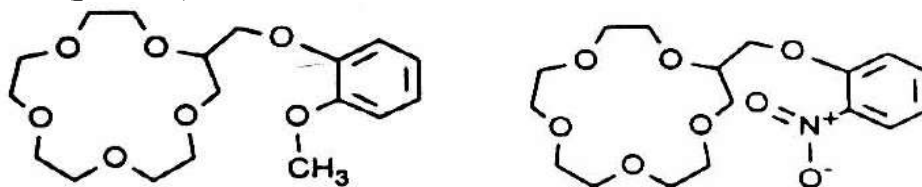


Рис.12. Пример лариат-эфиров на основе 18К6

Трехмерность комплексов полученных соединений с катионом достигалась за счет конформационных изменений, в результате которых “рука” нависает над плоскостью макроцикла. Катион-связывающие свойства данной структуры, ее трехмерность и динамичность делают ее “подобной” валиномицину. Однако до сих пор неизвестно, имеют ли полученные соединения подобную с валиномицином селективность, были установлены константы связывания этих соединений [6]. Проводились также исследования по сравнению свойств лариат-эфиров, различающихся природой связи макроцикла с “рукой” [89]: посредством углерода или азота. С помощью методов ЯМР [57, 144] было показано различие в их динамичности: лариат-эфиры, в которых “рука” связана с макроциклом посредством азота, оказались более гибкими структурами. Значительный интерес вызывают “двурукие” лариат-эфиры [89] (рис.13).

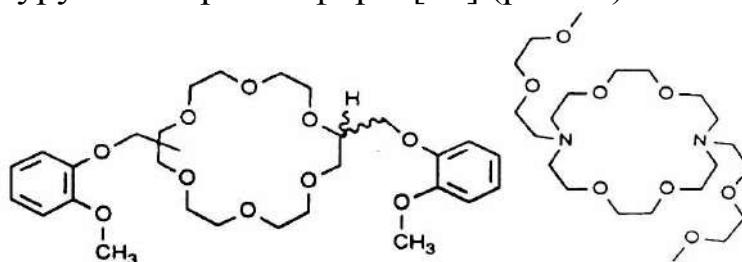


Рис.13. Пример “двуруких” лариат-эфиров

Было замечено [82], что в кристаллических структурах “одноруких” лариат-эфиров имеет место кооперативность макроцикла и “руки”. Однако в сольватной сфере часто присутствует катион. В случае двуруких лариат-эфиров возникает вопрос: будет ли лиганд полностью “окутывать” катион подобно валиномицину или же обе

“руки” будут реагировать со связанным кольцом катионом с одной и той же стороны (“цис”- и “анти”-расположение) (рис.14).

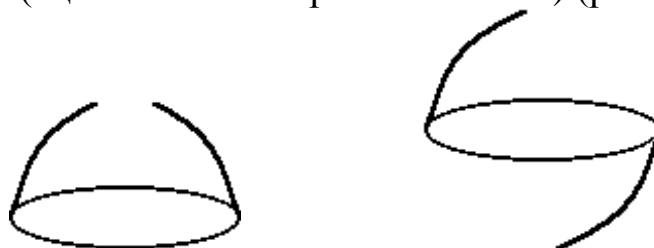


Рис.14. “Цис”- и “анти”-расположение “рук” лариат-эфиров при комплексообразовании

В результате проведенных исследований [89] оказалось, что в случае образования Na^+ -комплекса лариат-эфирами, основанными на 18-членных краун-эфирах, обе “руки” реагируют с катионом с одной и той же стороны макроцикла. Единственное исключение из общего правила обнаружил диаза-18-краун-6 с гидроксил-этильными “руками”. Замечено, что позиции донорных атомов в син-комплексах очень хорошо коррелируют с позициями донорных атомов соответствующих криптандных комплексах. Таким образом, син-комплексы лариат-эфиров могут рассматриваться как псевдокриптаты [7].

Были созданы различные лариат-эфиры [89], содержащие в разных “руках” эфир-карбонильные и амид-карбонильные группы. Авторами были проведены исследования комплексообразования этих структур с целью определения их селективности и степени участия в процессе связывания эфиркарбонильных групп. Были получены кристаллические “портреты” различных комплексов подобных соединений. Во всех исследованных комплексах взаимодействие связанного макроциклом Na^+ и “рук” осуществлялось с одной и той же стороны. Причем было замечено, что в связывании катиона участвовали только амидкарбонильные группы. Это оставалось верным и в случае K^+ комплексов, имеющих антирасположение. Исследование связывания Ca^{2+} дипептидными лариат-эфирами в водных растворах показали значения $\log K > 10^7$ и селективность $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+ > 10^4$. То, что сила связывания Ca^{2+} в водных растворах столь высока, вызывает особый интерес, т.к. связывание ионов щелочных металлов в воде обычно намного хуже, чем в полярных растворителях [53], моновалентный катион Na^+ и двухвалентный катион Ca^{2+} имеют приблизительно тот же радиус. Однако плотность заряда в Ca^{2+} в два раза выше. Вероятно, что селективность в этом случае является результатом влияния скорее электростатических факторов, чем стерических, как, например, соотношение размер полости -

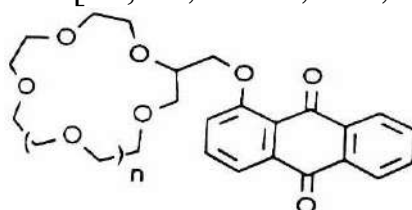
радиус катиона. Несмотря на это, сила и селективность связывания этих дипептидных лариат-эфиров не может соперничать с таковой валиномицина. Вероятно, причиной этому является то обстоятельство, что валиномицин при связывании катиона “использует” эфир-карбонильные группы, а в описанных соединениях связывающими являются амид-карбонилы. Тем не менее, данные соединения представляют собой яркий пример полностью синтетических структур, обладающих необычно высокой силой и селективностью связывания.

Редокс-переключаемые краун-эфиры

Одно из ранних исследовательских направлений, развившееся сразу после сообщения об комплексообразующих свойствах макроциклических полиэфиров, определилось стремлением создать аналогичные системы с более высокими константами стабильности и селективностью для различных катионов. Краун-эфиры показали себя как относительно сильные катионсвязывающие лиганды, обладающие достаточно высокой мембранной селективностью и эффективностью. С другой стороны, криптанды, имеющие трехмерную полость способную поместить катион подходящего размера, также формируют стабильные комплексы с ионами щелочных и щелочноземельных металлов, показывая высокую селективность [54, 20]. Однако их константы связывания слишком высоки (обычно порядка 10^{-7} - 10^{-8} М) для оптимальных катионтранспортных свойств [14]. Для того, чтобы мембранотропная молекула проявляла оптимальные ионофорные свойства, она должна обладать высокой константой связывания катиона на донорной стороне мембраны и относительно низкой на акцепторной стороне. Один из эффективных способов удовлетворить этим частично взаимопротиворечащим требованиям - встроить в молекулу ионофора так называемый переключающий механизм [248]. Предпосылкой такого подхода является тот факт, что некоторые молекулы имеют два различных места связывания. Функционирование этих участков может управляться внешними силами, такими как градиент pH [136, 137], свет [252], температура [251, 253] или редокс-градиент [49, 50, 58, 59, 109-111, 145, 240, 249].

Самыми эффективными редокс-переключаемыми лигандами должны быть структуры, которые обладают одним или более отрицательным зарядом в редокс-активном центре. Электроноактивная группа должна находиться в непосредственной близости и в подходящей геометрической ориентации по отношению к катион-

связывающему центру. Электрохимическая или химическая редукция приводит к избыточному отрицательному заряду, что, в свою очередь, повышает силу связывания катиона. Связывание катиона и редокс-процесса таким образом сопрягаются. Так как редокс-процесс обратим, переключатель позволяет контролировать комплексообразование, обратимо активируя различные участки с низким и высоким сродством. Существует множество редокс-активных групп, используемых в переключающем механизме, такие как нитробензен [145], азо-группы [109], хинон [49, 50, 58, 59, 110, 111, 207] и др. Одним из первых редокс-переключаемых лигандов были лариат-эфиры с нитробензеном в качестве редокс-активного центра [145]. Нитробензен может подвергаться обратимой одноэлектронной редукции. Анион-радикал о-нитробензильного заместителя способен формировать интрамолекулярные ионные пары с катионом, связанным макроциклом. Несмотря на значительное повышение силы связывания катиона при электроредукции, нитробензензамещенные лариат-эфиры оказались непригодны как ионофоры по причине быстрой декомпозиции анион-радикалов в присутствии воды. С другой стороны, анион-радикалы антрахинона, как известно, очень стабильны даже в водной среде с нейтральными рН в отсутствие кислорода [212]. Поэтому осуществлялись попытки заменить нитробенzenовые группы антрахиноновыми [49, 50, 58-59, 110, 111] (рис.15).



1. $n=1$
2. $n=2$

Рис.15. Пример редокс-переключающегося полиэфира, несущего хинонную группу

Электрохимическое поведение антрахинона отличается от нитробензена в способности подвергаться вторичной квазиобратимой редукции, приводящей к формированию соответствующего дианиона. Усиление связывания для антрахинон-замещенных лигандов определено как 10^2 - 10^6 [145]. Моновалентные катионы по силе связывания как с антрахинон- так и с нитробензензамещенными лигандами располагаются в следующий ряд: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$. Основная проблема, с которой сталкиваются в этом направлении-постредукционное снижение селективности этих соединений. При

электрохимической редукции усиливающие связывание факторы приводят к обратному эффекту, что объяснимо с позиций плотности заряда этих катионов. Макроцикл оказывает сглаживающий эффект на силы катионного связывания, что приводит к снижению селективности. Единственное исключение такому поведению показано азо-криптаном (рис.16) [212].

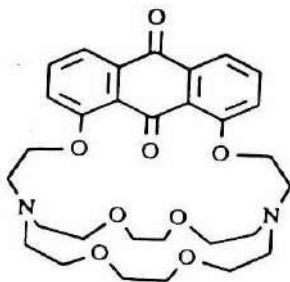


Рис.16. Редокс-переключаемый азо-криптан

Это соединение демонстрировало K^+ селективность (по отношению к Li^+ и Na^+) при электрохимической редукции. В попытках сконструировать селективные редокс-переключаемые системы были созданы более жесткие лиганды, основанные на антрахинонных группах, пришитых к краун-эфиру или криптанду. Циклическая вольт-амперметрия этих лигандов показала, что комплексообразующие свойства редуцированных форм определяются не только их структурой, но также взаимодействием ионных пар [89]. Для лигандов, имеющих большие полости, сила связывания, в основном, контролируется взаимодействием ионных пар. Таким образом, селективность лиганда при редукции нивелируется. Аффинность катионного связывания менее редуцированных краун-эфиров определяется комбинацией связывающей способности нейтрального лиганда и плотностью заряда иона. Большинство антрахинон-содержащих лигандов, так же как нитробензен-содержащих, формируют катионные комплексы со стехиометрией краун-эфир: катион 1:1. Исключением является азакриптан, имеющий также комплексы со стехиометрией 1:2.

Стратегия разработки редокс-переключаемых механизмов направлена на то, чтобы усилить комплексообразующие свойства переносчика, а затем деактивировать их после завершения переноса иона. Показано, что электрохимическая редукция боковых заместителей в нитробензен- и антрахинонзамещенных полиэфирах приводит к формированию сильного интрамолекулярного комплекса [89]. Также были продемонстрированы обратимость электрохимических редокс - процессов и повышение аффинности связывания этих

лигандов при их редукции. Следующим очевидным шагом была попытка использовать редокс-переключаемые лиганды в качестве переносчиков ионов. Первый успешный пример катион-электрон сопряженного транспорта, в котором и активация, и дезактивация носителей проводились электрохимически в жидкой мембране, был продемонстрирован в работах [60, 61]. В качестве переносчиков в этих экспериментах использовались антрахинонпроизводные лариат-эфиров. Первые эксперименты в этой области делали необходимым использование в качестве модели жидкие мембраны. Однако объемные жидкие мембраны - довольно плохая модель реальных липидных бислоев. Эксперименты на липосомах [89] показали, что трансмембранный перенос ионов через липидный бислой в присутствии редокс-активных липофильных подандов облегчается при создании редокс-градиента. Данное направление исследований переживает бурное развитие, особенно в отношении исследований на липосомах и других бислойных мембранах. Усилия многих лабораторий были направлены на расширение знаний, полученных в этой области [155, 157, 215].

Гибкие структуры

Слабые нековалентные взаимодействия (водородные связи, гидрофобные взаимодействия, силы Ван-Дер-Ваальса, солевые мостики) играют важную роль в формировании и поддержании важнейших биологически значимых молекул. Из всех типов слабых взаимодействий наиболее изучены гидрофобные. Значительное количество исследований в этой области, проводимых в последнее время, посвящено именно этому типу взаимодействий. Ярким примером исследований данного направления могут служить работы [113, 230]. Ранний пример достижения Гамильтона, названный “рецептором Гамильтона”, показан на рис.17.

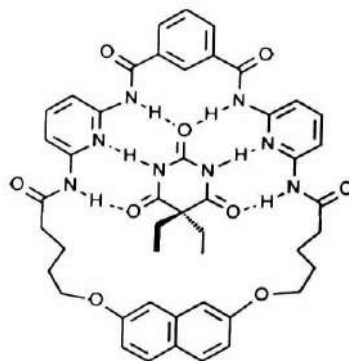


Рис.17. Молекулярная структура “рецептора Гамильтона”

Здесь образование водородных связей является основным фактором в образовании ассоциата “хозяин-гость”. Способность нафтаденовой части смещаться и возвышаться над барбитуратом (“хозяин”) увеличивает стабильность комплекса. Такие исследования позволяют определить вклад индивидуальных сил в общую стабильность.

Если в структуре “рецептора Гамильтона” прослеживается аналогия с краун-эфирами, то это влияние менее очевидно в семействе соединений, разработанных Ребеком. Яркий представитель этих соединений показан на рис.18.

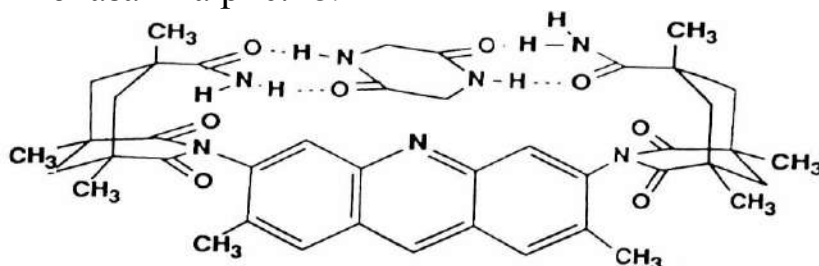


Рис.18. Молекулярная щель

Функциональные группы этих структур, благодаря полифункциональному производному циклогексана, могут фокусироваться в “молекулярную щель”. В работе [185] показано, что ферроцен может применяться как агент, способный к комплексообразованию по типу “молекулярной щели”. Описанные соединения позволяют исследовать тонкие механизмы слабых взаимодействий [148, 175]. Селективность этих соединений определяется дистанцией, типом первичных (водородные связи) и вторичных взаимодействий. Данная область обещает быть очень плодотворной, т.к. оперирует структурами с низким молекулярным весом, но богатыми различными функциональными группами.

Кооперативное связывание и “переключение”

За последнее время получили большое развитие направления кооперативного связывания и “переключающихся” систем. Проводятся интенсивные исследования фотохимических, термальных и редокс-переключений [5, 13, 15, 80, 250, 251, 253]. В частности, было показано, что стероидное производное ферроцена может формировать везикулы после окисления ферроцена $[\text{Fe}^{2+}]$ до феррициниума $[\text{Fe}^{3+}]$. Этот процесс обратим, что означает возможность захвата гостя внутрь везикулы и его освобождения после разрыва везикулы, вызванного редукцией.

Один из известных примеров кооперативного связывания - комплексующий мочевины агент Рейнхоудта [270]. В этой структуре ион уранила скомплексован селеном и в кооперации макроциклом обеспечивает соответствующие условия для комплексообразования мочевины (рис.19).

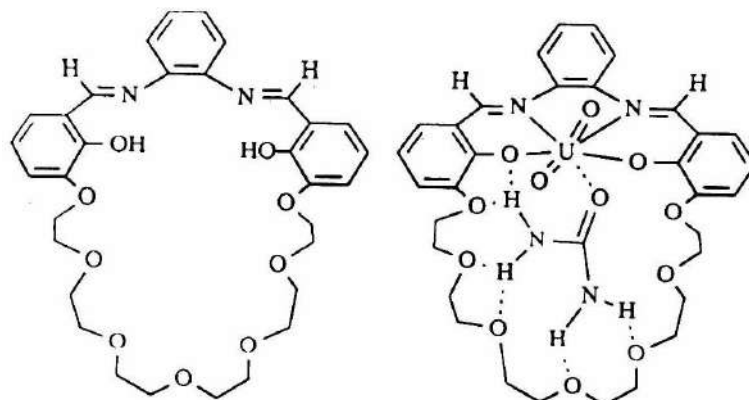


Рис.19. Кооперативное связывание уранил-иона и мочевины

Ребек продемонстрировал кооперативное связывание (аллостерию) в системе, содержащей бипиридин, используя ион одного металла, чтобы контролировать аффинность связывания иона другого металла [211, 231] или даже аниона [18, 27]. Работа ферроценового криптанда [12, 240] основана на подобном принципе: окисление ферроценового ядра до катиона понижает аффинность катионного связывания. Это свойство может быть использовано в трансмембранном транспорте. Предполагается, что “кооперативное” связывание, “переключение” и другие перечисленные выше характеристики молекул внесут значительный вклад в область исследования химии макроциклов, исследования мембранотропных свойств и их применения в практике.

Молекулярные основы функционирования ионофорных краун-эфиров в мембранах

Как уже было отмечено выше, макроциклические полиэфиры, наряду с ионофорными антибиотиками, образуют комплексы с ионами металлов и способны индуцировать катионный транспорт через различные мембранные системы [90, 101, 162, 187, 226, 243, 261-264, 395].

Транспортный процесс, индуцированный ионофорами, как уже отмечалось выше, характеризуется следующими основными этапами: комплексообразованием между молекулой ионофора и катионом, липофилизацией и диффузией комплекса в мембране, диссоциацией комплекса ионофор - катион, явлениями на границе раздела фаз

(мембрана-окружающий раствор). Существует строгое соотношение термодинамики и кинетики комплексообразования, липофилизации и межфазных явлений [307-309, 336, 382, 401, 402, 405]. Макроциклические полиэфиры представляют специальный интерес как индукторы ионного транспорта, так как широкие возможности изменения различных параметров синтетического лиганда, основанные на структурной модификации молекулы, позволяют получать ионофоры с заранее заданными свойствами.

Эффективный и селективный ионофор должен обладать следующими особенностями [227, 347, 376, 382]:

- обеспечивать высокую селективность комплексообразования и транспорта;
- обладать способностью к движению в виде комплекса с переносимым ионом от одной стороны мембраны к другой;
- обладать липофильностью;
- обеспечивать достаточно тонкие кинетические параметры всего процесса.

Мембранный транспорт предполагает высокую скорость движения во внутренней фазе мембраны (порядка 10^4 - 10^5 ионов в секунду).

Константы связывания иона должны быть оптимальными по величине, поскольку ионофор должен надежно связывать ион на одной стороне мембраны и легко отдавать его на другой (показывать быструю обменную кинетику). Следовательно, мощный комплексон не всегда является хорошим ионофором.

Транспортная селективность определяется как селективностью комплексообразования, так и обменной кинетикой. Как уже отмечалось, первое и четвертые особенности требуют противоположных лигандных свойств; жесткие лиганды образуют стабильные и селективные комплексы, но их катионный обмен медленный, в то время как гибкие лиганды дают кинетически и термодинамически лабильные комплексы. Скорости обмена в органической мембранной фазе предполагаются намного более медленными, чем в водной, следовательно гидрофилизационно-липофилизационный баланс ионофора будет также влиять на скорость транспорта, и определять распределение комплексов между двумя фазами.

Многие ионофоры имеют циклическую или псевдоциклическую структуру, причем при образовании комплекса ион включается во внутреннюю сферу молекулы; часто высокая избирательность

связывания иона обеспечивается за счет образования “сэндвичевых” или аналогичных структур с соотношением ионофор: катион, равным: 2:1, 3:2 и т.д. [37, 382]. Селективность связывания ионов при этом во многом определяется энергией их гидратации-дегидратации, поскольку ион в комплексе с ионофором частично или полностью десольватирован. Большинство известных ионофоров образуют с переносимым ионом весьма специфические комплексы, в которых ион связывается с полярными группировками молекулы ионофора за счет иондипольных взаимодействий; число связывающих ион лигандов, их пространственное расположение определяются законами координационной химии и специфичны для каждого иона.

Открытие и изучение ионофорных антибиотиков стимулировало широкие исследования синтетических комплексонов, ионофоров и каналоформеров. Синтез и исследования синтетических мембраноактивных соединений представляет собой отдельную область современной химии, далеко выходящую за рамки этой проблемы. Синтетические комплексоны, в частности, краун-эфиры успешно применяются в химической технологии и медицине, в качестве основы для производства ионселективных электродов, в качестве катализаторов в гомогенном катализе, экстрагентов для извлечения редких металлов и т.п.

Правильный подбор размера макроцикла, типа гетероатома и числа встроенных противоионов обеспечивает молекуле краун-эфира селективное комплексообразование с определенным катионом. Липофилизация молекулы краун-эфира и его комплекса с ионом играет ключевую роль для трансмембранного переноса иона. Учитывая, что краун-эфиры образуют устойчивые комплексы с ионами металлов, их влияние на проводимость бислоев в начале было несколько неожиданным [63, 183].

Дициклогексил-18К6 индуцировал увеличение проводимости липидного бислоя, хотя намного менее эффективно, чем ионофорные антибиотики. Это может быть объяснимо, если учесть, что молекула этого соединения не способна охватить и экранировать его так же хорошо, как молекулы классических ионофоров. Следовательно, увеличивая липофильность краун-эфиров и их комплексов с катионами, а также способность экранировать переносимый катион, создаются условия для успешного функционирования краун-эфиров как ионофорных соединений. Доказательством этого является то, что бис- (t-бутил)- дициклогексил-18К6, который имеет более высокий

коэффициент распределения, чем дициклогексил-18К6, повышает проводимость мембран при более низких концентрациях [183]. Это соединение обладает большим сродством с неполярным органическим растворителем и, вероятно, в силу большей способности накапливаться в бислое липидов оказывается на два порядка эффективнее в отношении способности увеличивать проводимость бислойных мембран. Результаты, полученные для бис-(*t*-бутил)-дициклогексил-18К6, позволили заключить, что в случае краун-эфиров необходимо принимать в расчет как равновесные параметры в водной фазе [178], так и образование комплексов высокого порядка в мембранной фазе. Действительно, было установлено, что в бислоях, модифицированных бис-(*t*-бутил)-дициклогексил-18К6, образуются “сэндвичевые” комплексы краун-эфир: катион состава: 2:1 и 3:1 [183, 376, 395]. В “сэндвичевых” комплексах ион значительно лучше экранирован от взаимодействия с анионом и растворителем, чем в эквимольных комплексах, обладает более высокой растворимостью в органических растворителях. Липофильная природа поверхности таких комплексов создает условия для их функционирования внутри мембраны, что, несомненно, способствует их участию в переносе ионов через бислойные мембраны, несмотря на сравнительно высокие константы устойчивости комплексообразования макроциклов. Экспериментальная проверка этой возможности и изучение влияния новых производных краун-эфиров на ионную проницаемость мембран, выяснение механизма трансмембранного переноса ионов, индуцированных краун-эфирами, была нашей основной целью.

Избирательность бислов, модифицированных краун-эфирами, в зависимости от их структурных особенностей

Бислойные мембраны формировали по методу Мюллера [192] из мембранообразующего раствора на отверстиях диаметром 200 мкм в перегородке двухкамерной тефлоновой ячейки. В экспериментах были использованы различные типы мембранообразующих растворов: раствор общих фосфолипидов бычьего мозга в хлороформ-метаноле [73], раствор окисленного холестерина, L-фосфатидилхолин соевых бобов (Sigma, Type-IV-S, USA) и хроматографически чистый яичный фосфатидилхолин. Перед экспериментом фосфолипиды из хлороформ-метанольного раствора (2:1) путем испарения растворителя переводили в раствор декана или *n*-октана до конечной концентрации фосфолипида 29 мг/мл. Формирование бислоя

контролировали при помощи осциллографа по увеличению емкостного тока в ответ на треугольный импульс с разверткой 10 в/сек до величины 300-400 пФ (0,23-0,32 мкФ/см²). Для измерения характеристик одиночных ионных каналов использовался метод фиксации мембранного потенциала.

Токи одиночных каналов регистрировались преобразователем “ток-напряжение” на основе операционного усилителя с сопротивлением обратной связи 10 ГΩ. Преобразователь соединялся с “trans” стороной камеры посредством Ag/AgCl электрода и солевого мостика (3 М KCl/3% агар). Таким образом, “trans” сторона камеры была соединена с виртуальной землей. Схема установки представлена на рис.20.

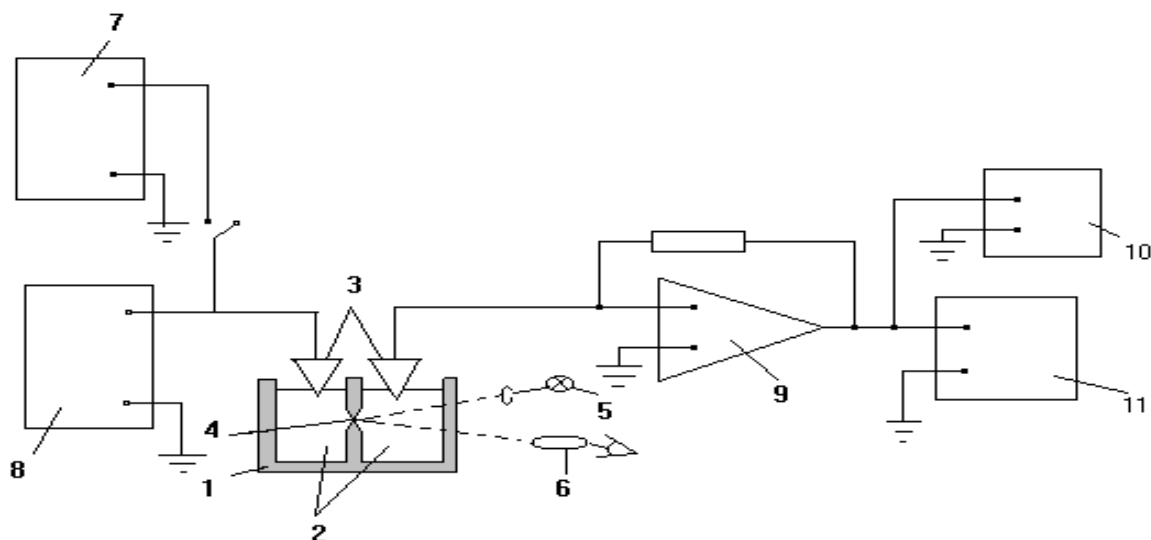


Рис.20. Схема установки для электрических измерений параметров бимолекулярных фосфолипидных мембран:

- 1. тefлоновая ячейка**
- 2. водные растворы**
- 3. хлорсеребряные электроды**
- 4. бислойная липидная мембрана**
- 5. источник освещения**
- 6. лупа (БМС-2)**
- 7. генератор импульсов Г5-79**
- 8. источник постоянного напряжения**
- 9. операционный усилитель**
- 10. осциллограф С1-117**
- 11. потенциометр самопишущий КСП-4**

Противоположная сторона камеры (cis) соединялась с источником напряжения посредством Ag/AgCl электрода и солевого мостика (3 М KCl/3% агар). Визуализация токов осуществлялась с помощью самописца. Потенциалы реверсии были коррелированы на присутствие диффузного потенциала в бионных условиях и в системах с солевым градиентом. Разность электродных потенциалов не превышала ± 1 мВ.

Известно, что в основе биологических эффектов ионофоров различной природы лежит также их способность селективно увеличивать проницаемость мембран для катионов. Экспериментальные данные, относящиеся к эффектам и механизму действия ионофорных молекул, показывают, что эти вещества одинаково активны как на биологических, так и искусственных мембранах. В связи с этим интерпретация эффектов ионофорных соединений на биологических мембранах, как правило, существенно облегчается с привлечением данных, полученных на модельных и, в первую очередь, на плоских бислойных мембранах.

Молекулы краун-эфиров не способны полностью охватывать ион и экранировать его от молекулы сольвента так же хорошо, как молекулы ионофорных антибиотиков. Тем не менее, они индуцируют ионную проводимость мембран как ионофоры, путем связывания с катионом и увеличением его растворимости в мембранной фазе.

Это возрастание растворимости достигается как липофильной природой комплекса, так и способностью лиганда экранировать заряд и увеличивать его эффективный радиус с соответствующим уменьшением энергии, необходимой для переноса иона в область мембраны с низкой диэлектрической постоянной.

Для выявления природы селективности бислоев, модифицированных краун-эфирами, нами были ранее изучены макроциклические полиэфиры, отличающиеся размером полости макроцикла, длиной, количеством и природой заместителей в бензольных кольцах [376, 395].

Такой структурно-функциональный подход позволил оценить избирательность и проводимость мембран на молекулярном уровне. Очевидно, что необходимыми критериями для проявления ионофорных свойств являются, как уже отмечалось выше, липофильность краун-эфиров и их комплексов с переносимым ионом, подвижность образованных в мембране комплексов, диссоциация этих комплексов и эффекты на границе раздела фаз (мембрана-окружающий раствор).

Сравнительный анализ всех этих условий применительно к гомологическим рядам (соединения 8т-14т, 15ц-20ц и 21т-29) различных краун-эфиров способствовал направленному синтезу и изучению макроциклических полиэфиров с заранее заданными свойствами, в том числе и поиску новых каналоформеров [376, 395].

Данные по влиянию различных концентраций краун-эфиров 2, 4, 6 и 8т, различающихся размером полости макроцикла, на проводимость бислов в присутствии ионов калия показывают, что кривые при определенной концентрации краун-эфиров имеют различные углы наклона, которые изменяются в зависимости от их концентрации. Изменение угла наклона на кривых, отражающих связь мембранных эффектов с концентрацией макроциклических полиэфиров, обусловлено неодинаковой при разных концентрациях краун-эфиров стехиометрией комплексообразования в мембране и свидетельствует о том, что в акте переноса иона через мембрану участвует более чем одна молекула краун-эфира [376].

Таким образом, действие этих краун-эфиров на бислои по сравнению с ионофорными антибиотиками отличается несоответствием между отношениями проницаемостей P_i/P_c и проводимостей g_i/g_c бислов при относительно высоких концентрациях переносимых ионов. В совокупности с колоколообразной зависимостью проводимости мембраны от концентрации переносимых ионов эти данные позволяют констатировать, что в мембране образуются сложные “сэндвичевые” комплексы, за счет которых и осуществляется трансмембранный перенос ионов [395].

С увеличением размера полости макроцикла от 15-члена к 18-члену натрий/цезиевая селективность мембран уменьшается в 130 раз. Важная с биологической точки зрения калий/натриевая селективность мембраны растет с увеличением размера полости макроцикла, однако эта зависимость не является монотонной [376].

Данные по исследованию диалкил- и ди- α -оксиалкил производных-ДБ18К6 (8т, 9т, 10т, 11т, 12т, 13т, 15ц, 16, 17, 18, 19ц, 20ц, соответственно) на калиевую проводимость бислов в зависимости от концентрации исследуемых соединений показали, что с ростом длины заместителей в бензольных кольцах этих соединений способность их переносить ионы калия через мембрану уменьшается, что вызвано, по видимому, уменьшением подвижности комплексных катионов в мембране и снижением сродства к ионам калия у длиноцепочных производных [376, 395].

Доказательством этого предположения явились результаты исследований этих соединений на проводимость бислоев в зависимости от концентрации ионов калия. Действительно, с ростом длины боковых цепей заместителей в бензольных кольцах молекул максимумы зависимостей на полученных кривых смещаются в область более высоких концентраций ионов калия [376].

Как показал анализ зависимости влияния длины заместителей на ионофорные свойства исследованных производных, K^+ -проводимость бислоев с увеличением длины диалкил и ди- α -оксиалкилпроизводных-ДБ18К6 линейно уменьшается. На митохондриальных мембранах диалкил- и ди- α -оксиалкилпроизводные-ДБ18К6 с длиной углеводородной цепи 2-8 атомов углерода также проявляют, в основном, свойства калиевых ионофоров [395]. В отличие от данных на бислоях, в случае митохондрий выявляется оптимальная длина боковой цепи, которой соответствует максимальная K^+ -ионофорная активность. Для диалкилпроизводных-ДБ18К6 это соответствует 4, а для ди- α -оксиалкилпроизводных-ДБ18К6 - 6-7 атомам углерода в боковой цепи.

Диацилпроизводные-ДБ18К6, которые на бислоях, митохондриях и мембранах саркоплазматического ретикулума, проявляют свойства Ca^{2+} -ионофоров, наблюдается одинаковый характер зависимости проводимости этих мембран от длины боковых заместителей. Наибольшим ионофорным эффектом по ионам Ca^{2+} обладают диацилпроизводные-ДБ18К6, содержащие цепочку из 3-4 атомов углерода при бензольных кольцах (дибутирил- и дивалерил-ДБ18К6).

Таким образом, было показано, что мембраноактивные свойства краун-эфиров проявляют зависимость от длины и природы заместителей в бензольных кольцах, что связано с влиянием их на растворимость краун-эфиров в липидной фазе и наличием определенных стерических требований при взаимодействии двух и более молекул краун-эфира с образованием "сэндвичевого" комплекса с катионом внутри.

Связывание диацилпроизводными-ДБ18К6 двухвалентных катионов, очевидно, происходит с участием свободных электронных пар карбонильных кислородов. Показано, что отсутствие кетонной группы в заместителях при бензольных кольцах или ее замена на оксигруппу существенно снижают или полностью исключают мембранную активность, зависящую от двухвалентных катионов.

Предполагается, что, наряду с размером полости макроцикла, природой и длиной боковых заместителей, дополнительным струк-

турным параметром молекулы краун-эфира, влияющим на избирательность и проводимость бислоев, может быть изменение количества боковых цепей заместителей в бензольных кольцах.

В связи с этим было изучено действие на электрические параметры бислоев краун-эфиров: 32, 34ц, 38, 39, 40-49. Полученные результаты, рассчитанные по величинам проводимостей и бионных потенциалов, характеризуют катионную специфичность по отношению проводимостей и ряд избирательности по относительным коэффициентам проницаемостей. Исследование особенностей проводимости бислоев в присутствии различных бутилпроизводных-ДБ18К6 показали, что, в отличие от диалкил- и ди- α -оксиалкилпроизводных-ДБ18К6, краун-эфир 33т проявляет ионофорную активность по двухвалентным катионам. Установлено, что мембраны, модифицированные этим соединением, имеют проводимость преимущественно по одновалентным ионам, включая H^+ . Из этих данных следует, что липидные мембраны, модифицированные 4', 4''-дивторбутил-ДБ18К6 имеют преимущественно Mg^{2+} проводимость по сравнению с другими двухвалентными ионами.

Катионная специфичность бислоев при этом для указанных катионов определяется последовательностью: $Mg: Sr: Mn: Ca: Ba = 1: 0.41: 0.28: 0.21: 0.13$ [376, 395].

Исследуемые краун-эфиры 35, 36, 37 по данным ЯМР, представляют собой смесь структурных изомеров (4', 4''- 4', 5''-дивторбутил)-ДБ18К6. В связи с тем, что вторбутильная группа имеет асимметрический атом углерода, эти продукты могут представлять собой смесь структурных изомеров [106].

“Транс”- и “цис”- изомеры дивторбутил-ДБ18К6 в отдельности проявляли магний-ионофорную активность на бислоиных мембранах [350], в то время как смеси изомеров этих соединений такой активностью не обладали.

Этот экспериментальный факт можно объяснить следующим образом. В отличие от диакил-, вторбутильные заместители не могут участвовать в комплексообразовании с катионами металлов, так как не имеют активных центров. Поэтому в случае алкилпроизводных-ДБ18К6 комплексообразование проходит лишь по макроциклу. Роль алкильных заместителей сводится к увеличению липофильности и электронной плотности макроцикла, что увеличивает его комплексообразующую способность. Избирательность же комплексообразования, по-видимому, связана с конформацией, которую может принять макроцикл, и зависит от разветвленности и взаимного располо-

жения заместителей. На моделях Стюарта-Бриглеба [395] для “транс”- и “цис”- изомеров дивторбутил-ДБ18К6 видно, что более плотная упаковка достигается при получении “сэндвича” из двух молекул одного и того же изомера (любого – “цис”- или “транс”-). В случае же смеси изомеров алкильные заместители мешают друг другу и не дают двум молекулам подойти достаточно близко. То есть, присутствие второго изомера как бы “разрыхляет” упаковку и катион магния, ионный диаметр которого (1,30-1,48) Å примерно в два раза меньше размера полости макроцикла, не образует координационные связи, а “проскакивает” через макроцикл. Этим можно объяснить отсутствие заметной магниевой активности у смесей изомеров.

Таким образом, показана возможность с помощью структурных модификаций молекулы краун-эфиров придавать им мембраноактивные свойства с определенной заданной ионной избирательностью.

Анализ литературных данных и собственных результатов показывают, что для проявления ионофорных свойств соответствие между размером полости макроцикла и радиусом иона не должно иметь решающего значения. Это проявляется в случае диэтил-ДБ30К10, который при относительно большом радиусе полости индуцирует проводимость по одновалентным катионам на бислоях, в основном, за счет высокой конформационной подвижности молекулы краун-эфира.

Адсорбция двухвалентных катионов на поверхности отрицательно заряженных бислоев приводит к уменьшению индуцированной краун-эфирами проводимости для одновалентных ионов. Этот фактор может быть использован для количественной оценки происходящих изменений потенциала двойного слоя.

В силу того, что плоскую бислойную мембрану можно рассматривать как два сложенных вместе монослоя, естественно, что между ее внутренней зоной и водными растворами существует разность электрических потенциалов. Поэтому концентрация катионных комплексов краун-эфиров во внутренней зоне бислойных мембран определяется не только их гидрофобностью, но и скачком потенциала на границе раздела фаз. По-видимому, изменяя величину этого потенциального барьера, можно регулировать отношение коэффициентов распределения свободных молекул и комплексов и, таким образом, направленно воздействовать на соотношение скоростей отдельных стадий переноса катионов, индуцированного краун-эфирами.

Из приведенных выше данных следует, что электродонорные заместители в бензольных кольцах ДБ18К6 придают соединениям калий-ионофорную активность на плоских бислойных мембранах. С увеличением длины заместителей в бензольных кольцах эта активность для диалкил- и ди- α -оксипроизводных - ДБ18К6 монотонно уменьшается. Введение акцепторных заместителей в бензольные кольца сообщают краун-эфирам свойства ионофоров двухвалентных катионов. Для диацетилпроизводных-ДБ18К6 наиболее эффективными ионофорами по Ca^{2+} на бислоях являются краун-эфиры, содержащие цепочку из 3-4 атомов углерода в боковой цепи. Mg^{2+} -ионофорной активностью обладают отдельно “транс”- и “цис”-изомеры дивторбутил-ДБ18К6, а не смеси изомеров, что объясняется гидрофобным взаимодействием заместителей в смеси изомеров.

Взаимосвязь структура - калий ионофорная активность краун-эфиров

Ионофорные свойства представленных краун-эфиров изучены достаточно хорошо [381, 395, 399, 401]. Задача получения эффективных и селективных ионофоров на основе макроциклических молекул остается актуальной, поскольку соединения этого класса находят самое широкое применение в различных областях техники, медицины и сельского хозяйства, а также как инструменты в химических и биологических исследованиях.

В связи с тем, что “скрининговый” поиск эффективных ионофоров требует весьма значительных материальных и временных затрат, представляется перспективным целенаправленное конструирование соединений с заданными свойствами на основе установления качественных и количественных зависимостей “структура - проявляемая активность” (СА). Следует отметить, что применительно к краун-эфиром попытки установления таких зависимостей предпринимались и ранее. Так, на основе экспериментальных и теоретических исследований было выведено уравнение, связывающее проводимость (G) бислойных липидных мембран, модифицированных краун-эфиром, с его коэффициентом распределения в системе вода-мембрана (k_s):

$$G = F^2/d \cdot u \cdot a (k_s c)^k K_{js}, \quad (1)$$

где u , k , K_{js} - подвижность, стехиометрия и гетерогенная константа ассоциации комплекса, a - и c - концентрация иона и переносчика в водной фазе [183]. Нетрудно видеть, что область приме-

ния данного уравнения весьма ограничена, так как она описывает связь ионофорной активности с липофильностью только при условии неизменности параметров остальных. Тем не менее, основной вывод, следующий из уравнения (1), получил экспериментальное подтверждение в работе по изучению K^+ -ионофорных свойств производных Б15К5, Б186 и ДБ3010 на эпидермальных отростках *Commelina Communis* [341]. Проведенное исследование позволило авторам установить прямую корреляционную зависимость между K^+ -ионофорной активностью ($\log 1/c$) и коэффициентом распределения краун-эфиров в системе вода-октанол ($\log P$):

$$\log 1/c = 1,85 + 1,02 (\log P); \quad (2)$$

$$R = 0,97, SD = 0,36, n = 10,$$

где R - коэффициент корреляции, SD – среднее квадратичное отклонение, n – число точек (веществ).

Необходимо отметить, что уравнение (2) получено с учетом стехиометрии комплексообразования производных Б15К5 и не включает каких-либо параметров, характеризующих комплексообразующие свойства макроциклов. Последние обстоятельства, противоречащие уравнению (1), авторы публикации связывают с недостаточной величиной варибельности величины K_{js} в изученном ряду соединений.

В настоящей работе исследована зависимость “структура - K^+ -ионофорная активность” краун-эфиров на более широкой выборке соединений с использованием программного комплекса “КЛАРАС”, позволяющего проводить внеэкспериментальное описание структуры в автоматизированном режиме, а также анализировать разнородные массивы данных [384]. Сведения об активности структурной формулы использованных соединений, краткое описание экспериментальной и расчетной части представлены ниже. Кроме того, в исходный массив соединений были включены не обладающие K -ионофорной активностью 12К4, 15К5, 18К6, 21К7 и 24К8.

Проведенные эксперименты показали, что из 51 представленного выше соединения 30 обладают различной K^+ -ионофорной активностью и 21 является неактивным. При этом, интервал изменения активности изученных краун-эфиров достаточно широк для постановки задач установления как качественных, так и количественных зависимостей СА. Вместе с этим, литературные данные [341, 395], а также результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что в рамках общей выборки могут существовать несколько групп молекул, отличающихся друг от друга особенностями

комплексобраования, механизма реализации ионофорного эффекта и влияния заместителей на конформацию макроциклического остова. Поскольку это обстоятельство значительно усложняет нахождение количественных зависимостей для всего массива данных к представленным в настоящей работе результатам, нами применена дискриминанта - регрессионная модель связи СА.

На первом этапе с помощью пошагового дискриминантного анализа были отобраны наборы наиболее существенные для K^+ -ионофорной активности дискрипторов, из которых сформирована соответствующая модель описания структуры (МОС). Как следует из результатов, полученная модель позволяет со 100%-ой достоверностью классифицировать все изученные соединения на активные и неактивные.



Рис.21. Гистограммы распределения проекций векторов, описывающих структуру соединений в дискриминантном пространстве дискрипторов на направляющий вектор гиперплоскости, разделяющий соединения на активные и неактивные калиевые ионофоры (а – для всех соединений, б, в, г – для веществ, содержащих ацильную группу, производных B15K5 и ДБ18К6, соответственно)

В пространстве переменных МОС изучено распределение соединений относительно дискриминантной гиперплоскости, разделяющей соединения на активные и неактивные. Результаты, представленные на гистограмме (рис.21.), где по оси ординат отложено число структур, имеющих определенную проекцию на ось направляющего вектора гиперплоскости.

Существование двух выраженных кластеров в группе активных соединений свидетельствуют о разнородности исходного массива по отношению к характеру проявляемой активности. При этом в кластер

1 вошли моно- и ди- (транс)-производные краун-эфиров, имеющие заместители с длиной цепи в 2-4 углеводородных атома (всего 7 соединений). Остальные ионофоры вошли во второй кластер.

Следующий этап исследований связан с установлением количественных регрессионных зависимостей ионофорной активности краун-эфиров от рассчитанных параметров структуры. Как и ожидалось, построение таких зависимостей для всей выборки соединений оказалось невозможным из-за разнородности исходного массива (коэффициент корреляции не превышал значения 0,66). Однако, использование результатов предварительно проведенной кластеризации позволило получить достоверное регрессивное уравнение для соединений, включенных в первый кластер:

$$\log 1/c = 5,8 + 7,63 (FP); \quad (3)$$

$$R = 0,95, SD = 0,16, F = 48, n = 7$$

и существенно улучшить параметры регрессии, описывающей связь СА для соединений, включенных во второй кластер:

$$\log 1/c = 1,5 + 14 (DP) - 0,05 (ST); \quad (4)$$

$$R = 0,84, SD = 0,44, F = 24, n = 23$$

где FP – поправочный параметр Крамера, не имеющий прямого физического смысла, DP – параметр Крамера, отражающий способность молекулы к деформации, ST – индекс Шеннона TIC [306], имеющий теоретико-информационный характер и отражающий внутреннее разнообразие структуры [392], F – критерий Фишера.

Статистические достоверные однопараметровые регрессионные зависимости получены также для всех ацильных соединений (EDF/N – сумма электроннодонорных факторов всех гетероатомов):

$$\log 1/c = 1,1 + 10 (EDF/N); \quad (5)$$

$$R = 0,97, SD = 0,13, F = 79, n = 7$$

и для производных бензо-краун-5:

$$\log 1/c = -2,9 + 0,68 (\log P); \quad (6)$$

$$R = 0,84, SD = 0,2, F = 38, n = 7$$

Интересно отметить, что уравнение (5) и (6) взаимно дополняют друг друга, поскольку параметр EDF/N имеет связь с комплексообразующими свойствами макроциклов (характеризует энтальпию взаимодействия с электроноакцепторами), а $\log P$ отражает липофильность соединений. Наряду с этим, при анализе уравнений (5) и (6) необходимо принимать во внимание возможность закоррелированности параметров EDF/N и $\log D$, так как вариация усредненной электроннодонорной характеристики гетероатомов реализуется в данном случае вследствие изменения длины заместителя

в ацильной группе. В любом случае полученные результаты подтверждают сделанное ранее предположение [374, 391] том, что вариация заместителей в ряду производных Б15К5 и Б18К6 не оказывает существенного влияния на механизм реализации K^+ -ионофорного эффекта (уравнение 2).

По-видимому, более сложное влияние оказывают заместители на ионофорные свойства производных ДБ18К6. Как и во всех остальных случаях сформированная с помощью выделения наиболее значимых дескрипторов МОС позволяет со 100%-ой достоверностью классифицировать эти соединения на активные и неактивные на новом качественном уровне. В то же время нам не удалось получить достоверной количественной зависимости СА для всех производных ДБ18К6. Раздельная обработка массивов соединений, содержащих заместители только в “цис”- или только в “транс”- положении, приводит к нахождению статически достоверных регрессионных зависимостей. Интересно, что добавление монозамещенных-ДБ18К6 в исходную выборку цис-производных заметно улучшают параметры регрессии, а совместная обработка моно- и транс-замещенных соединений приводит к ухудшению результатов. В качестве примера можно привести регрессионную зависимость K^+ -ионофорной активности транс-производных ДБ18К6 от теплоты испарения H_v (рассчитываемый параметр, характеризующий межмолекулярные взаимодействия):

$$\begin{aligned} \log 1/c &= 8,93 - 0,9 (H_v); \\ R &= 0,98, SD = 0,2, F = 183, n = 8 \end{aligned} \quad (7)$$

Таким образом, сформированная в настоящей работе модель описания структуры позволяет однозначно дискриминировать производные представленных рядов краун-эфиров на активные и неактивные. Для отдельных групп соединений, включающих практически все исследованные краун-эфиры, найдены достоверные количественные зависимости K^+ -ионофорного эффекта от параметров строения [374].

Анализ полученных результатов показал, что вариация ацильных и алкильных заместителей в ряду производных Б15К5 и Б18К6 не приводит к изменению основных закономерностей СА в данном ряду соединений. В случае производных-ДБ18К6 влияние заместителей на проявляемую активность имеет более сложный характер и, по-видимому, затрагивает механизм реализации ионофорного эффекта, включая особенности комплексообразования и взаимодействия с мембраной.

Глава III

КАНАЛОФОРМЕРЫ

Слабые взаимодействия и ионные каналы

С позиций исследования механизмов трансмембранного переноса ионов перспектива поиска, синтеза и дизайна каналоформеров намного более заманчива, чем создание новых ионофоров. Были осуществлены попытки создать различные катионные каналы [1, 34, 51, 75, 76, 100, 126, 142, 188, 198, 238, 239, 245, 255, 354, 369, 370], анионпроводящие структуры [43, 70, 71, 210] и редокс-активные [49, 50, 58, 59, 109-112, 145]. Большей частью эти структуры напоминали тоннели, имитирующие естественный ион-проводящий канал, формируемый грамицидином. Модель канала, приведенная в работе [255], имела сферическую форму.

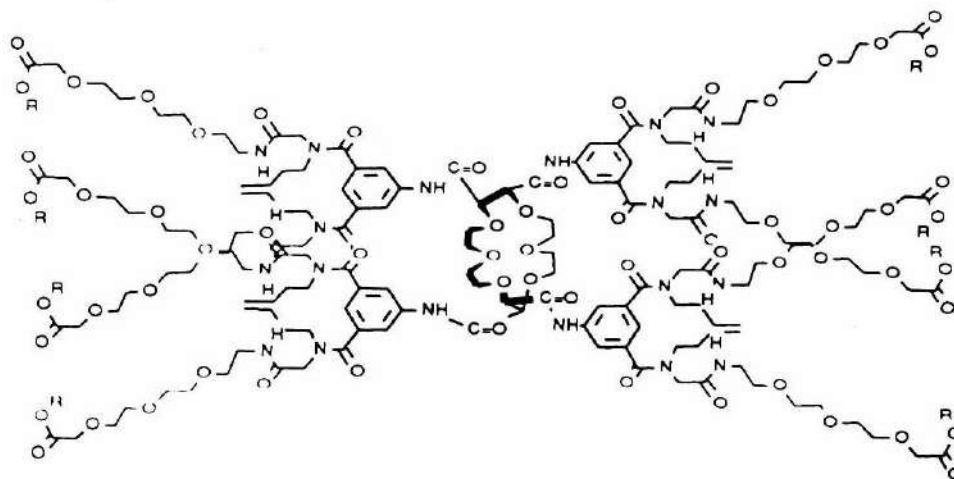


Рис.22. Молекулярная структура “чандла”

Интересным примером являлись так называемые “чандлы” (рис.22.), представленные в работе [142]. Попытки создать молекулы каналоформеры были проделаны Файлзом [34] и Фурхопом [76, 77] (рис.23).

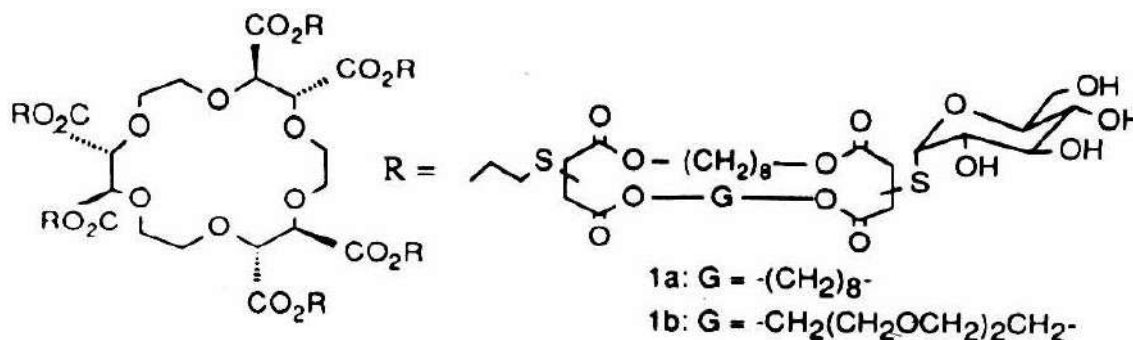


Рис.23. Примеры ранних попыток создания молекул каналоформеров

При рассмотрении проводимости бислоев канального типа, индуцированных краун-эфирами [84-86], одним из основных этапов является процесс движения иона по каналу. Маловероятно, что катион может “перескочить” с одного конца мембраны на другой без участия каналоформерных молекул. Например, в грамицидиновом канале имеются участки (карбонильные группы), которые могут временно сольватировать катион во время его движения по каналу. Карбонильные группы обращены внутрь и “перистальтические” движения продвигают катион по каналу от карбонила к карбонилу [90,203]. Электронные пары карбонильных групп сольватируют катион и на какое-то время стабилизируют его. Проблема создания ионных каналов проводимости на основе краун-эфиров, в основном, определяется решением следующих вопросов:

- могут ли краун-эфирные макроциклы функционировать в липидных мембранах как полярные группы?
- если да, могут ли третичные макроциклы быть использованы как центральное эстафетное звено или они будут слишком полярны?
- как далеко друг от друга могут располагаться макроциклы, чтобы пронизать бислой?
- сколько мест связывания необходимо для катиона и какие промежутки между ними являются оптимальными?
- какую роль играет вода в этих комплексных системах?

Многочисленные исследования в этой области проводились Г.В. Гокелем и сотр. [87, 93, 94, 97, 98, 102]. Им предложена концепция создания катионных каналов на основе краун-эфиров:

- на каждой из поверхностей мембраны должны находиться макроциклы краун-эфиров,
- эти краун-эфиры должны быть ковалентно связаны,
- к противоположным сторонам каждого краун-эфира должен быть привязан гибкий “хвост”, придающий структуре гидрофобность.

Одна из первых подобных структур была создана на основе трех 4, 13 диаза-18-краун-6, соединенных углеводородными цепочками из 12 звеньев и заканчивающихся такими же цепочками (рис.24).

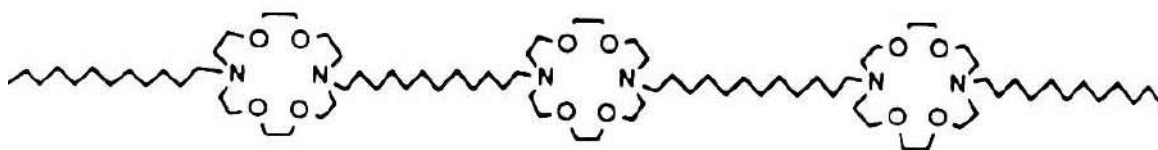


Рис.24.

Предполагалось, что если полученная макромолекула достаточно гидрофобна и встраивается в мембрану то, она обретает структуру приведенную на рис.25.

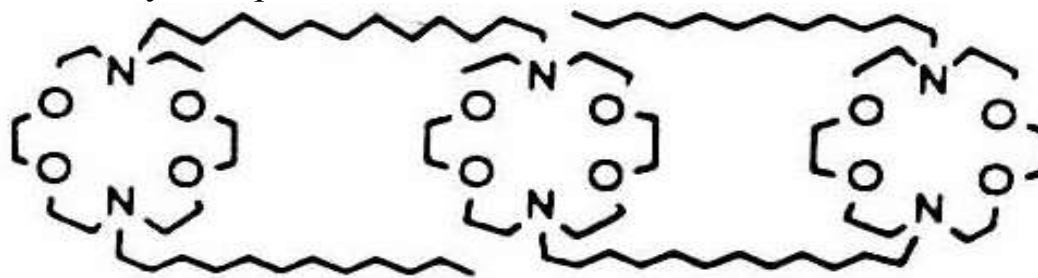


Рис.25.

Очевидно, что такая сложная система может иметь неограниченные структурные и конформационные возможности. Методом ЯМР, в котором измерялся ^{23}Na [49], было установлено, что исследуемое соединение [197] обладает катионной проводимостью, хотя и в 100 раз худшей, чем грамицидин [231]. Особенно интересно заметить, что существует разница в порядке кинетики для различных ионпроводящих систем. Как известно, грамицидин показывает кинетику второго порядка, что вполне объяснимо, т.к. при образовании ионного канала молекула грамицидина димеризуется. Было обнаружено, что приведенное выше соединение также показывает кинетику второго порядка, этот факт пока еще не нашел своего объяснения.

Исследование каналоформерных свойств краун-эфиров на плоских бислойных мембранах

- Ионные каналы типа “инвертированной” поры или липидные каналы

Особую роль в трансмембранном переносе ионов играют так называемые “косвенные” участники ионного транспорта, которые управляют работой ионофоров и каналоформеров, определяют их синтез, перестройку структуры, деградацию. Установлено, что эту роль могут выполнять прооксиданты и антиоксиданты: сильное электрическое поле, ионы Fe, аскорбат, глутатион, гидрофобные витамины E и P и т.д.. Известно также, что роль ион-транспортирующих систем могут выполнять фосфатидная кислота, кардиолипид, продукты окисления фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, холестерина, окисленные жирные кислоты и некоторые простагландины и т.д. [190, 335, 376].

Реконструируя различные “канальные” молекулы, часто используют плоские бислои из фосфатидилхолинов с холестерином или из окисленного холестерина. В обоих случаях регистрируется собственная “возбудимость” [114, 335]. В этой связи возникает вопрос: не являются ли эти реконструируемые соединения не прямыми участниками формирования каналов, а лишь инициаторами образования дискретных ионпроводящих липидных структур?

Наличие каналоформеров различной молекулярной структурой позволило предположить существование общего по своей физической природе механизма возникновения дискретной проводимости [386-388]. Главной особенностью этого предположения о природе трансмембранного канала является наличие дефекта упаковки молекул бислоя типа “инвертированной поры” или липидного канала. Появление ионного канала подобной природы могут индуцировать природные и синтетические молекулы, обладающие поверхностной активностью, способные при этом приводить к нарушениям его упаковки.

Различают три этапа в действии поверхностноактивных веществ (ПАВ) на биомембраны в зависимости от действующей концентрации [335]. На начальных этапах при низких концентрациях ПАВ происходит их встраивание в мембранный слой и наступает “пробой” осмотического барьера. Этому состоянию могут соответствовать флуктуации проводимости мембран, свидетельствующие о формировании каналов проводимости.

При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ идет распад мембран на смешанные мицеллы ПАВ-белок и сольubilизация липопротеидных комплексов. И, наконец, итогом действия ПАВ на биомембрану является отделение липидов от белков.

Возникающие в процессе перекисного окисления ненасыщенных липидов продукты также приводят к возникновению зон неупорядоченности в липидных бислоях, индукция канальной проводимости вызванная этим процессом изучалась в работах [335, 386]. Неионный детергент тритон X-100 способствует образованию флуктуаций проводимости бислоев типа одиночных ионных каналов [388]. Такая аргументация вопроса и полученные нами экспериментальные данные стимулировали поиски канальной проводимости бислойных мембран, индуцированных краун-эфирами и некоторыми их аналогами, обладающими поверхностноактивными свойствами.

На рис.26 приведены возможные механизмы трансмембранного переноса ионов через плоские липидные мембраны, индуцированные различными мембраноактивными соединениями [79].

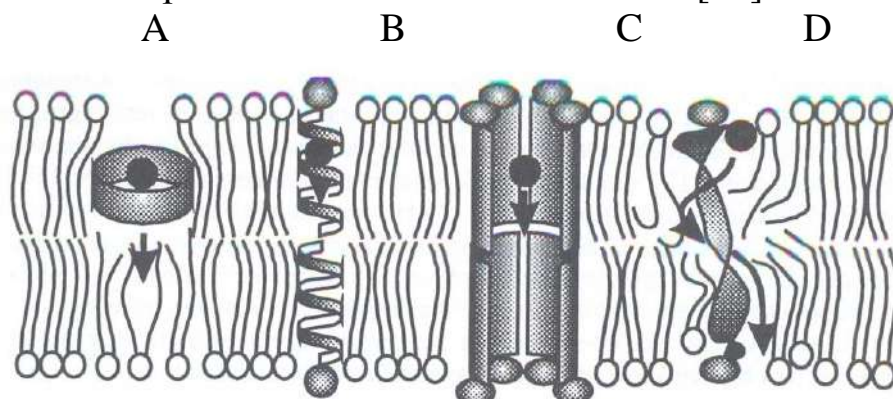


Рис.26. Возможные механизмы ионного транспорта на плоских бислойных мембранах: А – переносчик (ионофор), В – ионный канал, С – ионный канал на основе молекулярных ассоциатов, D – ионный канал на основе мембранной деструкции

Следует отметить, что при относительно небольших концентрациях краун-эфиров, наряду с интенсивным ($6 \cdot 10^{-5} \text{M}$) разрушением бислоев, вызванным поверхностно-активным действием краун-эфиров, наблюдаются скачкообразные изменения проводимости мембран. При более низких концентрациях краун-эфиров удастся зарегистрировать стабильные дискретные уровни изменения трансмембранного тока.

Результаты наших экспериментов показали, что 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6 и бис-о-метоксифенокси-диэтиловый эфир проявляют кальций - каналоформерные свойства на плоских бислойных мембранах. На рис. 27 и 28 приведены записи трансмембранного кальциевого тока, вольт-амперные характеристики и функции распределения амплитуд кальциевых каналов индуцированных 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол - ДБ18К6 (краун-эфир 50) и бис-о-метоксифенокси -диэтиловый эфир (краун-эфир 51), соответственно.

Видно, что в бислоях образуются достаточно большие по проводимости ионпроводящие структуры, порядка 200 Ps и более с линейными вольт-амперными характеристиками. Как отмечалось ранее, размер полости макроцикла, природа, длина и количество заместителей в бензольных кольцах ДБ18К6, в основном, определяют ионную проводимость и катионную специфичность мембран, модифицированных ионофорными краун-эфирами [376, 395].

Однако остается неясным вопрос, что же является определяющим в образовании канальной проводимости молекулами макроциклической и псевдоциклической структуры. Какие особенности молекулярной структуры или их физико-химических свойств отвечают за этот процесс? Получение ответа на эти вопросы к настоящему времени несколько затруднительно из-за недостаточности данных по каналообразующим характеристикам исследованных соединений и единого подхода для объяснения этого явления (сопоставление результатов в одинаковых условиях экспериментов, на одних и тех же липидах и т.д.).

По-видимому, для понимания природы каналообразования заметную помощь может оказать сравнительный анализ поверхностно-активных [327, 368], комплексообразующих и мембранотропных характеристик краун-эфиров, проявляющих ионофорные свойства [99, 101, 103, 395] с аналогичными параметрами этих соединений, индуцирующих на бислоях канальный тип проводимости [84, 97, 98, 103, 275, 276, 280].

Установлено, что добавление $(3-6)10^{-5}M$ исследуемых каналоформерных краун-эфиров ведет к интенсивному росту проводимости бислойных мембран для ионов кальция. Дальнейшее увеличение концентрации краун-эфиров в омывающем мембрану растворе уменьшает стабильность бислоев и, в конечном итоге, приводит к ее разрыву.

Краун-эфиры индуцируют канальную проводимость через бислойную мембрану из общих фосфолипидов мозга в интервале $pH = (4.5-8)$. Необходимо отметить, что сдвиг pH в кислую или щелочную область от этого интервала приводит к уменьшению стабильности мембран. Такая зависимость стабильности мембраны от pH находится в согласии с предположением, что при этом образуются фосфатидная кислота, которая в совокупности с действием поверхностноактивных краун-эфиров может приводить к разрыву бислоев.

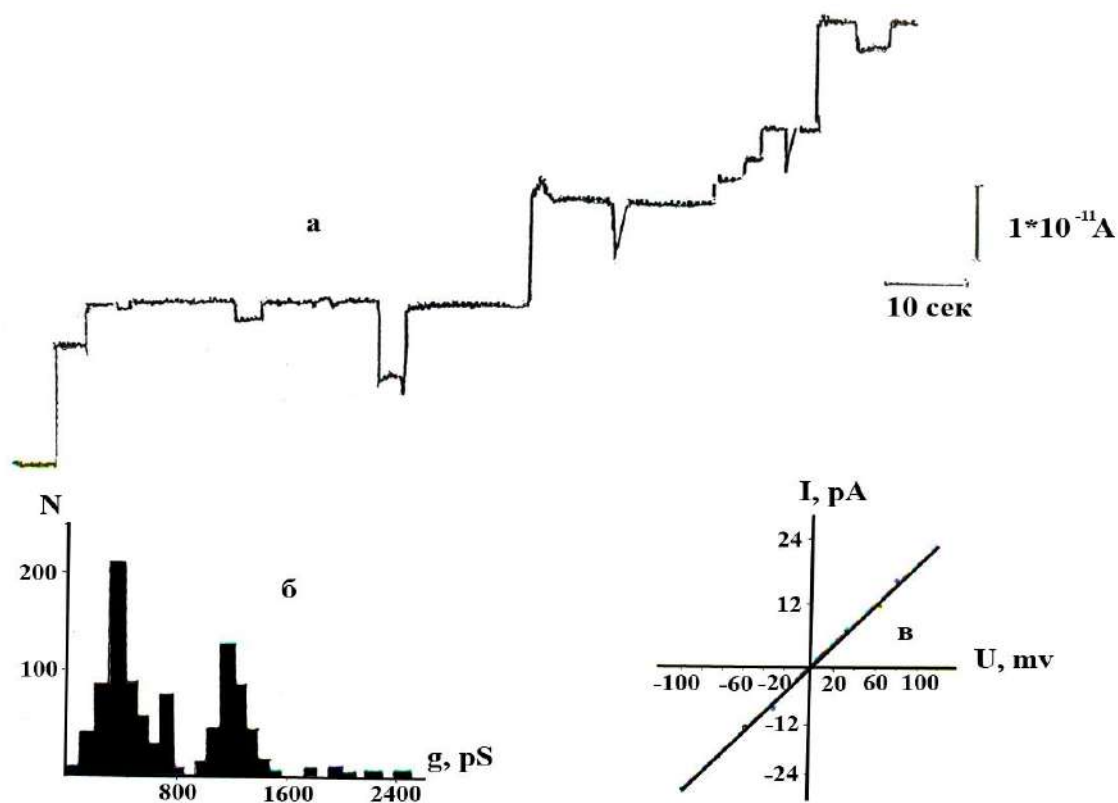


Рис.27.

а) Записи трансмембранного кальциевого тока через одиночные ионные каналы на бислоях, индуцируемые бис-о-метоксифеноксидиэтиловым эфиром (ТрисНС1-25мМ, CaCl_2 - $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, pH-7.5, краун-эфир - $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $U = 50 \text{ mV}$).

б) Гистограмма распределения кальциевых каналов проводимости (по оси абсцисс - проводимость каналов, по оси ординат - количество каналов с проводимостью, пределы которых указаны на абсциссе, остальные условия те же).

в) Вольт-амперная характеристика одиночного кальциевого канала (концентрация ионов Ca^{2+} - $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, остальные условия те же).

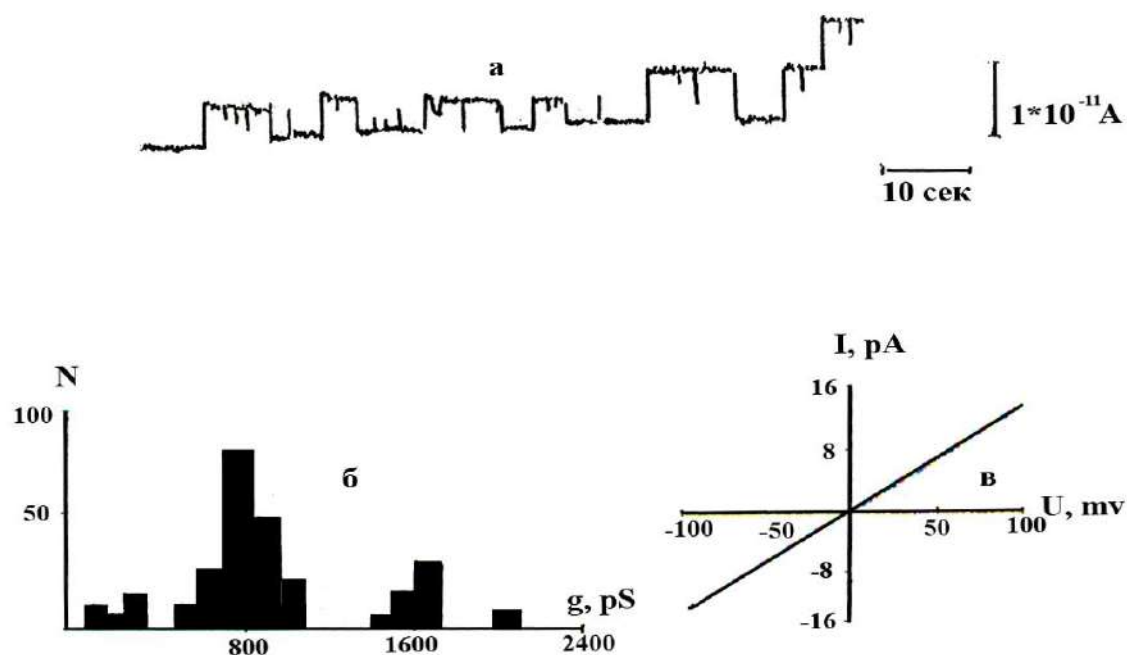


Рис.28.

а) Записи трансмембранного кальциевого тока через одиночные каналы на бислоях, индуцируемые 4'4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6 (ТрисНС1-25мМ, СаС1₂-1.10⁻²М, рН-7.5, краун-эфир-2.10⁻⁵ М, U= 50 мВ).

б) Гистограмма распределения кальциевых каналов проводимости (по оси абсцисс - проводимость каналов, по оси ординат - количество каналов с проводимостью, пределы которых указаны на абсциссе, остальные условия те же).

в) Вольт-амперная характеристика одиночного кальциевого канала (концентрация ионов Са²⁺-5.10⁻³М, остальные условия те же).

Нами было установлено, что в интервале рН от 4.5 до 8 не наблюдалось изменений стабильности, модифицированных исследуемыми краун-эфирами бислоев в зависимости от рН окружающей среды.

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что краун-эфиры проявляют каналообразующие свойства, в бислоях образуются достаточно большие по проводимости структуры. Вольт-амперные характеристики этих каналов линейны, при потенциалах +150 мВ ток не стремится к насыщению. Среднее время жизни каналов (регистрируемых чаще других) основной популяции превышает среднее время жизни каналов с большей величиной проводимости в 4-7 раз.

Для образования канальной проводимости бислоев необходимым условием было присутствие исследуемых краун-эфиров с двух сторон мембраны, а в окружающем мембрану растворе наличие ионов кальция. При добавлении краун-эфиров только лишь с одной стороны мембраны процесс каналаобразования не наблюдался. По-видимому, образование одиночных ионных каналов непосредственно связано с воздействием молекул краун-эфиров на фосфолипиды с каждой стороны мембраны по отдельности и образованием участков разупорядочивания в их структуре (рис.26D). И только при условии совпадения этих нарушений с обеих сторон бислоя возникала канальная проводимость. Очевидно, что ионный канал, наблюдаемый при этом, представляет собой сквозное отверстие в мембране, заполненное водой, внутри которого находятся полярные группы фосфолипидов. Причиной возникновения таких каналов может служить локальное уменьшение площади бислоя, обусловленное более плотной упаковкой жирнокислотных цепей в этих участках, что может привести к нарушению правильности кристаллической решетки фосфолипидов и появлению дислокаций. По-видимому, такие краун-эфиры, являясь катализаторами, стимулируют появление участков разупорядочивания - микродефектов и образование липидных каналов, селективность которых будет определяться в основном зарядом полярных групп фосфолипидов в самом канале [190]:



Для выяснения вклада электростатических сил в определении проводимости и избирательности изучаемых каналов мы исследовали ее зависимость от величины скачка потенциала на границе

мембрана-электролит и от ионной силы омывающего мембрану раствора. Поверхностный заряд бислоя изменяли за счет адсорбции на мембране гидрофобных анионов 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС⁻). Действительно, заряд полярных групп фосфолипидов или заряд, привносимый в мембрану, определенным образом должен влиять на энергетический профиль ионного канала [203]. АНС⁻-достаточно крупный анион хорошо сорбируется на поверхности мембран, точнее на глубине глицериновых остатков липида и не переходит на противоположную сторону мембраны [386].

Проводимость и катионная селективность мембран существенно изменяется при введении в водные растворы заряженных поверхностно-активных веществ и дипольных модификаторов. Движение зарядов в виде комплекса или отдельного иона зависит, в основном, от скачка потенциала на границе мембрана-электролит-У. Этот граничный скачок потенциала складывается из двух компонентов: поверхностного скачка потенциала U_S и незранируемого дипольного скачка потенциала U_D :

$$U = U_S + U_D$$

Для установления связи проводимости каналов, образуемых макроциклическими полиэфирами с величинами U_S и U_D , исследовались вольт-амперные характеристики этих каналов при изменении концентрации АНС⁻ с обеих сторон мембраны в растворах хлоридов кальция и магния различной концентрации. Показано, что в растворах с небольшой ионной силой рост концентрации АНС⁻ в водном растворе приводит к увеличению проводимости одиночных каналов. Этого не наблюдается в растворах с высокой ионной силой, т.е. при практически полной экранировке заряда мембраны. В данном случае введение в систему АНС⁻ не изменяет проводимости каналов, индуцированных исследуемыми краун-эфирами, и вольт-амперные характеристики их остаются такими, как и до введения АНС⁻ [376]. Подобное влияние состава электролита, очевидно, является результатом действия на проводимость исследуемых каналов только лишь величины поверхностного скачка потенциала - U_S .

При этом важно отметить, что величина незранируемого скачка потенциала - U_D при высокой ионной силе растворов должна, в принципе, влиять на энергетический профиль канала. Однако неизменность вольт-амперных характеристик каналов, индуцированных краун-эфирами, при практически полной экранировке привносимого адсорбцией АНС⁻ заряда, может рассматриваться как указание на неизменность энергетического профиля каналов [376, 388].

Если предположить, что при использовании растворов с высокой ионной силой (2 М) граничный скачок потенциала практически отождествляется с дипольной составляющей (так как поверхностный скачок потенциала полностью экранирован), то изменения граничного скачка потенциала при более низких ионных силах будут соответствовать изменению поверхностного скачка потенциала. Таким образом, мы приходим к заключению, что неэкранируемый дипольный скачок потенциала не влияет на энергетический профиль каналов, индуцированных исследованными краун-эфирами. Очевидно, что энергетический профиль исследуемых каналов может изменить лишь другая компонента граничного потенциала. Для объяснения влияния поверхностного потенциала U_s на свойства изучаемых каналов можно предположить, что трансмембранный перенос ионов по каналу осуществляется в результате их миграции и диффузии по поверхности бислоя, выстилающего дефекты в мембране типа “инвертированной” поры или липидного канала.

При миграции ионов по липидному каналу изменения поверхностного потенциала бислоев должны влиять на “силу анионного поля” и соответствующим образом изменять ряд катионной специфичности канала. Не вызывает сомнения, что изменение потенциала поверхности бислоя может привести к изменению соотношения катионов и анионов вблизи мембраны, что в случае прямого участия липидов в структуре канала должно изменять его селективность [386]. С целью проверки этого положения, нами были сопоставлены ряды катионной селективности одиночных ионных каналов (по Ca^{2+} , Mg^{2+} и K^+), индуцированных соединениями 50 и 51. Оценивались отношения проводимостей краун-эфирных каналов в отсутствии и присутствии АНС^- . Было показано, что адсорбция АНС^- на мембранах приводит к изменению величин катионной избирательности каналов, а иногда и ряда избирательности. В отсутствии АНС^- наблюдались следующие ряды дискриминации катионов каналами, индуцированными краун-эфирами:

$$50 - \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+: 1 > 0.61 > 0.35$$

$$51 - \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+: 1 > 0.74 > 0.52$$

В присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ М АНС^- величины катионной селективности этих каналов заметно изменялись:

$$50 - \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+: 1 > 0.72 > 0.48$$

$$51 - \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{K}^+: 1 > 0.93 > 0.61$$

Для установления связи проводимости изученных каналов с величинами U_s и U_D исследовались вольт-амперные характеристики

этих каналов при изменении концентрации АНС⁻ с обеих сторон мембраны в присутствии CaCl₂ и MgCl₂. Оказалось, что в растворах с небольшой ионной силой, рост концентрации АНС⁻ в омывающем мембрану растворе приводит к увеличению проводимости одиночных каналов. В растворах с высокой ионной силой введение в систему АНС⁻ не изменяет проводимости каналов и не влияет на их вольт-амперные характеристики. Такое влияние состава электролита, очевидно, является результатом действия на проводимость исследуемых каналов изменения величины скачка поверхностного потенциала - U_s .

С помощью монослойной техники удалось получить количественную оценку и характер взаимодействия молекул краун-эфиров с молекулами фосфолипидов в монослое. Исследовали граничный скачок потенциала, стехиометрию взаимодействия краун-эфиров с молекулами фосфолипидов и поверхностное натяжение монослоев на границе раздела фаз вода-воздух в условиях, идентичных с экспериментами на бислоях [370, 376]. Оказалось, что при наличии АНС⁻ в подстилающем растворе, в зависимости от ионной силы последней наблюдаются изменения в стехиометрии взаимодействия; площади, приходящейся на молекулу фосфолипида и граничном скачке потенциала на границе раздела фаз вода-воздух [376]. Измерение параметров монослоев производилось на автоматизированной установке (рис.29), собранной на кафедре биофизики НУУз им. М.Улугбека. Программное обеспечение давало возможность автоматически регистрировать кривые зависимости поверхностного натяжения, скачка потенциала от концентрации и площади на молекулу краун-эфиров на границе раздела фаз вода - воздух, а также позволяло математически обрабатывать результаты экспериментов.

Поверхностное натяжение регистрировали по методу Вильгельми с помощью механотрона 6МХ2Б [180], предварительно градуированного в мН/м. В качестве измерительного элемента использовали стеклянную пластинку периметром 5 см и толщиной 0,5мм.

Этот метод позволяет регистрировать поверхностное натяжение не хуже 0,03 мН/м. Скачок потенциала на границе раздела фаз вода-воздух измеряли методом вибрирующего электрода, в качестве которого использовали платиновую пластинку диаметром 1 см [290]. Частота собственных колебаний системы электрод-вибратор была равна 140 гц (использовался низкочастотный наушник). Скачок потенциала регистрировался с точностью до 1 мВ.

При измерении поверхностного натяжения и скачка потенциала монослоев на границе раздела фаз вода-воздух использовали тефлоновую ванну площадью 56,3 см и глубиной 0,3 см, со шлифованными бортами и тефлоновой пластинкой в качестве подвижного барьера. Измерения проводились при температуре $(21 \pm 1,5)^{\circ}\text{C}$.

Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду и соли квалификации х.ч. При изучении адсорбции краун-эфиров на границе раздела фаз вода-воздух на поверхность микропипеткой наносился этанольный раствор исследуемого соединения. Изменение состава и состояния “подстилающего” раствора монослоев осуществлялось с помощью проточной системы.

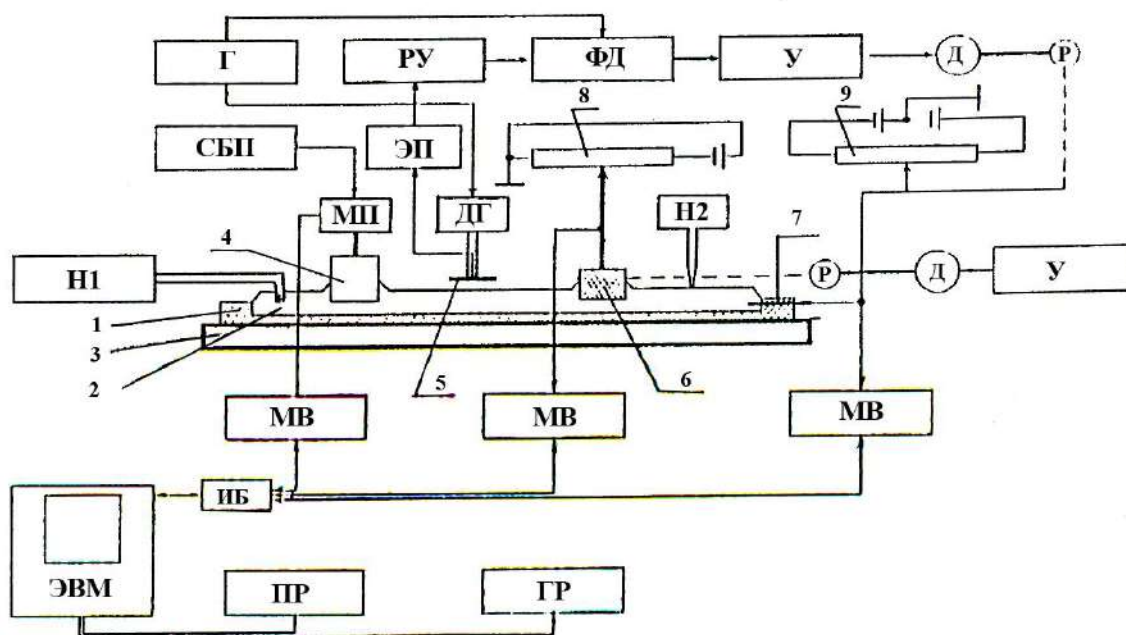


Рис.29. Блок-схема установки для исследований свойств монослоев на границе раздела фаз вода-воздух

1-тефлоновая проточная кювета, 2-исследуемый раствор, 3-термостатируемая подставка, 4-стеклянная пластина, 5-вибрируемый электрод, 6-подвижный барьер, 7-хлорсеребряный электрод, 8,9-многооборотный потенциометр, Г-звуковой генератор, РУ-резонансный усилитель, У-усилитель, ФД-фазочувствительный детектор, Д-реверсивный двигатель, Р-редуктор, СБП-стабилизированный блок питания, ЭП-эмиттерный повторитель, МП-механотронный преобразователь, ДГ-динамическая головка, Н1-перистальтический насос, Н2-водоструйный насос, МВ-милливольтметр, ИБ-интерфейсный блок, ПР-принтер, ГР-графопостроитель.

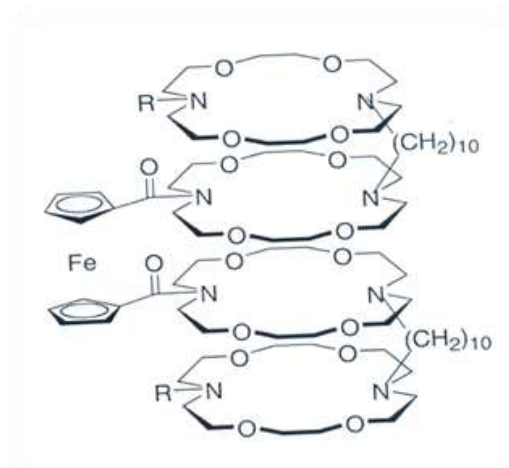
Максимальное содержание растворителей при монослойных и адсорбционных измерениях не превышало 0,01%, что не влияло на свойства монослоев.

При использовании подстилающих растворов с высокой ионной силой (1-2)М граничный скачок потенциала практически отождествляется с дипольной составляющей (так как поверхностный скачок потенциала полностью экранирован) и он оказался неизменным, а при более низких ионных силах соответствовал изменению поверхностного скачка потенциала - U_s . В условиях, идентичных с экспериментами на бислоях, это изменение составляло для 4',4''(5'') - диметиламиноэтанол-ДБ18К6 (краун-эфир 50) порядка (27 ± 1) мВ, а для краун-эфира 51-порядка (24 ± 1) мВ, соответственно.

Количественная теория миграции ионов по поверхности липидного бислоя ещё полностью не разработана, однако есть веские основания думать, что при малой степени заполнения мест связывания ионов на поверхности липидного слоя механизм движения ионов будет мало отличаться от обычного диффузионно-миграционного [388]. В таком рассмотрении сохраняется предположение о прыжковом механизме перемещения ионов от одного места связывания к другому, и проводимость одиночного ионного канала должна определяться концентрацией ионов в примембранном слое, зависящей от поверхностного потенциала. При этом незэкранируемая составляющая граничного скачка потенциала, относящаяся к внутренней зоне бислоя, на проводимость каналов влиять не должна. Экспериментальные данные полученные нами по каналобразующим свойствам краун-эфиров 50 и 51 свидетельствует в пользу механизма образования липидного канала или "инвертированной поры".

- Ионные каналы на основе "молекулярных ассоциатов"

В работе по изучению мембранной активности краун-эфиров авторы пытались рассмотреть возможность индукции проводимости канального типа (эстафету) на бислоях посредством образования "стопок" из молекул макроцикла [183]. Такой подход получил в дальнейшем свое развитие [113, 174], Халл и сотрудники использовали простую архитектуру в создании редокс-активного ионного канала, где сама структура канала включает в себя четыре диаза-18К6 полости, соединенные между собой с помощью двух додецил цепей и одного расположенного в центре ферроцена:



Скорость переноса ионов Na^+ такой структурой оказалась в шесть раз быстрее, чем у природного ионофора моненсина.

Нами изучались свойства одиночных ионных каналов проводимости, индуцированных водорастворимыми сульфопроизводными дибензо-18-краун-6 (краун-эфиры 56-59) на плоских бислойных мембранах. Исследуя влияние 4'-третбутил- 4''(5'')-ДБ18К6 сульфокислоты на бислойные фосфолипидные мембраны, мы зарегистрировали ступенчатые изменения трансмембранного тока в режиме фиксации потенциала на мембране. Это наблюдалось в растворах хлоридов моновалентных катионов, как при симметричном, так и асимметричном введении краун-эфира в эти растворы. Снижая концентрацию исследуемого соединения до $1 \cdot 10^{-6}$ М, нам удалось зарегистрировать в бислоях одиночные ионные каналы проводимости.

Амплитуды проводимостей каналов варьировали в пределах двух порядков для таких моновалентных катионов, как Li, Na, K, Rb, Cs. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов представлены на рис.30. Как видно на гистограммах, выраженный максимум приходится на $6,2 \pm 0,5$ пСм для исследованных моновалентных катионов ($U_{\text{фикс}} = +40$ мВ). Именно эти ионные каналы проводимости явились основным объектом наших исследований.

Для определения катион-анионной селективности были использованы измерения потенциалов нулевого тока через одиночный ионный канал в условиях 10-кратного градиента KCl или NaCl (10:100 мМ). Потенциалы нулевого тока определялись по точкам пересечения вольт-амперных характеристик одиночных ионных каналов с осью напряжений (рис.31). Значения измеренных потенциалов, с учетом диффузных потенциалов, были равны $+(56 \pm 2)$ мВ

(положительный потенциал в отсеке с меньшей концентрацией соли). Числа переноса для катиона рассчитывались по формуле [203]:

$$t_+ = (E_o - E_a) / (E_c - E_a),$$

где t_+ – число переноса для катиона, E_o – потенциал нулевого тока, E_c и E_a – теоретический нернстовский потенциал для катиона и аниона, соответственно.

Полученное значение равно $(0,98 \pm 0,2)$. Таким образом, исследованные одиночные ионные каналы проводимости обладают практически идеальной катионной избирательностью.

Как показатель катион-катионной специфичности нами были использованы отношения проницаемостей одиночных ионных каналов проводимости в биионных условиях, когда мембрану разделяли 100:100 мМ растворы хлоридов исследуемых катионов, причем NaCl всегда находился в “транс” отсеке ячейки. Отношения проницаемостей P_x/P_{Na} рассчитывались по формуле: $\phi_{рев} = [RT / F] \cdot \ln (P_x / P_{Na})$, где $\phi_{рев}$ – потенциал нулевого тока, R , T , F имеют свои обычные значения.

Потенциалы реверсии определялись по точкам нулевого тока на графиках вольт-амперных характеристик одиночных каналов (рис.31) аналогично описанному выше способу определения катион-анионной избирательности. Полученные значения потенциалов реверсии и рассчитанные из них отношения проницаемостей каналов приведены в таблице 4.

На основании полученных данных моновалентные катионы по селективности могут быть расположены в следующий ряд: $Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$, соответствующий первому ряду Эйзенмана.

Таблица 4

Коэффициенты проницаемостей ионных каналов

Ион	$\phi_{рев}, мВ$	$P_x:P_{Na}$
Li^+	$+17 \pm 2$	0,5
Na^+	0 ± 1	1
K^+	$-9 \pm 1,2$	1,4
Rb^+	$-15 \pm 1,5$	1,8
Cs^+	-18 ± 2	2

Вольт-амперные характеристики (ВАХ) одиночных ионных каналов суперлинейны и симметричны относительно начала координат как при одностороннем, так и при двустороннем введении каналоформера в омывающие мембрану растворы (рис.32, 33).

Анализ функционирования одиночных ионных каналов указывает на множественность их непроводящих и проводящих состояний. Из записей типичного эксперимента (рис.34а) можно видеть, что канал имеет два непроводящих состояния. Время нахождения в одном из них менее 0,2 сек., тогда как во втором - несколько секунд. Обнаруженные состояния аналогичны “закрытому” и “запертому” состояниям амфотерициновых каналов [314]. Кроме того, каналы с большой проводимостью из высокопроводящего состояния могут переходить в малопроводящие (рис.34б). Наблюдается потенциал-зависимость функционирования исследуемых каналов: при повышении фиксируемого потенциала они стремятся перейти в непроводящее состояние (рис.34в).

В предположении, что каналоформерные свойства данным соединениям придает сульфогруппа, мы исследовали 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислоту (краун-эфир 57), 4'-ДБ18К6-моносульфоокислоту (краун-эфир 58), 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислоту (краун-эфир 59).

Нами было обнаружено, что эти сульфопроизводные также обладают способностью индуцировать в бислоях образование одиночных ионных каналов проводимости в присутствии моновалентных катионов, как при одностороннем, так и двустороннем введении их в омывающие мембрану растворы. Благодаря наличию гидрофобных и гидрофильных групп все исследованные производные имеют сродство, как к углеводородной фазе мембраны, так и водной фазе. Обнаружена обратная корреляция между липофильностью этих соединений и их минимальной концентрацией, необходимой для образования ими ионных каналов. В ряду краун-эфиров 56-59 эта концентрация увеличивается, соответственно: $1 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ М (в $1 \cdot 10^{-2}$ М КСl). Амплитуды проводимостей одиночных ионных каналов, индуцированных соединениями 57, 58 и 59, также как для 56, варьируют довольно широко. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей показаны на рис.35-37. Как можно видеть из гистограмм, максимум приходится на область (6.2 ± 0.5) пСм для всех исследованных соединений, включая 56 (в аналогичных условиях проведения эксперимента).

Числа переноса для катионов вычислялись из потенциалов реверсии, которые оценивались по ВАХ одиночных ионных каналов, индуцированных краун-эфирами 57-59 в 10 кратном градиенте КСl. Полученные значения равны, соответственно, $(0,98 \pm 0,2)$, $(0,97 \pm 0,25)$, $(0,99 \pm 0,15)$. Таким образом, производные 57-59 аналогично 4'-трет-

бутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоислоте обладають практически идеальной катионной избирательностью.

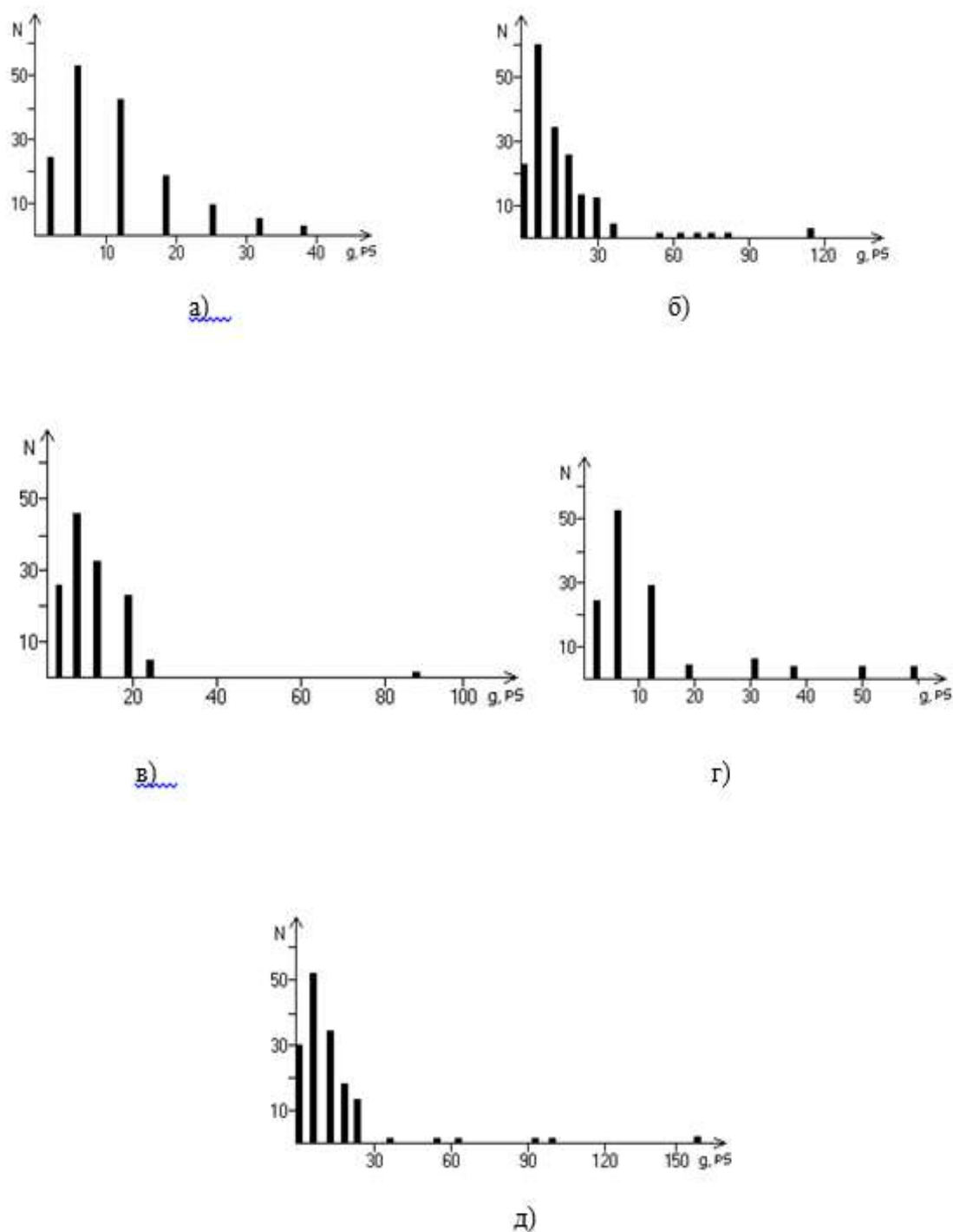
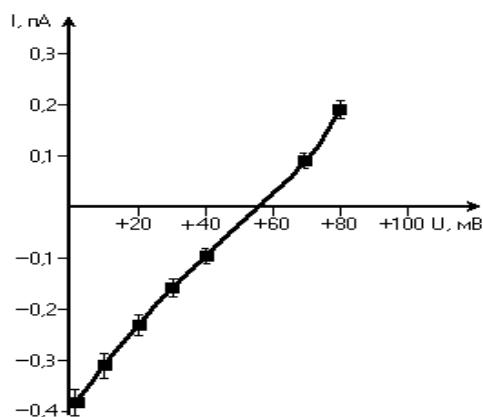
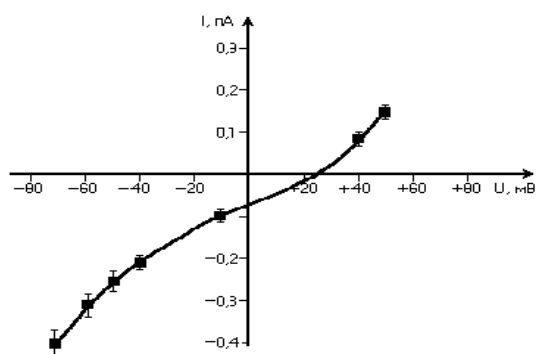


Рис.30. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов, индуцированных краун-эфиром 56. Условия экспериментов: 1 μ M -56 (сим), 25 мМ Трис-НСl, рН-7,4, 100 мМ LiCl (а), 100 мМ NaCl (б), 100 мМ KCl (в), 100 мМ RbCl (г), 100 мМ CsCl (д), $U_{\text{фикс}}$ +40 мВ.

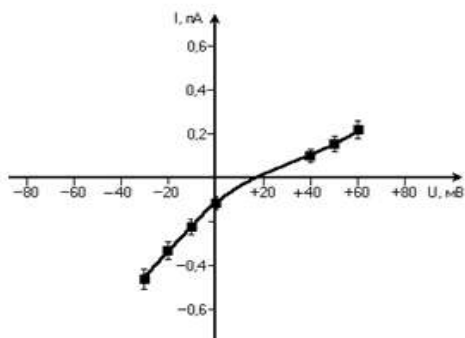


а)

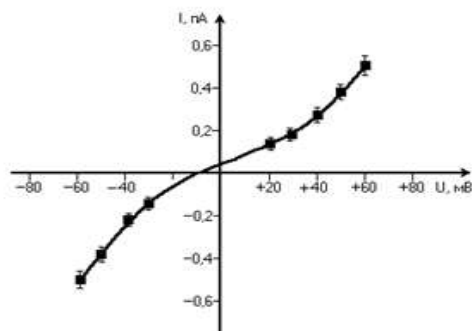


б)

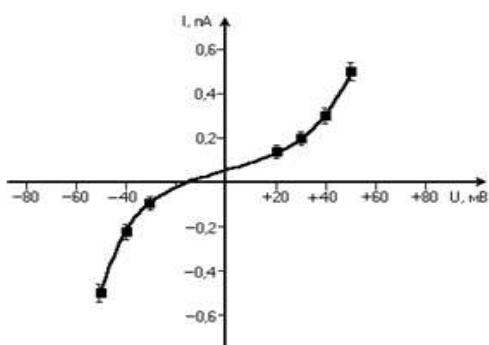
Рис.31. Вольт-амперные характеристики одиночных ионных каналов, зарегистрированных в условиях (а) 10-кратного градиента KCl (10 мМ/100 мМ), (б) 3-кратного градиента KCl (166 мМ/500 мМ), 2 μ М краун-эфира 56 (транс), 25 мМ Трис-НCl, pH-7,4.



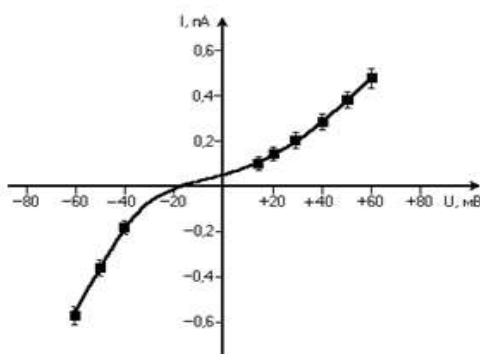
а)



б)



в)



г)

Рис.32. Вольт-амперные характеристики одиночных ионных каналов, зарегистрированных в биионных условиях. Омывающие мембрану растворы содержали “транс” 100 мМ NaCl, “цис” 100 мМ LiCl (а), 100 мМ KCl (б), 100 мМ RbCl (в), 100 мМ CsCl (г) (1 μ М краун-эфира 56 (сим), 25 мМ Трис-НCl, pH-7,4).

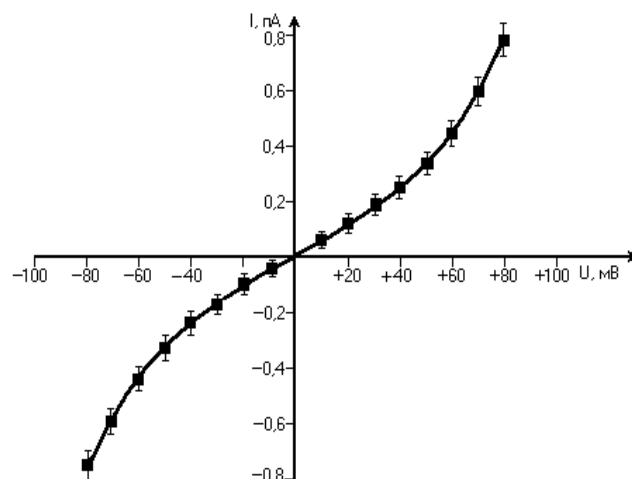


Рис.33. Вольт-амперная характеристика одиночных ионных каналов проводимости, индуцированных краун-эфиром 56. Условия эксперимента: 2 μ M краун-эфира 56 (транс), 25 mM Трис-HCl, pH-7,4, 100 mM KCl.

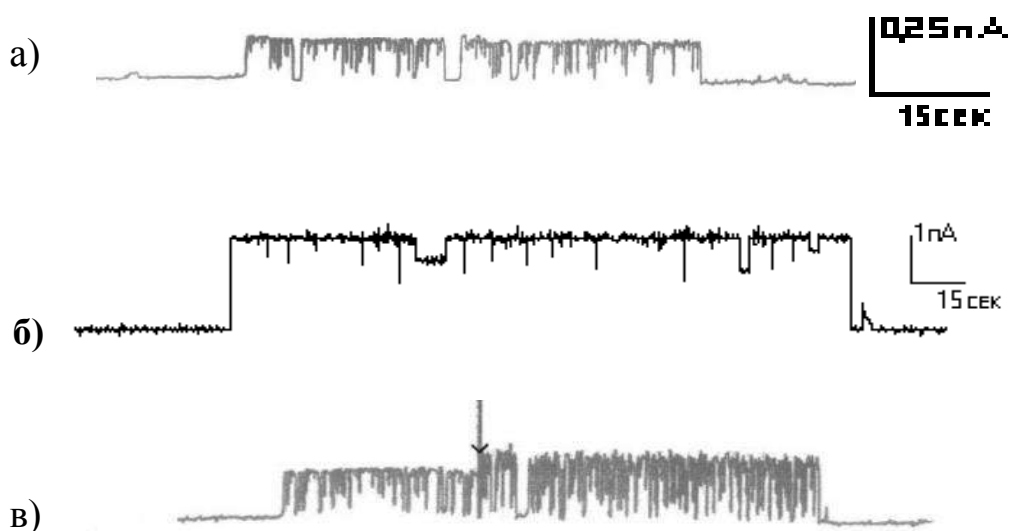
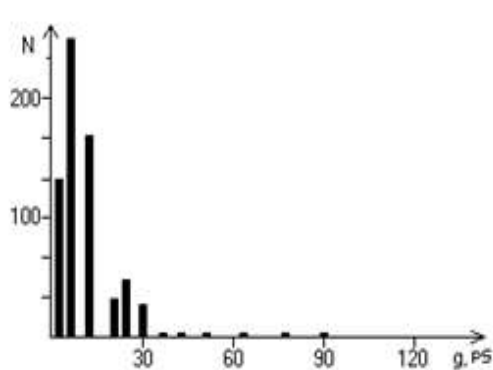
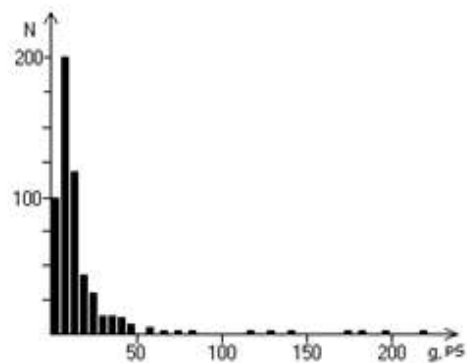


Рис.34. Множественность нерабочих состояний типичного канала (а) и рабочих состояний канала, имеющего высокую проводимость (б). Потенциалзависимость функционирования одиночного ионного канала (стрелкой обозначен момент увеличения фиксированного потенциала с 60 мВ до 80 мВ).

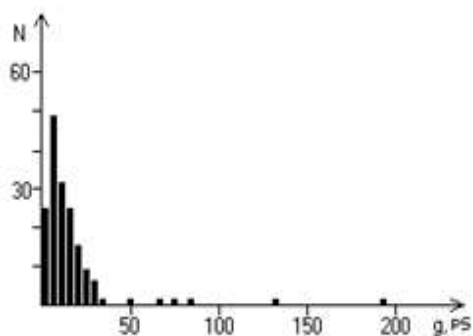
Условия экспериментов: 1 μ M краун-эфира 56 (сим), 25 mM Трис-HCl, pH-7,4, 50 mM KCl (а), 100 mM KCl (б), 500 mM KCl (в), $U_{\text{фикс}}$ +40 мВ (для а и б).



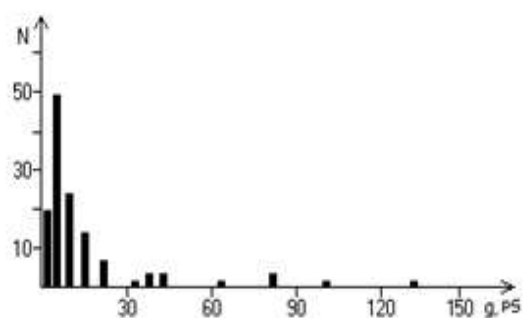
a)



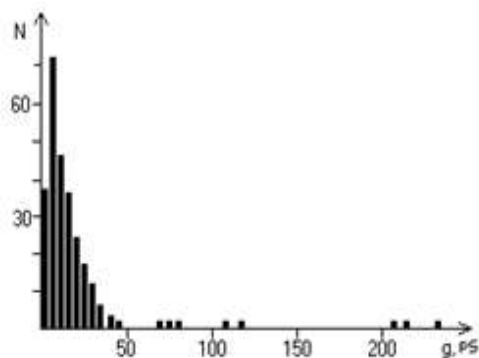
б)



в)



г)



д)

Рис.35. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов, индуцированных краун-эфиром 57. Условия экспериментов: 1 μ M краун-эфира 57 (сим), 25 mM Трис-HCl, pH-7,4, 100 mM LiCl (а), 100 mM NaCl (б), 100 mM KCl (в), 100 mM RbCl (г), 100 mM CsCl (д), Uфикс +40 мВ.

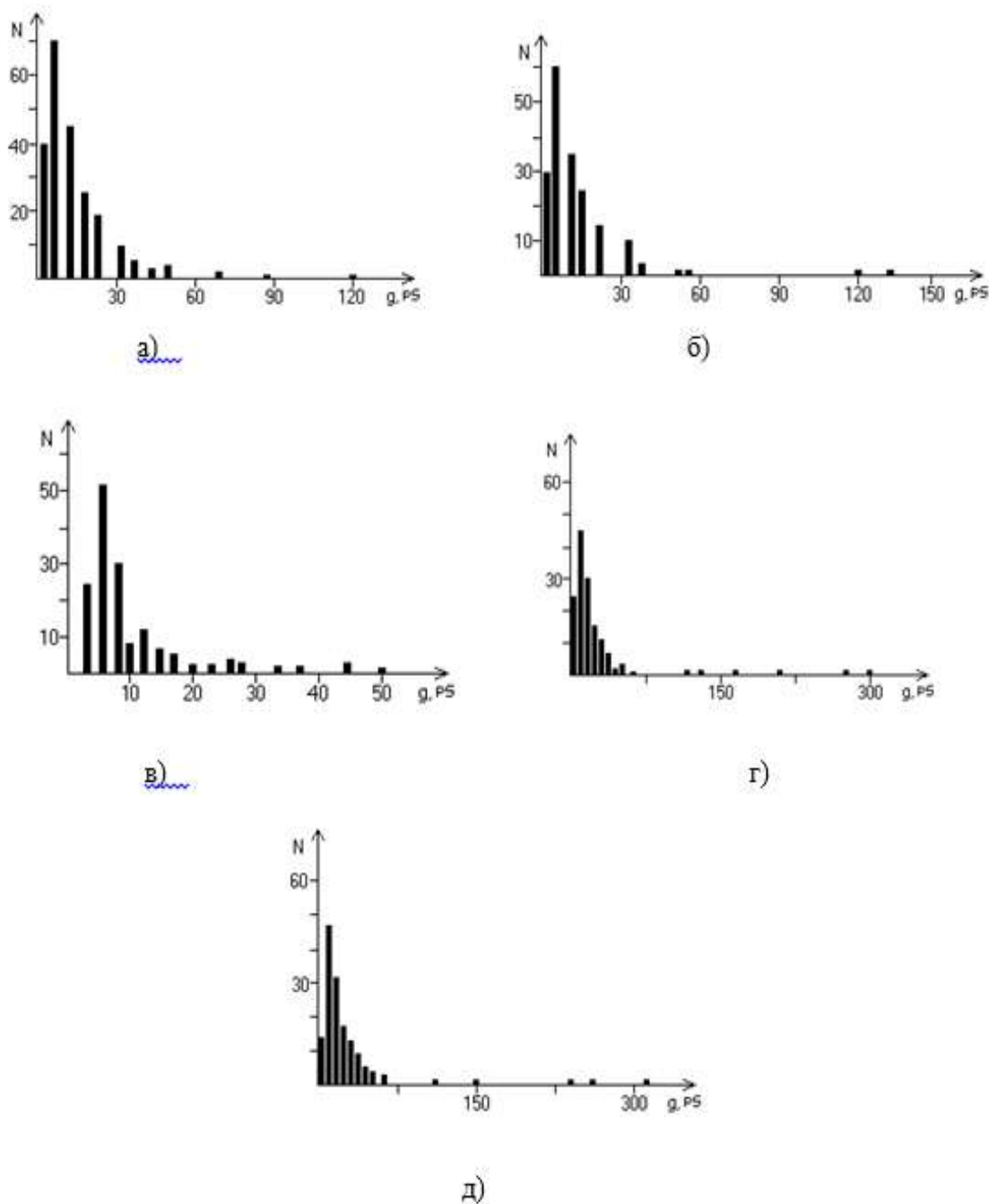


Рис.36. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов, индуцированных краун-эфиром 58. Условия экспериментов: 1 μ M краун-эфира 58 (сим), 25 mM Трис-HCl, pH-7,4, 100 mM LiCl (а), 100 mM NaCl (б), 100 mM KCl (в), 100 mM RbCl (г), 100 mM CsCl (д), Уфикс +40 мВ.

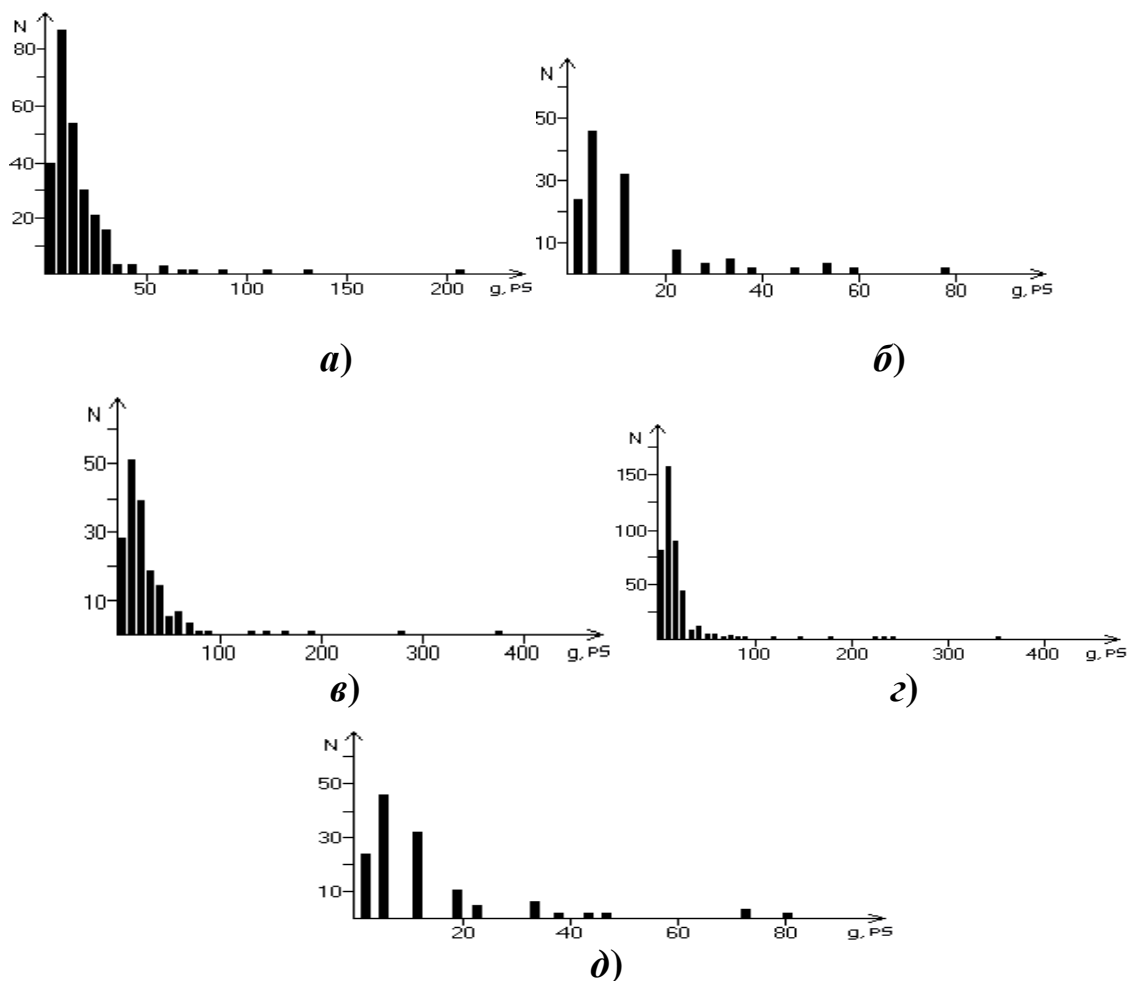


Рис.37. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов, индуцированных краун-эфиром 59. Условия экспериментов: 1 μ M краун-эфира 59 (сим), 25 mM Трис-HCl, pH-7,4, 100 mM LiCl (а), 100 mM NaCl (б), 100 mM KCl (в), 100 mM RbCl (г), 100 mM CsCl (д), $U_{\text{фикс}} +40$ мВ.

Катион-катионная специфичность производных 57-59 оценивалась аналогично 56 по отношению проницаемостей P_X/P_{Na} , рассчитанных из потенциалов реверсии одиночных каналов, функционирующих в бионных условиях. Потенциалы нулевого тока с учетом диффузных потенциалов определялись по нулевому току на ВАХ одиночных каналов. Потенциалы реверсии и рассчитанные отношения проницаемостей ионных каналов, индуцированных соединениями 57-59, достоверно не отличаются от таковых для краун-эфира 56.

Вольт-амперные характеристики одиночных каналов, индуцированных 57-59, в симметричных солевых растворах суперлинейны и симметричны относительно начала координат, аналогично 56 (рис.38-40).

Анализ полученных экспериментальных данных позволяет заключить, что исследованные сульфопроизводные-ДБ18К6 в присут-

ствии моновалентных катионов способны индуцировать в бислоях образование катионселективных ионных каналов с широким спектром проводимостей и низкой катион-катионной специфичностью. Частота образования каналов зависит от природы каналоформера, коррелируя с липофильностью. Суперлинейность и симметричность ВАХ одиночных ионных каналов (образованных при одностороннем добавлении каналоформера в омывающие мембрану растворы) свидетельствует, соответственно, о неоднородности их энергетического профиля и симметричности энергетического профиля относительно центра канала. Ионные каналы обладают множественностью состояний и потенциалзависимостью функционирования.

Исследование молекулярного механизма образования ионных каналов проводимости сульфопроизводными дибензо-18краун-6

Результаты изучения основных свойств одиночных ионных каналов проводимости, индуцированных всеми исследованными сульфопроизводными-ДБ18К6 демонстрируют их схожесть в идентичных экспериментальных условиях, что предполагает один и тот же молекулярный механизм каналообразования.

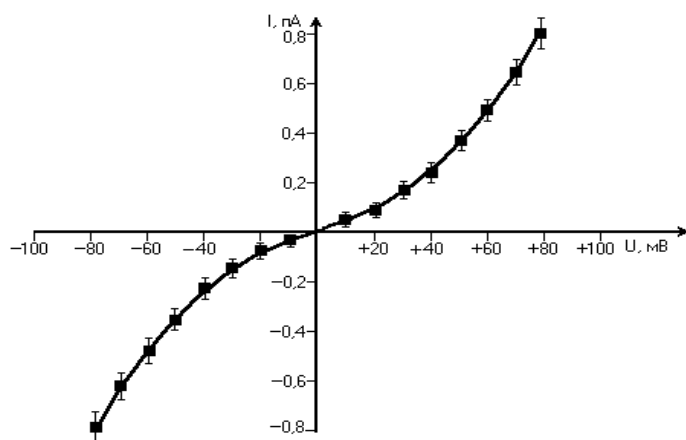


Рис.38. Вольт-амперная характеристика одиночных ионных каналов проводимости, индуцированных 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6 сульфокислотой. Условия эксперимента: 2μМ краун-эфира 57 (транс), 25 мМ Трис-НCl, pH-7,4, 100 мМ KCl.

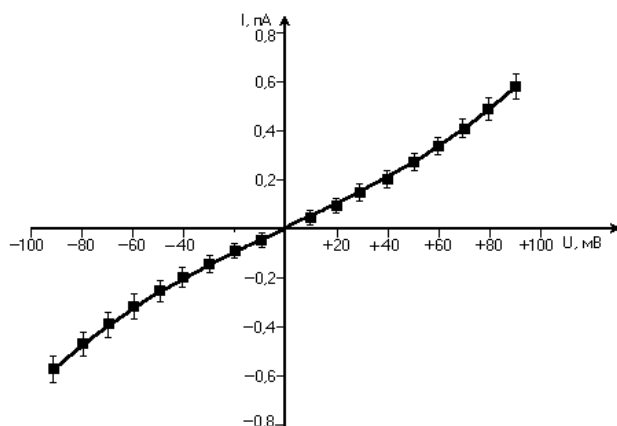


Рис.39. Вольт-амперная характеристика одиночных ионных каналов проводимости, индуцированных 4'-ДБ18К6-моносulfокислотой. Условия эксперимента: такие же как и на рис.38.

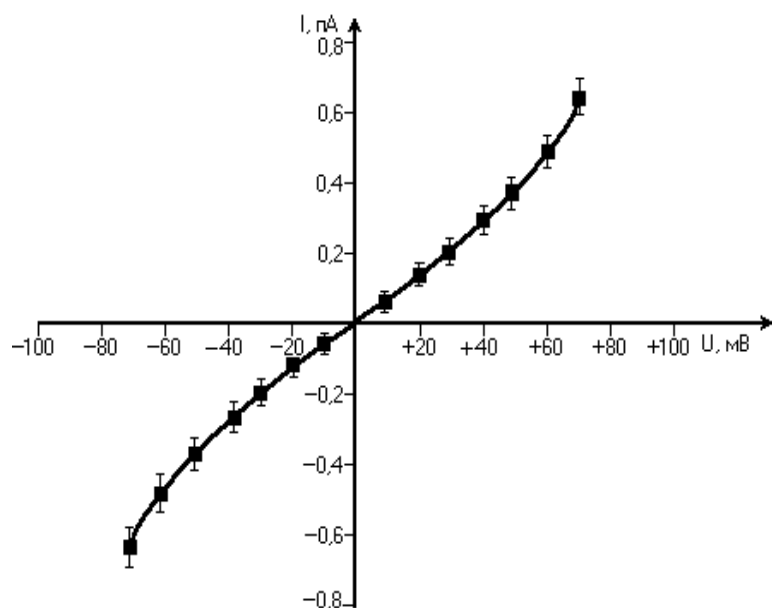


Рис.40. Вольт-амперная характеристика одиночных ионных каналов проводимости, индуцированных 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислотой. Условия эксперимента: 2μМ краун-эфира 59 (транс), 25 мМ Трис-НСl, рН-7,4, 100 мМ КСl.

При исследовании механизма образования ионных каналов, мы исходили из того, что “размеры” данных краун-эфиров невелики относительно толщины бислоя. Индуцируемые ими каналы могут иметь либо “липидную” природу и представлять собой инвертированные фосфолипидные поры, образуемые в результате нарушения упаковки бислоя в ответ на внедрение в него чужеродного агента, либо являться мультимолекулярными сборками краун-эфиров достаточной длины, чтобы пронзить бислой. В изучении молекулярного механизма каналообразования, на наш взгляд, важную роль могут сыграть исследования зависимости катион-анионной селективности, вольт-амперных характеристик (ВАХ), формирования каналов и спектра их амплитуд от рН и ионной силы, омывающих мембрану растворов. Значительную информацию о структуре ионного канала, на наш взгляд, можно получить, исследуя роль переносимого катиона в процессе каналообразования. В данной серии экспериментов нами был выбран краун-эфир - 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота (56) как наиболее эффективный каналоформер.

Исследования рН-зависимости формирования одиночных ионных каналов показали, что при неизменности экспериментальных условий наблюдается снижение частоты каналообразования от 120-150 каналов (каналы всего спектра проводимости) за 1ч регистрации при рН=7,4 до 10-15 каналов/ч при рН=5 и 2-3 каналов/ч при рН=3 (концентрация каналоформера - $1 \cdot 10^{-6}$ М симметрично, КСl- 0.1 М, $U_{\text{фикс}}$ +40 мВ). рН-зависимость образования каналов указывает на участие в этом процессе депротонированных сульфогрупп, т.е.

депротонированные сульфогруппы, возможно, являются прямыми участниками в формировании и поддержании структуры ионного канала. С другой стороны, маловероятно нахождение такой полярной группы в мембранной фазе и логично предположить, что отрицательный заряд депротонированной сульфогруппы в процессе образования структуры ионного канала определенным образом экранируется.

Обнаружена зависимость ширины спектра амплитуд проводимостей одиночных каналов от pH омывающих мембрану растворов. Так, со снижением pH наблюдается сужение спектра за счет уменьшения доли каналов с высокой проводимостью (рис.41).

Для определения роли переносимого катиона в процессе каналообразования мы исследовали способность краун-эфира 56 формировать ионные каналы в условиях, когда каналоформер и KCl добавлялись в разные отсеки ячейки. (Как было показано выше, данные соединения эффективны как при двустороннем, так и одностороннем их введении в омывающие мембрану растворы). В данных экспериментальных условиях (0.05 М KCl / $2 \cdot 10^{-6}$ М краун-эфира 56, 25 мМ Трис-HCl, pH=7.5, Uфикс +40 мВ) исследованное соединение не проявляло каналоформерных свойств. Отсюда можно заключить, что катион является не только участником акта переноса, но и в качестве структурного элемента входит в состав ионпроводящей единицы.

Вольт-амперные характеристики одиночных ионных каналов оставались суперлинейными и симметричными относительно начала координат при pH=3 и pH=7.4 (KCl 0.1 М) (рис.42). Повышение ионной силы омывающих мембрану растворов в диапазоне 0.05 ± 0.5 М KCl также не влияло качественно на форму ВАХ (рис.43). Таким образом, ВАХ в нашем случае оказались малоинформативными.

Эксперименты с катион-анионной избирательностью одиночных ионных каналов в бислоях из хроматографически чистого фосфатидилхолина при pH=7,4 показали, что каналы обладают катионной избирательностью. Катионная избирательность предполагает наличие в канале участков с отрицательным зарядом. Так как молекула фосфатидилхолина при данном значении pH суммарно нейтральна, катионная избирательность может указывать либо на краун-эфирную природу канала, имеющую на входах заряды, генерируемые молекулами краун-эфиров, либо на “липидную” пору.

Известно, что заряженные группы на входе в канал обеспечивают увеличение катионной проницаемости при малых концентрациях электролита, но не работают при больших концентрациях по

причине экранирования этих групп противоионами раствора. Заряженная группа в полости поры могла бы обеспечить высокую селективность по знаку проникающего иона в растворе, но при высоких концентрациях такая группа резко уменьшала бы эффективность транспорта, создавая в поре глубокую потенциальную яму для проникающего катиона [314, 315, 347]. В наших экспериментах практически идеальная катионная избирательность одиночных каналов, измеренная в условиях 10-кратного градиента KCl (потенциал реверсии $\varphi_{\text{рев}} = +56 \pm 2 \text{ мВ}$), не снижалась с увеличением ионной силы растворов ($\varphi_{\text{рев}} = +25 \pm 1.5 \text{ мВ}$ в 3-кратном градиенте). Не снижалась она также при закислении среды до $\text{pH}=3$ ($\varphi_{\text{рев}} = +24 \pm 2 \text{ мВ}$ в трехкратном градиенте) (рис.44).

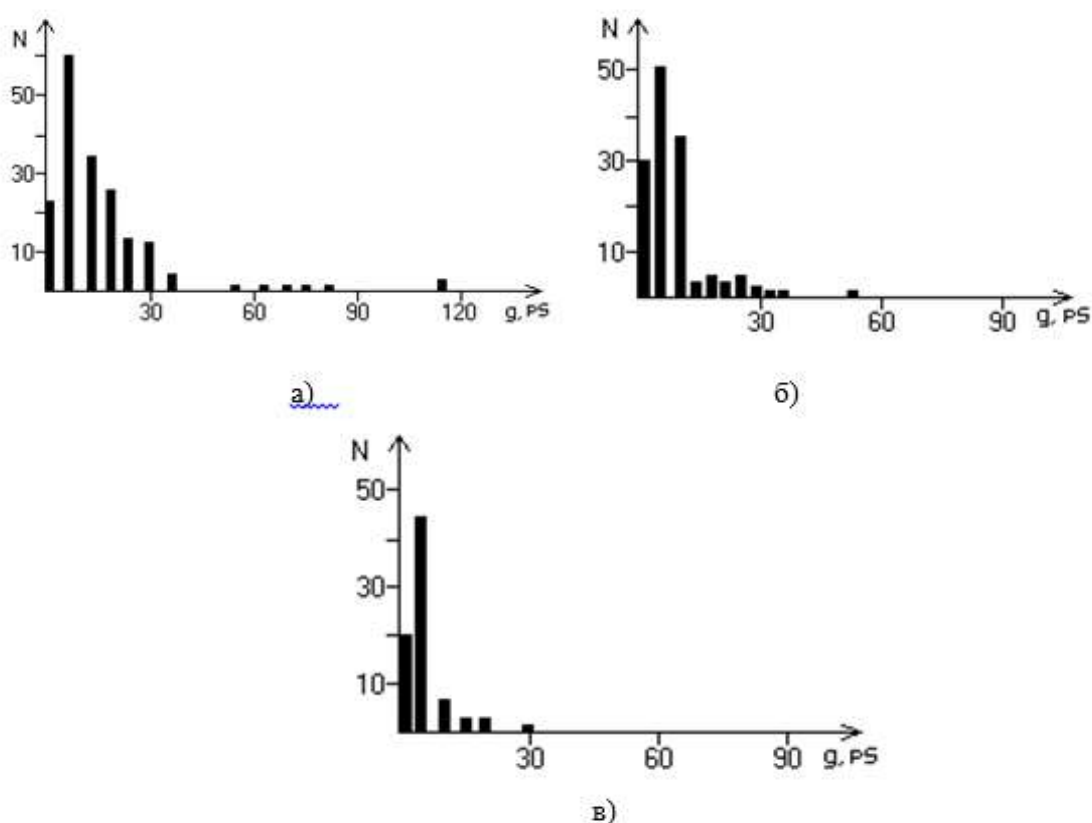


Рис.41. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов, индуцированных краун-эфира 56. Условия экспериментов: 1 $\mu\text{М}$ краун-эфира 56 (сим), 25 мМ Трис-НСl, $\text{pH}=7,4$ (а), $\text{pH}=5$ (б), $\text{pH}=3$ (в), 100 мМ KCl, Уфикс +40 мВ.

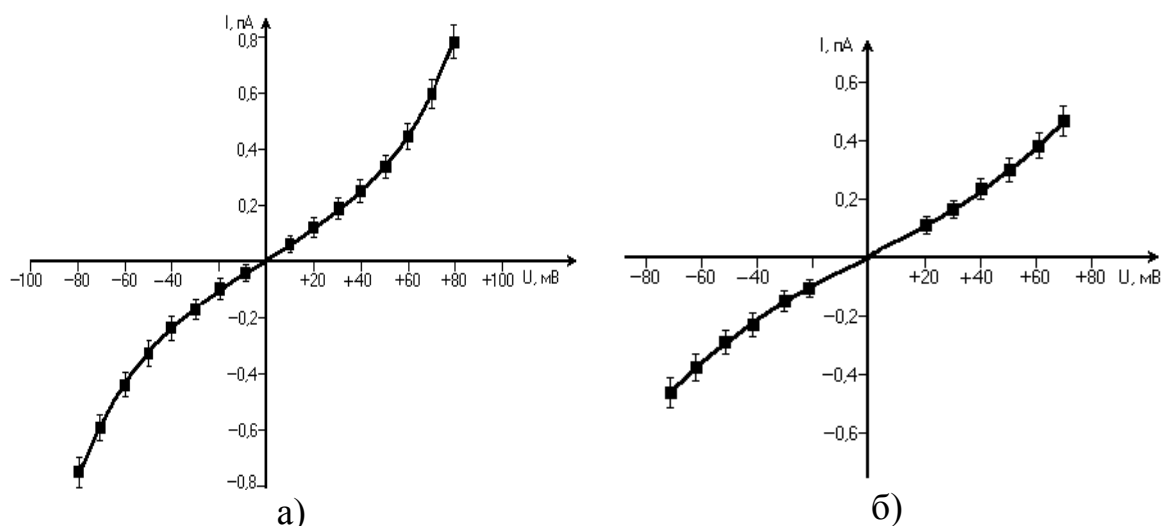


Рис. 42 Вольт-амперные характеристики одиночных ионных каналов в БЛМ, сформированных в растворах с pH-7,4(а), pH-3(б).
Условия экспериментов: 100 мМ KCl (сим), 2 μ М 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислоты (транс), 25 мМ Трис-HCl.

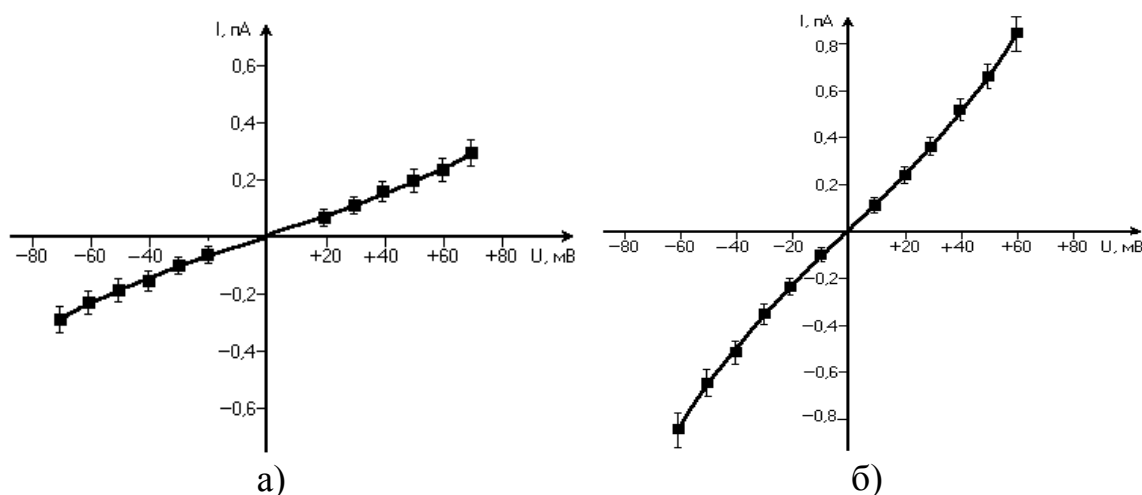


Рис.43. Вольт-амперные характеристики одиночных ионных каналов, зарегистрированных в симметричных растворах (а) 50, (б) 500 мМ KCl, 1 μ М 4'-третбутил-4''(5'') -ДБ18К6-сульфокислоты (сим), 25 мМ Трис-HCl, pH-7,4.

Как было показано выше, ряды катионной специфичности одиночных каналов соответствуют 1 ряду Эйзенмана, в котором катионы щелочных металлов располагаются в порядке убывания их радиусов и соответственно увеличения энергии гидратации этих ионов. Известно, что первый ряд Эйзенмана характеризует селективность мембран, содержащих ионофоры и каналоформеры со слабой катионсвязывающей способностью: большого размера, с лигандными кислородными атомами, далеко отстоящими от катиона [335], к числу которых принадлежат и краун-эфир.

Суммируя результаты экспериментов по катион-анионной специфичности и катионной селективности, можно предположить, что местами связывания переносимых катионов, а также селективными центрами являются макроциклы исследованных соединений.

Таким образом, ответ на вопрос о структуре каналов может сводиться к решению задачи о расположении исследуемых сульфо-производных краун-эфиров в цепочки, звенья которой связаны посредством депротонированных сульфогрупп и переносимого катиона. Наиболее оптимальными нам видятся структуры, представляющие собой цепочки, в которых сульфогруппа одной молекулы образует ионную пару с катионом, координированным макроциклом другой молекулы. Подобная структура, состоящая из связанных комплексных ассоциатов, показана для 4'-бензо-15-краун-5-сульфокислоты (рис.45) [324]. Это соединение образует с ионами натрия комплексы, в которых каждый катион скоординирован всеми атомами кислорода одной молекулы краун-эфира и двумя атомами кислорода сульфогруппы другой, связанной с первой центром инверсии. Данный процесс сопровождается депротонированием сульфогрупп, в результате чего они приобретают отрицательный заряд. В результате подобной сборки обеспечивается экранирование зарядов и сохраняется относительно высокая подвижность катионов, удерживаемых только координационными связями с лигандными атомами кислорода макроцикла и сульфогруппы.

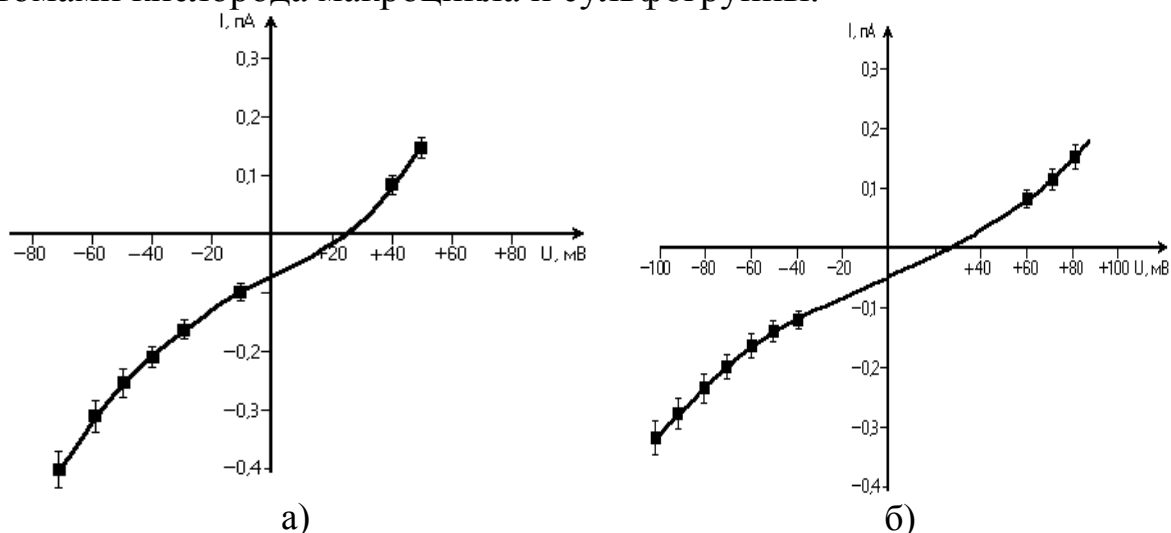
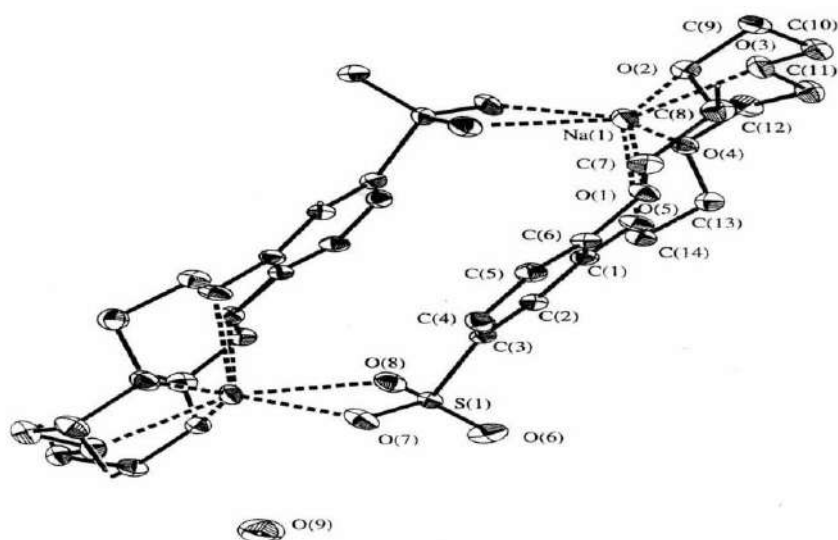
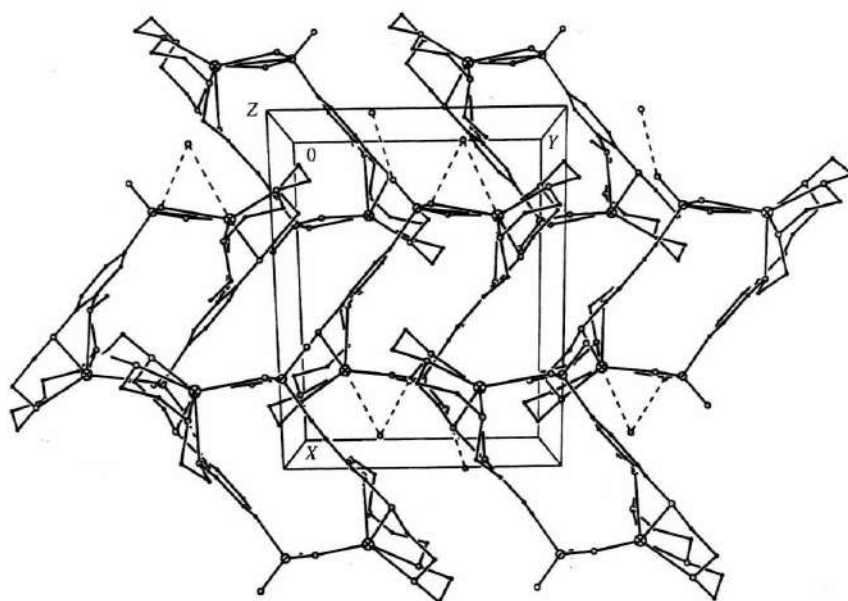


Рис.44. Вольт-амперные характеристики одиночных ионных каналов в БЛМ, сформированных в условиях 3-кратного градиента KCl: (а) 166 (цис)/500 (транс) mM KCl pH-7,4, (б) 100 (цис)/300 (транс) mM KCl, pH-3. Среда содержала: 2 μ M 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислоты (транс), 25 mM Трис-HCl.



а)



б)

Рис.45.
Конформация
комплексного
бимолекулярного
бизидерного
ассоциата,
содержащего две
молекулы 4'-
Б15К5-
сульфокислоты и
два иона натрия
(а).
Кристаллическая
структура
натриевого
комплекса 4'-
Б15К5-
сульфокислоты
(б).

Отсутствие зависимости катион-анионной селективности от ионной силы омывающих мембрану растворов свидетельствует о том, что первое предположение не реализуется. То есть отрицательный заряд не локализован на входах в канал. Тот факт, что катион-анионная селективность не снижается при закислении среды свидетельствует и против второго варианта, т.е. можно предположить, что данное свойство канала определяется неионогенными группами, а малыми зарядами или диполями, локализованными в канале равномерно.

В случае правильности нашего предположения канал представляет собой цепочку из идентичных звеньев, являющихся ассоциатами исследованных соединений с переносимыми катионами. Данная структура канала предполагает равномерное распределение

зарядов в канале и в симметричных растворах солей переносимых катионов ВАХ должны быть линейны. Нелинейность ВАХ может быть следствием действия сил электростатического изображения, создающих на границах канала две потенциальные ямы [347]. С учетом сил электростатического изображения потенциальная энергия иона в мембране имеет вид, показанный на рис.46.

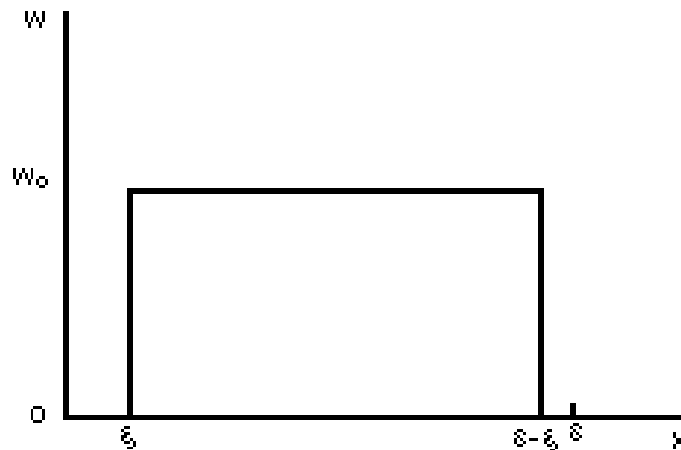


Рис.46. Профиль потенциальной энергии иона в мембране с учетом сил электростатического изображения

Кривая имеет такую форму вследствие того, что ионы притягиваются к среде с более высокой диэлектрической постоянной. ВАХ мембраны с подобным профилем потенциальной энергии имеет вид:

$$I = \{z^2 F D \gamma e^{\psi} / (\delta e^{\omega})\} \cdot \{(e^{z\psi} - 1) / (e^{z\psi(1-\xi/\delta)} - e^{z\psi\xi/\delta})\}, \quad [347]$$

где z - заряд иона, F - постоянная Фарадея, D - коэффициент диффузии иона в мембране, γ - коэффициент распределения ионов между фазами, ψ - мембранный потенциал, δ - толщина мембраны, ξ - ширина ямы.

Степень нелинейности определяется отношением проводимости при произвольном напряжении g к предельной проводимости в малых полях g_0 . При больших потенциалах: $g/g_0 \approx (1+2\xi/\delta) \exp(z\psi\xi/\delta)$ [347].

Таким образом, ВАХ растет экспоненциально, однако показатель роста не слишком велик, поскольку он определяется отношением ширины ямы к толщине мембраны ξ/δ .

Оценка вклада сил электростатического изображения представляется затруднительной, поскольку одним из факторов, определяющих реальный профиль потенциальной энергии иона в канале, является диэлектрическая постоянная внутренней среды канала, расчет которой является крайне сложной задачей.

Если наше предположение о том, что исследованные ион-проводящие структуры представляют собой ассоциаты комплексов краун-эфиров с переносимыми катионами является верным, то факторы, влияющие на константу комплексообразования комплексов, должны определять как частоту каналообразования, так и вероятность формирования ионных каналов с различными проводимостями.

Эксперименты по исследованию влияния рН омывающих мембрану растворов на частоту каналообразования и спектр амплитуд их проводимостей показали, что закисление растворов до $\text{pH}=3$ ведет не только к уменьшению частоты формирования ионных каналов, но и значительно снижает долю каналов с высокой проводимостью. Эти данные могут свидетельствовать в пользу того, что ионные каналы являются ассоциатами различных размеров и, соответственно, обладают различным количеством “треков” для проходящего катиона.

С другой стороны, если, по нашему предположению, имеет место процесс самосборки ассоциатов в солевых растворах, то такой фактор, как “возраст” растворов, также может определять процесс каналообразования и свойства каналов. Для проверки этого предположения мы исследовали спектры амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов, сформированных в солевых растворах каналоформера, имеющих различный “возраст”. Из гистограмм распределения амплитуд проводимостей одиночных каналов в бислоях, сформированных в 12 и 24 ч. растворах (рис.47), можно видеть, что “старение” растворов приводит к повышению доли каналов с большей проводимостью и сдвигу всего спектра (регистрация типичных одиночных каналов, сформированных в указанных условиях, показана на рис.48). Данное “старение” растворов, вероятно, сопровождается укрупнением комплексных агрегатов и, соответственно, увеличением доли каналов, имеющих большую проводимость в общем спектре амплитуд. В этой серии экспериментов наблюдалось некоторое уменьшение частоты каналообразования, что, возможно, связано со снижением вероятности встраивания ассоциатов с увеличением их размеров.

Встраивание предполагаемых ассоциатных агрегатов в бислой не обязательно должно приводить к образованию симметричной относительно центра бислоя структуры и логично уменьшению этой вероятности с увеличением размеров агрегатов. Такая асимметрия структуры канала должна приводить к асимметрии профиля потен-

циальной энергии в канале, что отразилось бы на ВАХ. Эксперименты по исследованию зависимости симметрии ВАХ (относительно начала координат) от проводимости одиночных ионных каналов (рис.49) показали, что с увеличением проводимости появляется и увеличивается асимметрия ВАХ.

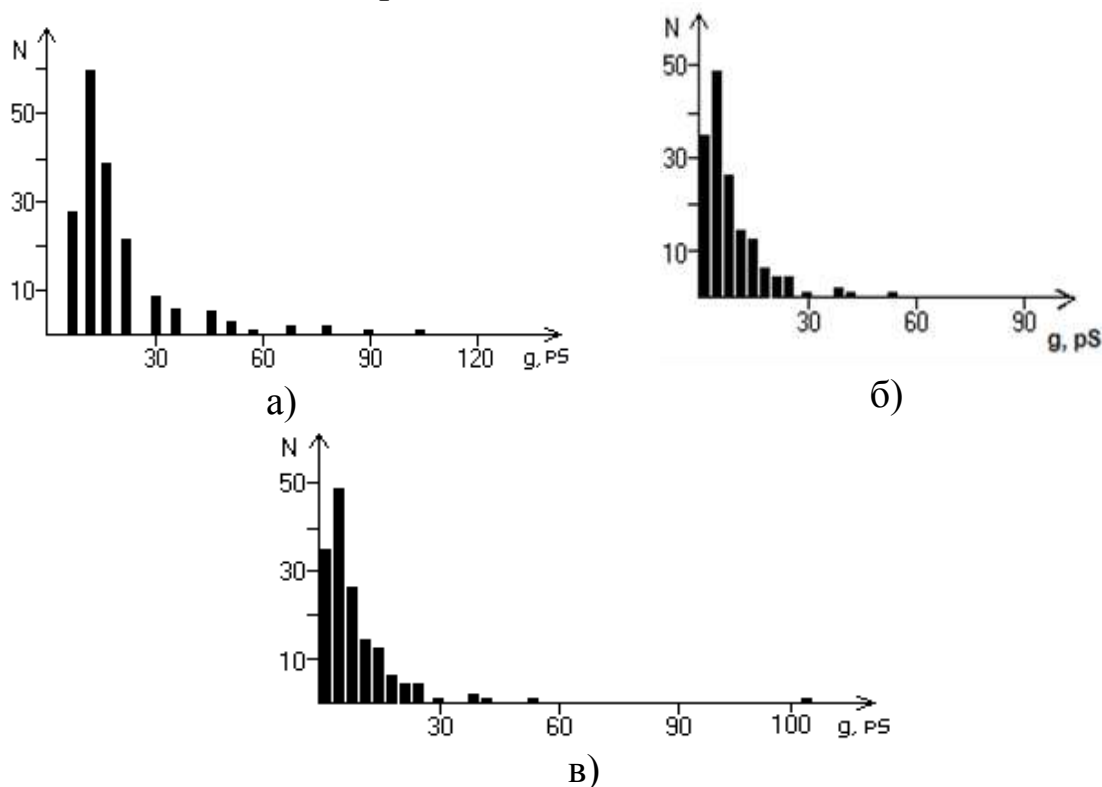


Рис.47. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов в БЛМ, сформированных в (а) свежеприготовленных, (б) 12 ч, (в) суточных растворах 50 мМ КСl, 1μМ краун-эфира 56 (сим), 25 мМ Трис-НСl, рН-7,4, Уфикс +40 мВ.

Дополнительная информация о молекулярной структуре каналов могла бы быть получена из экспериментов по объяснению широкого разброса амплитуд проводимостей исследованных каналов. Феномен широкого спектра амплитуд может являться следствием различий:

- в потенциалах у входа в каждый отдельно регистрируемый канал;
- в распределении приложенного потенциала по барьерам в канале;
- в величинах сечений каналов;
- и в количестве элементарных каналов в сборке в случае кластерной организации.

В первом случае потенциал, создаваемый ионогенными группами, перераспределит концентрации ионов у входа в канал по

закону Больцмана. Если одиночный канал образован одной молекулой каналоформера или их фиксированным количеством, дисперсия проводимости регистрируемых каналов будет определяться только различиями в величинах потенциалов у входа в канал.

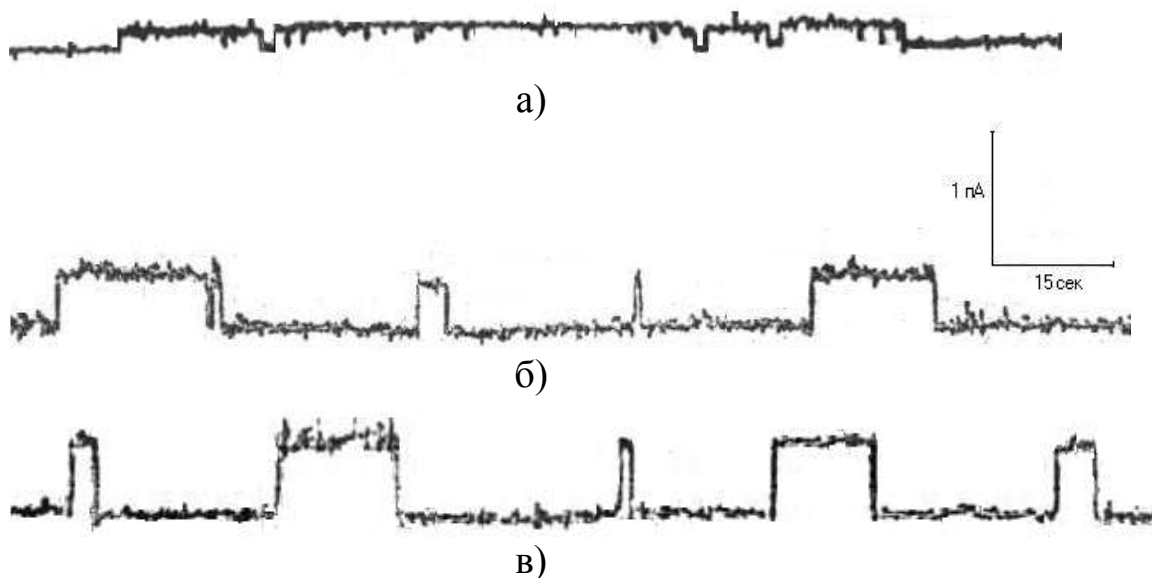


Рис.48. Регистрация одиночных ионных каналов в БЛМ, сформированных в (а) свежеприготовленных, (б) 12 ч, (в) суточных растворах 50 мМ KCl, 1 μ М краун-эфира 56 (сим), 25 мМ Трис-НСl, рН-7,4, $U_{\text{фикс}}$ +40 мВ.

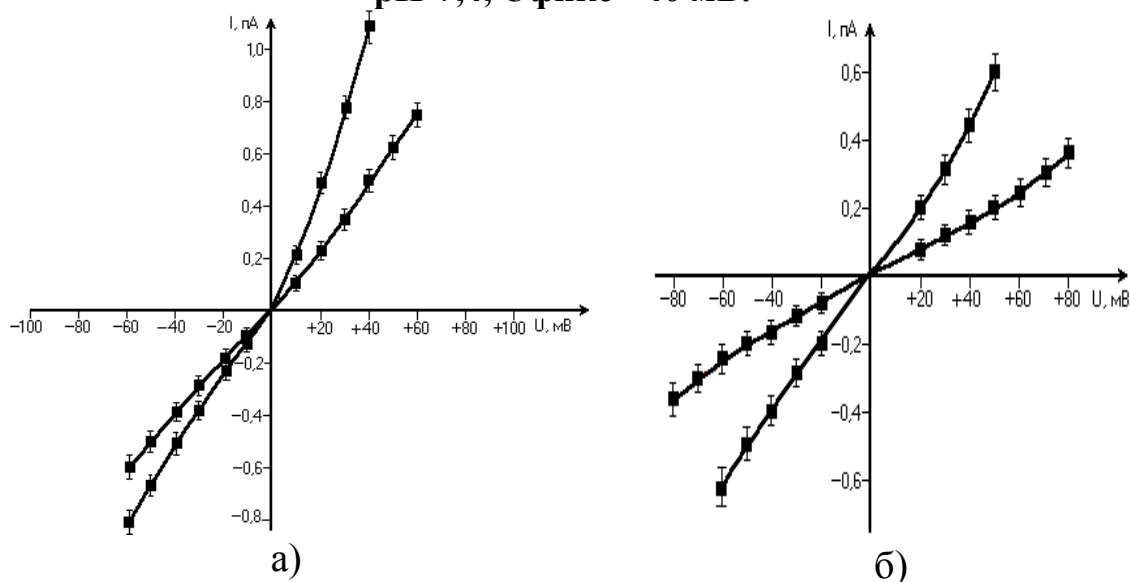


Рис.49. Вольт-амперные характеристики одиночных ионных каналов с различной проводимостью, зарегистрированных в асимметричных условиях добавления (а) 2 μ М краун-эфира 56 (транс) и (б) 2 мМ краун-эфира 59 (транс) в омывающие мембрану растворы. Растворы содержали 100 мМ KCl (сим), 25 мМ Трис-НСl, рН-7,4.

Тогда увеличение концентрации соли в растворе, уменьшая дебаевскую длину, должно привести к нивелированию концентрации у входов в канал и, соответственно, их проводимостей. Эксперименты по выяснению влияния повышения ионной силы растворов показали (рис.50), что ширина спектра распределения амплитуд проводимостей одиночных каналов изменяется с величиной концентрации электролита. Следовательно, дисперсия потенциала у входа в канал не может объяснить весь спектр амплитуд проводимостей каналов. Различия в распределении приложенного потенциала по барьерам в канале также не реализуются, т.к. ВАХ одиночных каналов, имеющих различную проводимость, качественно не различаются (рис.51). Таким образом, разброс амплитуд проводимостей каналов может быть связан либо с вариацией их радиусов, либо с их кластерной организацией (комплекса параллельных ион-проводящих путей). Если увеличение проводимости каналов связано с увеличением их диаметра, то катион-анионная селективность должна уменьшаться или, по крайней мере, оставаться постоянной за счет снижения взаимодействия проходящих ионов с заряженными группами канала. Эксперименты по выяснению зависимости катион-анионной селективности от величины проводимости (рис.52) показали, что катион-анионная селективность ионных каналов несколько снижается.

Однако причиной этого факта в нашем случае не обязательно может являться увеличение диаметра канала. В растворах краун-эфиров могут образовываться комплексы с контактными или сольватно-разделенными ионными парами [380]. Ассоциаты могут содержать некоторое количество анионов раствора, находящихся в “транс” положении по отношению к плоскости макроцикла. Этот факт мог бы объяснить появление и некоторое увеличение парциального тока анионов с увеличением размеров ассоциатов. К тому же из регистрации работы одиночного канала, имеющего высокую проводимость, можно видеть, что канал “включается” и “выключается” как одна функциональная единица, что вряд ли можно ожидать в случае канала с переменным диаметром. В последнем случае можно было бы наблюдать ступенчатые переключения, связанные с добавлением или отсоединением каналобразующих субъединиц от функционирующего канала, меняя его поперечное сечение [415]. Таким образом, объяснение феномена широкого спектра амплитуд проводимостей исследованных ионных каналов,

хоть и может быть получено с позиций предполагаемой модели молекулярного механизма формирования и функционирования этих ионпроводящих структур, оно не является достаточным для указания на этот механизм как на единственно возможный.

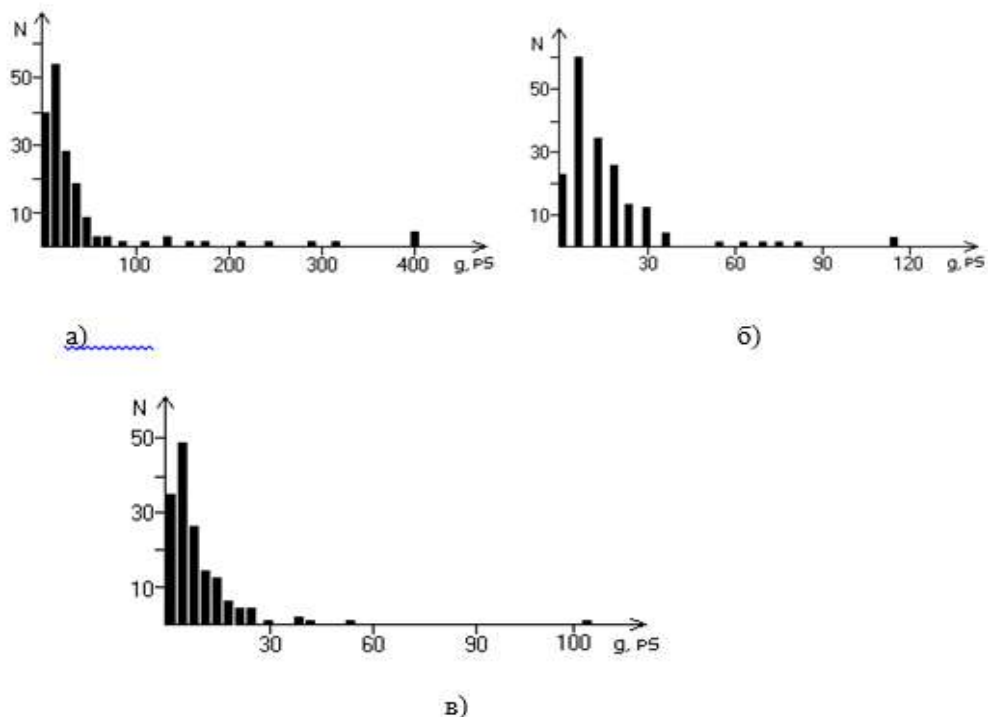


Рис.50. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов, индуцированных краун-эфиром 56. Условия экспериментов: 1 μ M краун-эфира 56 (сим), 25 mM Трис-НCl, pH-7,4, 50 mM KCl (а), 100 mM KCl (б), 500 mM KCl (в), $U_{\text{фикс}}$ +40 мВ.

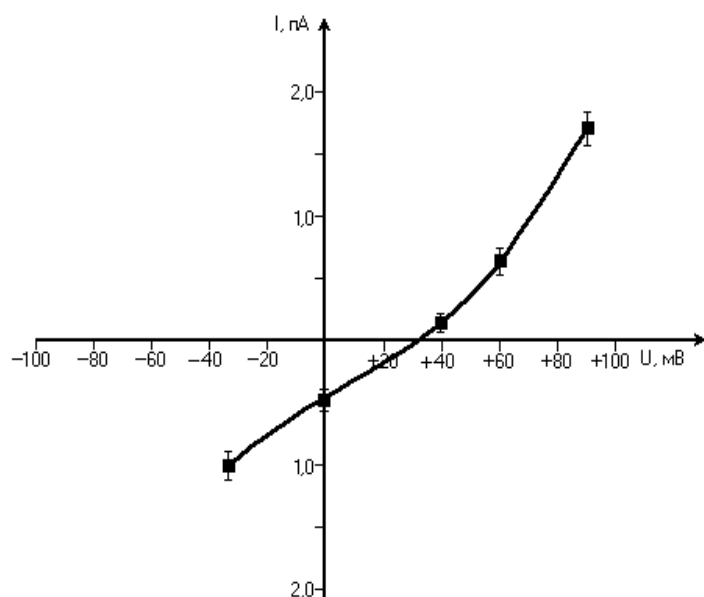


Рис.51. Вольт-амперная характеристика высоко-амплитудных одиночных ионных каналов, зарегистрированных в 10 кратном градиенте KCl (166 mM/500mM), 2 μ M краун-эфира 56 (транс), 25 mM Трис-НCl, pH-7,4.



Рис.52. Регистрация токов одиночных ионных каналов, обладающих различными проводимостями. Условия экспериментов: 1 μ M краун-эфира 56 (сим), 100 mM KCl, 25 mM Трис-HCl, pH-7,4, $U_{\text{фикс}}$ +40 мВ.

Влияние двухвалентных катионов на каналоформерные свойства сульфопроизводных дибензо-18-краун-6

В наших экспериментах не наблюдалось увеличения проводимости бислоев, модифицированных исследованными соединениями для двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} в диапазоне концентраций хлоридов этих металлов до 100 mM. Однако мы обнаружили, что способность исследованных соединений формировать ионные каналы проводимости сильно зависит от присутствия этих катионов в омывающих мембрану растворах. При этом особое значение имеет порядок добавления, соответственно, моновалентного и двухвалентного катиона в омывающие мембрану растворы, содержащие модифицирующее вещество. Данная способность сильно снижается, если переносимый катион добавляется в среду, уже содержащую CaCl_2 . В этом случае наблюдается не только снижение частоты каналообразования, но и доли каналов, имеющих высокую проводимость (рис.53). Так, частота формирования ионных каналов после добавления 50 mM KCl в среду с 50, 100 и 1000 мкМ CaCl_2 снижается, соответственно, в 2, 10 и 100 раз (по отношению к таковой в отсутствие CaCl_2). Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов показывают, что увеличение концентрации Ca^{2+} приводит к снижению доли каналов с высокой проводимостью.

Влияние двухвалентных катионов менее выражено, если они добавляются в растворы, уже содержащие модификатор и переносимый катион. При этом для проявления эффекта на процесс каналообразования необходимы гораздо большие концентрации двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Наблюдалось приблизительно двукратное снижение частоты срабатывания каналов после добавления в омывающие растворы 50 mM Ca^{2+} или Mg^{2+} . В этих concentra-

циях катионы не оказывали заметного качественного влияния на спектр амплитуд проводимостей одиночных каналов, но снижали их проводимость (рис.54).

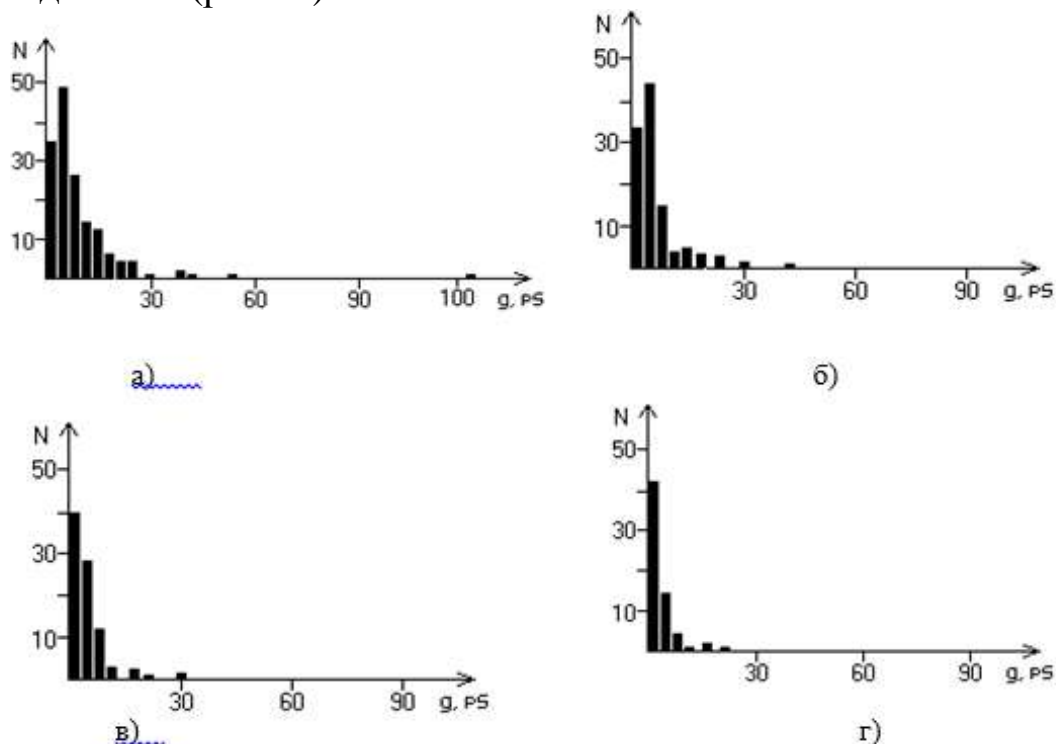


Рис.53. Гистограммы распределения амплитуд проводимостей одиночных ионных каналов в БЛМ, сформированных в растворах (а), не содержащих CaCl_2 , (б) содержащих $50 \mu\text{M}$ CaCl_2 , (в) содержащих $100 \mu\text{M}$ CaCl_2 , (г) содержащих 1mM CaCl_2 . CaCl_2 добавлялся в среду, первоначально содержащую 50 mM KCl , $1\mu\text{M}$ краун-эфира 56 (сим), 25 mM Трис- HCl (pH -7,4, $U_{\text{фикс}} +40\text{ мВ}$).

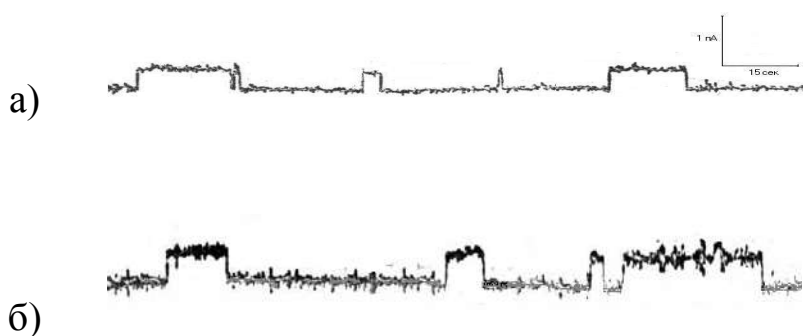


Рис.54. Регистрация одиночных ионных каналов до добавления CaCl_2 (а) и после добавления 50 mM CaCl_2 (б). Среда: 100 mM KCl , $1\mu\text{M}$ краун-эфира 56 (сим), 25 mM Трис- HCl , pH -7,4, $U_{\text{фикс}} +40\text{ мВ}$.

В рамках предполагаемой модели молекулярного механизма каналообразования закисление среды должно сдвигать реакцию образования комплексов влево, что приведет к снижению концентрации комплексных ассоциатов - структур предполагаемой модели молекулярного механизма каналообразования, закисление среды должно сдвигать реакцию образования комплексов влево, что приведет к снижению концентрации комплексных ассоциатов - структур, выполняющих, по нашему предположению, роль ионных каналов проводимости.

Результаты экспериментов по действию двухвалентных катионов позволяют предположить их влияние на процесс сборки каналов, происходящий в водных растворах. Механизм этого влияния может заключаться в реакции взаимодействия двухвалентных катионов с сульфогруппами исследованных соединений, что препятствует образованию предполагаемых ассоциатов. В этом случае отсутствие эффекта на уже сформированные ассоциаты, вероятно, объясняется как их относительно высокой стабильностью, так и недоступностью сульфогрупп, находящихся в толще ассоциатных агрегатов для двухвалентных катионов. С другой стороны, корреляция между мембранной активностью соединений, функционирующих в бислоях и мембранах митохондрий, обнаруженная для многих ионофоров, часто не имеет места в случае каналоформирующих соединений.

Изученные нами водорастворимые сульфопроизводные ДБ18К6 обладают способностью индуцировать образование в плоских бислоях потенциал-зависимые ионные каналы проводимости для моновалентных катионов. Эти свойства зависят от pH омывающих мембрану растворов и присутствия в них двухвалентных катионов.

Таким образом, афинность моновалентных катионов к ионному каналу уменьшается с увеличением их гидратных радиусов. Спектр амплитуд проводимостей каналов широкий, но имеет максимум при $6,2 \pm 0,5$ пСм.

ВАХ изученных одиночных ионных каналов суперлинейны и симметричны относительно начала координат во всем исследованном диапазоне pH и концентраций переносимого катиона. С увеличением проводимости каналов появляется и увеличивается асимметрия ВАХ.

Установлена множественность рабочих и нерабочих состояний ионных каналов, а также потенциалзависимость их функционирования. Обнаружена зависимость формирования ионных каналов от pH среды и присутствия в ней двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} .

На основании проведенных экспериментов предложена модель возможного молекулярного механизма образования и функционирования исследованных ионпроводящих структур в плоских бислоях.

Глава IV

Взаимодействие краун-эфиров, различающихся механизмами мембранного действия, с мультиламеллярными слоями

Изучение взаимодействия Ca^{2+} -комплексонов с мультиламеллярными слоями из ДПФХ

Исследование взаимодействия краун-эфиров, различающихся по структуре и механизму мембранного действия, с мультиламеллярными дисперсиями даёт возможность установить различие в их влиянии на перестройку исходной структуры липидных бислоев. Исследование перестройки структуры липидных бислоев при взаимодействии комплексонов, ионофоров и каналотропов с мембраной позволяет получить важную информацию о механизмах трансмембранного переноса ионов.

Одним из эффективных методов, позволяющих выявлять индуцируемые мембраноактивными молекулами особенности структурных преобразований в липидных бислоях, является метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [256]. Информация, полученная методом ДСК, отражает характер вносимых мембранотропными молекулами возмущений в регулярную пространственную упаковку бислоя. Увеличение подвижности фосфолипидов при температурном сканировании связано с появлением в ацильных цепях гош-конформеров, причём переход транс-гош происходит одновременно для большого числа молекул липидов, объединённых в одну из кооперативных единиц. Процесс коллективного перехода конформации транс-гош называется кооперативным плавлением липидов в бислое.

Измеряемыми параметрами в экспериментах являются термодинамические величины: общая энтальпия плавления (ΔH) [142] и кооперативность плавления, определяемая по величине полуширины пика основного фазового перехода ($\Delta T_{1/2}$), отражающие процессы увеличения подвижности углеводородных цепей фосфолипидов бислоя, первоначально находящихся в полностью транс-конформации. Молекулы мембраноактивных соединений могут изменять динамическое состояние липидного бислоя и тем самым влиять на фазовый переход фосфолипидов из состояния геля (когда все углеводородные цепи находятся в транс-конформации) в жидкокристаллическое состояние (увеличение подвижности цепей фосфолипидов за счёт увеличения вероятности гош-конформеров) [402]. Степень влияния мембранотропных молекул зависит от эффективности их

взаимодействия с липидными молекулами, уровня локализации и латеральной подвижности.

В связи с этим, методом ДСК нами было проведено сравнительное исследование действия ряда краун-эфиров, различающихся механизмами мембранного действия для определения принципов их функционирования в липидных бислоях [410].

Кривые микрокалориметрических измерений были получены с 5-кратной повторностью ($n=5$). Эти данные были подвергнуты статистической обработке с применением пакета прикладных программ статистического анализа на компьютере с вычислением среднего квадратичного отклонения (S), критерия Стьюдента (t), дисперсии нормального распределения (δ) по формуле:

$$\delta = t * \Delta S_{cp.}$$

где δ - дисперсия нормального распределения

t - коэффициент Стьюдента

$\Delta S_{cp.}$ - среднее квадратичное отклонение.

За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $P < 0,05$ [410].

Термограмма плавления мультиламеллярной дисперсии ДПФХ представляет собой узкий пик с максимумом при температуре $T_{пл.}$, называемой температурой основного фазового перехода в гель-жидкий кристалл [406], равной 42.2°C , и менее выраженным пиком предперехода при температуре $T_{пл.}$, равной $(35-36)^{\circ}\text{C}$ (рис.55, контроль). Предпереход связан с изменением наклона ориентированных углеводородных цепей фосфолипидных молекул в гелевой фазе, который нуждается в незначительной энергии при переходе углеводородных цепей липидов из $L\beta$ в $P\beta$ конфигурацию. При плавлении молекулы фосфолипидов переходят из гелевой фазы (когда липиды упакованы в транс - конфигурации) в жидкокристаллическую фазу. Основным вкладом на изменение энтропии этого процесса вносит возможность новых конфигураций, происходящих за счёт транс-гош изомеризации в углеводородных цепях липида. Таким образом, в жидкокристаллическом состоянии ($T > T_{пл.}$) низкая вязкость (высокая текучесть) углеводородной области мембраны объясняется увеличением амплитуды вращательных колебаний вокруг С-С-связей, возникающих гош-конфигурацией и их быстрой изомеризацией в следующую позицию [407].

Полуширина основного пика плавления определяет кооперативность процесса фазового перехода, в то время как площадь под

пиком прямо пропорциональна энтальпии плавления $\Delta H_{пл}$ или тепловому эффекту данного процесса.

Если мембраноактивные краун-эфиры проникают глубоко внутрь гидрофобной области липидного бислоя, то они обычно приводят к нарушению исходной структурной упаковки липида в гелевой фазе. В этом случае характер изменения упаковки липида зависит от структурных особенностей молекул краун-эфиров. На рис.55 приведены экспериментальные данные по действию краун-эфиров, проявляющие Ca^{2+} -комплексонные свойства на мультиламеллярных дисперсиях из ДПФХ. Известно, что изученные нами Ca^{2+} -комплексоны практически не индуцируют трансмембранный перенос ионов Ca^{2+} . Однако при добавлении Ca^{2+} -комплексонов к липидным образцам наблюдается расширение основного пика плавления по сравнению с контролем и увеличение общей энтальпии процесса плавления липидов на 54,9%, 36,7% и 36,9%, уменьшение кооперативности процесса на 77,8%, 44,4% и 44,4%, соответственно (рис.55, табл.5).

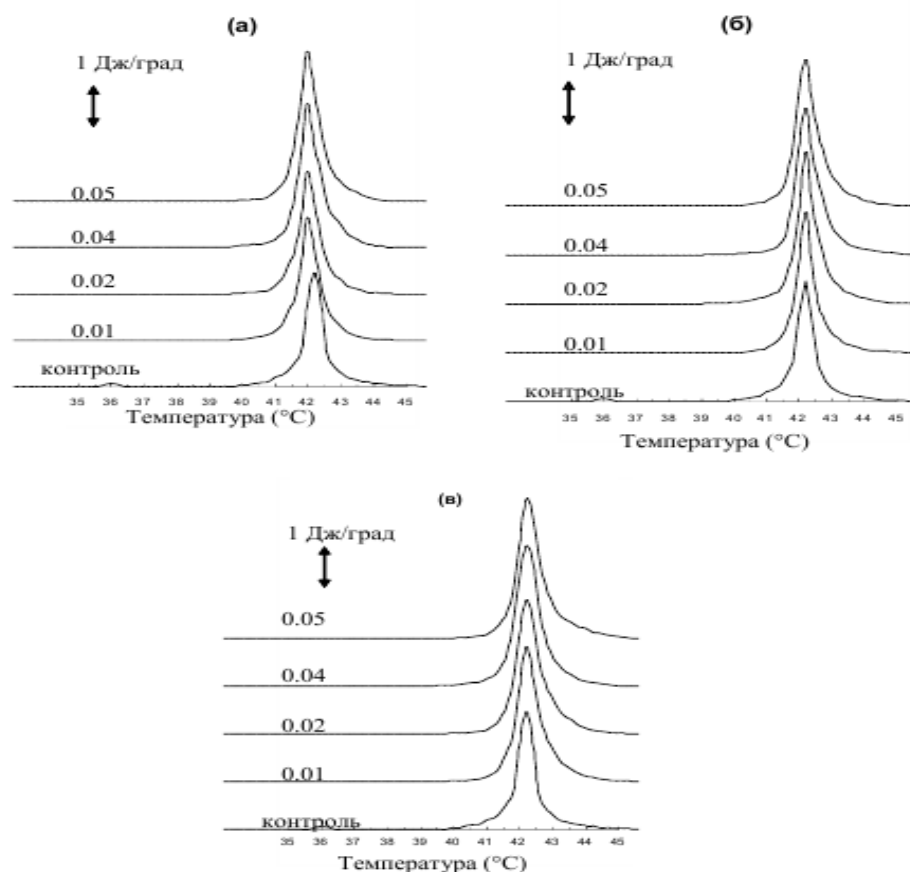


Рис.55. Термограммы плавления мультиламеллярных дисперсий из ДПФХ в зависимости от относительной концентрации Ca^{2+} -комплексонов к липиду: а) 4',4''-диацетил-ДБ18К6; б) 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6; в) 4',5''-диоктаноил-ДБ18К6.

При возрастании относительной концентрации краун-эфира к липиду для 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 и 4',5''-диоктаноил-ДБ18К6 значения $T_{пл}$ остаются практически неизменными, тогда как для 4',4''-диацетил-ДБ18К6 наблюдается слабое уменьшение значения $T_{пл}$ на 1,4% (табл.5). Увеличение общей энтальпии при возрастании относительной концентрации любого из Ca^{2+} -комплексонов к липиду свидетельствует о взаимодействии этих краун-эфиров с полярной частью липидного бислоя без их глубокого проникновения внутрь гидрофобной области. Для 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 и 4',5''-диоктаноил-ДБ18К6 (низкая ионофорная активность) возможно проникновение в незначительную глубину межцепочного пространства углеводородных цепей липидов. В случае 4',4''-диацетил-ДБ18К6 происходит взаимодействие его молекулы лишь с полярной частью липидного бислоя. Если происходит проникновение углеводородных остатков вышеупомянутых краун-эфиров, то они должны затруднить транс-гош изомеризацию углеводородных цепей липидов в процессе плавления при температурах близких к температуре $T_{пл}$ на уровне локализации углеводородных остатков краун-эфиров. В этом случае наблюдается смещение $T_{пл}$ в сторону высоких температур (табл.5). Краун-эфир 4',4''-диацетил-ДБ18К6 вносит возмущение на поверхности липидного бислоя и такое возмущение приводит к уменьшению значения $T_{пл}$ с одновременным увеличением общей энтальпии процесса фазового перехода.

Кооперативность фазового перехода липида обычно зависит от размера кластера, определяемого из экспериментальных значений полуширины основного пика плавления. Оценка кооперативности производится вычислением значения параметра $B = (\Delta H_{экс.} / \Delta H_{VG})^2$, где $\Delta H_{экс.}$ - общая энтальпия процесса плавления липида, ΔH_{VG} - энтальпия Ван Гоффа, которая вычисляется по формуле $\Delta H_{VG} \approx 7 \cdot T_{пл}^2 / \Delta T_{1/2}$, где $T_{пл}$ и $\Delta T_{1/2}$ - температура и полуширина основного пика плавления, соответственно. В отсутствии кооперативности процесса $B=1$, а при высокой кооперативности $B \ll 1$. Увеличение или уменьшение значения B для липидных образцов при добавлении к ним краун-эфиров свидетельствует о снижении или возрастании кооперативности процесса фазового перехода липида, соответственно. Из экспериментальных данных следует, что возрастание относительной концентрации Ca^{2+} -комплексонов приводит к увеличению значения B в сравнении с контролем или к уменьшению кооперативности процесса (табл.5).

Таблица 5

Термодинамические параметры процесса плавления мультиламеллярных дисперсии из ДПФХ под действием Ca^{2+} -комплексонов при различных молярных соотношениях краун-эфира к липиду ($C_e/C_{\text{лип.}}$)

$C_e/C_{\text{лип.}}$	$\Delta H_{\text{пл}}$ (кДж/моль)	$T_{\text{пл}}$ (°C)*	$\Delta T_{1/2}$ (°C)*	σ
Контроль	35.98±0,87	42.20	0.70	0.036±0,0008
4',4''-диацетил-ДБ18К6				
1:100	39.33±1,71	42.00	0.72	0.041±0,0009
1:50	38.96±1,74	41.80	0.72	0.040±0,0009
1:25	48.12±1,84	41.80	0.74	0.051±0,0012
1:20	49.97±1,87	41.80	0.80	0.058±0,0014
1:10	55.75±1,93	41.60	0.80	0.064±0,0015
4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6				
1:100	39.13±1,83	42.20	0.72	0.041±0,0009
1:50	46.14±1,80	42.20	0.72	0.048±0,0010
1:25	47.02±1,77	42.20	0.74	0.050±0,0012
1:20	49.07±1,83	42.25	0.74	0.052±0,0012
1:10	49.17±1,80	42.25	0.74	0.052±0,0012
4', 5''-диоктаноил-ДБ18К6				
1:100	46.47±1,77	42.20	0.72	0.048±0,0011
1:50	48.53±1,84	42.20	0.72	0.050±0,0012
1:25	51.65±1,25	42.20	0.74	0.055±0,0013
1:20	51.00±1,24	42.25	0.74	0.054±0,0013
1:10	49.26±1,19	42.25	0.74	0.052±0,013

*Ошибка измерения температуры составляет 0,01°C.

Все изученные Ca^{2+} -комплексоны увеличивают общую энтальпию и полуширину, уменьшают кооперативность фазового перехода липида. При этом Ca^{2+} -комплексоны 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 и 4',5''-диоктаноил-ДБ18К6 проникают на незначительную глубину межцепочного пространства углеводородных цепей липидов, что согласуется с их низкой ионофорной активностью. В случае глубокого внедрения углеводородных заместителей этих соединений и при наличии электростатического взаимодействия между молекулами краун-эфиров и полярной частью фосфолипидов может наблюдаться явление интердигитации в липидной фазе, которое обычно обнаруживается как высокотемпературное плечо на термограмме плавления [410].

Изучение взаимодействия Ca^{2+} -ионофоров с мультиламеллярными слоями из ДПФХ

Ионофорные и каналоформенные свойства краун-эфиров зависят также от их сродства к высокоорганизованным липидным системам, одними из которых являются бислойные липидные мембраны. Ионофоры при внедрении в бислой должны совершенно иначе влиять на структурно-динамические свойства липидных бислоев, в отличие от соединений, формирующих в бислоях ионные каналы проводимости. Кроме того, краун-эфиры с низкой липофильностью и, соответственно, с высокой полярностью могут взаимодействовать только с полярной частью липидного бислоя без заметного проникновения вглубь гидрофобной области [406, 407]. Следовательно, важным является выявление различий в структурных преобразованиях липидного матрикса, которые могут индуцировать краун-эфиры, обладающие различными механизмами трансмембранного переноса ионов.

Если краун-эфир проявляет ионофорные свойства, тогда его молекулы распределяются внутри липидного матрикса и исключают часть липидных молекул из кооперативного процесса плавления, поскольку изменяется исходная упорядоченность липидных молекул, находящихся в гелевой фазе. В этом случае будет наблюдаться исчезновение пика предперехода, увеличение полуширины основного пика плавления и уменьшение значения общей энтальпии фазового перехода. Подобный феномен наблюдается для большинства мембраноактивных молекул, внедряющихся глубоко внутрь гидрофобной области липидных мембран [35, 410].

В отличие от Ca^{2+} -комплексонс: 4',4''-диацетил-18К6, 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 и 4',5''-диооктаноил-ДБ18К6, краун-эфиры 4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6 и 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 проявляют Ca^{2+} -ионофорную активность [395]. Следовательно, эти соединения полностью локализуются внутри бислойного пространства. Молекулы ионофоров нарушают строгую упаковку углеводородных цепей липида при температуре ниже температуры основного фазового перехода ДПФХ. В связи с этим, некоторая часть молекул липидов, возмущенная молекулами ионофоров, должна быть исключена из процесса фазового перехода, что приводит к уменьшению интенсивности основного пика плавления на 0,94% (рис.56). Это означает, что происходит уменьшение общей энтальпии процесса фазового перехода на 26,2% и 17,5%, соответственно (табл.6).

При внедрении в липидный бислой молекулы ионофоров нарушают межцепочное гидрофобное взаимодействие между молекулами липида, что объясняется уменьшением значения $T_{пл}$ и увеличением полуширины $\Delta T_{1/2}$, которая зависит от кооперативности процесса фазового перехода липидной дисперсии. Параметр Δ , оценивающий степень кооперативности в случае Ca^{2+} -ионофоров, в отличие от Ca^{2+} -комплексонов уменьшается незначительно.

Следовательно, на основе экспериментальных данных можно заключить, что в отличие от Ca^{2+} -комплексонов, молекулы Ca^{2+} -ионофоров слабо увеличивают размер кооперативных кластеров.

Изучение взаимодействия Ca^{2+} -каналоформеров с мультиламеллярными слоями из ДПФХ

Экспериментальные данные по взаимодействию краун-эфиров, проявляющих каналоформерные свойства: диметиламиноэтанол-ДБ18К6 (краун-эфир 50) и псевдоциклического аналога ДБ18К6 (краун-эфир 51) с мультиламеллярными липидными дисперсиями из ДПФХ показаны на рис.57. Эти Ca^{2+} -каналоформеры, в отличие от молекул ионофоров, имеют ограниченную свободу движения и могут непосредственно влиять только на окружающие их липидные молекулы. Оказалось, что Ca^{2+} -каналоформеры уменьшают общую энтальпию фазового перехода процесса плавления липидов на 39,9% и 15,9%, увеличивая кооперативность процесса на 38,9% и 16,7%, соответственно (табл.7).

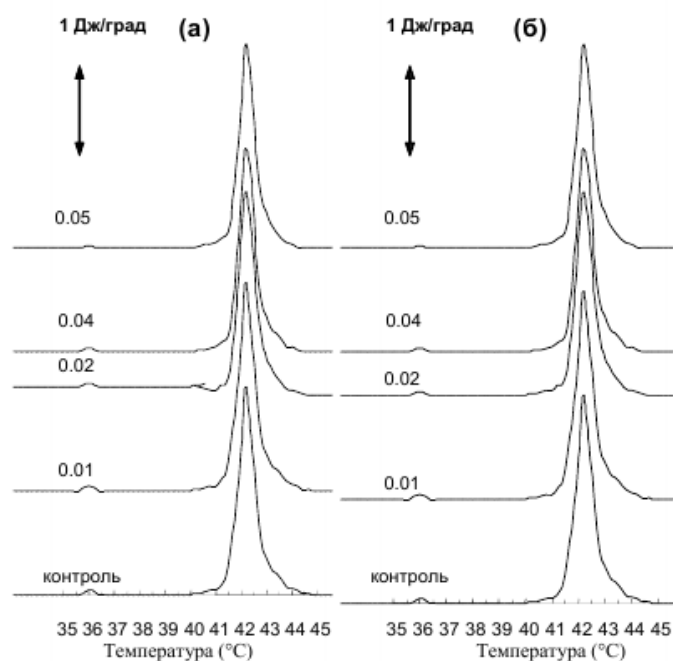


Рис.56. Термограммы плавления мультиламеллярных дисперсий из ДПФХ в зависимости от относительной концентрации Ca^{2+} -ионофоров к липиду: а) 4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6; б) 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6

Таблица 6

Термодинамические параметры процесса плавления
мультиламеллярных дисперсии из ДПФХ под действием
 Ca^{2+} -ионофоров при различных молярных соотношениях
краун-эфира к липиду ($C_c/C_{\text{лип.}}$)

$C_c/C_{\text{лип.}}$	$\Delta H_{\text{пл}}(\text{кДж/моль})$	$T_{\text{пл}}(^{\circ}\text{C})^*$	$\Delta T_{1/2}(^{\circ}\text{C})^*$	σ
Контроль	$35.98 \pm 0,87$	42.20	0.70	$0.036 \pm 0,0008$
4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6				
1:100	$29.65 \pm 0,72$	42.00	0.74	$0.035 \pm 0,0008$
1:50	$29.17 \pm 0,70$	41.80	0.80	$0.034 \pm 0,0008$
1:25	$28.48 \pm 0,69$	41.80	0.80	$0.033 \pm 0,0008$
1:20	$28.02 \pm 0,68$	41.80	0.80	$0.032 \pm 0,0008$
1:10	$26.55 \pm 0,65$	41.80	0.80	$0.031 \pm 0,0007$
4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6				
1:100	$35.28 \pm 0,86$	42.20	0.72	$0.036 \pm 0,0008$
1:50	$34.46 \pm 0,84$	42.05	0.76	$0.035 \pm 0,0008$
1:25	$29.98 \pm 0,73$	41.05	0.76	$0.033 \pm 0,0008$
1:20	$29.95 \pm 0,73$	41.80	0.80	$0.033 \pm 0,0008$
1:10	$29.68 \pm 0,72$	41.80	0.82	$0.032 \pm 0,0008$

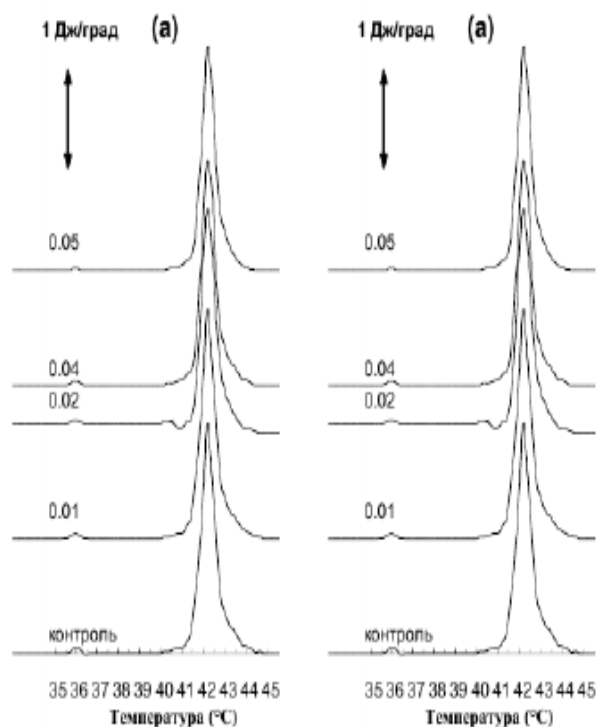


Рис.57. Термограммы плавления мультисамеллярных дисперсий из ДПФХ в зависимости от относительной концентрации Ca^{2+} -каналоформеров к липиду: а) 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6; б) бис-о-метокси-фенокси-диэтиловый эфир

Таким образом, изученные краун-эфиры проявляют принципиально различное действие на структуру липидных дисперсий. Это видно из рис.58, где приведены изменения общей энтальпии процесса фазового перехода для мультисамеллярных дисперсий из ДПФХ при добавлении возрастающих концентрации трёх типов краун-эфиров: Ca^{2+} -комплексон, Ca^{2+} -ионофоров и Ca^{2+} -каналоформеров. Для изученных Ca^{2+} -комплексон происходит возрастание значений общей энтальпии, тогда как для Ca^{2+} -ионофоров и Ca^{2+} -каналоформеров уменьшение значений тепловых эффектов.

Изучение взаимодействия K^{+} -каналоформеров с мультисамеллярными дисперсиями из ДМФХ

Ранее было установлено, что водорастворимые сульфопроизводные - 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-, 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-, 4'-ДБ18К6- сульфокислота и 4',4''(5'')-ДБ18К6- дисульфокислота способны индуцировать в липидных бислоях одиночные ионные каналы проводимости для моновалентных катионов [415]. Каналоформерные свойства этих соединений зависели от степени их липофильности и располагались в следующий ряд:

4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота > 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота > 4'-ДБ18К6-сульфокислота > 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислота [412, 413, 415].

Таблица 7

Термодинамические параметры процесса плавления
мультиламеллярных дисперсий из ДПФХ под действием
Ca²⁺-каналоформеров при различных молярных соотношениях
краун-эфира к липиду (C_c/C_{лип.})

C _c /C _{лип.}	ΔH _{пл} (кДж/моль)	T _{пл} (°C)*	ΔT _{1/2} (C°)*	σ
Контроль	35.98±0,87	42.20	0.70	0.036±0,0008
4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6				
1:100	31.41±0,76	42.20	0.70	0.032±0,0007
1:50	30.55±0,74	42.20	0.70	0.031±0,0007
1:25	29.96±0,73	42.20	0.70	0.030±0,0007
1:20	28.76±0,69	42.20	0.70	0.029±0,0007
1:10	21.62±0,52	42.20	0.70	0.022±0,0005
бис-о-метоксифенокси-диэтиловый эфир				
1:100	35.31±0,86	42.20	0.70	0.036±0,0008
1:50	34.46±0,83	42.20	0.70	0.035±0,0008
1:25	34.00±0,83	42.20	0.70	0.034±0,0008
1:20	31.78±0,77	42.20	0.70	0.032±0,0007
1:10	30.25±0,73	42.20	0.70	0.030±0,0007

*Ошибка измерения температуры составляет 0,01°C.

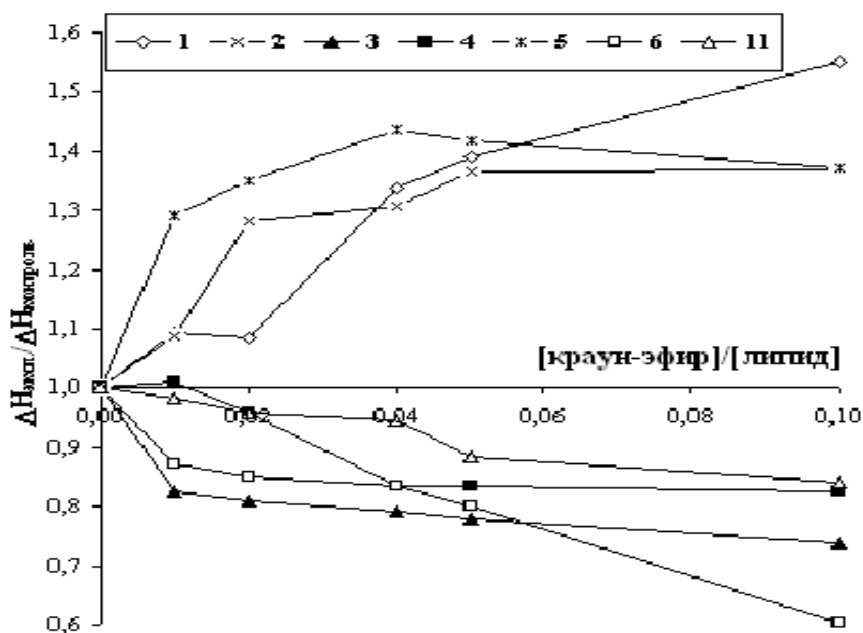


Рис.58. Изменение относительной энтальпии процесса плавления мультиламеллярных дисперсии из ДПФХ при возрастании относительной концентрации краун-эфиров к липиду: 4',4''-диацетил-ДБ18К6-(1), 4',4''(5'')-дипропиоил-ДБ18К6-(2), 4',5''-диоктаноил ДБ18К6-(5) -(Ca²⁺-комплексоны); 4',4''(5'')-дивалерил -ДБ18К6-(3), 4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6-(4) -(Ca²⁺-ионофоры); 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6-(6), бис-*o*-метоксифеноксидиэтиловый эфир-(11)-(Ca²⁺-каналотормеры)

На рис.59 показано, что термограммы плавления контрольных мультиламеллярных дисперсий (ДМФХ) представляют узкий пик с максимумом при температуре $T_{пл}$, равной 24,2°C, и менее выраженным пиком предперехода при температуре $T_{пл}$, равной 14°C.

Изученные сульфопроизводные-ДБ18К6 приводят к изменению исходной организации молекул липидов, которые, в первую очередь, уменьшает величину пика предперехода [406, 407]. Это наблюдается, когда в липидную дисперсию из ДМФХ (рис.59) добавляются более липофильные сульфопроизводные - 4'-третбутил-4''(5'')- и 4'-ацетил-4''(5'')- ДБ18К6-сульфоокислота. Практически для этих краун-эфиров уже при соотношении $C_0/C_{лип.} = 0.02$ исчезает пик предперехода, тогда как в случае соединений 4'-ДБ18К6-сульфоокислоты и 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислоты пик предперехода наблюдается при всех использованных концентрациях. Следовательно, краун - эфиры 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота и 4'-ацетил - 4''(5'') - ДБ18К6 - сульфокислота приводят к уменьшению общей энтальпии

процесса фазового перехода на 17,7%, тогда как для 4'-ДБ18К6-сульфоокислоты и 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфоокислоты это уменьшение составляет 6,3% и 2,6%, соответственно. В таблице 8 показано, что 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота и 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота приводят к существенному расширению основного пика плавления и смещению значения температуры максимума основного фазового перехода в сторону низких температур при $C_c/C_{\text{лип.}}=0.02$. Расширение основного пика плавления свидетельствует об увеличении параметра Δ , и следовательно уменьшения кооперативности процесса.

Показано, что 4'-ДБ18К6-сульфоокислота и 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфоокислота более слабо влияют на термодинамические параметры процесса фазового перехода дисперсии ДМФХ. В случае взаимодействия Ca^{2+} -каналоформеров: 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6 и бис-о-метоксифенокси-диэтиловый эфир с мультисамеллярными дисперсиями из ДПФХ, значения полуширины фазового перехода и температуры основного пика плавления $T_{\text{пл}}$ оставались неизменными. В случае взаимодействия K^+ -каналоформеров: 4'-третбутил-4''(5'')-, 4'-ацетил-4''(5'')-, 4'-ДБ18К6-сульфоокислота и 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфоокислота с мультисамеллярными дисперсиями из ДМФХ наблюдалось как расширение основного пика плавления, так и смещение температуры основного фазового перехода в сторону низких температур. Таким образом, было выявлено принципиальное различие в характере взаимодействия краун-эфиров, различающихся механизмами мембранного действия, с мультисамеллярными дисперсиями из ДПФХ и ДМФХ.

Таким образом, изучено взаимодействие Ca^{2+} -комплексонеров: 4',4''-диацетил-, 4',4''(5'')-дипропиноил- и 4',5''-диоктаноил-ДБ18К6, Ca^{2+} -ионофоров: 4',4''(5'')-дибутирил- и 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 и Ca^{2+} -каналоформеров: 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6 и бис-о-метоксифенокси-диэтиловый эфир с мультисамеллярными дисперсиями из ДПФХ, а K^+ -каналоформеров: 4'-третбутил-4''(5'')-, 4'-ацетил-4''(5'')-, 4'-ДБ18К6-сульфоокислота и 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфоокислота с мультисамеллярными дисперсиями из ДМФХ.

Показано, что Ca^{2+} -комплексоны взаимодействуют за счёт электростатических сил с полярной частью липида, что приводит к

увеличению энергии, необходимой для перехода липидной дисперсии из гелевой в жидкокристаллическую фазу, т.е. общей энтальпии данного процесса. При возрастании относительной концентрации краун-эфиров к липиду в случае Ca^{2+} -ионофоров увеличивается значение полуширины фазового перехода.

Установлено, что при взаимодействии K^+ -каналоформеров с мультисамельными дисперсиями из ДМФХ наблюдается как расширение основного пика плавления, так и смещение температуры основного фазового перехода в сторону низких температур.

Определение особенностей взаимодействия краун-эфиров, различающихся по механизму мембранного действия с мультисамельными слоями дает возможность показать различие в их влиянии на перестройку исходной структуры липидных бислоев. Это отражает характер вносимых мембранными молекулами возмущений в регулярную упаковку бислоя и позволяет судить о вероятном участии взаимодействия с молекулой.

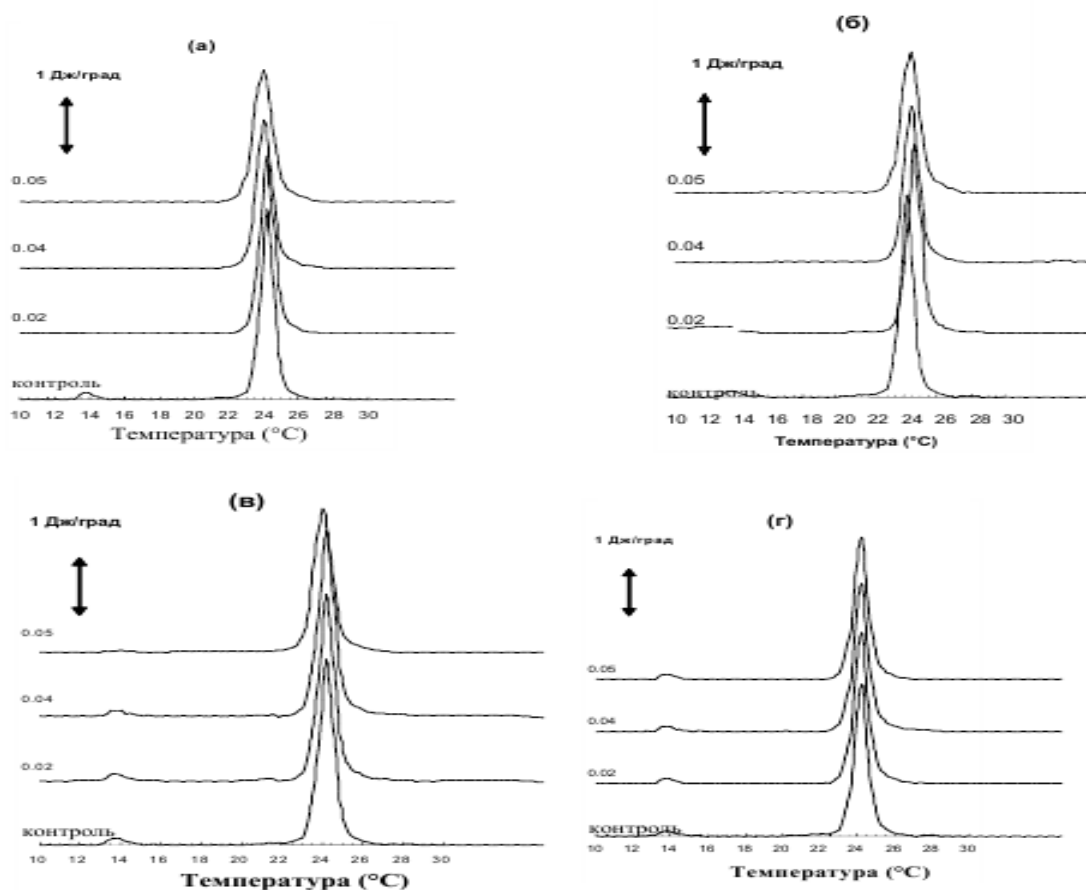


Рис.59. Термограммы плавления мультисамельных дисперсии из ДМФХ в зависимости от относительной концентрации K^+ -каналоформеров к липиду: а) 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота, б) 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота, в) 4'-ДБ18К6-сульфокислота, г) 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислота.

Таблица 8

Термодинамические параметры процесса плавления мульти-
ламеллярных дисперсий из ДМФХ под действием
K⁺-каналоформеров при различных молярных соотношениях
краун-эфира к липиду (C_c/C_{лип.})

C _c /C _{лип.}	ΔH _{пл} (кДж/моль)	T _{пл} (°C)*	ΔT _{1/2} (°C)*	σ
Контроль	27.34±0,66	24.2	0.80	0.035±0,0008
4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота				
1:50	25.77±0,63	24.2	0.90	0.038±0,0009
1:25	24.38±0,59	24.0	0.98	0.039±0,0009
1:20	22.50±0,54	24.0	1.20	0.044±0,001
4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота				
1:50	25.94±0,62	24.2	0.84	0.035±0,0008
1:25	24.79±0,60	24.0	0.88	0.038±0,0009
1:20	22.50±0,54	24.0	1.20	0.044±0,001
4'-ДБ18К6-сульфокислота				
1:50	27.50±0,67	24.2	0.84	0.036±0,0008
1:25	26.88±0,65	24.2	0.84	0.037±0,0009
1:20	25.63±0,62	24.1	0.86	0.037±0,0009
4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислота				
1:50	27.64±0,67	24.2	0.80	0.035±0,0008
1:25	27.13±0,66	24.2	0.82	0.036±0,0008
1:20	26.63±0,64	24.2	0.82	0.036±0,0008

*Ошибка измерения температуры составляет 0,01°C.

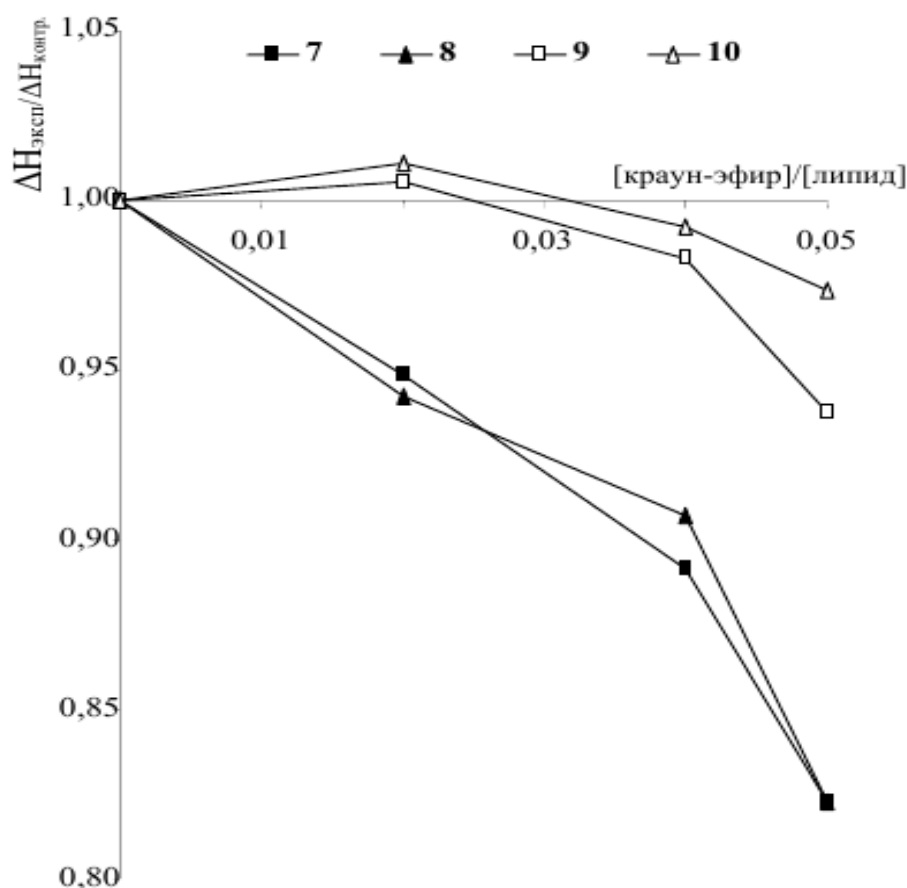


Рис.60. Изменение относительной энтальпии процесса плавления мультисамельлярных дисперсий из ДМФХ при возрастании относительной концентрации краун-эфиров к липиду: 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота(7), 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота (8), 4'-ДБ18К6-сульфокислота (9), 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислота (10) - K^+ -каналомформеры

На основании полученных термограмм плавления мультисамельлярных дисперсий фосфолипидов можно констатировать, что Ca^{2+} -комплексоны: 4',4''-диацетил-ДБ18К6, 4',4''(5'')- дипропионил-ДБ18К6 и 4',5''-диооктаноил-ДБ18К6 повышают общую энтальпию фазового перехода процесса плавления липидов, уменьшая кооперативность процесса. При возрастании относительной концентрации краун-эфиров к липиду увеличивается значение полуширины фазового перехода, а температура основного пика плавления липидов $T_{\text{пл}}$ незначительно увеличивается для длиноцепочных комплексонов и уменьшается для короткоцепочного комплексона. Для длиноцепочных Ca^{2+} -комплексонов: 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 и 4',5''-диооктаноил-ДБ18К6 наблюдается незначительное смещение $T_{\text{пл}}$ в сторону высоких температур. Это

свидетельствует о том, что для длиноцепочных комплексонов, проявляющих слабую ионофорную активность, возможно проникновение в незначительную глубину межцепочного пространства. 4',4''-диацетил-ДБ18К6 вносит возмущение всецело на поверхности липидного бислоя и это приводит к уменьшению $T_{пл}$ с одновременным увеличением общей энтальпии процесса фазового перехода.

Ca^{2+} -ионофоры: 4',4''(5'') -дибутирил-ДБ18К6 и -дивалерил-ДБ18К6 понижают общую энтальпию фазового перехода процесса плавления липидов, слабо увеличивая кооперативность процесса. Ca^{2+} -ионофоры полностью локализуются внутри бислойного пространства, они нарушают строгую упаковку углеводородных цепей фосфолипидов при температуре ниже температуры основного фазового перехода, нарушают межцепочное гидрофобное взаимодействие между различными молекулами фосфолипидов. В связи с этим, определенная часть молекул фосфолипидов, возмущенная молекулами Ca^{2+} -ионофоров, исключается из процесса фазового перехода фосфолипидов, что ведет к уменьшению интенсивности основного пика плавления и как следствие к уменьшению общей энтальпии процесса фазового перехода. Эти Ca^{2+} -ионофоры вносят незначительные возмущения поверхности липидного бислоя, что приводит к уменьшению $T_{пл}$ на 0,94%.

Ca^{2+} -каналоформеры: 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6 и бис-о-метоксифеноксидиэтиловый эфир понижают общую энтальпию фазового перехода процесса плавления липидов, увеличивая кооперативность процесса. При возрастании относительной концентрации краун-эфиров к липиду значение полуширины фазового перехода и температура основного пика плавления липидов $T_{пл}$ остаются неизменными. Ca^{2+} -каналоформеры образуют каналые структуры, которые, встраиваясь в бислой, нарушают строгую упаковку углеводородных цепей фосфолипидов. Это ведет к уменьшению общей энтальпии процесса фазового перехода и увеличению его кооперативности.

K^{+} -каналоформеры: 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота, 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота, 4'-ДБ18К6-сульфокислота и 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислота понижают общую энтальпию фазового перехода процесса плавления липидов, уменьшая кооперативность процесса. При возрастании относительной концентрации краун-эфиров к липиду значение полуширины фазового перехода увеличивается, а температура основного пика плавления

липидов $T_{пл}$ остается неизменной. По-видимому, K^+ -каналоформеры нарушают строгую упаковку углеводородных цепей фосфолипидов, не вызывая каких-либо заметных поверхностных возмущений ($T_{пл} - const$).

Кооперативность фазового перехода липидов зависит от кластеров, определяемых из экспериментальных значений полуширины основного пика плавления. Области с сохраняющимся ближним порядком (кластеры) характерны в каждый данный момент времени как для жидких кристаллов, так и для обычных жидкостей. В таких кластерах ближайшие к полярным головкам участки цепей имеют несколько более плотную упаковку геля в “твердом” бислое. По направлению к центру бислоя плотность упаковки уменьшается, как и на границах кластеров, которые непрерывно распадаются и образуются, перемещаясь вдоль бислоя. При этом граничные области между кластерами являются как бы динамическими дефектами в бислое. Таким образом, кластеры - это динамические (мгновенные) образования с временем жизни 10^{-7} секунд, включающие 40-60 углеводородных цепей (20-30 молекул фосфолипида) [322].

Действительно, для краун-эфиров 4',4''(5'') - диметиламино-этанол-ДБ18К6 (краун-эфир 50) и бис-о-метоксифенокси-диэтиловый эфир (краун-эфир 51) индуцирующих Ca^{2+} -канальную проводимость на бислоях типа липидного канала наблюдается увеличение кооперативности фазового перехода липидов на 38,9% и 16,7% соответственно. Для сульфопроизводных-ДБ18К6 (краун-эфир 56-59), индуцирующих K^+ -канальную проводимость типа “молекулярных ассоциатов”, не наблюдается такой тенденции, а фиксируется наоборот уменьшение кооперативности фазового перехода липидов, хотя как и в случае липидного канала мы имеем дело с индуцированием канальных структур. Это может служить еще одним веским доводом в пользу различия в механизмах этих двух типах каналообразования краун-эфирами на бислоях.

В целом, для изученных Ca^{2+} -комплексонов происходит увеличение значения общей энтальпии, тогда как для Ca^{2+} -ионофоров и Ca^{2+} -каналоформеров уменьшаются значения тепловых эффектов. Для K^+ -каналоформеров эта тенденция сохраняется, но в отличие от Ca^{2+} -каналоформеров дозозависимо уменьшается полуширина основного пика плавления липидных дисперсии из ДМФХ. Таким образом, для изученных краун-эфиров удалось обнаружить общую закономерность: относительная энтальпия процесса плавления

мультиламеллярных дисперсии липидов при возрастании соотношения концентрации краун-эфиров к липиду для комплексонов возрастает, а для ионофоров и каналоформеров уменьшается независимо от переносимого катиона (рис.58,60).

Сравнительный анализ комплексообразующих, мембраноактивных и термодинамических характеристик краун-эфиров, различающихся механизмами мембранного действия

Нами были изучены и сравнены между собой комплексообразующие свойства сульфопроизводных-, N-замещенных-, дивторбутилпроизводных-, диацилпроизводных-ДБ18К6, а также 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6 и бис-о-метоксифенокси-диэтилового эфира методом кондуктометрии [376,408-410]. Кривые кондуктометрического титрования получены с 5-кратной повторностью (n=5). Данные подвергнуты статистической обработке с применением пакета прикладных программ статистического анализа на компьютере с вычислением среднего квадратичного отклонения (S), критерия Стьюдента (t), дисперсии нормального распределения (δ) по формуле: $\delta = t * \Delta S_{cp}$.

где δ - дисперсия нормального распределения

t - коэффициент Стьюдента

ΔS_{cp} - среднеквадратичное отклонение [410].

За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $P < 0,05$.

На рис.61 приведены зависимости изменения свободной энергии Гиббса при комплексообразовании сульфопроизводных-ДБ18К6 с ионами K^+ , Na^+ и Ca^{2+} .

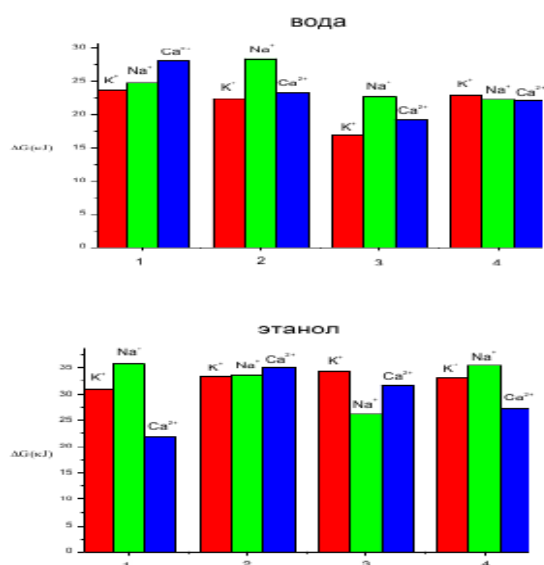


Рис.61. Изменение свободной энергии Гиббса при комплексообразовании сульфопроизводных-ДБ18К6 с ионами K^+ , Na^+ и Ca^{2+} .

1. 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота
2. 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота
3. 4'-ДБ18К6-сульфокислота
4. 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислота

Очевидно, что свободная энергия образования комплекса в растворе $\Delta F_{\text{компл}} = -RT \cdot \ln K$ определяется следующим выражением: $\Delta F_{\text{компл}} = \Delta F_{\text{ML}} - \Delta F^s_{\text{M}} + \Delta F^s_{\text{ML}} - \Delta F^s_{\text{L}} = \Delta F_{\text{ML}} - \Delta F^s_{\text{M}} + \Delta(\Delta F^s)_{\text{L}}^{\text{ML}}$, где ΔF_{ML} – энергия взаимодействия молекул комплексона с ионами в газовой фазе, ΔF^s_{M} – энергия сольватации свободных ионов, а член $\Delta(\Delta F^s)_{\text{L}}^{\text{ML}}$ отражает разницу в энергиях сольватации комплексов и свободных молекул [32].

Свободная энергия Гиббса указывает на тенденцию связывания молекулами краун-эфиров ионов металлов. Чем выше по абсолютной величине значение ΔG , тем выше тенденция к образованию комплексов. Как видно из табл. 9, диапазон изменения величины ΔG для комплексообразования в водной среде составляет ~11 кДж и ~14 кДж в этанольном растворе. Это означает, что по отношению к некоторым ионам процесс самопроизвольного образования комплексов избирателен. Но, однозначно следует, что процесс связывания молекулами краун-эфиров с ионами металлов предпочтительно в этаноле, нежели в воде. Это, по-видимому, связано, в первую очередь, с конформацией молекул краун-эфиров, детерминированных внешней средой.

Важная с биологической точки зрения K^+/Na^+ - избирательность комплексообразования установлена для 4'-ДБ18К6-сульфоокислоты в этаноле (K^+/Na^+ -избирательность в этаноле =4,2).

На рис.62 видно, как изменяется константа комплексообразования по ионам Ca^{2+} . Было показано, что сульфопроизводные-ДБ18К6 в различной степени амфифильны, причём сродство к неполярной фазе снижается в ряду: 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота, 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота, 4'-ДБ18К6-сульфоокислота, 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислота. Также установлено, что сродство этих соединений к неполярной фазе выше в водной фазе хлорида калия [23]. Наибольшей каналоформерной активностью среди них по ионам K^+ обладает 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота.

Наибольшая Ca^{2+} избирательность наблюдается в этаноле для 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота, а в воде - для 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислоты, причём в воде наблюдается монотонный рост этой избирательности.

Анализ полученных результатов показывает, что практически во всех экспериментах комплексообразование по ионам K^+ , Na^+ и Ca^{2+} в этаноле выше, чем в воде, и отличается на один и более поряд-

ков. Исключение составляет комплексообразование по ионам Ca^{2+} в этаноле для 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислоты, где она меньше, чем в воде более, чем в 10 раз.

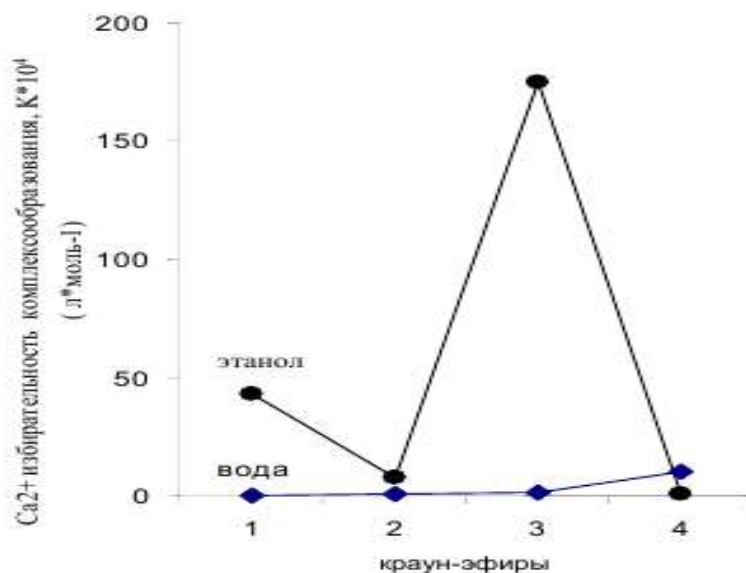


Рис.62. Изменение Ca^{2+} -избирательности комплексообразования в зависимости от структуры сульфопроизводных - ДБ18К6: 4'-ДБ18К6-сульфокислота (1), 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислота (2), 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота(3), 4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота (4)

Таким образом очевидно, что устойчивость комплекса 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота с ионами Ca^{2+} отличается от устойчивости комплексов других исследованных сульфопроизводных. Как уже отмечалось выше, константа устойчивости может быть представлена как мера теплотворной способности и изменения энтропии реакции комплексообразования, поэтому устойчивость комплекса увеличивается с повышением теплотворной способности и энтропии процесса. По-видимому, именно это и происходит в случае комплексообразования 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислота с ионами Ca^{2+} в этаноле.

Если рассматривать структурную формулу 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислоты, то видно, что сульфогруппа из акцепторного заместителя может превращаться в донорный заместитель, что

приводит к увеличению реакционной способности второго бензольного ядра. Создаются условия для перехода бензоидной структуры в хиноидную, в результате образования которой на катехольном кислороде возникает полный положительный заряд и как следствие образование “триножной структуры” макрокольца (рис.63) [396].

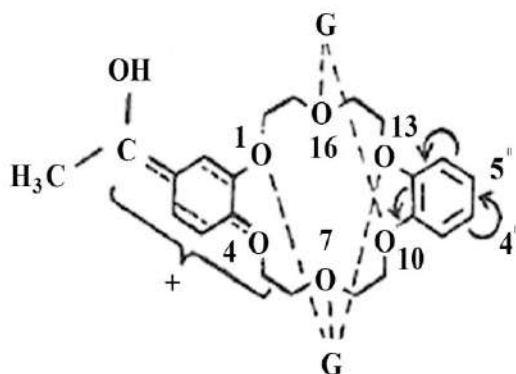


Рис.63. Хиноидная структура 4'-ацетил-4''(5'')- ДБ18К6-сульфокислоты

Оставшиеся 5 кислородов макроцикла имеют по две пары свободных электронов, которые способны связываться с ионами Ca^{2+} . Аналогичные эффекты мы наблюдали ранее при изучении комплексообразования диацилпроизводных-ДБ18К6 [348,394,395]. Таким образом, образование хиноидной структуры (рис.63) приводит к значительным конформационным изменениям структуры молекулы 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфокислоты при комплексообразовании в этаноле. Это ещё раз подтверждает увеличение вклада энтропийного члена в реакцию комплексообразования по сравнению с другими исследованными сульфопроизводными-ДБ18К6.

Ранее нами было показано, что в целом наблюдается хорошая корреляция константы устойчивости комплексов с термодинамическими параметрами комплексообразования [349, 376], но наибольший коэффициент корреляции наблюдается для изменения значений энтальпий радикалов заместителей. С увеличением длины заместителей в бензольных кольцах диалкил- и диацилпроизводных-ДБ18К6 константа устойчивости комплексов с ионами Ca^{2+} монотонно изменяется. Причём для диалкилпроизводных-ДБ18К6 она линейная, тогда как для диацилпроизводных-ДБ18К6 она имеет квадратичный характер. В таблице 9 приведены термодинамические параметры боковых заместителей макроцикла для диацилпроизводных-ДБ18К6. Комплексообразующая способность изменяется в зависимости от изменения энергии взаимодействия между катионом и донорными

атомами кислорода макроцикла, поскольку заместители в боковых бензольных кольцах оказывают несомненное влияние на зарядовое распределение в кольце, а значит и на электростатические взаимодействия катиона с лигандом. Свой вклад вносят и процессы сольватации исходных реагентов и комплексов. Этим и объясняется столь очевидная зависимость комплексообразования в растворе от изменения энтальпии, термодинамической функции, которая наиболее полно отражает процессы сольватации исходных реагентов и образующихся комплексов, а также энергию связи с донорными атомами макроцикла.

На примере сульфопроизводных-ДБ18К6 видно, что нельзя пренебрегать и возможными конформационными изменениями в молекуле краун-эфиров в зависимости от природы заместителей. Повидимому, такие изменения в молекуле краун-эфиров при комплексообразовании могут увеличить энтропийный вклад в термодинамический процесс.

Таким образом, использование в анализе данных по комплексообразованию термодинамических характеристик позволяет придать полученным данным вполне определенное физико-химическое толкование.

Таблица 9

**Термодинамические параметры боковых заместителей
диацилпроизводных-ДБ18К6.**

заместители	C (kal/MK)	S (kal/MK)	H (kkal/M)	G (kkal/M)
COCH ₃	14.54	89.12	-20.76	0.43
COC ₂ H ₅	20.74	98.72	-25.96	2.06
COC ₃ H ₇	26.24	108.14	-30.91	4.03
COC ₄ H ₉	31.74	117.55	-35.86	5.96
COC ₆ H ₁₃	42.74	136.39	-45.75	9.89
COC ₇ H ₁₅	48.24	145.81	-50.71	11.83
COC ₈ H ₁₇	53.74	155.23	-55.65	12.51

Влияние природы заместителей на зарядовое распределение в макроцикле краун-эфиров исследовано на ряде конкретных примеров в работах Варнека [307-309]. Бензольные кольца в ДБ18К6 несколько уменьшают заряд на связанных с ними атомах кислорода. Аналогичное влияние оказывают электроннодонорные заместители (Cl^- , NO_3^-). Алкильные заместители практически не оказывают влияния на зарядовое распределение в макроциклическом кольце. Для углеводородных цепей характерно конформационное многообразие, оптимальна конформация углеводородных радикалов, при которой атомы углерода (начиная с пропильного радикала) находятся в транс-положении, когда углеводородный радикал не создает стерических препятствий для иона. При “загибании” алкильной цепи к полости макроцикла энергия напряжения возрастает, что свидетельствует об отсутствии стерических затруднений со стороны алкильных радикалов при комплексообразовании. Вместе с тем, алкильные цепи могут без существенных энергетических затрат вращаться вдоль связи С-С и ориентироваться как по одну сторону с бензольными кольцами (in-ориентация), так и в противоположную (out-ориентация).

Традиционное представление о механизме влияния электроннодонорных или электронноакцепторных заместителей на комплексообразующую способность краун-эфиров не всегда адекватно отражает экспериментально обнаруженные свойства [324].

Нами были изучены зависимости комплексообразования 18-членных краун-эфиров от характера введенных боковых заместителей, в частности, некоторые N-замещенные-, дивторбутилпроизводные-, диацилпроизводные- ДБ18К6, а также псевдоциклический аналог ДБ18К6. Показано, что все производные, имеющие в боковых бензольных кольцах N-содержащие заместители, формируют стабильные комплексы с ионами калия в растворе (табл.10). Максимальное значение константы стабильности комплекса получено для 4',5''-(бис)-ацетамида-ДБ18К6, это же соединение проявляет наибольшую мембранную активность. Стехиометрия комплексов всех исследованных N-замещенных-ДБ18К6 с ионами калия составляет 1:1 и 2:1 краун-эфир: катион (рис.64).

При изучении комплексообразования гомологического ряда диацилпроизводных-ДБ18К6 нам не удалось кондуктометрическим методом зафиксировать образования комплексов этих соединений с щелочными металлами в используемых нами экспериментальных условиях (концентрация краун-эфиров была порядка 10^{-4} М). Но все

исследованные соединения этого гомологического ряда от 4',4''-диацетил- до 4',5''-диоктаноил-ДБ18К6 эффективно связывают ионы кальция.

Таблица 10

Количественные характеристики комплексообразования N-замещенных-ДБ18К6 с ионом калия в этаноле при 25°C.

краун-эфир	формула радикала	lgK	λ_o^{M+L}	$r_s, \text{\AA}$
4',5''-диамино-	-NH ₂	7,05	7,46	10,05
4',5''-бис-(ацетамид)-	-NH-CO-CH ₃	7,60	7,60	9,87
4',5''-бис-(нитрофур-фурилендамин)-	-N-CH-O-NO	6,38	7,59	9,87
4',5''-бис-(цианамилденамин)-	-N=CH ₂ -CH ₂ =CH ₃	6,82	7,60	9,87

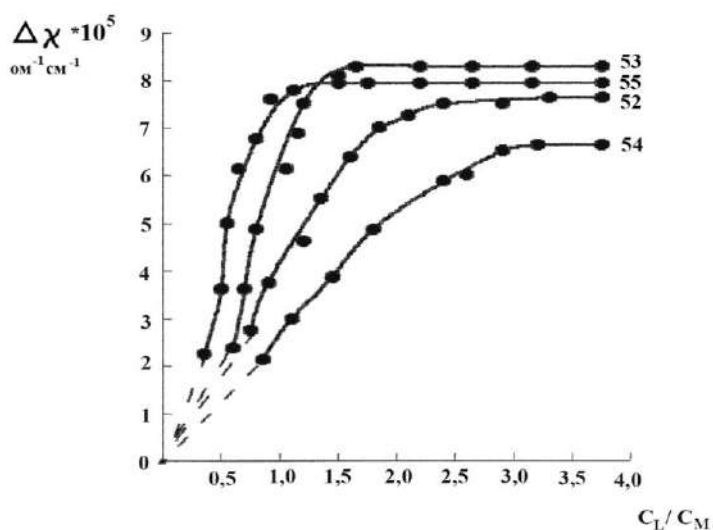


Рис.64. Изменение удельной электропроводности раствора КС1 в этаноле в присутствии N-замещенных -ДБ18К6 (χ - удельная электропроводность, C_M -молярная концентрация соли, C_L -концентрация лиганда)

Ацильные группы, являясь акцепторами электронов, снижают электронную плотность макроцикла, что соответственно уменьшает комплексообразующую способность с одновалентными катионами. Комплекс с кальцием, по-видимому, образуется за счет участия в комплексообразовании карбонильных кислородов.

Аналогичное участие боковых заместителей в комплексообразовании наблюдали для комплексов Rb^+ и Cs^+ с 4'-нитро-Б18К6 [225].

Из приведенных ранее данных (рис.3) видно, что с увеличением концентрации краун-эфира электропроводность раствора уменьшается и затем выходит на плато. По-видимому, при этих концентрациях циклополиэфира достигается максимальное связывание ионов Ca^{2+} . По кривым титрования в области максимального связывания

катиона были рассчитаны параметры комплексообразования диацилпроизводных-ДБ18К6 с ионами Ca^{2+} (табл.11).

С увеличением длины углеводородной цепи ацильных заместителей наблюдается увеличение константы устойчивости образующихся комплексов; максимальной величины константа устойчивости достигает у кальциевого комплекса 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6. Дальнейшее увеличение длины углеводородного радикала приводит к постепенному снижению стабильности комплексов, что обусловлено, возможно, возникновением конформационных препятствий для связывания катиона [376,408].

Таблица 11

**Количественные характеристики комплексообразования диацил-
производных-ДБ18К6 с CaCl_2 в этаноле**

Краун-эфиры	$\lg K$	λ_o^{M+L}	$r_s, \text{\AA}$
4',4''-диацетил-	6.83	11.8	6.4
4',4''(5'')-дипропионил-	6.89	10.3	7.3
4',4''(5'')-дибутирил-	6.87	11.4	6.6
4',4''(5'')-дивалерил-	6.74	11.9	6.3
4',4''(5'')-дигексаноил-	6.31	12.0	6.1
4',4''-дигептаноил-	5.72	11.7	6.5
4',5''-диоктаноил-	5.36	10.0	7.5

Диацилпроизводные-ДБ18К6, имеющие в боковых заместителях кетонную группу ($\text{C}=\text{O}$), являются индукторами проницаемости искусственных и биологических мембран для двухвалентных катионов; причем наблюдается достаточно выраженная $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -селективность этих краун-эфиров. Способности транспортировать одновалентные ионы для диацилпроизводных-ДБ18К6 практически не отмечены, хотя все они обладают заметной протонофорной активностью. Сравнивая экспериментальные данные по мембранной активности и комплексообразующей способности изученных диацилпроизводных-ДБ18К6, отметим, что наиболее эффективные мембранотропные соединения формируют стабильные комплексы с ионами Ca^{2+} в растворе, а логарифмы констант устойчивости этих комплексов равны 6,87 и 6,74 для 4',4''(5'')-дибутирил- и 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6, соответственно.

Как известно, наряду с размером макроциклической полости краун-эфира, природой и длиной боковых радикалов, роль структурных параметров молекулы краун-эфира, влияющих на ее мембранные свойства, играет количество заместителей в бензольных кольцах макроцикла [395].

Нами методом кондуктометрического титрования изучено комплексообразование различных вторбутилзамещенных-ДБ18К6 с ионами одно- и двухвалентных металлов в этаноле (рис.65). Вторбутилпроизводные-ДБ18К6 способны изменять проводимость бислойных мембран и мембран митохондрий для ионов щелочных и щелочноземельных катионов [395]. С этими катионами металлов исследованные краун-эфиры образуют комплексы состава 1:1, константы устойчивости комплексов выше с ионами щелочных металлов, особенно с ионами Rb^+ и Cs^+ . Равновесные константы реакций комплексообразования с ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} отличаются между собой весьма незначительно (табл.12).

Максимальной комплексообразующей способностью по одновалентным катионам обладает монозамещенный-ДБ18К6 (4'-вторбутил-ДБ18К6). Возможно, наличие лишь одного бокового заместителя мало сказывается на конформации молекулы и не создает серьезных стерических препятствий для захвата катионов макроциклической полостью.

Очевидно, что способность к формированию стабильных комплексов краун-эфиров с ионами металлов в растворе является хотя и необходимым, но далеко не единственным условием для проявления краун-эфирами мембранной активности. Так, для вторбутилзамещенных-ДБ18К6 константы устойчивости комплексов с ионами одновалентных металлов значительно выше, чем с ионами Mg^{2+} или Ca^{2+} , тем не менее, эти соединения индуцируют выраженную Mg^{2+} -проводимость мембран. Дополнительно дивторбутил-ДБ18К6 проявляет незначительную мембранную активность для одновалентных ионов, включая H^+ , однако это общее свойство, присущее всем ионофорам двухвалентных катионов.

Особый интерес вызывает тот факт, что краун-эфиры, различающиеся механизмом мембранного действия, заметно отличаются и по комплексообразующим свойствам. Изучено комплексообразование этих соединений с различными ионами металлов (табл.12). Анализируя экспериментальные данные и сравнивая количественные характеристики комплексообразования 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6 и псевдоциклического аналога ДБ18К6 (Ca^{2+} каналоформеры) с таковыми для 4',4''-диацетил-ДБ18К6 (комплексон Ca^{2+}) и 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 (наиболее эффективный Ca^{2+} -ионофор), можно отметить, что константы устойчивости комплексов каналоформеров с ионами Ca^{2+} на 1-1,5 порядка ниже, чем для Ca^{2+} -ионофо-

ров - 4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6 и 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 (табл.13).

Анализ экспериментов по изучению комплексообразования различных производных 18-членных краун-эфиров позволяет сделать вывод, что введение в боковые бензольные кольца заместителей различной природы оказывает влияние не только на стабильность формирующихся комплексов, но и на селективность и стехиометрию комплексообразования.

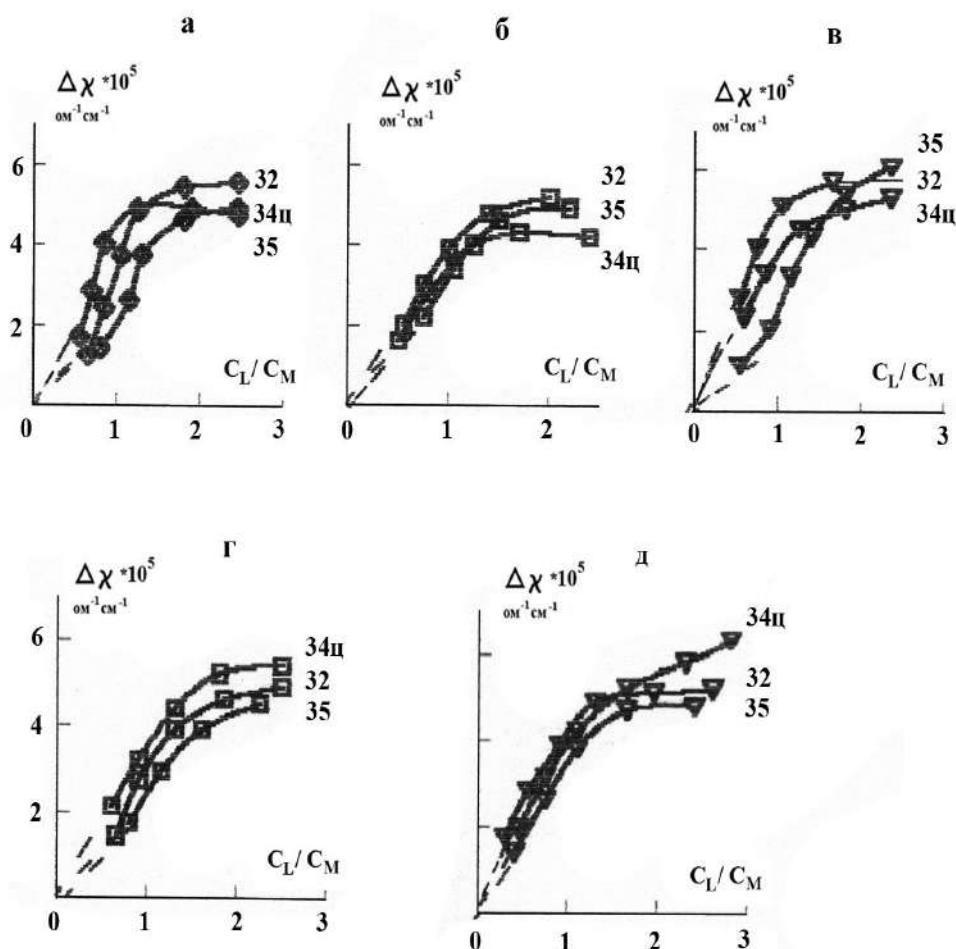


Рис.65. Кривые кондуктометрического титрования дивторбутил-производных ДБ18К6 с ионами Cs^+ (а), Rb^+ (б), K^+ (в), Mg^{2+} (г) и Ca^{2+} (д) в этаноле (χ – удельная электропроводность, C_M – молярная концентрация соли, C_L – концентрация лиганда)

Как было показано выше, краун-эфиры обладают комплексонными, ионофорными и каналоформерными свойствами [395, 396, 415]. Сульфопроизводные-ДБ18К6 индуцируют на бислоях образо-

вание одиночных ионных каналов проводимости преимущественно для ионов калия [415].

Исследование зависимости эффектов краун-эфиров на биологических и искусственных мембранах от их молекулярного строения, выявление закономерностей между структурой краун-эфиров и их мембранной активностью является неизбежным этапом в направленном синтезе новых краун-эфиров с заранее заданными свойствами. Такие исследования позволяют осуществить поиск путей направленного синтеза молекул, индуцирующих в мембране проницаемость заданного типа, в частности, новых краун-эфиров для использования их в экспериментальной биологии, медицине, аналитической химии, сельском хозяйстве и других отраслях науки и техники.

Таблица 12

Константы устойчивости комплексов (lgK) вторбутильных-производных ДБ18К6

краун-эфиры	lgK				
	K ⁺	Rb ⁺	Cs ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
4'-вторбутил	5.51	7.13	7.46	5.30	4.89
4',5''-дивторбутил	5.63	6.28	6.60	5.29	4.32
4',4''(5'')-дивторбутил	5.05	5.61	5.70	5.06	4.70

Таблица 13

Сравнительная характеристика комплексообразующих свойств краун-эфиров, различающихся механизмом мембранного действия

краун-эфиры	lgK		
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺
бис-о-метоксифеноксидиэтиловый эфир	5.10	5.03	5.05
4',4''(5'')-диметиламиноэтанол- ДБ18К6	5.45	4.12	4.53
4',4''-диацетил-ДБ18К6	6.83	3.78	-
4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6	6.74	4.27	-
4'-вторбутил-ДБ18К6	4.89	5.30	5.51
4',5''-дивторбутилДБ18К6	4.69	5.29	5.63

Ионная избирательность мембран зависит не только от соотношения констант устойчивости комплексов, но и от межфазовых коэффициентов распределения (экстракции) комплексных катионов.

Таким образом, исследованы и сравнены комплексообразующие способности краун-эфиров, различающиеся механизмами мембранного действия. Изучались комплексообразующие свойства сульфопроизводных-ДБ18К6 с ионами одно- и двухвалентных металлов методом кондуктометрии. Полученные результаты были сравнены с

комплексобразующими характеристиками Ca^{2+} -комплексонов: 4',4''-диацетил-ДБ18К6, 4',5''-диооктаноил-ДБ18К6; Ca^{2+} -ионофоров этого же ряда: 4',4''(5'')-дибутирил- и -дивалерил- ДБ18К6, а также Ca^{2+} -каналоформеров: бис-о-метоксифенокси-диэтиловый эфир и 4',4''(5'')-диметиламиноэтанол-ДБ18К6.

Были оценены количественные характеристики комплексообразования сульфопроизводных-ДБ18К6 с ионами K^+ , Na^+ , Ca^{2+} в воде и в этаноле. Показано, что эти соединения не способны образовывать достаточно устойчивые комплексы с ионами данных солей. Максимальные значения константы стабильности комплекса получено для 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислоты в воде и для 4',4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислоты в этаноле.

В молекулы, содержащие боковые бензольные кольца, легко вводятся практически любые функциональные группы. Таким образом, конструирование “каркаса” может способствовать изменению как избирательности комплексообразования, так и мембранной активности. Введением в состав молекул одного и того же соединения заместителей различной природы можно варьировать способность краун-эфиров к комплексообразованию и способности индуцировать избирательную ионную проницаемость мембран.

Кондуктометрические исследования сульфопроизводных-ДБ18К6 в этаноле показывают, что для 4',4''(5'')-ДБ18К6-дисульфокислоты получено максимальное значение константы стабильности комплекса. Из полученных кривых титрования зависимости проводимости ($\Delta\chi$) от соотношений концентраций соли к краун-эфиру (C/L) было установлено, что проводимость увеличивается соответственно увеличению концентрации солей, не образуя область плато. Рассчитаны количественные характеристики взаимодействия исследуемых краун-эфиров и ионов солей (табл.14). В таблице представлены основные термодинамические параметры, характеризующие процесс взаимодействия щелочных металлов с сульфопроизводными краун-эфиров: константы взаимодействия ($\lg K$) и свободные энергии Гиббса (ΔG) [409].

Константу взаимодействия вычисляли, исходя из того, что в эксперименте не имелась область насыщения и на экспериментальной кривой выбирали две точки, для которых предполагалось равенство константы взаимодействия; данные подставляли в формулу для расчета константы при отсутствии насыщения [410].

Анализ термодинамических характеристик взаимодействия изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) показывает, что процесс

взаимодействия изученных краун-эфиров с ионами одно- и двухвалентных металлов идет “самопроизвольно”, т.е. $\Delta G < 0$. В данном случае, взаимодействие, возможно, достигается за счет образования ионных связей между ионами диссоциировавших солей и заряженными участками молекул краун-эфиров.

Известно, что константы устойчивости в метаноле и этаноле для краун-эфиров на несколько порядков выше, чем в воде. Очевидно, вследствие того, что и метанол, и этанол являясь намного более слабой сольватирующей средой в меньшей степени конкурируют с краун-эфиром за катион [401, 409]. Следует ожидать, что константы устойчивости будут выше, особенно для малых катионов. В этом случае более заметным станет влияние аниона, так как более или менее интенсивное образование ионных пар будет влиять на полученные результаты [26].

Установлено, что константа взаимодействия зависит от природы растворителя и выше при растворении в этаноле. Тем не менее, данная величина для всех исследованных сульфопроизводных-ДБ18К6, являющихся K^+ каналоформерами, оказалась на порядок ниже, чем для известных Ca^{2+} -комплексонов и Ca^{2+} -ионофоров [355, 367, 395] (Табл.13,14).

Таблица 14

Количественные характеристики взаимодействия сульфопроизводных-ДБ18К6 с одно- и двухвалентными ионами в дистиллированной воде и этаноле при температуре 20°C

краун-эфиры	Катион	lgK		ΔG (kJ)	
		дистилли- рованная вода	этанол	дистилли- рованная вода	этанол
4'-третбутил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота	K^+	4,21	5,53	-23.64±1,95	-30,99±1,30
	Na^+	4,38	5,38	-24.65±1,99	-35,83±1,50
	Ca^{2+}	4,99	3,85	-28.03±1,93	-21,86 ±1,71
4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислота	K^+	3,99	5,96	-22.37±1,83	-33,41±1,65
	Na^+	5,05	6,00	-28.35±1,80	-33.65±1,72
	Ca^{2+}	4,15	6,24	-23.29±1,93	-35.02±1,74
4'-ДБ18К6-сульфоокислота	K^+	2,95	5,74	-16.82±0,9	-34.31±1,69
	Na^+	3,00	5,12	-22.70±1,07	-24.25±1,33
	Ca^{2+}	3,48	5,63	-19.15±1,10	-31.59±1,20
4', 4''(5'')-ДБ18К6-дисульфоокислота	K^+	4,09	5,91	-22.92±1,19	-33.13±1,22
	Na^+	3,96	6,33	-22.24±1,58	-35.51±1,18
	Ca^{2+}	3,92	4,87	-21.98±1,56	-27.33±1,25

Как уже отмечалось выше, сульфопроизводные-ДБ18К6 обладают способностью индуцировать в бислоях образование одиночных ионных каналов проводимости для моновалентных катионов как при одностороннем, так и двустороннем введении их в омывающие мембрану растворы.

Каналоформерные свойства этих исследованных соединений коррелируют с липофильностью. Свойства одиночных ионных каналов проводимости, индуцированных, сульфопроизводными-ДБ18К6 схожи. Исследованные ионные каналы проводимости обладают практически идеальной катионной селективностью, которая сохраняется в диапазоне $\text{pH} = 3-7,5$, демонстрируя при этом относительно низкую катионную избирательность.

Суммируя полученные экспериментальные результаты, можно заключить, что в зависимости от механизма мембранного действия краун-эфиров заметно изменяются особенности их комплексообразования и взаимодействия с мультиламеллярными слоями.

Образование хиноидной структуры в молекуле 4'-ацетил-4''(5'')-ДБ18К6-сульфоокислоты обуславливает её высокую Ca^{2+} избирательность комплексообразования, объясняет увеличение вклада энтропийного члена в реакцию комплексообразования. Для Ca^{2+} -комплексонов происходит увеличение значения общей энтальпии фазового перехода процесса плавления фосфолипидов, тогда как для Ca^{2+} -ионофоров, Ca^{2+} -каналоформеров и K^+ -каналоформеров эти значения уменьшаются.

Представленный выше экспериментальный материал раскрывает лишь некоторые из основных обязательных этапов во взаимодействии краун-эфиров с мембраной, не затрагивая их биологического действия. Актуально изучение мембраноактивных свойств краун-эфиров, позволяющих понять механизмы трансмембранного переноса ионов и создание необходимой теоретической базы для направленного синтеза новых высокоэффективных и экологически чистых молекул, проявляющих антимикробную, кардиотропную, противоопухолевую и другие виды биологической активности.

Глава V

Биологическое действие краун-эфиров

Модификация краун-эфирами состояния биомембран

Мембраны митохондрий

Краун-эфиры увеличивают перенос катионов через мембраны, эритроцитов [264, 395, 415], митохондрий [119, 162, 296, 362, 395], разобщают окислительное фосфорилирование и влияют на дыхательную цепь. Ранее на митохондриальных мембранах были изучены краун-эфиры, в которых изменялись размер полости макроцикла, длина, природа и количество заместителей в бензольных кольцах, исследовались краун-эфиры, содержащие 5, 6, 8 и 10 атомов кислорода в макроцикле [223, 224, 261-264, 376, 395].

Введение алкильных и ди- α -оксиалкильных заместителей в бензольные кольца ДБ18К6 (соединения 30, 31, 35, 41т, 42ц, 43, 44ц, 45, 46, 48, 49) повышало K^+ -ионофорную активность в экспериментах с митохондриями. Однако в отличие от алкилпроизводных-ДБ18К6 наибольшая мембранная активность в случае ди- α -оксиалкилпроизводных-ДБ18К6 отмечалась для соединений с 6-7 атомами углерода в боковой цепи. Исследования диацилпроизводных-ДБ18К6 на проницаемость мембран митохондрий и плоских бислоев показали, что наибольшее увеличение проницаемости вызывают соединения, содержащие цепочку из 3-4 атомов углерода при бензольных кольцах. При этом 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6, оказывающий максимальный эффект, практически не проявляет селективности по отношению к катионам щелочноземельных металлов в отличие от 4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6, имеющего четко выраженную Ca^{2+} -селективность [395].

N-замещенные-ДБ18К6 изменяли проницаемость мембран митохондрий и увеличивали проводимость бислоев для одновалентных катионов [362, 367].

Необходимо отметить, что ионофорный эффект краун-эфиров зависит от свойств, как самого ионофора, так и от конкретной мембранной системы, используемой для его тестирования [69, 92, 99, 103-105, 263]. Данный факт подтверждает несовпадение действующих концентраций краун-эфиров (при сохранении тенденции действия) на различные мембраны (митохондрии, эритроциты, саркоплазматический ретикулум, липосомы, бислои и т.д.). Различная чувствительность отдельных типов мембран к действию краун-эфиров объяс-

няется неодинаковым составом, физико-химическими, структурными и другими особенностями мембранных систем.

Мембраны эритроцитов

Было исследовано действие диалкилпроизводных-ДБ18К6 (K^+ -ионофоров) на скорость выхода ионов K^+ из эритроцитов. Изученные краун-эфиры стимулировали этот процесс, однако, как и в экспериментах с митохондриями, наиболее эффективными оказались соединения с 3-6 атомами углерода в алкильных цепях. Действие 4',4''-дигексил- ДБ18К6 по активности на эритроцитах было близко к 4',4''-диамил-ДБ18К6, хотя в экспериментах с митохондриями последний краун-эфир влиял на проницаемость мембран в существенно меньших концентрациях и был, примерно, в 6 раз более активен, чем 4',4''- дигексил-ДБ18К6 [395].

В работе [415] показано, что водорастворимые сульфопроизводные-ДБ18К6 (каналоформеры для ионов K^+ и моновалентных катионов) инкубированные в течение 1 часа с эритроцитами человека в среде, содержащей 150 мМ NaCl, не проявили какой-либо гемолитической активности в использованных концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ М для краун-эфиров 56, 57, 58 и 59 соответственно.

Гемолитическую активность эритроцитов определяли спектрофотометрически при 540 нм. Величину, соответствующую 100% гемолизу, устанавливали с помощью разрушения клеток в среде, содержащей детергент тритон X-100. Определение размеров эритроцитов проводилось визуально под световым микроскопом ("Биолам Р-14") при фазовом контрасте с помощью окуляр-микрометра (МОВ-1-15х) с линейным разрешением 0,1 мкм. В экспериментах по влиянию этих соединений на пассивную проницаемость мембран эритроцитов в 150 мМ NaCl после 2 часов инкубации наблюдалось набухание эритроцитов.

Сульфопроизводное 56 в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М вызывало 5% набухание, причем дальнейшее увеличение концентрации краун-эфира до $1 \cdot 10^{-4}$ М не приводило к усилению эффекта. Такое же набухание происходило после инкубации эритроцитов в среде с $1 \cdot 10^{-3}$ М краун-эфира 57. Было зарегистрировано 5-6% и 6-7% набухание после инкубации эритроцитов в среде с $1 \cdot 10^{-4}$ М и $1 \cdot 10^{-3}$ М с краун-эфирами 58 и 59, соответственно.

Наблюдаемое в проведенных экспериментах набухание эритроцитов, вероятно, вызвано изменением гидростатического статуса клеток, вызванного преобладанием входящего потока через образо-

ванные ионные каналы ионов Na^+ по электрохимическому градиенту над выходящим K^+ .

Действие диацилпроизводных-ДБ18К6 на уровень свободного Ca^{2+} в тромбоцитах человека

Исследования проводили на дважды отмытых тромбоцитах, загруженных флуоресцентным зондом Quin 2 для определения концентрации ионов кальция, на спектрофлуориметре Hitachi 850. Расчет концентрации ионов Ca^{2+} проводили по методу, описанному в работе [266].

Среди исследованных диацилпроизводных-ДБ18К6 только 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 (эффективный кальциевый ионофор) влиял на концентрацию ионов Ca^{2+} в тромбоцитах. Это соединение в концентрации 10^{-5} М (0,5-1,5 мин.) вызывало повышение уровня кальция соизмеримо с эффектом дигитонина, разрушающего мембраны тромбоцитов. Это повышение не блокировалось верапамилом и простагландином Е, т.е. не связано с влиянием на рецептор-зависимые Ca^{2+} -каналы, а осуществляется в результате переноса ионов Ca^{2+} аналогично действию А3187, либо в результате разрушения мембраны.

4',4''-диацетил-, 4',4''(5'')-дипропионил-, 4',4''-дигептаноил-, 4',5''-диоктаноил- и 4',4''(5'')-дидеканоил- ДБ18К6 не влияли на индуцируемое фактором агрегации тромбоцитов (ФАТ) (10^{-8} - 10^{-7} М) повышение концентрации ионов Ca^{2+} [373]. Показано, что эффект ФАТ на фоне 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 и 4',5''-диоктаноил-ДБ18К6 не проявляется. Псевдоциклический аналог ДБ18К6 (каналоформер по ионам кальция) в концентрации 10^{-4} М аналогично верапамилу понижал эффект ФАТ на 60-70%. Таким образом показано, что это действие диацилпроизводных-ДБ18К6, а также псевдоциклического аналога ДБ18К6 - индуктора кальциевой проводимости мембран не связано с влиянием указанных соединений на рецептор-зависимые Ca^{2+} -каналы, а обусловлено их ионофорной или каналоформерной активностью.

Исследование действия диацилпроизводных-ДБ18К6 на дигидропиридин-чувствительные кальциевые каналы

Ионные каналы и рецепторы непосредственно связаны с процессами передачи сигнала внешнего раздражения в цитоплазму в форме вторичных посредников. Известно участие дигидропиридин-чувствительных Ca^{2+} -каналов в реализации митогенного сигнала

[283]. Альтернативой Ca^{2+} -сигналу, поступающему в клетку через каналы плазматической мембраны, является всплеск концентрации Ca^{2+} в цитоплазме за счет высвобождения из внутриклеточных депо. Важным молекулярным элементом, обуславливающим готовность клетки отвечать на внеклеточный сигнал, является Ca^{2+} -канал плазматической мембраны, биогенез которого чрезвычайно сильно зависит от условий роста клеток.

Именно поэтому на многих клетках дигидропиридин-чувствительные Ca^{2+} -каналы могут быть чрезвычайно важным инструментом регуляции пролиферации, секреции и дифференцировки.

В связи с этим были исследованы диацилпроизводные-ДБ18К6 (Ca^{2+} -ионофоры и комплексоны), а также псевдоциклический аналог ДБ18К6 (Ca^{2+} -каналоформер) на дигидропиридин-чувствительные кальциевые каналы мембран клеток мозга кролика [375]. Эксперименты показали, что все исследованные соединения в концентрации 10^{-5}М не вытесняют $^3\text{Н}$ -нитрепидипин из канала. Соединения - 4',4''(5'')-дивалерил-, 4',4''(5'') -дигексаноил-, 4',4''-дигептаноил-, 4',5''-диооктаноил-, 4',4''(5'') -динонаноил- и 4',4''(5'') -дидеканоил-ДБ18К6 в концентрации 10^{-5}М увеличивают связывание $^3\text{Н}$ -нитрепидипина в 2-4 раза, а в концентрации 10^{-6}М не влияют на это связывание. Эффекты 4',4''- диацетил-, 4',4''(5'') -дипропионил-ДБ18К6 и псевдоциклического аналога ДБ18К6 не обнаружены. На основании полученных результатов можно сделать заключение, что эффекты изученных краун-эфиров являются неспецифическими, зависят от гидрофобности этих соединений и осуществляются путем влияния на липидный матрикс мембран.

Индукция спонтанного выделения медиатора

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах портняжной мышцы лягушки *Rana temporaria*. Препарат помещался в экспериментальную камеру из органического стекла объемом 4 мл, камера соединялась переходным краном и капельницей с растворами исследуемых веществ. Удаление жидкости из камеры производилось с помощью капиллярного самооттока.

Для одновременной регистрации мембранного потенциала покоя (МПП) и миниатюрных потенциалов использовались стеклянные микроэлектроды, приготовленные из стекла “Пирекс”. Стеклянные микроэлектроды вытягивались в автомате МЭ-4, диаметр кончика электрода был в пределах(1-3) мк, а сопротивление порядка (5-15) Мом.

В процессе эксперимента индифферентный электрод погружался в раствор, омывающий мышцу. Использовался раствор состава (в мМ): NaCl-115, CaCl₂-1,8, KCl-2,5, NaH₂PO₄-2,0, pH=7,2. Все модификации раствора Рингера проводились за счет соответствующего изменения концентрации CaCl₂. Миниатюрные потенциалы концевых пластинок (МПКП) усиливались предварительным усилителем постоянного тока [343]. Запись электрических процессов с экрана осциллографа С 1-18 производили на киноплёнку с помощью фоторегистратора марки ФОР-2.

При помощи бинокулярной лупы МБС-2 обнаруживали район концевых пластинок и вводили в эту область микроэлектрод.

Подведение микроэлектрода к нервно-мышечному препарату осуществляли с помощью микроманипулятора, под бинокулярной лупой МБС-2.

Попадание микроэлектрода в синаптическую область определяли по появлению на экране осциллографа МПКП. В начале проводилась регистрация МПП, с целью выяснения состояния мышечного волокна, в который введен микроэлектрод, а также для контроля самого процесса введения электродов в клетку. Для исследования выбирались волокна, мембранный потенциал которых был порядка (80-90) мВ. Эта часть работы выполнялась совместно с д.б.н. Каликуловым Д.

- Изучение влияния диацилпроизводных-ДБ18К6 на спонтанную активность нервно-мышечных синапсов

Из литературных данных [294, 411] известно, что ионы кальция играют важную роль в механизме секреции нейромедиаторов. Как было установлено, медиаторы освобождаются из нервных окончаний в виде квантов, секреция которых зависит от внутриклеточной концентрации ионов кальция.

В настоящее время мы располагаем разнообразными избирательными ионофорами, позволяющими контролировать проницаемость биологических мембран для различных ионов. Диацилпроизводные-ДБ18К6 увеличивают проницаемость бислойных липидных и митохондриальных мембран для ионов Ca²⁺ [395].

Эксперименты проводили в нормальном растворе Рингера. Было исследовано около 30 мышечных волокон. Среднее значение МПКП в контрольных значениях составляло (86,00±2,2) мВ, среднее значение амплитуды МПКП - (0,42±0,10) мВ, а частота - (0,85±0,4) мВ в сек.

После ряда контрольных записей МПКП в раствор, омывающий нервно-мышечный препарат, вносили концентрированные растворы краун-эфиров в объеме 0,1 мл, конечная концентрация которых была $1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$. Через определенный латентный период наблюдалось постепенное увеличение частоты МПКП. В первой фазе наблюдалось увеличение частоты МПКП, во второй фазе снижение частоты МПКП. На рис.66 представлены осциллограммы, иллюстрирующие яркое изменение частоты МПКП во времени. Максимальное увеличение частоты МПКП и интенсивность секреции медиаторов были в прямой зависимости от концентрации краун-эфира, вносимого в экспериментальную камеру. При этом среднее значение амплитуды МПКП под действием краун-эфира не изменялось. В процессе действия вещества в синаптической области с ростом частоты МПКП наблюдалось снижение МПП, который возвращался к исходному уровню в конце второй фазы действия 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 (рис.66). Во внесинаптической области в процессе действия краун-эфира не наблюдалось никаких изменений.

Добавление краун-эфира - 4',4''-дигептаноил-ДБ18К6 в раствор, омывающий нервно-мышечный препарат, через определенный латентный период вызывало увеличение частоты МПКП (рис. 67). Характер изменения частоты МПКП также имел двухфазный характер. При этом не наблюдалось изменения среднего значения амплитуды МПКП.

Аналогичные эксперименты были проведены с другими производными краун-эфиров - 4',5''-диоктаноил- и 4',4''(5'')-дидеканоил-ДБ18К6. Эти мембраноактивные комплексоны, проявляя слабую ионофорную активность, вызвали усиление секреции медиатора, при этом изменение частоты носило двухфазный характер.

Как известно, частота МПКП и квантовый состав ответов, вызываемых нервными импульсами, полностью определяются состоянием пресинаптической мембраны, а амплитуда синаптических потенциалов определяется состоянием постсинаптической мембраны [411].

Полученные нами данные показывают, что при действии краун-эфиров происходит изменение частоты МПКП без изменения средних значений амплитуды МПКП. Эти данные свидетельствуют о том, что наблюдаемый эффект при действии краун-эфира обусловлен его влиянием на состояние пресинаптической мембраны.

На нервно-мышечном синапсе млекопитающих было показано, то частота МПКП в покое возрастает при увеличении концентрации

ионов кальция в окружающей среде. Эта зависимость наблюдается при изменении концентрации Ca^{2+} в пределах от 10^{-3}М до 10^{-2}М .

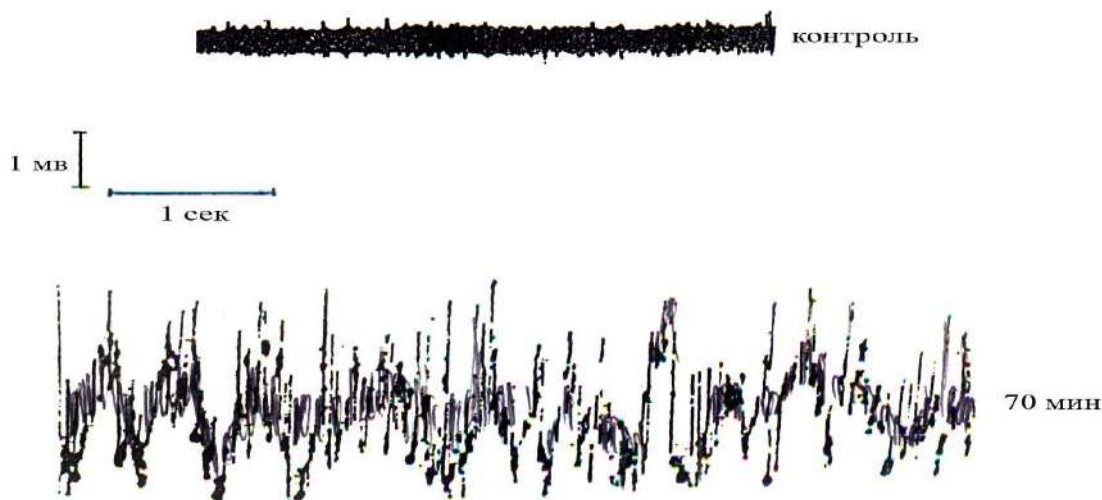


Рис.66. Изменение частоты МПКП в присутствии 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 в концентрации $5 \cdot 10^{-7}\text{М}$ (раствор Рингера, в мМ: NaCl -111, KCl -2,5, CaCl_2 -1,8, NaH_2PO_4 -0,8, NaH_2PO_4 -2,0, pH -7,2)

При этом частота МПКП меняется не очень сильно, всего в несколько раз. Аналогичное увеличение частоты МПКП наблюдается на нервно-мышечных синапсах лягушки, при изменении концентрации Ca^{2+} в пределах $(2-5) \cdot 10^{-3}\text{М}$. При этом также частота МПКП изменяется всего в несколько раз [294].

В связи с этим было изучено влияние Ca^{2+} -ионофоров при различных концентрациях ионов кальция в окружающей среде, а также при отсутствии их. Эксперименты показали, что действие краун-эфира, выражающееся в виде увеличения частоты МПКП, находилось в прямой зависимости от концентраций внеклеточного Ca^{2+} . Максимальное значение частоты МПКП находилось в прямой зависимости, а время достижения его - в обратной зависимости от концентрации ионов кальция в окружающей среде.

Как уже отмечалось выше, диацилпроизводные-ДБ18К6 и псевдоциклический аналог ДБ18К6 индуцируют кальциевую проводимость бислойных мембран. Можно предположить, что аналогичным образом эти краун-эфиры могут влиять на трансмембранный перенос ионов кальция из внеклеточной среды в аксоплазму нервного окончания, что и приводит к усилению секреции медиатора.

В подтверждение такого предположения следует обратить внимание на то, что краун-эфиры не были способны усиливать секрецию медиатора в бескальциевых растворах Рингера. Наблюдаемое нами снижение величины МПП можно объяснить тем, что увеличение

концентрации ацетилхолина в синаптической щели за счет усиленной секреции медиатора приводит к ацетилхолиновой деполяризации.

Действительно, в подтверждении этого предположения говорит то, что во внесинаптической области не наблюдаются изменения величины МПП мышечных волокон. Полученные результаты показывают, что эффекты краун-эфира на нервно-мышечном синапсе прямо зависят от внеклеточной концентрации ионов кальция и не проявляются при отсутствии ионов кальция в физиологическом растворе.

Таким образом, наблюдаемое в экспериментах увеличение частоты МПКП объясняется возросшей концентрацией ионов кальция в аксоплазме терминали, обусловленной индуцированием краун-эфиром кальциевой проводимости в пресинаптической мембране [366].

- Исследование действия изомеров дивторбутил-ДБ18К6 на спонтанную активность нервно-мышечных синапсов

В этой серии экспериментов было исследовано влияние изомеров магниевого ионофора (дивторбутил-ДБ18К6) на нервно-мышечные синапсы. Было исследовано около 15 мышечных волокон.

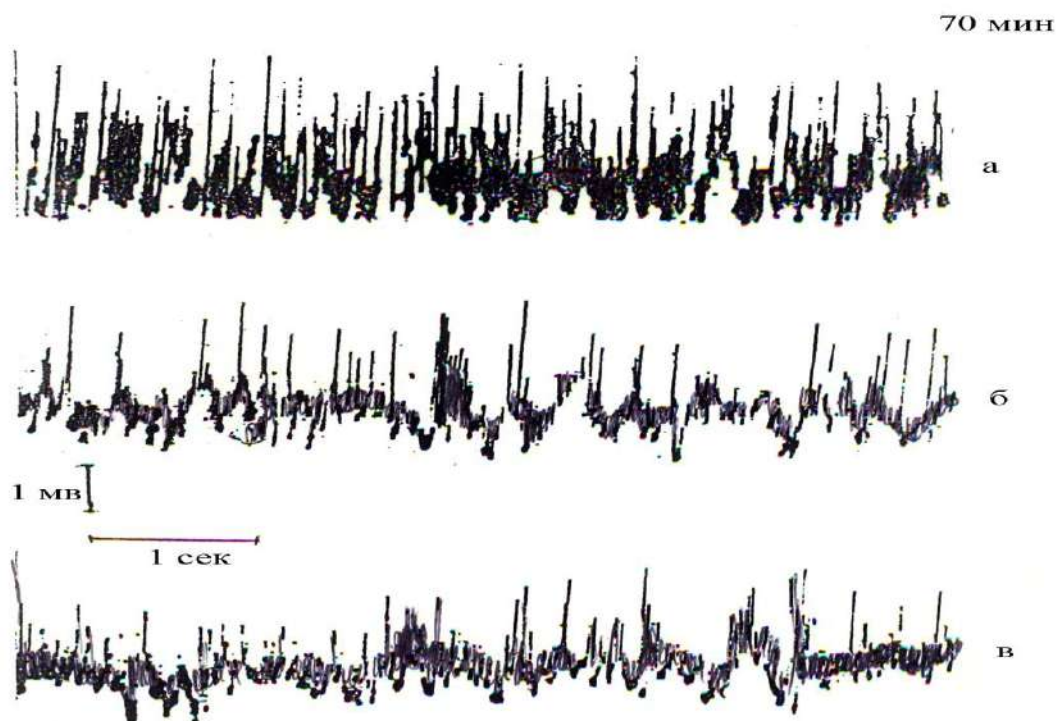


Рис.67. Изменение частоты МПКП в присутствии 4',4'' - дигептаноил- (а), 4',5''-диоктаноил- (б) и 4',4''(5'') -дидеканоил-ДБ18К6 (в) в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М (раствор Рингера, в мМ: NaCl-111, KCl-2,5, CaCl₂-1,8, NaH₂PO₄-0,8, Na₂HPO₄ - 2,0, pH-7,2)

Среднее значение МПКП в норме составлял $(85,0 \pm 0,25)$ мВ, среднее значение амплитуды МПКП- $(0,35 \pm 0,05)$ мВ, а частота- $0,3 \pm 0,10$ в сек. Эксперименты проводили при отсутствии ионов кальция в физиологическом растворе, но содержащий различные концентрации ионов Mg^{2+} и 1мМ ЭГТА.

Полученные результаты показали, что добавление магниевого ионофора в раствор, омывающий нервно-мышечный препарат, через определенный латентный период приводит к увеличению частоты спонтанной активности. Аналогичные результаты были получены с изомерами магниевых краун-эфиров - дивторбутил-ДБ18К6, различающиеся температурой плавления.

На рис.68, 69 представлены данные, показывающие характер изменения частоты МПКП в присутствии краун-эфиров, проявляющих магниий ионофорную активность. Степень возрастания частоты МПКП была прямо пропорциональна концентрации магниевого ионофора, вносимого в экспериментальную камеру. Изменение частоты МПКП (ломанная линия), амплитуды МПКП (чёрные квадратики) и величины МПП (кружки) мышечного волокна в присутствии 4',5''- диоктаноил-ДБ18К6 и изменение частоты МПКП для Mg^{2+} -ионофора приведены на рис.70.

В среде, лишенной ионов магния и содержащей 10^{-3} М ЭГТА, Mg^{2+} -ионофор был неэффективным. С повышением концентрации ионов магния во внешней среде, влияние Mg^{2+} -ионофора на процесс секреции медиатора носило более выраженный характер.

Следует отметить, что этот ионофор индуцировал магниевую проводимость искусственных и биологических мембран [395]. В связи с этим можно предположить, что изомеры дивторбутил-ДБ18К6 аналогично Ca^{2+} - ионофорам индуцируют магниевую проводимость пресинаптической мембраны.

Согласно данным, приведенным в работе [294], роль ионов кальция могут выполнять и другие катионы, в частности ионы Mg^{2+} , Ba^{2+} и трехвалентный лантан. Однако эффективность этих ионов в процессе секреции медиаторов определяется проницаемостью их через пресинаптическую мембрану. Наблюдаемое при действии краун-эфиров незначительное усиление секреции медиаторов в растворах Рингера, где ионы кальция заменены на ионы магния, могут свидетельствовать о некоторой способности исследованных ионофоров переносить и ионы магния.

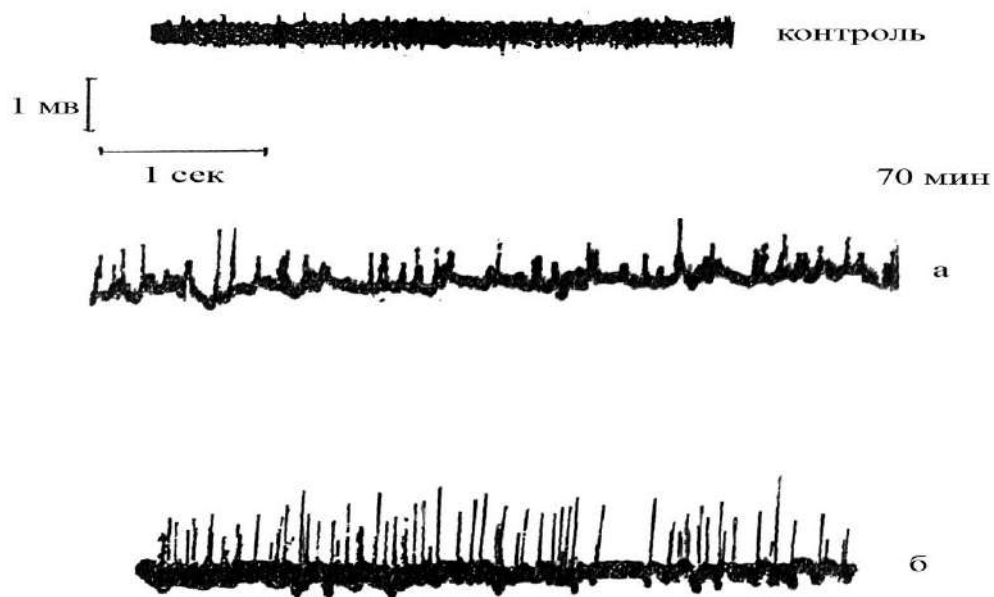


Рис.68. Изменение частоты МПКП в присутствии 4',4''(5'') - дивторбутил-ДБ18К6: (а) “цис” изомер и (б) смесь изомеров ($T_{пл}$ 82-87) $^{\circ}C$ в концентрации $5 \cdot 10^{-7}M$ (раствор Рингера, в мМ: NaCl-111, KCl-2,5, $MgCl_2$ -1,8, NaH_2PO_4 -0,8, Na_2HPO_4 -2,0, pH-7,2)

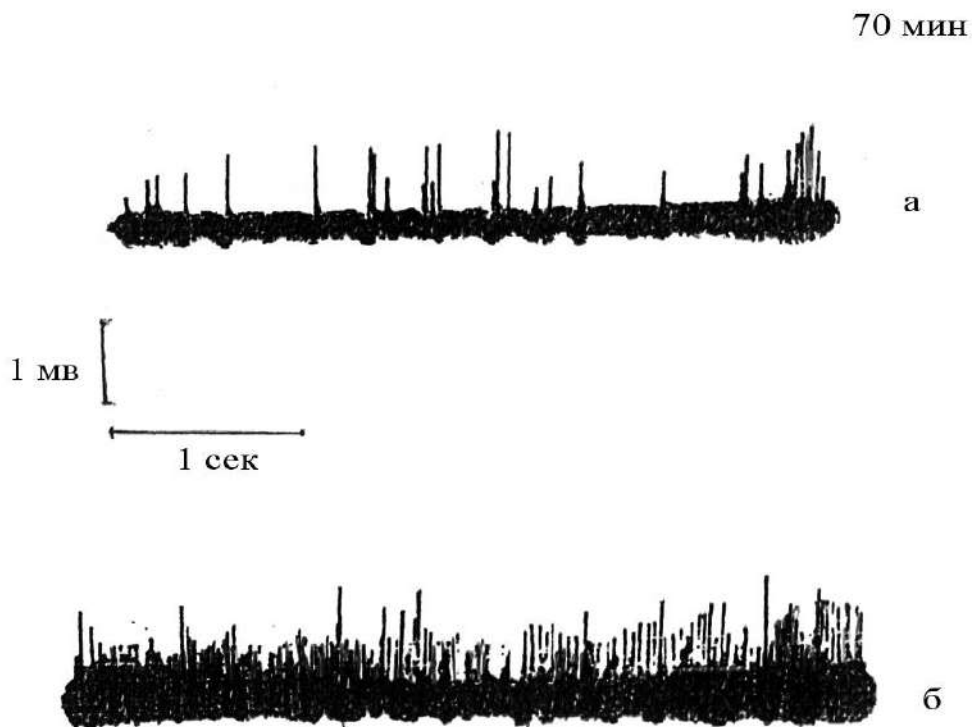


Рис.69. Изменение частоты МПКП в присутствии 4',4''(5'') - дивторбутил-ДБ18К6: (а) “транс” изомер и (б) смесь изомеров ($T_{пл}$ 85-90) $^{\circ}C$ в концентрации $5 \cdot 10^{-7}M$ (раствор Рингера, в мМ: NaCl-111, KCl-2,5, $MgCl_2$ -1,8, NaH_2PO_4 -0,8, Na_2HPO_4 -2,0, pH-7,2)

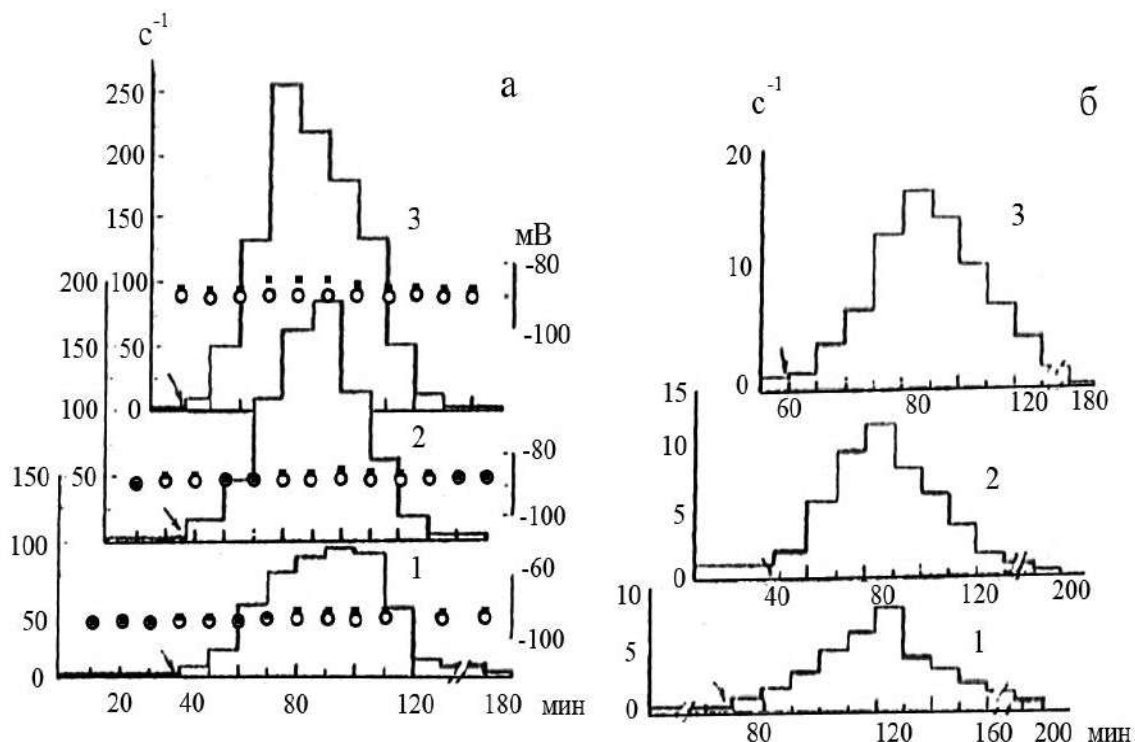


Рис.70. (а) Изменение частоты МПКП (ломанная линия), амплитуды МПКП (чёрные квадратики) и величины МПП (кружки) мышечного волокна в присутствии 4',5''- диоктаноил-ДБ18К6 в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ (1), $1 \cdot 10^{-6}$ (2) и $1 \cdot 10^{-5}$ (3) М, соответственно, (стрелкой указан момент начала действия краун-эфира на частоту МПКП; кальциевая среда раствора Рингера).

(б) Изменение частоты МПКП в присутствии “цис” изомера 4', 5''- дивторбутил-ДБ18К6 ($T_{пл} 90-93$) $^{\circ}C$ в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ (1), $1 \cdot 10^{-6}$ (2) и $1 \cdot 10^{-5}$ (3) М, соответственно, (стрелкой указан момент начала действия краун-эфира на частоту МПКП; магниевая среда раствора Рингера)

Таким образом, полученные нами данные являются прямым подтверждением того, что роль ионов кальция в процессе секреции медиаторов могут выполнять и другие катионы, в частности ионы магния.

Известно, что при изучении механизма секреции медиатора из нервных окончаний широко используются различные мембраноактивные соединения, такие как токсины некоторых пауков, пресинаптические нейротоксины, обладающие фосфолипазной активностью, ботулиновый и столбнячные токсины, а также различные ионофорные антибиотики и их синтетические аналоги. При помощи этих молекул получены важные сведения в пользу квантово-везикулярной гипотезы нейросекреции.

- Действие синтетического Ca^{2+} -каналоформера на спонтанную активность нервно-мышечного синапса

Для выявления связи между механизмами мембранного действия краун-эфиров (ионофорный, каналоформерный) и влиянием их на спонтанную активность нервно-мышечного синапса нами был исследован синтетический Ca^{2+} -каналоформер - псевдоциклический аналог ДБ18К6 (краун-эфир 51).

Среднее значение мембранного потенциала покоя мышечных волокон составляло (86 ± 2) мВ, среднее значение амплитуды МПКП $0,42 \pm 0,1$ мВ, частота МПКП – $(0,4 \pm 0,85)$ сек⁻¹.

Выше было отмечено, что Ca^{2+} -ионофоры из ряда диацилпроизводных-ДБ18К6 на нервно-мышечном препарате лягушки индуцируют освобождение медиатора, вызывая двухфазное изменение частоты МПКП. При этом изменение частоты МПКП носило непрерывный характер. Эксперименты показали, что исследуемый в данной работе Ca^{2+} -каналоформер - бис-о-метоксифенокси-диэтиловый эфир (краун-эфир 51) также индуцирует увеличение спонтанной секреции медиатора, однако процесс секреции имеет дискретный характер, о чем свидетельствуют пачки МПКП на (рис.71). Через 60 - 80 минут после добавления (латентный период) синтетического каналоформера в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М наблюдаются первые пачки МПКП. Частота МПКП в пачках составляет 10-50 сек⁻¹, длительность пачек от доли секунды до десятков секунд, а межпачечный интервал - от 2-5 сек до 1-2 мин. Эти параметры варьировали от эксперимента к эксперименту при одинаковой действующей концентрации ($2 \cdot 10^{-5}$ М) краун-эфира 51. С увеличением концентрации каналоформера наблюдается снижение длительности пачек, уменьшается также интервал между ними, а при концентрации псевдоциклического аналога ДБ18К6, равной $5 \cdot 10^{-5}$ М, происходит слияние МПКП. С ростом концентрации кальция в среде до $5 \cdot 10^{-3}$ М в присутствии $2 \cdot 10^{-5}$ М этого каналоформера также наблюдается увеличение длительности пачек и снижение межпачечных интервалов.

При увеличении концентрации кальция в среде до 10^{-2} М происходит полное слияние пачек МПКП. Как было показано выше, бис-о-метоксифенокси-диэтилового эфир способен формировать на плоских бислоях Ca^{2+} -каналы проводимости. По-видимому, данное соединение аналогичным образом модифицирует пресинаптическую мембрану и увеличивает ее проницаемость для кальция, в результате чего и наблюдается дискретное изменение частоты МПКП [371].

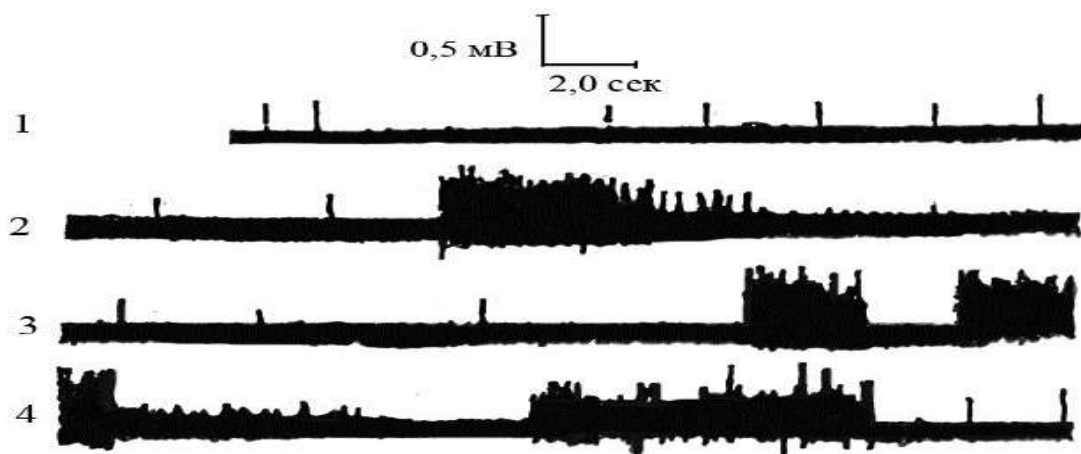


Рис.71. Действие бис-о-метоксифенокси-диэтилового эфира (кальциевого каналоформера) на спонтанную активность нервно-мышечного синапса лягушки (кальциевая среда раствора Рингера; 1-контроль, 2-через 70 мин., 3-через 80 мин., 4-через 100 мин. после добавления аналога краун-эфира)

Таким образом, обнаруженные нами эффекты Ca^{2+} -ионофоров и Ca^{2+} -каналоформера на модельных системах и на нервно-мышечных синапсах показывают, что эти молекулы могут быть использованы для регуляции и изучения процесса секреции медиатора на нервных окончаниях при различных экспериментальных условиях.

Биологические эффекты краун-эфиров

Краун-эфиры привлекли внимание биологов в связи с перспективой применения их в качестве молекул, взаимодействующих с ферментами, нуклеотидами, с органическими кислотами и т.д. [149-151], как эффективные синтетические аналоги ионофоров и каналоформеров - индукторов ионной проницаемости искусственных и биологических мембран. Многочисленные исследования подтвердили уникальность биологических свойств краун-эфиров [26,30,44, 91,92,140,163-165,164,213,214] и определили направления их практического применения [81,96,102,297,395]. Это создание кардио- и психотропных препаратов; средств, влияющих на вегетативную нервную систему; разработка новых антимикробных, противопаразитарных, противоопухолевых препаратов; способов их доставки; а также новых средств повышения урожайности сельскохозяйственных культур [23,26,104,141,237,298,364,376] .

Краун-эфиры и их аналоги используются в различных областях науки и техники, нашли применение в сельском хозяйстве, медици-

не, в создании новых материалов и технологий. Они применяются для разделения, концентрирования, очистки и регенерации металлов; для разделения лантаноидов, изотопов; для создания ионселективных датчиков и мембран [153,154,222,234,334,379-382,401,405]; для разделения оптических изомеров [271-273,330]; для создания новых фармакологических препаратов, контейнеров для лекарств [141,152]; пестицидов, детоксикантов и других биологически активных соединений [287, 295-298, 323, 333, 338, 342, 344, 357].

Фундаментальные направления современной биологии тесно связаны с развитием и достижением мембранологии. Другая особенность мембранологии и биофизики, в целом, вытекает из прикладных аспектов биологии, ее связи с медициной, сельским хозяйством, охраной окружающей среды. Краун-эфиры представляют собой перспективный класс биологически активных соединений, являющихся удобным и легкодоступным инструментом в изучении мембранных процессов и систем. Направленный синтез мембраноактивных краун-эфиров и их аналогов позволяет получить широкий спектр различных ионофорных и каналоформерных соединений с заранее заданными свойствами, дает возможность управлять ионным транспортом на молекулярном уровне.

Ранее была обнаружена способность краун-эфиров влиять на активность различных ферментов, в особенности связанных с мембраной [32, 38, 67, 162, 395]. Было показано, что 18-краун-6, 21-краун-7, криптанды [2.2.2.] и [2.2.1.] ингибируют K^+ - Na^+ -АТФазу в системе сопряженных ферментов, состоящей из АТФазы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы [38]. Описаны несколько возможных механизмов влияния краун-эфиров на активность мембранных ферментов. Например, в мембранах митохондрий, за счет ионофорных свойств, некоторые краун-эфиры (ди- α -оксиалкилпроизводные-ДБ18К6) могут выступать в роли разобщителей окислительного фосфорилирования и таким путем влиять на активность K^+ - Na^+ -АТФаз [395,]. В мембранах саркоплазматического ретикулума некоторые краун-эфиры (дивторбутил-ДБ18К6), наоборот, могут препятствовать разобщению транспорта кальция и гидролиза АТФ за счет торможения реакции перекисного окисления липидов [319]. Некоторые исследователи [32, 296] приходят к заключению, что краун-эфиры способны хелатировать катионы, связанные с мембраной и принимающие участие в работе ферментных систем. Кроме опосредованного действия краун-эфиров на ферментные системы, т. е. за счет их

ионофорных свойств, или через хелатирование катионов, имеются доказательства и прямого действия на ферменты [38]. В некоторых случаях краун-эфиры могут образовывать комплексы с анионами, являющимися субстратами для некоторых ферментов, и за счет этого влиять на активность этих ферментов. Например, 18-краун-6 образует стабильные комплексы с цитратом, сукцинатом, о-фталатом и др. поликарбоксилатами [149], с АТФ, АДФ, АМФ [150]. Предполагается, что комплексообразование с органическими анионами в водных растворах происходит за счет образования водородных связей. Особенно активными в отношении ферментных систем оказались макроциклические полиамины (МПА), которые легко образуют водородные связи с рядом важных органических кислот, например, с лимонной, янтарной и малоновой [151].

Таким образом, на основе мембраноактивных свойств краун-эфиров и их непосредственного взаимодействия с ферментами, субстратами и т.д. можно предполагать широкий спектр активности этих соединений в отношении клеток и живых организмов.

Действие диацилпроизводных-ДБ18К6 на клетки саркомы-45

Общепринято, что понятие “трансформированная клетка” можно определить, используя набор признаков и свойств, каждый из которых сам по себе может быть присущ и нормальным клеткам. Одним из таких признаков является высокая Ca^{2+} - проницаемость трансформированных клеток. Ионы Ca^{2+} являются регуляторными: с их помощью опосредуется действие “вторичных мессенджеров” - цАМФ, диацилглицерола, инозитолтрифосфата.

К настоящему времени известно, что TRP-каналы (*transient receptor potential channels*) являются единственными в своем роде структурами, ведущими себя как сенсоры для широкого круга различных (физических, химических и т.д.) стимулов, обладающие многосторонними регуляторными функциями и связями с большинством каналов, участвующих в регуляции Ca^{2+} -гомеостаза. Они определяют эффект входа кальция через особые каналы, контролирующие пролиферацию и апоптоз [248]. Например, роль Ca^{2+} -каналов в реализации феномена развития рака простаты обсуждается в работе [247]. Мы ставили своей целью подойти к решению этих вопросов, опираясь на возможности бислойной техники и используя в качестве модификаторов проницаемости мембран *in vivo* и *in vitro* некоторые краун-эфиры.

Важной ступенью злокачественной трансформации является вход кальция в клетку. Многими авторами показана высокая Ca^{2+} -проницаемость плазматической мембраны опухолевой клетки, которая не образует эффективного барьера против входа кальция во внутриклеточное пространство [33, 40, 41, 123]. Так, например, после добавления ионов Ca^{2+} к клеткам асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) наблюдается увеличение потребления этого катиона, который полностью аккумулируется митохондриями [25, 40]. При этом клетки АКЭ проявляют четкую зависимость содержания внутриклеточного Ca^{2+} от концентрации внешнего Ca^{2+} (до определенного уровня). При относительно высоких концентрациях внутриклеточного Ca^{2+} происходит активация механизма выброса Ca^{2+} [41]. Кроме того, Ca^{2+} -ионофор A23187 не вызывает дополнительного увеличения скорости накопления и общего содержания Ca^{2+} в опухолевых клетках, находящихся в активном метаболическом состоянии. Таким образом, вход ионов Ca^{2+} в опухолевые клетки в физиологических условиях происходит с максимальной скоростью. Все физиологические функции, которые включаются при увеличении входа Ca^{2+} в опухолевых клетках, уже полностью активированы. Так, например, если в нормальных клетках тимуса ионофор A23187 (10^{-6}M) вызывает сильное увеличение содержания общего Ca^{2+} , существенную стимуляцию аэробной продукции лактата и транспорта глюкозы, то в противоположность этому в асцитных клетках тимомы даже 10^{-5}M ионофора не оказывает значительного влияния ни на содержание общего Ca^{2+} , ни на продукцию лактата, ни на транспорт глюкозы [41]. Основным механизмом, поддерживающим в нетрансформированных клетках низкую концентрацию цитозольного Ca^{2+} , является направленная наружу, поддерживаемая АТФ, Ca^{2+} -помпа плазматической мембраны [376, 395].

Для опухолевых клеток, например АКЭ, показано, что увеличению внутриклеточного содержания Ca^{2+} препятствует АТФ-зависимый выход ионов Ca^{2+} , противодействующий потоку внутрь, скорость которого, вероятно, выше, чем в нормальных клетках. В интактных клетках АКЭ синтез АТФ в системах энергопродукции препятствует увеличению внутриклеточного Ca^{2+} . Для того, чтобы увеличить общее содержание Ca^{2+} в клетках АКЭ, необходимо достигнуть истощения АТФ более, чем на 90%. Клетки тимомы, обработанные дыхательными гликолитическими ингибиторами, становятся чувствительными к ионофору A23187, который в этих

условиях сильно увеличивает вход ионов Ca^{2+} в эти клетки. Показано, что клетки гепатомы Йошида, обработанные разобшителем без глюкозы, становятся чувствительными к А23187, сильно увеличивающему при этом общее содержание ионов Ca^{2+} в клетках. Этот эффект может быть обращен добавлением глюкозы в различные сроки после аккумуляции ионов Ca^{2+} . При стимуляции анаэробного гликолиза, который приводит к заметному синтезу АТФ, становится активной Ca^{2+} -выкачивающая помпа [41].

В плазматических мембранах клеток асцитной гепатомы АН 109А была найдена Ca^{2+} -стимулируемая, Mg^{2+} -зависимая АТФ-аза обладающая высоким сродством к свободному Ca^{2+} [213]. Максимальная активность наблюдалась при $2 \cdot 10^{-7}$ М свободного Ca^{2+} и $(3-10) \cdot 10^{-3}$ М Mg^{2+} . Кинетические свойства этой АТФ-азы подобны кинетическим свойствам АТФ-зависимой Ca^{2+} -выкачивающей помпы плазматических мембран эритроцитов, лимфоцитов и сердечной сарколеммы [31, 236]. В связи с этим было сделано предположение, что Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая АТФаза плазматических мембран опухолевых клеток, возможно, является Ca^{2+} -выкачивающей АТФ-азой этих клеток.

Таким образом, описанная в опухолевых клетках Ca^{2+} -помпа, Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая АТФ-аза способна обеспечить низкую концентрацию цитозольного Ca^{2+} в этих клетках.

Было найдено, что концентрация цитоплазматического Ca^{2+} в клетках АКЭ и асцитной гепатомы Йошида ниже, чем в нормальных покоящихся лимфоцитах и тромбоцитах [226] и в 5-10 раз ниже, чем в митоген-стимулированных лимфоцитах [266]. Найдено, что концентрация цитоплазматического Ca^{2+} в этих опухолевых клетках лежит в области 40-60 нМ [226], тогда как в нормальных гепатоцитах концентрация внутриклеточного Ca^{2+} была найдена равной 200-300 нМ [194]. Показано также, что внутриклеточное содержание Ca^{2+} в трансформированных клетках 3Е3 в 2-3 раза ниже, чем в их нетрансформированных аналогах [120, 236, 274]. Однако низкий уровень концентрации Ca^{2+} в цитоплазме может быть специфической характеристикой некоторых клеточных линий, но не общим правилом быстро пролиферирующих опухолей.

Следует отметить, что имеющийся в настоящее время ряд данных по изменению Ca^{2+} -гомеостаза после злокачественной трансформации противоречивы. Показано, что две линии опухолевых клеток АКЭ и асцитная гепатома Йошида имеют концентрацию свободного

Ca^{2+} в цитоплазме порядка 100-150 нМ, приближающуюся к таковой в нормальных клетках [7, 139]. Авторы отмечают, что изменения концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме не могут быть основными свойствами трансформированного фенотипа.

Различие между нормальными и трансформированными клетками, вероятнее всего, проявляется в чувствительности клеточных процессов к концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Например, высокое содержание кальмодулина в некоторых опухолевых клетках может приводить к повышенной активации некоторых Ca^{2+} -кальмодулинзависимых реакций даже при нормальной концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме. С другой стороны, увеличенным содержанием кальмодулина можно объяснить низкий уровень концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме, наблюдаемый некоторыми авторами в опухолевых клетках. Увеличение концентрации кальмодулина может активировать Ca^{2+} -помпу плазматической мембраны, приводя к снижению стационарной концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме.

Другой системой, реагирующей на изменение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме является протеинкиназа С [200]. Известно, что форболовые эфиры, индуцирующие развитие опухолевых клеток, меняют чувствительность протеинкиназы к Ca^{2+} , приводя к заметным эффектам протеинкиназы при общем отсутствии какого-либо увеличения концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме [40].

В митохондриях опухолевых клеток эндогенное содержание Ca^{2+} и Mg^{2+} также претерпевает существенные изменения. Большинство митохондрий опухолевых клеток характеризуется повышенным содержанием в них эндогенного Ca^{2+} . Наибольшее содержание эндогенного Ca^{2+} найдено для быстро растущей гепатомы Морриса 3924А [56] 123 нг. ионов Ca^{2+} /мг белка, тогда как миелоидные митохондрии не имеют избыточного количества эндогенного Ca^{2+} -15 нг. ионов Ca^{2+} /мг белка [3]. Митохондрии из большинства изученных нормальных тканей животных содержат от 5 до 20 нг ионов Ca^{2+} /мг белка [145]. Так как некоторые типы митохондрий характеризуются высоким содержанием эндогенного Ca^{2+} , можно думать, что присутствие больших количеств ионов Ca^{2+} внутри митохондрий не является специфическим свойством опухолевых клеток, хотя имеется тенденция к повышению содержания ионов Ca^{2+} в митохондриях опухолевых клеток. Для митохондрий опухолевых клеток, наряду с изменением содержания эндогенного Ca^{2+} , характерно также увеличение содержания эндогенного Mg^{2+} .

Таким образом, кратко резюмируя эти работы, следует отметить, что митохондрии опухолевых тканей способны эффективно осуществлять активный транспорт ионов Ca^{2+} и удерживать его в относительно больших количествах в матриксе. Повышенное накопление ионов Ca^{2+} и способность его тормозить и подавлять транспорт адениннуклеотидов и окислительное фосфорилирование имеет важное значение для развития опухолевых клеток.

Другим важным отличием опухолевых митохондрий от нормальных является повышенная устойчивость митохондрий опухолевых клеток к массивным Ca^{2+} -нагрузкам, которая выражается в отсутствии разобщающего действия ионов Ca^{2+} на систему преобразования энергии в митохондриях [41]. Этот эффект также может быть весьма существенным фактором в развитии злокачественной трансформации клеток. Рассмотренные выше изменения в системе транспорта Ca^{2+} и окислительного фосфорилирования могут являться существенными причинами, обуславливающими высокую скорость аэробного гликолиза и увеличенное гликолитическое образование АТФ в быстрорастущих опухолях [283]. Необходимо отметить, что однозначные причины и механизм ингибирующего и разобщающего действия ионов Ca^{2+} в опухолевых митохондриях остаются не выяснены.

Нарушения кальциевого гомеостаза организма (повышенное содержание ионов кальция в крови), связанные с онкологическими заболеваниями, являются обычными осложнениями [72]. Для объяснения этого факта привлекается ряд гипотез: продуцирование опухолью паратироидного гормона (ПТГ), продуцирование опухолью витамин-D-подобных стеролов, продуцирование опухолью простагландинов, продуцирование остеокластактивирующих факторов.

Резюмируя вышеизложенное, можно сказать, что аномально высокая потребность опухолевых клеток в ионах Ca^{2+} коррелирует как с данными по изучению метаболизма собственно опухолевых клеток (повышенная проницаемость плазматических мембран для Ca^{2+} , высокая Ca^{2+} -емкость митохондрий, резистентность окислительного фосфорилирования к высоким концентрациям ионов Ca^{2+}), так и с феноменологией опухолевого заболевания на уровне целостного организма (гиперкальциемия). Таким образом, изучение механизмов кальциевого транспорта в опухолевых клетках представляет несомненный интерес, как в теоретическом плане, так и исходя из насущных задач медицинской практики.

Саркома-45

В качестве модели была выбрана перевиваемая опухоль крыс саркома-45 (S-45). Штамм получен из банка РОНЦ (Российский онкологический научный центр). Перевивка осуществлялась подкожно, на бедре с левой стороны общепринятым методом [326]. Использовались, как правило, беспородные крысы - самцы массой 100-150 г. разведения Рапаловского зоокомбината.

- Выделение фосфолипидов

Животных забивали на 18 день после перевивки. Опухолевый материал быстро извлекали и помещали в ледяную среду, содержащую KCl-150mM, 10mM трис-HCl, pH=7,4. Все дальнейшие операции проводились на холоде при 0°C. Навеску опухолевой ткани гомогенизировали в однократном объеме среды стеклянным гомогенизатором Поттера. Экстракция липидов из гомогената проводили по методу Блая-Дайера [19].

К гомогенату добавлялось рассчитанное количество хлороформ-метанольной смеси так, чтобы в конечном итоге получить соотношение хлороформ-метанол-вода 1:2:0,8. Затем экстракт был разбавлен одним объемом воды и одним объемом хлороформа. Нижний хлороформный слой, содержащий липиды упаривается на ротонном испарителе при 30°C. Экстракцию липидов из ткани проводили дважды. Из полученной суммарной фракции липидов опухолевой ткани фосфолипиды осаждали холодным ацетоном по методу, описанному Кейтсом [325].

Измерение параметров плоских бислойных мембран, сформированных из фосфолипидов трансформированных клеток, оценивали по описанной выше методике.

С целью получения фосфолипидов, обогащенных мембранными компонентами отдельных клеточных органелл, опухолевый материал подвергался фракционированию методом дифференциального центрифугирования.

Свежий опухолевый материал гомогенизировали стеклянным гомогенизатором Поттера в 10-кратном объеме среды, содержащей: сахараза-300mM, 10mM трис HCl, pH=7,2 и фракционировали. Каждая фракция подвергалась переосаждению в среде, содержащей KCl-120mM, трис HCl-5mM, pH=7,2, при соответствующей величине фактора разделения. Все операции проводились при 4°C. Из полученных фракций, обогащенных соответствующими органеллами, выделялись фосфолипиды по методу, описанному выше.

- Приготовление липосомных препаратов краун-эфиров

Навеску краун-эфиров растворяли в небольшом объеме хлороформа. Затем добавляли яичный лецитин из расчета 10 мг лецитина на 1 мг краун-эфира. Хлороформ удаляли на роторном испарителе, фосфолипидную пленку, содержащую краун-эфир, высушивали при температуре не выше 30°C под вакуумом в течение 1 часа. К высушенной фосфолипидной пленке добавляли физиологический раствор из расчета 0,25 мл на 10 мг фосфолипида, затем озвучивали на установке УЗДН-1 при частоте 44 кГц и максимальном резонансе в течение 5 минут. Все операции по получению липосом производились в стерильных условиях. Препарат пустых липосом готовился идентичным способом без добавления краун-эфиров. Липосомные продукты в экспериментах *in vivo* применялись *ex tempore*.

- Характеристика ионных каналов проводимости Саркомы-45 на бислоях

Плоские бислойные мембраны, сформированные из фосфолипидов клеток Саркомы-45 отличались по своим электрическим свойствам от бислоев, полученных из фосфолипидов нормальных клеток. В присутствии ионов Ca^{2+} в окружающем мембрану растворе на этих мембранах при фиксированном напряжении наблюдались ступенчатые изменения трансмембранного тока. На рис.72 (а) видно, что от мембраны к мембране при одном и том же фиксированном потенциале (при прочих равных условиях) открывается различное число каналов, но предельный уровень проводимости остается постоянным. Однако при изменении потенциала на мембране число открытых каналов также изменяется и приводит к смещению предельного уровня проводимости. Наблюдается явная потенциалзависимость индуцированных ионных каналов. На рис.73 приведены гистограммы распределения и вольт-амперные характеристики мембран при различных концентрациях ионов Ca^{2+} . Изменение содержания ионов Ca^{2+} в указанных пределах практически не влияет на характер зависимости, которая остается линейной.

Каналы ионной проводимости формировались уже при концентрации ионов Ca^{2+} , равной $1 \cdot 10^{-3}$ М. Увеличение концентрации ионов Ca^{2+} до $(3-5) \cdot 10^{-3}$ М приводило к расширению спектра наблюдаемых ионных каналов. Регистрировались ионные каналы с Ca^{2+} -током, равным $35 \cdot 10^{-12}$ А и $90 \cdot 10^{-12}$ А, а также каналы, трансмембранный ток которых делится на эти величины (при потенциале фиксации=50 мВ). Сдвиг рН в щелочную область (рН=8,6) приводит к

исчезновению каналов проводимости кратных $90 \cdot 10^{-12} \text{ А}$ (условия приведены на рис.73). Наличие каналов обоих типов при изменении концентрации ионов Ca^{2+} и постоянном pH, а также неизменность вольт-амперных характеристик в указанных пределах изменения концентрации ионов Ca^{2+} показывает, что исчезновение каналов одного типа связано лишь со сдвигом pH в щелочную область.

Обнаружено, что добавление 4',4''-диацетил-ДБ18К6 по обе стороны мембраны в концентрации $2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ приводит к полному подавлению наблюдаемых каналов проводимости рис.72 (б). В условиях, когда краун-эфир находится по одну сторону мембраны (со стороны “минус”), подавление не наблюдается, реверсия и увеличение потенциала приводит к полному блокированию каналов проводимости. Такая потенциалзависимость блокирования указывает на то, что в этом процессе участвует положительно заряженный комплекс краун-эфир : Ca^{2+} . По-видимому, блокирование осуществляется по типу “пробки” и, в первую очередь, подавляются каналы минимальной проводимости, что не дает возможности самосборки больших проводящих структур и как следствие - полное блокирование наблюдаемых каналов проводимости [353, 358, 361].

- Влияние 4',4''-диацетил-ДБ18К6 на рост саркомы-45 *in vivo*

Обнаруженные нами в фосфолипидной фракции клеток саркомы-45 кальциевые каналы, по-видимому, могут обуславливать феномен высокой Ca^{2+} проницаемости плазматических мембран трансформированных клеток. В связи с этим было оценено влияние 4',4''-диацетил-ДБ18К6 на рост перевиваемой опухоли S-45 (Саркома-45).

Представляло особый интерес выяснение изменения в характеристиках роста S-45 *in vivo* под действием дивалерил-ДБ18К6 – краун-эфира того же ряда, обладающего, однако, выраженной ионофорной активностью по ионам Ca^{2+} .

В связи с высокой гидрофобностью краун-соединений, последние в экспериментах *in vivo* вводились непосредственно в опухоль (интратумарально) в виде липосомного препарата. Было проведено три серии экспериментов, отличающихся друг от друга режимом введения (сроками после перевивки и величинами однократной и суммарной доз препарата). Результаты экспериментов представлены в таблице 15.

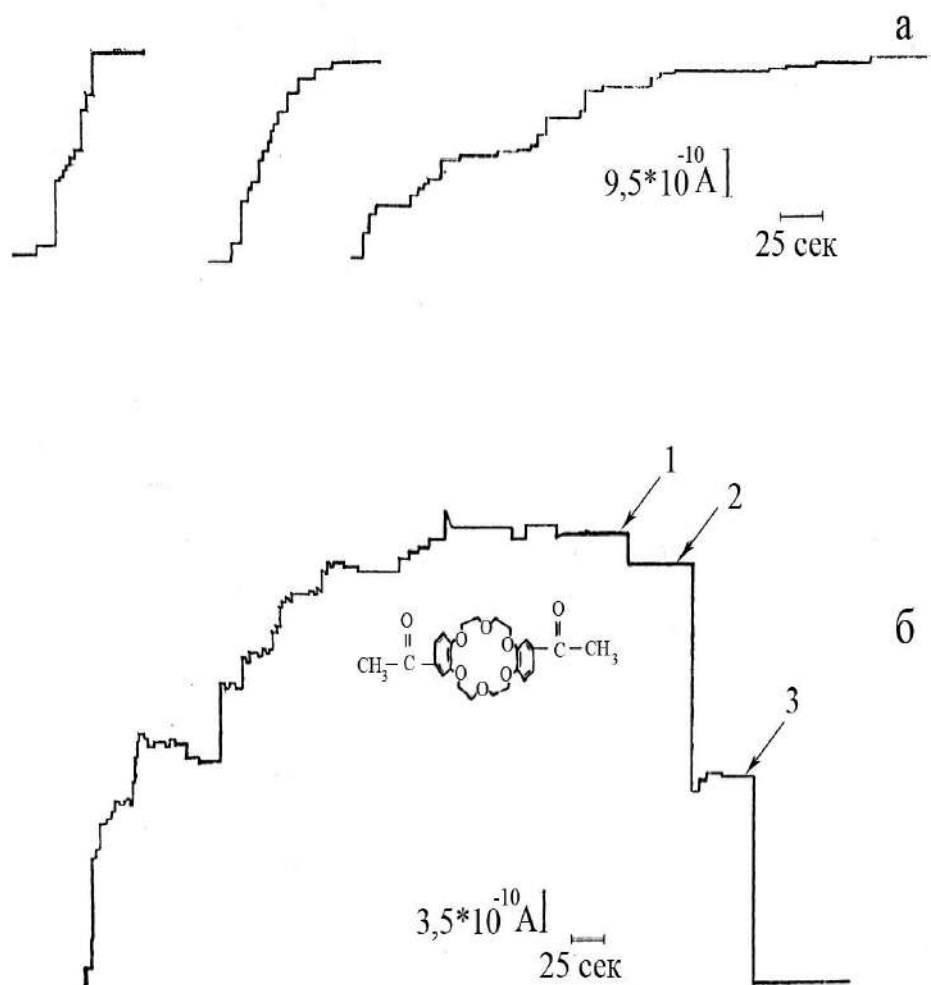


Рис.72. Ионные каналы проводимости бислоев из фосфолипидов клеток саркомы-45

а- записи трансмембранного кальциевого тока, индуцированные на бислоях из фосфолипидов трансформированных клеток (среда: Трис-НС1 - 25 мМ, CaCl_2 - $3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, pH-7, $U=50 \text{ мВ}$);

б- блокирование ионных каналов проводимости 4',4''-диацетил-ДБ18К6 (1-концентрация краун-эфира составляет $5 \cdot 10^{-6}$, 2 - $1 \cdot 10^{-5}$, 3 - $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, соответственно)

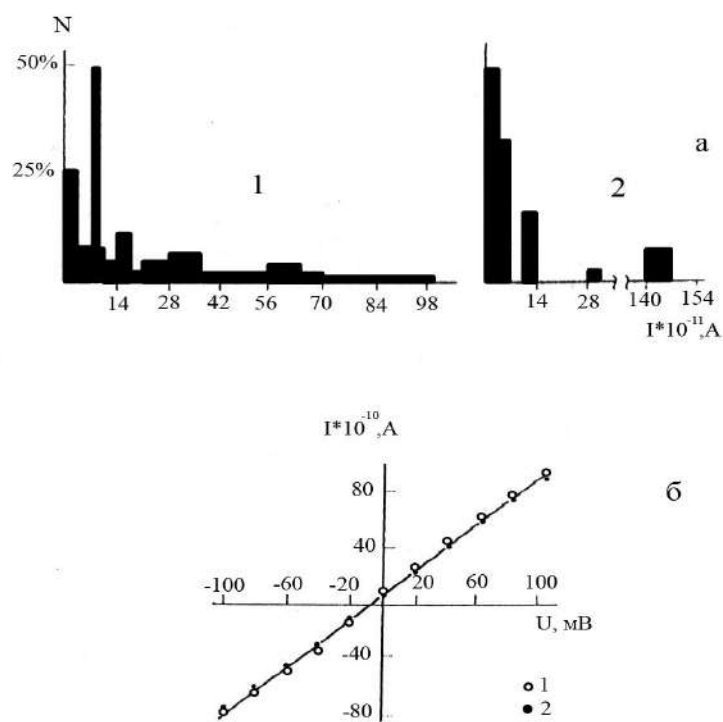


Рис.73. Характеристика ионных каналов проводимости бислоев из фосфолипидов клеток саркомы-45

а - гистограммы распределения Ca^{2+} -каналов проводимости, по оси ординат- доля каналов в % с амплитудой, указанной на абсциссе; (общее число каналов 100, среда: Трис НС1-25мМ, CaCl_2 - $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$, рН-7 для 1 и 2 - та же среда при рН-8,6, $U=50 \text{mV}$); б -вольт-амперные характеристики мембран; среда:ТрисНС1-25мМ, 1 - концентрация CaCl_2 равна $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ и 2 - CaCl_2 равна $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$, соответственно

Как видно из данных таблицы 15, процент торможения роста опухоли в наибольшей степени зависит от сроков введения краун-эфиров. Так, при введении 4',4''-диацетил-ДБ18К6, начиная со следующего дня после перевивки, процент торможения достигает 86%. При введении краун-эфира в более поздние сроки (начиная с 10-го дня) процент торможения не превышает 28%.

Оказалось, что не удастся достигнуть его увеличения путем повышения суммарной дозы препарата (см. серии 2 и 3).

Очевидно, механизм действия 4',4''-диацетил-ДБ18К6 на рост S-45 не предполагает гибель клеток опухоли. Он, по-видимому, сводится к ингибированию акта деления трансформированных кле-

ток без заметного снижения их жизнеспособности. В этом случае регистрируемый в экспериментах процент торможения будет находиться в прямой зависимости от опухолевой массы к моменту воздействия и, следовательно, от срока введения препарата после перевивки [372].

Таблица 15

Влияние диацилпроизводных-ДБ18К6 на рост саркомы-45

№ серии	№ группы	Продолжительность опыта (сутки)	Режим и доза введения	% павших ко дню забоя	% излеченных	М, г	К, % в скобках уровень достоверности	Х, %
1	1	27	4',4''-диацетил-ДБ18К6 в виде липосомного препарата в суммарной дозе 40 мг/кг на 1, 5, 9 и 22 сутки после перевивки	0	0	1.25 ± 0.64	-87 (0.01)	18.83 ± 2.10
	2	27	4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 в том же режиме и суммарной дозе	0	0	16.18 ± 9.22	+75 (0.01)	2.87 ± 0.24
	3	27	Контроль. Пустые липосомы в суммарной дозе фосфолипида 400 мг/кг в том же режиме	0	0	9.62 ± 3.17	-	8.65 ± 2.64
2	4	35	4',4''-диацетил-ДБ18К6 на 12,13 и 15 сутки после перевивки в суммарной дозе 10 мг/кг	20	10	18.3 ± 6.35	-28 (0.01)	-
	5	35	Контроль. Пустые липосомы в том же режиме и дозе фосфолипида 100 мг/кг	40	0	25.5 ± 11.92	-	-

Примечание. Доза липосомного препарата в первой серии вводилась на 1, 5, 9 и 22 сутки после перевивки, во второй серии – на 12, 13 и 15 сутки. М - масса опухоли к концу опыта, К - коэффициент торможения (в скобках указан уровень достоверности отличий от контроля), Х – митотический индекс.

4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 при введении в тех же режимах оказывал стимулирующее действие на рост опухоли. Этот факт подтверждает существование связи между повышением концентрации ионов Ca^{2+} внутри клетки и актом деления [364]. Интересно отметить, что 4',4''(5'')-динонаноил-ДБ18К6-соединение, не обладающее как заметными ионофорными свойствами, так и не являющееся блокатором Ca^{2+} -каналов S-45, в опытах *in vivo* не оказывает влияние на рост перевиваемой опухоли. Следует отметить, что близость, или даже идентичность химических свойств трех краун-соединений диацильного ряда делает маловероятным возможность каких-либо иных объяснений Ca^{2+} проницаемости плазматических мембран трансформированных клеток и является условием их повышенной пролиферативной активности. Торможение пролиферации путем блокады Ca^{2+} -каналов продемонстрированное в наших экспериментах, является новым, не описанным ранее цитостатическим механизмом.

- Внутриклеточная локализация кальциевых каналов

С целью поиска внутриклеточной локализации Ca^{2+} каналов нами были выделены фосфолипидные фракции ядер, митохондрий, “легких митохондрий” и микросом. На бислойных мембранах, сформированных из фракций фосфолипидов ядер, митохондрий и “легких митохондрий”, не обнаружено ранее наблюдаемых кальциевых каналов. На бислойных мембранах, сформированных из фосфолипидов микросомальной фракции, наблюдаются каналы, кратные $90 \cdot 10^{-12} \text{ A}$. Таким образом, очевидно, что структуры, ответственные за каналные эффекты, локализованы, главным образом, на цитоплазматических мембранах. И хотя дальнейшее уточнение топологии каналов нами не проводилось, представляется вероятной их локализация именно в плазматической мембране клетки S-45.

Нами проведен также анализ фосфолипидного спектра выделенных фракций методом тонкослойной хроматографии на пластинах “Силуфол”. Оказалось, что качественный состав фосфолипидов отдельных фракций идентичен, за исключением тех характерных особенностей, которые являются маркерными для индивидуальных органелл. Однако при хроматографии фосфолипидов микросомальной фракции обнаруживается неизвестный компонент на старте, который дает положительную реакцию с нингидриновым реактивом, что указывает на наличие аминок групп. Таким образом, вполне вероятно, что он имеет белковую природу. Подобное неидентифици-

рованное пятно присутствует также на хроматограмме фосфолипидной фракции, полученной из общей опухолевой массы. Не исключена возможность, что образование каналов на бислойных мембранах связано с присутствием этого неидентифицированного компонента.

Таким образом, установлено, что в бислоях из фосфолипидов клеток саркомы-45 присутствуют Ca^{2+} -каналы двух типов: кратные $35 \cdot 10^{-12} \text{A}$ и $90 \cdot 10^{-12} \text{A}$. При сдвиге pH окружающего мембраны раствора в щелочную область один тип каналов (кратные $90 \cdot 10^{-12} \text{A}$) исчезает полностью. Выявлена связь между мембранной активностью диацилпроизводных-ДБ18К6 и их действием на рост саркомы-45 в экспериментах *in vivo*: блокатор кальциевых каналов- 4',4''-диацетил-ДБ18К6 вызывает торможение роста; индуктор кальциевой проводимости мембран- 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 стимулирует рост опухоли; 4',4''(5'')-динонаноил-ДБ18К6, не проявляющий мембранной активности (длинноцепочный Ca^{2+} комплексон), не влияет на скорость роста трансформированных клеток.

Нами показано, что цитологический анализ препаратов саркомы-45 после воздействия 4',4''-диацетил-ДБ18К6 (Ca^{2+} -комплексон) выявил уменьшение митотического индекса клеточной популяции и повышение под действием 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 (Ca^{2+} -ионофор). Наиболее вероятным объяснением действия исследованных краун-эфиров на рост саркомы-45 является цитостатический эффект вследствие частичной блокады кальциевой проницаемости плазматических мембран 4',4''-диацетил-ДБ18К6 и, наоборот, стимуляция клеточной пролиферации за счет повышения проницаемости плазматических мембран по Ca^{2+} краун-эфиром 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6. Аналогичные результаты были получены нами при изучении ионных каналов проводимости бислоев из фосфолипидов карциномы Уокера [359].

Антирадикальная активность краун-эфиров

Одним из ведущих механизмов клеточной патологии, лежащей в основе многих болезней, являются свободнорадикальные процессы, в том числе цепное перекисное окисление липидов в биомембранах. Механизмы повреждающего действия свободнорадикальных процессов на уровне клетки включают в себя нарушения структурных и барьерных свойств липидного бислоя биологических мембран. Один из наиболее ранних эффектов свободнорадикального окисления мембранных липидов-электрический пробой липидного бислоя собственным мембранным потенциалом. Он приводит к потере мем-

браной ее барьерных свойств и, возможно, к дальнейшей активации процессов свободнорадикального окисления. Скорость свободнорадикальных процессов в липидной фазе зависит от физических свойств этой фазы; с другой стороны, свободнорадикальные процессы в мембранах приводят к серьезному изменению физических свойств мембран, что лежит в основе нарушения их функционирования.

В липидный матрикс биологических мембран встроены молекулы жирорастворимых антиоксидантов, инактивирующие свободные радикалы липидов, возникающие в процессе перекисного окисления липидов. В норме процесс свободнорадикального перекисного окисления липидов (ПОЛ) поддерживается на постоянном минимальном уровне благодаря функционированию природных биоантиоксидантных систем организма.

Ограничение свободнорадикальных реакций в живой клетке обеспечивается целой системой ферментов и липидных антиоксидантов, действие которых направлено, в конечном счете, на удаление четырех потенциально опасных соединений: непосредственно липидных радикалов в мембране, гидроперекисей липидов, перекиси водорода и ионов железа [311]. Нарушение одной из систем защиты приводит к активации свободнорадикальных реакций и серьезным нарушениям в жизнедеятельности клеток. Роль таких реакций в развитии патологических состояний можно считать общепризнанной [292].

Свободнорадикальное окисление ненасыщенных жирнокислотных цепей фосфолипидов мембран сопровождается появлением на поверхности мембран отрицательно заряженных групп. Изменение поверхностного заряда, и следовательно поверхностного потенциала мембран должно отразиться на межмембранных взаимодействиях. Наряду с изменением поверхностного заряда, перекисное окисление сопровождается и другими изменениями липидного слоя, в первую очередь, увеличением микровязкости. Кроме того, возникает так называемая “водная коррозия” мембраны, т.е. увеличивается проникновение воды через липидный бислой в результате образования полярных групп продуктов окисления липидов в мембранах.

Нарушение барьерной функции липидного слоя мембран наступает, по-видимому, еще раньше, чем заметные изменения структурных параметров липидного слоя. При перекисном окислении резко увеличивается проницаемость биологических мембран для ионов. Конкретный молекулярный механизм увеличения проницаемости мембран для ионов связан с образованием ионных каналов [311,335].

При исследовании биологических мембран и решении практических задач, связанных с обеспечением длительного сохранения качества пищевых жиров и липидсодержащих фармакологических препаратов, возникает необходимость прогнозирования окислительной устойчивости природных липидов. Устойчивость липидов к окислению зависит как от количества и активности биоантиоксидантов, так и от свойств липидного субстрата [305]. Возможен также поиск различных синтетических препаратов, способных выполнять в той или иной степени функции природных антиоксидантов.

4',4''(5'')-дивторбутил-ДБ18К6 обладает способностью стабилизировать мембраны саркоплазматического ретикулума, уменьшая утечку кальция из везикул, индуцированную перекисным окислением липидов [318]. Причем этот эффект связан с наличием у исследованного соединения антиоксидантной активности.

Первичным промежуточным продуктом является гидроперекись (ROOH), которая в развившемся процессе служит основным источником радикалов. Конечный продукт окисления - пирокатехины, обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами [332]. С целью выяснения возможного механизма антиоксидантного действия краун-эфиров, нами была изучена антирадикальная активность гомологического ряда диацилпроизводных-ДБ18К6, индуцирующих Ca^{2+} -проводимость мембран.

Антирадикальные свойства краун-эфиров исследовали с помощью электрохемилюминесценции [339] в смеси ацетон:хлороформ (1:1) +1мМ малеиновой кислоты. Анализ полученных экспериментальных данных показал заметное изменение антирадикальных свойств в гомологическом ряду диацилпроизводных-ДБ18К6 (рис.74).

При введении в реакционную смесь макроцикла 18К6 изменения исходного уровня свечения не наблюдалось, что позволяет сделать вывод об отсутствии какого-либо влияния этого соединения на течение радикальной реакции в смеси, вызванной электрическим током. Наличие боковых бензольных колец в макроцикле придает соединению слабо выраженную антирадикальную активность - тушение начального свечения наполовину наблюдается при концентрации ДБ18К6 равной 50 мкМ. Введение же заместителей в боковые бензольные кольца резко изменяет характер действия этого соединения.

Так, 4',4''-диацетил-ДБ18К6 обладает резко выраженной антирадикальной активностью: при концентрации равной $2 \cdot 10^{-6}$ М

этот краун-эфир на 50% подавляет радикальную реакцию, а при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М практически полностью ингибирует процесс.

С ростом длины углеводородной цепи заместителей свойства диацилпроизводных-ДБ18К6 претерпевают значительные изменения, так, 4',4''(5'')-дибутирил-, дивалерил- и -дигексаноил-ДБ18К6 в малых концентрациях $(2-4) \cdot 10^{-6}$ М обладают прорадикальным действием, т.е. стимулируют радикальный процесс, и только при десятикратном увеличении концентрации исследуемого вещества в системе оно выступает как ингибитор радикального процесса.

Можно считать установленным, что различные антиоксиданты, действующие на антикислородном, антирадикальном, антиперекисном уровнях, обладают противоопухолевым эффектом, т.е. являются антиканцерогенными.

Исследования по изучению влияния прооксидантов на возникновение и развитие вторичных колоний гриба *Fusarium bulbigenum* var. *Blasticola*, которые по ряду признаков проявляют сходство с истинными неоплазиями, и их можно рассматривать как примитивные патологические новообразования [316], показали, что все вещества, обладающие способностью стимулировать течение радикальных реакций, однозначно стимулируют индукцию вторичных колоний и, таким образом, способствуют росту неопластических клеток.

Интересным представляется тот факт, что 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6, обладающий в низких концентрациях максимальным прорадикальным эффектом, способствует росту пролиферативных клеток неопластических образований, тогда как наиболее эффективный антагонист радикальных реакций - 4',4''-диацетил-ДБ18К6 подавляет рост и развитие злокачественных опухолей. Это показано нами на карциноме Уокера [359] и саркоме-45 [361,372].

Таким образом установлено, что диацилпроизводные-ДБ18К6 (Ca^{2+} -ионофоры и -комплексоны) проявляют как прорадикальную, так и антирадикальную активность в модельной системе. Проявление тех или иных свойств краун-эфирами зависит от структуры молекулы, содержащей заместители в макрокольце; вернее существенное влияние оказывает длина цепочки боковых углеводородных заместителей в бензольных кольцах.

Молекула 4',4''-диацетил-ДБ18К6 в кислой среде принимает хиноидную структуру ($\lambda=530$ нм) [106], по которой происходит

связывание радикалов и, как следствие, подавление радикальной реакции. В таком виде молекула 4',4''-диацетил-ДБ18К6 выступает как ловушка активных радикалов. Вероятно, удлинение углеводородной цепи заместителя сказывается на конформационных изменениях в молекуле и на ее сольватации в растворе.

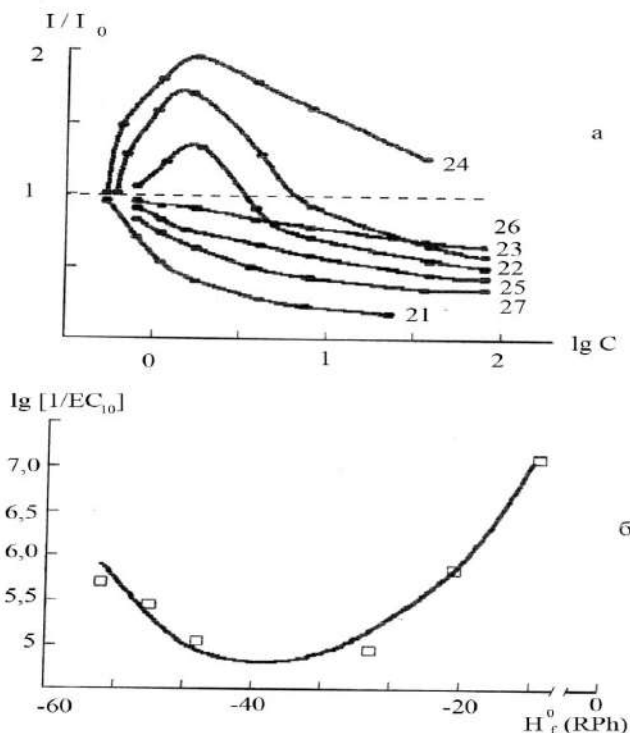


Рис.74. Антирадикальная активность диацилпроизводных-ДБ18К6
а) концентрационные зависимости антирадикальной активности;
б) зависимость антирадикальной активности от энтальпии
углеводородных заместителей

Попытка интерпретировать экспериментальные данные по проявлению антирадикальных свойств исследованными краун-эфирами на основе электронных эффектов, включая заряды на атомах и индукционные константы боковых заместителей в макрокольце не привела к успеху. Электронные свойства ацильного и эфирного атомов кислорода при бензольном кольце после $n=6$ (n – количество атомов углерода в боковой цепи) не изменяются совсем. Это позволяет сделать вывод о том, что вариация про- и антирадикальных свойств диацилпроизводных-ДБ18К6 не определяется влиянием заместителей на электронные свойства этих атомов. Возможно,

что с увеличением длины цепи углеводородных заместителей конформация молекулы краун-эфира изменяется так, что не удается учесть различные стерические факторы.

Кроме того, не исключено, что значительное изменение свойств в данном гомологическом ряду обусловлено сольватационными эффектами. В этом случае представляется возможным описать антирадикальные свойства исследованных соединений изменением термодинамических характеристик заместителей в макрокольце. Действительно, такая зависимость проявляемой краун-эфирами активности от изменения энтальпии соответствующих углеводородных цепей хорошо описывается полиномом второй степени (коэффициент корреляции $r=0,959$) (рис.74 б).

Можно сделать заключение, что в исследованной нами модельной системе антирадикальная активность изученного гомологического ряда диацилпроизводных-ДБ18К6 определяется термодинамическими изменениями свойств молекулы, связанными прежде всего с его сольватацией, как и в случае проявления этими краун-эфирами комплексообразующей способности, изученной в гомогенной среде. По-видимому, в гетерогенной среде поведение этих соединений будет несколько иным, поскольку в этом случае основную роль будут играть конформация молекулы и ее комплекса в мембране, а также процессы на границе раздела фаз мембрана-окружающая среда, подвижность молекулы и ее комплекса в мембране и т.д.

Фармакологическая активность краун-эфиров

Исследования, установившие, что возбудимые образования могут быть мишенью для краун-эфиров в организме приведены в работах [297, 299, 300, 328]. Это также было продемонстрировано на органах животных, так, 15К5 способен изменять силу и частоту сокращений сердца животных. Это действие не ослабляется специфическими модуляторами адрено- и холиноэргической системы регуляции сердечной деятельности. В основе указанных эффектов может лежать прямое кардиотропное действие, заключающееся в изменении потенциалчувствительности и проницаемости электровозбудимой мембраны кардиомиоцитов [296]. Изучение взаимосвязи структура-активность на примере моделей электровозбудимых мембран позволяет предположить [299, 300], что наиболее эффективными в терапевтическом отношении должны быть комплексоны со сложноэфирными группами,

модифицирующие механизмы потенциалчувствительности ионных каналов электровозбудимой мембраны. Действительно, краун-лактоны обнаружили выраженное антиаритмическое и антифибрилляторное действие на моделях сердечных аритмий [299, 300]. Установлена противосудорожная активность производных ДБ18К6 [321].

Важнейшая характеристика лекарственного средства его терапевтическая широта, которая выражается отношением средней дозы, вызывающей гибель половины исследованных животных, к дозе, оказывающей терапевтический эффект у половины животных. Краун-эфиры в комплексе (или образуя контейнеры) с лекарственными средствами обладают способностью преодолевать клеточные мембраны. Например, в работе [184] исследовались 12К4, 15К5 и 18К6 по их способности увеличить растворимость рибофлавина при терапии кератоконуса, когда роговица глаза истончается и принимает коническую форму.

Другим участком действия краун-эфиров может быть хемовозбудимая мембрана нейронов, введение 50 мг/кг 15К5 вызывает явно выраженные изменения в реакциях поведения мышей, продолжающиеся в течение нескольких часов. Совместное введение блокаторов ацетилхолиновой и гистаминовой системы регуляции нервной деятельности снимало эффекты краун-эфира, что доказывает прямое взаимодействие молекулы 15К5 с хемовозбудимыми мембранами нейронов [247]. Авторы определили 15К5 как холиноподобное вещество мускаринового типа, близкое к оксотреморину. Использование ряда модельных систем показали, что причина активности краун-эфира заключается во взаимодействии его не с узнающим участком холинорецептора (это характерно для холиноподобных веществ), а с ионным каналом, контролируемым этим участком. Таким образом, влияние 15К5 на ионную проницаемость электро- и хемовозбудимой мембраны имеет общую молекулярную основу.

Как известно, малая эффективность при внутривенном введении некоторых молекул, способных взаимодействовать с хемовозбудимыми мембранами нейронов и других клеток, связана с низкой проницаемостью гематогенных барьеров для этих соединений. Можно ожидать, что присоединение таких веществ к краун-эфирам с помощью химических связей, легко расщепляемых ферментными системами клеток-мишеней, значительно повысит их биодоступность [302]. Так, были синтезированы и исследованы на мышах

производные диаза-18-краун-6, содержащие ряд фармакофорных групп [178, 313]. Как и предполагалось, фармакологическое действие этих производных краун-эфиров было близким к действию самих фармакологических агентов. Перечень выявленных процессов действия краун-эфиров на возбудимые образования достаточно велик [297, 302, 395], но большинство эффектов непосредственного действия краун-эфиров можно объяснить их ионофорными и комплексообразующими свойствами опосредовано или прямо влияющими на эти процессы.

Способность некоторых физиологически активных соединений преодолевать клеточные и гематоорганные барьеры повышается при использовании комплексов этих соединений с краун-эфирами [302]. Экспериментальной предпосылкой этого положения служат работы, в которых было показано, что некоторые краун-эфиры (15-краун-5, 18-краун-6, 21-краун-7) способны транспортировать аммониевые соли в неполярную фазу через границу раздела хлороформ-вода [233]. Установлено, что не только аммониевые соли, но и соединения, содержащие первичные аминогруппы [284], и многие биогенные амины (норадреналин, дофамин, гомовератриламин) [10] способны транспортироваться краун-эфирами через границу вода-неполярный растворитель. Особенно перспективно использование в качестве переносчиков биогенных аминов макроциклических полиаминов, например, 1, 4, 7, 10, 13, 16-гексазациклооктадекана [152]. По мнению ряда авторов [295, 296], комплексы этих соединений могут быть использованы как “контейнерные” лекарства для воздействия на функции центральной и вегетативной нервной системы.

Таким образом, как взаимодействие краун-эфиров с возбудимыми структурами биологических мембран, так и изменение ими биодоступности известных препаратов, действующих на нервную систему, открывает широкие перспективы поиска новых лекарственных средств [302]. Возможным применением краун-эфиров в терапии инфекционных заболеваний может быть их использование совместно с известными антимикробными агентами. Было показано [83], что введение внутрь животным комплекса сульфанометоксина с 18K6 в несколько раз увеличивает уровень свободного сульфаниламида в крови по сравнению с содержанием его в крови при индивидуальном введении [83]. Причиной значительного повышения биодоступности сульфаниламида, вероятно, является облегчение его транспорта через стенки желудочно-кишечного тракта комплексами 18K6-сульфанометоксина.

Антимикробная активность краун-эфиров

Многие мембраноактивные соединения естественного и искусственного происхождения обладают антимикробным действием, наблюдается синергизм между синтетическими ионными каналами и антимикробной активностью [140]. Известно, что краун-эфиры 15K5, 18K6 токсичны для кишечной палочки *Escherichia coli* [267], эта токсичность выражается в увеличении лаг-периода и изменении логарифмической фазы роста культуры. Установлено также, что ионы калия, но не натрия, уменьшают лаг-период, индуцированный 18K6. В целом, антибактериальная активность краун-эфиров проявляется в концентрациях (5÷50) мМ и уменьшается в ряду дицикло-18K6 > 18K6 > 4'-метилбензо-18K6 > бензо-18K6 > 15K5. В этой же последовательности снижается эффективность транспорта калия (но не натрия) через границу раздела фаз хлороформ-вода [282]. Причина антимикробного действия краун-эфиров заключается в нарушении ионного гомеостаза бактериальных клеток за счет транспорта внутриклеточного калия из клетки под действием градиента концентраций [268].

В работе [395] отмечено высокоэффективное антибиотическое действие около 40 производных бензо-18K6 на возбудителей бактериальных и грибковых заболеваний хлопчатника. Показано, что исследованные краун-эфиры подавляют рост грибов, но не оказывают ингибирующего действия на грамположительные (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательные (*Escherichia coli*) бактерии, актиномицеты (*Streptomyces griseus*), дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*). Отмечается корреляция между K^+ -ионофорной активностью краун-эфиров и их антимикробным действием, что наблюдалось и ранее [297]. Такое действие ионофорных краун-эфиров, скорее всего, объясняется реализацией комплекса свойств краун-эфиров, включающих ионную избирательность и сродство к определенному типу биомембран.

Некоторые полиэфирные комплексоны природного происхождения обладают антикокцидными свойствами, что делает перспективным поиск аналогичного действия среди краун-эфиров. Так, была сделана попытка смоделировать структуру антикокцидного антибиотика моненсина [83]. Был синтезирован ряд ациклических карбоксилсодержащих аналогов краун-эфиров, однако, ни один из них не оказывал влияния на развитие паразитов *Eimeria tinella*. Отсутствие антикокцидной активности у ациклических аналогов

краун-эфиров, возможно, объясняется тем, что они не имеют натрий-селективных свойств, присущих моненсину. Исследование противопротозойной активности показало, что незамещенные ДБ18К6, Б15К5 и метилзамещенный Б15К5 обладают выраженной антикокцидной активностью. В то же время 15К5, 18К6, а также карбоксильные, альдегидные и метоксильные производные Б15К5 оказались совершенно неактивными. Отличительной особенностью указанных соединений является большая, чем у бензокраунов, константа устойчивости комплексов со щелочными металлами при меньшей липофильности. Такие различия в свойствах определяют наличие или отсутствие ионофорных свойств соединений. По антикокцидной активности дибензо-краун-эфиры можно расположить в следующий ряд: ДБ14К4>ДБ18К6>ДБ24К8>ДБ30К10. Вероятно, повышение активности этих соединений при увеличении размеров макроцикла связано также с возрастанием ионофорных свойств за счет лучшего экранирования включенного в цикл катиона. Обнаруженная закономерность увеличения соответствующих типов физиологической активности при повышении ионофорного действия краун-эфиров создала предпосылки для дальнейших исследований. Так, микробиологические испытания алкил-, фенил-, бензил- производных-ДБ18К6 показали высокую антимикробную активность в дозах, близких для таких известных антибиотиков, как пенициллины. Те же соединения оказались активными в отношении внутриклеточных паразитов [302]. Эти данные показывают, что краун-эфиры могут быть использованы для создания нового класса антимикробных и противопаразитарных препаратов.

Взаимодействие диацилпроизводных-ДБ18К6 с Ca^{2+} -каналами проводимости бислов, индуцированные фосфолипазой A_2 из яда *Vespa Orientalis*

Механизмы функционирования возбудимых мембран являются одними из основных в физико-химической биологии и нейрофизиологии. В решении этой проблемы важную роль играют исследования природных физиологически-активных веществ - нейротоксинов, выделенных из ядов различных видов змей, пауков, скорпионов, морских анемонов, кораллов и т.д. Фундаментальные исследования, проведенные с использованием зоотоксинов различной химической структуры, позволили осуществить формирование современных представлений об особенностях их биологического действия на функции возбудимых мембран и способствовали созданию высоко-

эффективных препаратов.

Известно, что в яде *Vespa Orientalis* содержится ряд мембрано-активных компонентов с уникальными свойствами. Это прежде всего ориентотоксин - нейротоксин пресинаптического действия, обладающий лизофосфолипазной активностью, токсическая и нетоксическая фосфолипазы A_2 с необычайными свойствами. Токсическая фосфолипаза A_2 , выделенная из яда шершня *Vespa Orientalis*, существенно различается физико-химическими характеристиками, функциональными свойствами, особенностями отдельных элементов структуры (аминокислотная последовательность N-концевого фрагмента, концевые аминокислотные остатки, спектры кругового дихроизма и т.д.) от всех известных фосфолипаз A_2 из различных источников и в том числе от фосфолипазы A_2 из яда пчелы. Молекулярная масса, вычисленная из анализа аминокислотного состава составляла 16000 дальтон. По-видимому, фосфолипаза A_2 существует в виде димера. Полипептидная цепь фосфолипазы A_2 из яда большого шершня более протяженная, чем в случае фермента из яда пчелы и особенно из яда кобры [397]. Фосфолипаза A_2 , выделенная из яда шершня *Vespa Orientalis* была любезно предоставлена д.б.н., проф. Туйчибаевым М.У.

Основная роль ионов Ca^{2+} в активизации фосфолипазы A_2 в том, что они способствуют связыванию фермента с отрицательно заряженными головками фосфолипидов и образованию фермент- Ca^{2+} -субстратного комплекса. Ионы металлов по своей активирующей способности можно расположить в следующий ряд: $La > Mn > Ca > Al > Ba > Co > Mg > Sr$, а по ингибирующему эффекту ионы металлов располагаются следующим образом: $Co > Zn > Fe$. Полагают, что ионы Ca^{2+} и других металлов, обладающих активирующим действием, непосредственно не участвуют в комплексообразовании с ферментом, а необходимы лишь для проявления высокой каталитической активности как модификаторы поверхности субстратной фазы. Кроме того, ионы Ca^{2+} оказывают и стабилизирующее действие на молекулу токсической фосфолипазы A_2 яда шершня.

Наилучшим субстратом для фосфолипазы A_2 из яда шершня является и природный фосфатидилэтаноламин, причем скорость гидролиза растет при укорачивании жирнокислотной цепи. При любых концентрациях фосфолипазы A_2 полный гидролиз субстрата не достигается. По-видимому, это связано с ингибированием фермента продуктами гидролиза. При этом максимальная скорость реакции отмечена при значении $pH=8-9$ и температуре $50^\circ C$.

Фосфолипаза A_2 яда шершня обладает мембраноактивным действием на митохондриях, которое выражается в разобщении окислительного фосфорилирования, ингибирования синтеза АТФ и транспорта ионов кальция, увеличении проницаемости мембран и в модификации активности различных участков дыхательной цепи [397].

В клетке большинство ферментативных процессов протекает в гетерогенных условиях: на поверхности мембран, в обращенных фазах (в неводной среде) или субстраты ферментов входят в состав неводной фазы или они сами ее составляют. Распространенные ферменты, которые, находясь в адсорбированном или “включенном” в мембрану состоянии, катализируют превращения водорастворимых субстратов. Когда водорастворимые ферменты действуют на нерастворимые или адсорбированные на мембранах субстраты, эффективность ферментативного процесса зависит не только от природы и состояния связывающего и каталитического участков активного центра, а определяется еще и характером взаимодействия белковой глобулы+фермента с поверхностью субстратсодержащей или субстратной фазы. Поэтому, практически все изученные фосфолипазы A_2 , субстратами которых являются фосфолипиды, лучше проявляют активность на агрегированном субстрате, т.е. на границе раздела фаз, чем на мономерном.

Монослой, плоские бислойные мембраны и липосомы широко используются для исследования кинетики липолитических ферментов, в частности фосфолипазы A_2 . Эти исследования существенны для понимания механизма действия фосфолипазы A_2 на биологические мембраны, а также биологических эффектов ферментов.

**- Интегральная проводимость плоских бислоев,
модифицированных фосфолипазой A_2 из яда *Vespa Orientalis***

Эксперименты на плоских бислойных фосфолипидных мембранах показали, что фосфолипаза A_2 из яда шершня влияет на стабильность мембран и при концентрации 10 мг/мл вызывает её разрыв в результате гидролиза фосфолипидов. Время разрыва мембран зависит от используемой концентрации фермента. При концентрации фермента $2 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл фосфолипаза A_2 вызывала ступенчатые изменения интегральной проводимости бислоев. При этом в окружающем мембрану растворе присутствовали ионы $CaCl_2$ в концентрации 10^{-2} М и КС1 в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М, фосфолипаза A_2 была в концентрации $2,7 \cdot 10^{-4}$ мг/мл [356]. Изменение рН окружающего раствора заметно влияло на интегральную проводимость бислоев,

модифицированных ферментом. Следует отметить, что во всех случаях интегральная проводимость бислоев, индуцированная токсической фосфолипазой A_2 из яда шершня, изменяется ступенчато. С другой стороны, скачкообразное изменение проводимости мембраны повторялось через определенные промежутки времени. Предполагается, что вызываемая токсической фосфолипазой проводимость бислоев обусловлена образованием ионных каналов, индуцированных этим ферментом.

- Ca^{2+} -каналы проводимости, индуцированные фосфолипазой A_2 из яда *Vespa Orientalis*

Проведенные исследования показали, что фосфолипаза A_2 из яда шершня индуцирует проводимость плоских бислоев путем формирования в ней одиночных кальциевых каналов проводимости. Формирование этих каналов от мембраны к мембране было неодинаковым и отличалось как количеством открываемых каналов, так и их проводимостью [356]. При внесении фосфолипазы A_2 в концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ мг/мл (по обе стороны мембраны) наблюдались дискретные изменения проводимости бислоев, величины которых при напряжении фиксации на мембране 50 мВ были кратны 70 пС.

Результаты экспериментов показали, что фосфолипаза A_2 из яда шершня, обработанная БМАК (бромметиладамантилкетон-блокатор активного центра фермента) и таким образом, не обладающая ферментативной активностью, индуцирует аналогичные каналы проводимости, как и молекулы нативного фермента. Эти данные позволяют предположить, что каналоформерные свойства фосфолипазы A_2 из яда шершня не связаны с их каталитической активностью. Повидимому, эти свойства исследуемых ферментов определяются их цитотоксической функцией.

Результаты экспериментов по действию Na_2 ЭДТА (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) на кальциевые каналы явились подтверждением нашего предположения. Добавление к раствору, омывающего бислою, Na_2 ЭДТА в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М частично снимает каналоформерное действие этого фермента, а в концентрации 10^{-4} М эти каналы исчезают полностью.

С другой стороны, в экспериментах по определению ферментативной активности фосфолипазы A_2 , в присутствии 10^{-4} М Na_2 ЭДТА и $6 \cdot 10^{-3}$ М $CaCl_2$ (при таких же концентрациях, как и в экспериментах на бислоях), наблюдалось трехкратное увеличение этого параметра по сравнению с нормой [356]. Это ещё раз показывает, что канало-

формерные свойства исследуемого фермента не связаны с их каталитической активностью.

На бислоях из окисленного холестерина наблюдалось резкое уменьшение частоты появления кальциевых каналов проводимости и заметное изменение их формы. Это может быть связано с высокой плотностью упаковки молекул окисленного холестерина в бислое (по сравнению с бислоем из общих фосфолипидов мозга), а сам факт существования каналов свидетельствует о том, что продукты фермент-субстратного взаимодействия не влияют на канальную проводимость мембраны.

Как уже отмечалось выше, в ряду диацилпроизводных-ДБ18К6 найдены как Ca^{2+} -ионофоры, так и Ca^{2+} -комплексоны. Добавление по обе стороны бислоев, модифицированных исследуемым ферментом, 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 подавляло полностью кальциевые каналы при концентрации $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

Одним из объяснений такого действия краун-эфиров может быть блокирование изучаемых каналов проводимости комплексными катионами краун-эфир: Ca^{2+} . Действительно, концентрация ионов кальция на 2-3 порядка выше концентрации краун-эфиров в окружающем мембрану растворе, поэтому все ионы кальция не могут быть комплексированы краун-эфирами. Сравнение радиусов по Стоксу комплексов этих краун-эфиров с Ca^{2+} , измеренная кондуктометрическим методом, показало, что у 4',4''-диацетил-ДБ18К6 этот параметр равен $6,4 \text{ \AA}$, а у 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6 несколько больше и составляет $7,3 \text{ \AA}$. По-видимому, размер комплексного катиона 4',4''(5'')-дипропионил оптимален для блокирования Ca^{2+} -каналов проводимости, индуцированных фосфолипазой A_2 из яда *Vespa Orientalis*. Потенциалзависимость блокирования доказывает это предположение. Поэтому, можно заключить, что диаметр одиночного кальциевого канала сравним с относительным размером комплексного катиона 4',4''(5'')-дипропионил-ДБ18К6: Ca^{2+} и не превышает $14,6 \text{ \AA}$.

Токсичность и психотропная активность

4',4''-диацетил-ДБ18К6

Краун-эфир (дициклогексильное производное 18К6) в малых дозах (10%-ный раствор в пропиленгликоле) вызывают у крыс необратимые изменения роговицы глаза, а при больших (300 мг/кг веса или 130 мг/кг при аппликации на кожу) – смерть подопытных животных. В десятидневных опытах по кумулятивному токсическому действию вещество не оказывало воздействия на самцов крыс при дозе 60 мг/кг в день. В то же время 18-членные диаза-краун-эфиры имеют ЛД₅₀ в пределах 5-50 мг/кг веса крыс [376, 395].

Очевидно, что практическому использованию краун-эфиров должна предшествовать их токсикологическая проверка (оценка общей токсичности, возможности биodeградации, накопления в тканях и окружающей среде).

Токсикологические данные для различных краун-эфиров и меры предосторожности при работе с ними рассмотрены в работах [302, 401]. Наблюдается явная корреляция токсикологического действия и мембраноактивных свойств, при этом токсические свойства краун-эфиров с низкой ионофорной активностью объясняются их влиянием на центральную и вегетативную нервную систему.

Исследованы острая и хроническая токсичности 4',4''-диацетил-ДБ18К6, его противосудорожная и антигипоксическая активность, а также влияние на спонтанное поведение животных в условиях свободного содержания.

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах (самцах) весом 20-22 гр. Острую токсичность краун-эфира оценивали при внутрибрюшинном и пероральном способах введения. Животных за сутки до эксперимента лишали корма. Прием воды не ограничивали. В каждом опыте использовали по 6 животных. Вещество вводили в виде взвеси в оливковом масле (внутрибрюшинно) или в 1%-ной крахмальной суспензии (перорально). Наблюдение за животными проводили в течение 15-ти суток после введения вещества.

Эксперименты показали, что исследуемое соединение не проявляет токсических свойств в дозе 1000 мг/кг при внутрибрюшинном введении и 10000 мг/кг при пероральном введении. В связи с высокой плотностью получаемых суспензий исследование токсических свойств соединений в более высоких дозах не проводилось.

Хроническую токсичность соединения оценивали при внутрибрюшинном способе введения. Исследуемое вещество вводили

животным ежедневно (однократно) в виде взвеси в оливковом масле в течение двух недель. Ежедневная доза соединения составляла 500 мг/кг. Опыты показали, что данное соединение в дозе 500 мг/кг ежедневно не проявляет эффектов кумулятивной токсичности. Наблюдения за животными проводили в течение трех недель после последнего введения. Каких-либо отклонений в поведении и развитии животных в течение эксперимента и после него обнаружено не было.

Противосудорожную активность соединения оценивали по его влиянию на тонические и клонические судороги у мышей, вызываемые коразолом (125 мг/кг, подкожно) и максимальным электрошоком (53 мА, 0,5 с, трансаурикально). Взвесь краун-эфира в оливковом масле вводили животным внутрибрюшинно за 15 минут до введения коразола и до электрического раздражения. Исследуемое соединение неактивно по обоим тестам в дозах от 50 до 200 мг/кг.

Антигипоксическую активность исследовали с помощью теста гипоксии с гиперкапнией в гермобъеме (210 мл). Взвесь вещества в оливковом масле вводили животным внутрибрюшинно за 15 минут до помещения их в гермообъем. Эксперименты показали, что исследуемое соединение в дозах 100 мг/кг и выше проявляет антигипоксические свойства. При этом эффективность антигипоксического действия около 30% ($p < 0,01$).

Влияние соединения на спонтанное поведение животных в условиях свободного содержания оценивали при внутрибрюшинном введении. Наблюдение за животными проводили в течение 4 часов после введения вещества. Обнаружено, что в интервале доз от 50 до 500 мг/кг исследуемое соединение не вызывает судорог, тремора, симптома Штрауба, дискоординации, миорелаксации, птоза, изменений в двигательной и исследовательской активности, эмоциональном состоянии, нарушений болевого, зрительного, звукового и тактильного восприятия. Заметных признаков психотропного действия данного соединения не было обнаружено и при более высоких дозах, включая 1000 мг/кг (внутрибрюшинно) и 10000 мг/кг (перорально).

Действие краун-эфиров на ауксиновые рецепторы

Большинство из применяемых стимуляторов роста и развития семян растений принадлежит к ауксин-подобным соединениям. В качестве физиологических тестов на ауксин-подобную активность использовали рост отрезков coleoptiles пшеницы и укоренение листовых черенков фасоли обыкновенной. Из 2-3-дневных этиолированных проростков хлопчатника сорта 175-Ф методом дифферен-

циального центрифугирования получали фракции ядер, плазматических мембран, а также препарат, обогащенный растворимыми ауксин-связывающими белками с помощью аффинной хроматографии. Эксперименты по связыванию ^3H -индолилуксусной кислоты (^3H -ИУК) с удельной активностью 21 Ки/ммоль “Амершам” проводили с использованием фильтров “Сынпор” (ЧССР). РНК-полимеразную активность в препарате хроматина из ядер проростков в присутствии ИУК и очищенного аффинной хроматографией ауксинового рецептора оценивали по включению ^3H -УТФ (“Изотоп”) с удельной активностью 15 Ки/ммоль. Эксперименты проводились совместно с к.б.н. Тонких А.К.

В тестах на рост отрезков coleoptилей пшеницы и в экспериментах на рост корней у листьев фасоли краун-эфиры Б15К5, ДБ18К6 и 18К6 проявили ауксин-подобную активность при концентрациях, схожих с концентрациями ИУК [329]. С целью поиска конкретных мишеней действия краун-эфиров на растения, было исследовано действие их на ауксин-рецепторное связывание ^3H -ИУК с препаратами, содержащими ауксиновые рецепторы.

Мембраносвязанный ауксиновый рецептор в ответ на связывание ауксина активирует работу протонной помпы, в то время как растворимый ядерно-цитоплазматический рецептор в присутствии ауксина активирует синтез РНК в ядре. Установлено, что исследованные краун-эфиры ингибируют связывание ^3H -ИУК как с препаратами мембран, так и с препаратами водорастворимого ауксинового рецептора, ингибирование при этом имеет конкурентный характер.

Агонисты ауксина в присутствии очищенного растворимого рецептора стимулируют включение нуклеотидов в препарат хроматина, содержащий эндогенные РНК-полимеразы. Показано, что краун-эфиры Б15К5, ДБ18К6, 18К6 аналогично ИУК стимулируют включение ^3H -УТФ в хроматин из проростков хлопчатника в присутствии очищенного рецептора.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что стимулирующее действие краун-эфиров на растения может быть опосредовано связыванием их с активным центром ауксиновых рецепторов и активированием последних, как и при действии фитогормона ауксина. Установленное свойство краун-эфиров действовать в качестве агонистов ауксинового рецептора предполагает потенциальную возможность их практического использования в качестве регуляторов роста растений ауксинподобного действия.

В целях поиска новых высокоэффективных регуляторов роста и развития растений мы обратили внимание на то, что некоторые краун-эфиры, в частности 15K5, 18K6 и ДБ18K6, стимулируют всхожесть семян ряда растений с последующим увеличением их зеленой массы [329]. Механизм обнаруженного стимулирующего действия на растения краун-эфиров был неизвестен, имелось только общее предположение, что в основе его лежит изменение краун-эфирами ионного гомеостаза растительных клеток [298, 299].

В связи с этим, изучение механизмов регулирующего действия краун-эфиров на растения, поиск среди существующих краун-эфиров новых эффективных и безопасных препаратов, повышающих урожайность растений, направленный синтез новых краун-эфиров с регулирующим действием на растения, безусловно, являются актуальными, требующими своего решения задачами.

Показано, что в физиологических тестах на фитогормоны краун-эфиры 15K5, 18K6 и ДБ18K6 проявляют действие, аналогичное стимулирующим растительным гормонам: ауксинам, цитокининам и гиббереллинам. Такое гормоноподобное действие краун-эфиров, не проявляющих ионофорных или каналоформерных свойств, объясняется взаимодействием этих краун-эфиров с рецепторами для фитогормонов. С другой стороны, перечисленные выше фитогормоны являются Ca^{2+} -каналоформерами на плоских бислоях, поэтому мы вправе ожидать от краун-эфиров - индукторов кальциевой проводимости мембран более ощутимых результатов по гормоноподобному действию. Обнаружение у макроциклических полиэфиров универсального стимулирующего гормоноподобного действия на растения создает предпосылки для их использования в растениеводстве как нового класса регуляторов роста и развития растений. Установление факта взаимодействия краун-эфиров с белковыми рецепторами для фитогормонов делает краун-эфиры ценными инструментами исследования гормональных рецепторов.

Регуляция краун-эфирами транспорта ионов в клетках корневой системе хлопчатника

В условиях засоления одной из причин угнетения роста и развития хлопчатника является нарушение транспорта ионов и ионного гомеостаза, при этом происходит существенное нарушение транспорта ионов K^+ и Na^+ . В нормальных условиях Na^+ обычно выделяется в среду, а при засолении он поступает в корневую систему, такое изменение направления транспорта ионов Na^+ в клетке

корневой системы обусловлено изменением электрохимического градиента, определяемого концентрацией NaCl в среде.

Показано, что поступление Na^+ в клетки корневой системы и его накопление в них, в свою очередь, сказывается на поглощении ионов K^+ , которое при этом значительно подавляется. Установлено, что одной из причин уменьшения поглощения ионов K^+ в условиях засоления является деполяризация мембран корневых клеток, происходящая при активном поступлении ионов Na^+ в последние.

В экспериментах использовали 7-дневные проростки хлопчатника *Gossypium hirsutum* сорта 108-Ф. Вегетационные исследования проводились по общепринятой методике [390] совместно с к.б.н. Садыковой К.А. В процессе выращивания использовались смеси микроэлементов и производили подкормку смесью питательных элементов. Содержание K^+ , Na^+ и Ca^{2+} в корневых клетках хлопчатника в различные фазы развития определяли методом пламенной фотометрии после предварительного сухого озоления тканей [390].

О транспорте ионов K^+ и Na^+ в корневых клетках хлопчатника судили по изменению их концентрации в среде инкубации, в аликвотах которой измеряли концентрацию ионов. Для измерения концентрации ионов использовали ионселективные электроды, поставляемые вместе с ионометром И-102 (Гомель) и Ca^{2+} -электроды фирмы “Orion Research” (США). Электроды были подготовлены к работе согласно инструкции и откалиброваны по стандартным растворам.

Регистрацию мембранного потенциала клеток корневой системы проростков хлопчатника проводили стандартным методом с помощью микроэлектродного усилителя “Dagan-8500” (США). Отведение потенциалов осуществляли с помощью микроэлектродов. Полученные результаты обсуждались с д.б.н., проф. П.Б.Усмановым.

Наиболее активными стимуляторами поглощения ионов K^+ и выделения ионов Na^+ из клеток корневой системы хлопчатника оказались 4',4''-дибутил-ДБ18К6, 4',4''(5'')-ди- α -оксибутил-ДБ24К8, 4',5''-ди- α -оксигептил-ДБ24К8 и 4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6 [390].

Анализируя данные, полученные при исследовании влияния краун-эфиров на ионный транспорт в клетках корневой системы проростков хлопчатника, можно заметить закономерность. В частности, некоторые краун-эфиры, наряду со стимуляцией поглощения ионов K^+ , усиливали выделение Na^+ , что может свидетельствовать о сопряженности этих процессов. Учитывая, что поглощение ионов K^+

и выделение ионов Na^+ происходит против концентрационных градиентов, можно предположить, что эти краун-эфиры активируют ионные насосы или транспортные АТФазы.

В присутствии диацилпроизводных-ДБ18К6, проявляющих Ca^{2+} -ионофорные свойства, наряду с увеличением поглощения ионов K^+ клетками корневой системы проростков хлопчатника, наблюдалось подкисление среды инкубации. Особенно заметное подкисление среды имело место в присутствии эффективного Ca^{2+} -ионофора- 4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6. Известно, что подкисление среды инкубации является одним из критериев функционирования H^+ -насоса [312]. Причем одновременная стимуляция H^+ -оттока и АТФазной активности ионами калия и одинаковая чувствительность этих процессов к ингибиторам АТФаз свидетельствует о том, что H^+ -отток - это активный процесс и обеспечивается работой H^+ -АТФазы [42].

Вместе с тем было показано, что поглощение ионов K^+ почти всегда сопровождается H^+ -оттоком, например фитогормон - фузико-кокцин, активируя H^+ -АТФазу, усиливает H^+ -отток и поглощение ионов K^+ [390].

Поэтому, можно заключить, что в основе вышеперечисленных эффектов краун-эфиров лежит аналогичный механизм, а именно активация H^+ -АТФазы, сопровождающаяся усилением H^+ -оттока и поглощением K^+ . Вместе с тем, активация H^+ -АТФазы, наряду с усилением H^+ -оттока и поглощением K^+ , может сопровождаться усилением выхода Na^+ в среду. Особенно важен этот процесс в связи с изучением солеустойчивости растений, которая зависит от способности растений поддерживать ионный гомеостаз в цитозоле при засолении NaCl . Очевидно, краун-эфиры, индуцирующие Ca^{2+} -проводимость мембран, стимулируют поступление Ca^{2+} в клетки корневых проростков и улучшают их Ca^{2+} -статус. При этом, поступление Ca^{2+} может сопровождаться активацией АТФ-аз и нормализацией транспорта K^+ и Na^+ в растительных клетках.

Краун-эфиры в искусственном питании тутового шелкопряда

Процессы усвоения питательных веществ непосредственно связаны с транспортом ионов, углеводным обменом, переносом аминокислот и т.д. В этом смысле особый интерес представляют краун-эфиры, проявляющие ионную и молекулярную специфичность, способные повышать эффективность использования кормовых ресурсов. Индукторы Ca^{2+} -проницаемости мембран пригодны для исполь-

зования в животноводстве как эффективные катализаторы поступления ионов Ca^{2+} в организм. Увеличение внутриклеточного Ca^{2+} стимулирует, в первую очередь, транспорт сахаров, а также активацию различных ферментных систем клетки. Краун-эфиры использовались в качестве эффективных добавок в искусственный корм тутового шелкопряда. Для повышения эффективности искусственного питания тутового шелкопряда во взятые за основу питательные среды, разработанные в соответствии с пищевой специализацией и потребностью насекомого, вводились краун-эфиры. В результате массового разведения устанавливались: изменение гусеничного периода развития, выживаемость гусениц, изменение средней массы кокона и шелковой оболочки. Эксперименты проводились совместно с д.б.н. Мадьяровым Ш.

В качестве добавок в искусственном корме тутового шелкопряда исследовались Ca^{2+} -комплексоны и Ca^{2+} -ионофоры. Выбор краун-эфиров, индуцирующих кальциевую проводимость мембран, был обусловлен универсальностью этого иона в метаболических и других важнейших внутриклеточных процессах.

Для повышения эффективности искусственного питания тутового шелкопряда во взятые за основу искусственного питания среды, вводились краун-эфиры. Содержание краун-эфиров было в пределах от 0,001% до 0,005% от готовой к употреблению питательной среды.

В результате массового эксперимента были выявлено, что при исследовании 4',4''(5'')-дибутирил-ДБ18К6 и 4',4''(5'')-дивалерил-ДБ18К6 - индукторов Ca^{2+} -проводимости мембран происходит сокращение гусеничного периода развития до 2 суток, увеличение выживаемости гусениц до 10%, увеличение средней массы кокона до 16% и шелковой оболочки до 8%. Действие Ca^{2+} -комплексонных оказалось намного меньше влияния индукторов Ca^{2+} -проводимости мембран.

Полученные результаты позволяют заключить, что краун-эфиры, индуцирующие Ca^{2+} -проводимость мембран, могут быть использованы в повышении эффективности нетрадиционных кормов для тутового шелкопряда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В монографии приведены данные о структуре и свойствах мембраноактивных краун-эфиров, проявляющих комплексонные, ионофорные и каналоформерные свойства. Эти краун-эфиры исследованы на плоских бимолекулярных и мультитамеллярных слоях. Установлены различия во взаимодействии комплексонных, ионофорных и каналоформерных краун-эфиров с мультитамеллярными слоями, определены два типа каналообразования. Изучены основные принципы организации и функционирования ионных каналов, индуцированных краун-эфирами на плоских бислоях. На биомембранах исследованы ионофорные и каналоформерные свойства краун-эфиров, изучено биологическое действие и определены некоторые области их использования.

Благодаря своим уникальным комплексообразующим и ионофорным свойствам, макроциклические полиэфиры внесли заметный вклад в изучение процессов трансмембранного переноса ионов, выступая в качестве моделей ионофорных антибиотиков.

Долгое время не удавалось синтезировать каналоформеры на основе краун-эфиров. Основные исследования в этом направлении сопровождались созданием довольно сложных молекул, полученных в результате трудоемкого синтеза. Обнаружение каналоформерных свойств у краун-эфиров, приведенных в монографии, подтверждает тот факт, что способностью формировать на бислоях ионные каналы могут обладать краун-эфиры с небольшой молекулярной массой и относительно простым синтезом.

Зависимость комплексообразующих и мембраноактивных свойств краун-эфиров от их структурных особенностей дает возможность синтезировать молекулы каналоформеров с препрограммируемыми свойствами, что значительно расширяет область исследования данных соединений и применения их на практике.

В монографии изложены результаты исследований мембраноактивных свойств краун-эфиров. Изучались краун-эфиры, различающиеся размером полости макроцикла, природой, длиной и количеством заместителей в бензольных кольцах на плоских бислойных мембранных. Исследовались особенности действия краун-эфиров на искусственные и биологические мембраны.

Направленный синтез мембраноактивных краун-эфиров позволил выявить ряд интересных ионофорных и каналоформерных соединений. Материалы монографии показывают, что современные знания структурных особенностей селективного комплексообразо-

вания позволяют анализировать данные по мембранной проводимости и избирательности. Комплексообразующие свойства краун-эфиров исследованы довольно детально, но проблема получения эффективных и селективных ионофоров и каналоформеров на основе этих соединений остается чрезвычайно актуальной.

Представленные в монографии данные позволяют рассматривать их не только в плане изучения механизмов мембранного действия краун-эфиров, но и также свидетельствуют о возможности использования этих соединений в различных областях медицины, сельского хозяйства, в создании новых материалов и технологий.

Анализируя, направления, в которых можно развивать настоящие исследования отметим, что одним из них является установление закономерностей взаимодействия краун-эфиров и их аналогов с различными белками, ферментами, ионными каналами, рецептор-канальными комплексами и т.д., выяснения механизмов их прямого и опосредованного действия на биомембраны и биологические системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abel E., Meadows E.S., Suzuki I., Jin T., Gokel G.W. Unusually long open times, determined by planar bilayer conductance studies, for a synthetic tris (macrocycle) that functions as a transmembrane channel in a phospholipid bilayer // J.Chem. Soc. Chem. Commun., 1997, p.1145-1146.
2. Abel E., Maguire G.E.M., Murillo O., Suzuki I., Gokel G.W. Hydrophile channels: Structural and fluorescent probes of position and function in a phospholipid bilayer // J.Am. Chem. Soc., 1999, v.121, p.9043-9052.
3. Abou-Khalil S., Abou-Khalil W.H., Yunis A.A. Inhibition by Ca^{2+} of oxidative phosphorylation in myeloid tumor mitochondria // Arch. Biochem. Biophys., 1981, v.209, p.460-464.
4. Agostiano A., Gaselli M., Della M.M. A polarographic investigation on the equilibrium constants of crown complexes in alcohol solutions // J. Electroanal. Chem., 1976, v.74, p.95-105.
5. Andrioukhina E.N., Fedorova O.A., Ushakov E.N. Photoswitchable ditopic receptors; synthesis, cation-induced self-assembly into dimeric complexes and stereospecific [2+2]-photocycloaddition of multiphotochromic 15-crown-5 ethers of quinoline series // Incl. Phen., 2000, Ann. N.Y. Acad.Sci., 1972, v.195, p.273-290.
6. Arnold K.A., Gokel G.W. Experimental method for the determination of cation-binding constants in methanol using ion selective electrode methods // J. Org. Chem., 1986, v.51, p.5015.
7. Arslan P., Di V.F., Bertrame M., Tslene R., Rozzan T. Cytosolic Ca^{2+} -homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinoma // J. Biochem., 1985, v.260, N 5, p.2719-2727.
8. Aylward S., Beer P.D., Carr S. Towards magnesium selective ionophores // Abs. XVII International Symposium on Macrocyclic Chemistry, Provo, Utah U.S.A., 1992, p. 4.
9. Barbour L.J., De Wall S.L., Meadows E.S., Gokel G.W. Experimental Evidence for Alkali Metal Ion Cation- π Interactions Using Bibracchial Lariat Ether Complexes // Ind.Engr.Chem., 2000, v.39, 10, p.3436-3441.
10. Bacon E., Jang I., Lehn J.M. Crown-ethers as transmitter of biogen amines. // Eur. J.Med.Chem., 1980, v.15, p.89-93.
11. Beer P.D., Keefe A.D., Drew M.G.B., New bis-ferrocene calix[4]arene hydrophobic molecules and cristal structure of one of them // J.Organomet. Chem., 1988, v.353, p.10.
12. Beer P.D., Smythe A.C., Tite E.L., Ibbotson A. Redox-active cavitand host molecules containing multiple redox centers, syntheses and x-ray cristal structure of a dichlormetane inclusion complex // J. Organomet. Chem., 1989, v.376, p.11.

13. Beer P.D., Philip P.A. A new class of redox active ionophore; calyx [4] tetraquinone // XXV ISMC, Scotland, U.K., 2000, p.78.
14. Behr J.P., Kirch M., Lehn J.M. Carrier-mediated transport through bulk liquid membranes. Dependence of transport rates and selectivity on carrier properties in a diffusion-limited process // J. Am. Chem. Soc., 1985, v.107, p.241.
15. Bernhardt P.V., Hayes E.Y. Cyclam-type macrocycles bearing pendant crown ethers: potential redox-active receptors // XXV ISMC, Scotland, U.K., 2000, p.53.
16. Bhadwat V.W., Manahar H., Poonia N.S. On pronounced anion-philicity of calcium the first example of exclusive anion-solvent environment around Ca^{2+} ion in a crown-ether product $\text{Ca}^{2+}(\text{Picrate})_2(\text{benzo-15-crown-5})\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ // Nucl.Chem.Lett., 1980, v.16, p.289-292.
17. Bhadwat V., Monahar H., Poonia N.S. Effect of chelating anions on metal-crown interaction. Part III. X-ray structure of potassium picrate complex of benzo-15-crown-5 // Inorg. Nucl. Chem. Lett., 1981, v.17, p.207-210.
18. Bianchi A. Anion coordination by synthetic receptors // Incl. Phen., 1999, p.56.
19. Bligh E.G and Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of biochemistry and physiology, 1957, N 8, p.37.
20. Bochenska M., Zielinska A., Korezagin I. Studies of complex formation constants in PVC membrane and extraction constants for new calyx[4]arene ionophores with alkali metal cations // XXV ISMC, Scotland, U.K., 2000, p.123.
21. Boheim G., Hanke W., Eibl H. Lipid phase transition in planar membrane and the effect on carrier- and pore-mediated ion transport // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., 1980, v.77, N 6, p.3403-3407.
22. Bowsher B.R., Rest A.I., Main B.G. Template synthesis and ionophores properties of substituted crown-ethers towards alkali metal ions // J.Chem.Soc.Dalton Trans., 1974, N 7, p.1421-1425.
23. Brock, N., Wilmanns, H. Action of a cyclic phosphoamide ester of N mustard on experimentally produced tumors-chemotherapeutic activity and pharmacological properties // Disch. Med. Wochenschr., 1958, 83, p.453.
24. Bradshaw J.S., Maas G.E., Lamb G.D. et al. Cation complexing properties of synthetic macrocyclic polyether-diether ligands containing the pyridine subcyclic unit // J.Amer. Chem. Soc., 1980, v.102, N 2, p.467-474.
25. Brierley C.P. Passive permeability and energy-linked ion movements in isolated heart mitochondria // Ann. N.Y. Acad. Sci., 1974, v.22, p.398-411.

26. Bryan A.S., Daschbach M.M., Gammon S.T., Shuzhang Xiao Sarah, Chapman E., Hudson C., Suckow M., Piwnica-Worms D., Gokel G.W. and Leevy W.M. In vivo cell death mediated by synthetic ion channels // *Chem. Commun.*, 2011, v. 47, 28, p.7977-7979.
27. Budka J., Wichlova V., Lhotak I. Novel calyx [4] arene-based receptors for anion recognition // XXV ISMC, Scotland, U.K., 2000, p.116.
28. Busch D.H. Thompson M.L. Reaction of coordinated ligands. IX. Utilization of the template hypothesis to synthesize macrocyclic ligands // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1964, v.26, N 8, p.3651-3657.
29. Bush M.A., Mary K., Truter M.R. Crystal structure of complexes between alkali-metal salts and cyclicpolyethers part (II) complex formed from sodium froneide and 2, 3, 11, 12-dibenzo-1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaoxa-cyclooctadeca-2,11-diene (dibenzo-18-crown-6) // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1971, p.1440.
30. Cantwell R., Garrad E.S., Gokel M.R., Hayes M.J., Meisel J.W., Negin S., Patel M.B, and Gokel G.W. Biological Activity of Macrocyclic Cation Transporters // *Curr. Org. Chem.*, 2015, 19, p.2229.
31. Caroni P., Carafoli E. The Ca^{2+} -pumping ATP-ase of heart sarcolemma // *J.Biol. Chem.*, 1981, v.256, p.3260-3270.
32. Carabez A., Sondoal F. Properties of ionophores with broad range of cation selectivity // *Biochim. et biophys. acta.*, 1981, v.638, 1, p.125-131.
33. Carafoli E., Lehninger A. A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species // *Biochem. J.*, 1971, v.122, p.681-690.
34. Carmichael V.E., Dutton P.J., Fyles T.M., James T.D., Swan J.A., Zojaji M. Biomimetic ion transport: a functional model of a unimolecular ion channel // *J. Am.Chem.Soc.*, 1989, v.111, p.767-769.
35. Casselman A.A., Thompson H.S., Bannard R.A.B. An examination of macrocyclic ether-alkali metal salts complexes as reagents for the destruction of boxing organic compounds // *Sec. Symp. Macr. Comp.*, 1978, v.2, p.23.
36. Cazacu A, Tong C., Fyles T.M., Barboiu M. Columnar self-assembled ureido crown ethers: an example of ion-channel organization in lipid bilayers // *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, v.128, 29, p.9541-9548.
37. Christensen J.J., Eatough D.J., Izatt R.M. The synthesis and ion binding of synthetic multidentate macrocyclic compounds // *Chem. Rev.*, 1974, v.74, p.351.
38. Christensen M.K., Weber D.J. Effect of macrocyclic polyethers on the properties membrane enzymes // *Plant and cell physiology*, 1981, v.22, N3, p.479-488.

39. Ciani S.M., Eisenman G., Szabo G. Properties of liquid membranes containing neutral molecular carriers of ions // *J.Membr.Biol*, 1969, 1, p.3.
40. Cittadini A., Scarpa A., Chance B. Calcium transport in intact Ehrlich ascites tumor cells // *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, v.291, p.246-259.
41. Cittadini A., Dani A., Wolf F., Bossi D., Calviello G. Calcium permeability of Ehrlich ascites tumor cell plasma membrane in vivo // *Biochem.Biophys.Acta*, 1982, v.696, N 1, p.27-35.
42. Cocucci M.C., Marri E. Erythrosin B as effective inhibitor of electrogenic H extrusion // *Plant Cell and Environ.*, 1986, N 8, p.677-679.
43. Carl R. Yamnitz, Negin S., Carasel I. A., Winter R.K. and Gokel G.W.. "Dianilides of Dipicolinic Acid Function as Chloride Channels" // *J. Chem.Comm.*, 2010, p. 2838-2840.
44. Cusumano Z.T., Gokel G.W. Synthetic Ion Channels As Novel Anti-microbial Agents // *Current Bioactive Compounds*, 2006, 2, p.13-18.
45. Cygan A., Biernat J.F., Chandzynski H. Macrocyclic polyfunctional lewis bases. Part III. Electrophonetic behavior of macrocyclic polyethers // *Pol. J.Chem.*, 1979, v.53, p.929-933.
46. Dasgupta D., Thanabal V., Krishnan V. Metallo crown porphyrins as ionophores-metal dependent uncoupling of mitochondrial energy potential // *Biochem.Biophys.Res.Comm*, 1982, 104, p.1427.
47. Dalley N.K. Structural studies of synthetic macrocyclic molecules and their cation complexes // *Acad.Press. New York*, 1978, p.200.
48. Dalley N.K., Larsson S.B. Correlation of structural and thermodynamic data for some cation-cyclopolyether complexes // *Sci.Symp.Macr. Comp.*, 1978, v.4, p.44.
49. Delgado M., Echegoyen L., Gatto V.J., Gustowski D.A., Gokel G.W. Direct electron-spin resonance evidence for sodium selective intramolecular ion pairing in redox-switched nitrogen-pivot lariat ethers // *J. Am. Chem.Soc.*, 1986, 108, p.4135.
50. Delgado M., Gustowski D.A., Yoo H.K., Gokel G.W., Echegoyen L. Contrasting one-cation and 2-cation binding behavior in synanthraquinon and anti-anthraquinon bibrachial podand (BIP) mono- and di- anions assessed by cyclic voltammetry and electron-paramagnetic resonance // *J. Am.Chem.Soc.*, 1988, 110, p.119.
51. De Wall S.L., Meadows E.S., Murray C.L., Shabany H., Gokel G.W. Synthetic sodium-ion-conducting tris(macrocyclic) channels that function in a phospholipid bilayer membrane: an overview // *Supramol. Chem.*, 2001, 12, p.13-22.
52. Deng Y., Wu G.G., Moyer B.A. et al. Calorimetric study of the interaction of divalent transition metal ions with a crown-ether: inverting the

Irving-Williams order // Abs. XVII International symposium on macrocyclic chemistry, Provo, Utah U.S.A., 1992, p.29.

53. Dishong D.M., Gokel, G.W. Crown cation complex effects. Solvent dependence of the 15-crown-5 and 18-crown-6 equilibrium with sodium cation // J.Org. Chem., 1982, 47, p.147.

54. Dietrich B., Lehn J.M., Sauvage, J.P. Cryptates // Tetrahedron Lett., 1969, p.2885.

55. Dobler M. 18-crown-6; NUR ein einfaches molekule // Chimia, 1984, v.38, N 12, p.415.

56. Eboli M.L., Malmstrom K., Caleotti T., Lopez-Alarcon, Carafoli E. Calcium transport and translocation of adenine nucleotides in mitochondria from Morris hepatoma 3924 A // Cancer. Res. , 1979, v.39, p.2737-2742.

57. Echegoyen L., Kaifer A., Durst H.D., Gokel G.W. Dynamics of crown and lariat ethers cation complexation assessed by carbon-13 NMR relaxation times // J.Org.Chem., 1984, 49, p.688.

58. Echegoyen L., Gustowski D.A., Gatto V.J., Gokel G.W. Electrochemical switching of lariat ethers. Enhanced cation binding by one-electron and 2-electron reduction of an anthraquinone sidearm // J.Chem.Soc. Chem. Commun., 1986, p.220.

59. Echegoyen L., Gokel G.W., Echegoyen L.E., Chen Z., Yoo H.K. Electrochemical switching in reducible lariat ethers: from cation binding enhancements to electrochemically-mediated transport // J.Incl. Phen., 1989, 7, p.257.

60. Echegoyen L.E., Yoo H.K., Gatto V.J., Gokel G.W., Echegoyen L. Cation transport using anthraquinone-derived lariat ethers and podands: the first example of electrochemically switched on/off activation/ deactivation // J.Am.Chem.Soc., 1989, v.111, p.2440.

61. Echeverria L., Delgado M., Gatto V.J., Gokel G.W., Echegoyen L. Enhanced transport of Li^+ through an organic model membrane by an electrochemically reduced anthraquinone podand // J.Am.Chem.Soc., 1986, v.108, p.6825.

62. Eisenman G., Ciani S.M., Szabo G. Some theoretically expected and experimentally observed properties of lipid bilayer membranes containing neutral molecular carriers of ions // Federat. Proc., 1968, 27, p.1289-1304.

63. Eisenman G., Ciani S.M., Szabo G. Some Theoretical Expected and Experimentally observed Properties of Lipid Bilayer Membranes Containing Neutral Molecular Carriers of Ions // Federat. Proc., 1968, 32, p.1968-1703.

64. Eisenman G., Giani S.M., Szabo G. Some theoretically expected and experimentally observed properties of lipid bilayer membranes containing neutral molecular carriers of ions. Ibid., 1968, 27, p.1289.

65. Eisenman G. and Krasne S. The ion selectivity of carrier molecules, membranes and enzymes // In: *Internat. Rev. Sci., Biochem. ser.*, 2. London 1973, p.1-42.
66. Elliott E., Stine K., Keith J. and Gokel G.W. "Air-water Interfacial Behavior of Amphiphilic Peptide Analogs of Synthetic Chloride Ion Transporters // *J. Membrane Sci.*, 2008, 321, 43-50 [PMID: 19169376].
67. Estrada O.S., Carabez A.J. The action crown-ethers on membrane binding enzymes // *Bioenerg.*, 1972, N 3, p.429-443.
68. Fenton D.E., Mercer M., Truter M.R. The crystal structure of a model carrier complex formed between sodium bromide and 2, 3, 11, 12-dicyclohexyl-1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaoxa-cyclooctadeca-2,11-diene(Dicyclohexyl-18-crown-6) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 48, N 1, p.10-15.
69. Ferdani R., Gokel G.W. "Ionophores," in *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, J.W.Steed and J.A.Atwood (Eds.), Marcel Dekker, 2003, p.760-766.
70. Ferdani R., Pajewski R., Djedovic N., Pajewska J., Schlesinger P.H. and Gokel G.W. Anion transport in liposomes responds to variations in the anchor chains and the fourth amino acid of heptapeptide ion channels // *New J. Chem.*, 2005, 29, p.673-680.
71. Ferdani R., Gokel G.W. Planar bilayer studies reveal multiple conductance states for synthetic anion transporters // *Org. Biomol. Chem.*, 2006, 4, p.3746-3750.
72. Fisker R.A., Heath D.A. and Bold A.M. Hypercalcemia a hospital survey // *Quarterly Journal of Medicine*, 1980, v.49, p.405-408.
73. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. The simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J.Biol. Chem.*, 1957, v.226, p.497-509.
74. Frensdorff H.K. Stability constants of cyclic polyether complexes with univalent cations // *J.Amer. Chem. Soc.*, 1971, v.93, p.600-606.
75. Fuhrhop J.H., Liman U., David H.H. Sealing opening porous mono-layer vesicle membranes // *Angew. Chem. Int. Ed.Engl.*, 1985, 24, p.339-340.
76. Fuhrhop J.H., David H.H., Mathieu J., Liman U., Winter H.J., Bockema E.J. Bolaamphiphiles and monolayer lipid membranes made from 1,6,19,24-tetraoxa-3,21-ciclohexa-thiacontadiene-2,5,20,23-tetrone// *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, v.108, p.1785.
77. Fuhrhop J.H., Fritsch D. Bolaamphiphiles form ultrathin porous and unsimmetric monolayer lipid membranes// *Acct.Chem. Res.*, 1986, 19, p.180.
78. Fyles T.M. Principles of artificial membrane transport of ions by syntetic ionophores. Ed.by T. Osa and J. L. Atwood, *Inclusion aspects of membrane chemistry*, Kluwer academic publishers, Dordrecht / Boston / London, topics in inclusion science, 1991, v.2, p. 59-111.

79. Fyles T.M. Cation Transport Across Bilayer Membranes: Techniques and Mechanisms. Ed. by L.Echegoyen and A.E.Kaifer // Physical Supramolecular Chemistry, NATO ASI Series, Series C: Mathematical and Physical Sciences, 1996, v.485, p.39-47.
80. Gakil E. Fluorescent effective ionophore macrocycles // XXV ISMC, Scotland, U.K., 2000, p.84.
81. Gammon S.T., Leevy W.M., Gross S., Gokel G.W. & Piwnica-Worms D. Spectral Unmixing of Photon Emission from Bioluminescent Organisms in Co-Culture // Analytical Chemistry, 2006, 78, p.1520-1527.
82. Gandour R.D., Fronczek R.R., Gatto V.J., Minganti C., Schultz R.A., White B.D., Arnold K.A., Mazocchi D., Miller S.R., Gokel G.W. Solid-state structural chemistry of lariat ethers and BIBLE cation complexes. Metal-ion identity and coordination-number determine cavity size // J. Am.Chem.Soc., 1986, v.108, p.4078.
83. Gardner I.O., Beard C.O. Acyclic analogues of crown ethers as functional model for monencin // J. Med.Chem., 1987, 21, p.357.
84. Gokel G.W. Hydrapiles: Design, Synthesis, and Analysis of a Family of Synthetic, Cation-Conducting Channels // Chem. Comm., 2000, p.1-9.
85. Gokel G.W., Mukhopadhyay A. Synthetic Models of Cation-Conducting Channels, Chem. Soc. Rev., 2001, v.30, 5, p. 274-286.
86. Gokel G.W., Ferdani R., Liu J., Pajewski R., Shabany H. and Uetrecht P. Hydrapile Channels: Models For Transmembrane Cation-Conducting Transporters // Chem. Eur. J., 2001, 7, p.33-38.
87. Gokel G.W. Artificial Cation-Conducting Channels: Design, Synthesis and Characterization // Cell Biochemistry and Biophysics, 2001, v.35, 3, p.211-231.
88. Gokel G.W., Barbour L.J., De Wall S.L. and Meadows S.L. Macrocyclic polyethers as probes to assess and understand alkali metal cation- π interactions // Coordination Chemistry Reviews, 2001, 222, p.127-154.
89. Gokel G.W. Lariat Ethers // In Encyclopedia of Supramolecular Chemistry, J.W.Steed and J.A.Atwood (Eds.). Marcel Dekker, 2003, p. 782-790.
90. Gokel G.W. Crown Ethers // In Encyclopedia of Supramolecular Chemistry, J.W.Steed and J.A.Atwood (Eds.). Marcel Dekker, 2003, p. 326-333.
91. Gokel G.W., Some thoughts on chemistry and biology // New J. Chem., 2003, p.1157-1158.
92. Gokel G.W., Leevy W.M., Weber M.E. Crown Ethers: Sensors for Ions and Molecular Scaffolds for Materials and Biological Models // Chemical Reviews, 2004, 104 (5), p.2723-2750.
93. Gokel G.W., Schlesinger P.H., Djedovic N.K., Elliott E., Ferdani R., Leevy W.M., Pajewski R., Pajewska J., Wang W., Weber M., You L.

- Synthetic, Ion-conducting Transmembrane Channels // Chemicke Listy, 2004, 98, p.85.
94. Gokel G.W., Schlesinger P.H., Djedovic N. K., Ferdani R., Harder E.C., Hu J., Leevy W.M., Pajewska J., Pajewski R., Weber M.E. Functional, synthetic organic chemical models of cellular ion channels // Bioorg. & Med. Chem., 2004, 12, p.1291-1304.
 95. Gokel G.W. (Ed.) Advances in Supramolecular Chemistry, 9, 2004, Cerberus Press. 263 p.
 96. Gokel G.W., Leevy W.M., Weber M.E. Model Systems For Biological Processes // Macrocyclic Chemistry: Current Trends and Future, Springer, 2005, p.253-265.
 97. Gokel G.W., Schlesinger P.H. Synthetic ion channels. U.S. Patent 7, 129, 208 issued 2006.
 98. Gokel G.W., Daschbach M.M. Coordination and Transport of Alkali Metal Cations through Phospholipid Bilayer Membranes by Hydrphile Channels // Coordination Chemistry Reviews, 2008, 252, p.886-902 [NIHMSID:77892] .
 99. Gokel G.W and N.Barkey.Transport of Chloride Ion through Phospholipid Bilayers Mediated by Synthetic Ionophores // New J. Chem., 2009, 33, p.947-963.
 100. Gokel G.W and Negin S. Synthetic Membrane Active Amphiphiles // Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64, p. 784-796.
 101. Gokel G.W. Cation Binding by Crown Ethers // Elsevier Chemical, Molecular Sciences and Engineering Chapter, 2013, 5615, 15 p.
 102. Gokel G.W and Negin S. Synthetic ion channels: From pores to biological applications // Acc. Chem. Res., 2013, v.46,12, p.2824-2833.
 103. Gokel G.W and Meisel J.W. Synthetic Receptors for Alkali Metal Cations // Supramolecular Chem., 2015, 14, p.86.
 104. Gokel G.W, Gokel M.R., Negin S. and Patel M.B. Molecules that inhibit efflux pumps in multi-drug resistant bacteria and uses thereof // U.S. Pat. Appl. Publ. 2016, US 2016036129 A1 20161215.
 105. Gokel G.W, Negin S., Cantwell R. “ Crown Ethers” in Comprehensive Supramolecular Chemistry , II, 2017, p.3-48.
 106. Gomez-Puyou A., Gomez-Lojero C. Use of ionophores and channel-formers in the study of the function of biological membranes // Current Topics on Bioenergetics, 1977, v.6, p.221-257.
 107. Grech N., Pullman A. Cation ionophore interactions: quantity cation on the factors underlying selective complexation by means of theoretical computations // Met.Ions Biol.Syst., New York, Basel, 1985, v.19, p.335-386.

108. Gunther R., Hauswirth O., Ziskoven R. Influence of crown-ethers on some excitable tissues // *Pharmacol.*, 1968, 310, p.79.
109. Gustowski D.A., Gatto V.J., Kaifer A.E., Echegoyen L., Godt R.E., Gokel G.W. Electrochemically switched cation binding in nitro-benzene-substituted, nitrogen-pivot lariat ethers // *J. Chem.Soc.Comm.*, 1984, p.923.
110. Gustowski D.A., Delgado M., Gatto V.J., Echegoyen L., Gokel G.W. Geometrical and electronic cooperativity on cation mediated electrochemical reductions of anthraquinone-substituted podands // *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, p.3487.
111. Gustowski D.A., Delgado M., Gatto V.J., Echegoyen L., Gokel G.W. Electrochemical switching in anthraquinone substituted carbon-pivot lariat ethers and electronic cooperativity // *J. Am.Chem.Soc.*, 1986, 108, p.7553.
112. Hall C.D., Kinkovits G.Y. Redox-active artificial ion channels // XXIV ISMC, 1999, Barcelona, OS7-3.
113. Hall A.C., Suares C., Hom-Choudhury A., Manu ANA, Hall C.D., Kirkovits G.J., Ghiriviga I. Cation transport by a redox-active synthetic ion channel // *Org. Biomol. Chem.*, 2003, 1, p. 2973.
114. Hanai T.D., Haydon D.H., Taylor J.L. The variation of capacitance and conductance of bimolecular lipid membranes with area // *Theoret. Biol.*, 1965, 9, N 3, p. 433-443.
115. Hancock R.D., Thom V.J. Macrocyclic effect in transition metal ion complexes of a mixed (nitrogen, oxygen) donor macrocycle // *J.Amer. Chem. Soc.*, 1982, 104, N 1, p.291.
116. Hancock R.D., Wade P.W. Ligand design for complexation in aquatic solution. Chelate ring size as a basis for control of size-based selectivity for metal ions // *Inorg. Chem.*, 1990, 29, N 10, p. 1968-1974.
117. Hanson I.R., Hugnes D.L., Truter M.R. Crystal and molecular structure of 6,7,9,10,12,13,20,21,23,24,26,27-dodecahydrodibenzo *b,n*/1,4,7,10,13,16,19,22/ octaoxacyclotetra-cosin(dibenzo-24-crown-8)//*J.Chem.Soc. Perkin Trans II*, 1976, N 8, p. 972-976.
118. Hanson I.R. The structure of benzo-15-crown-5 at 150°C // *Acta Crystallogr.*, 1978, v.34, p.1026-1028.
119. Harris E.J., Zaba B., Truter M.R., Parsons D.G. Specificities of cation permeabilities induced by some crown ethers in mitochondria // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, v.182, p.311-320.
120. Hazelton B., Tupper J. Calcium transport and exchange in mouse 3T3 and SV 40-3T3 cells // *J. Cell. Biol.*, 1979, v.81, p. 538-542.
121. Hayashita T., Kasprzyk S., White J.C. et al. Synthesis and property of dibenzo crown-ether resins possessing various side-arm groups // *Abs. XVII*

International Symposium on Macrocyclic Chemistry, Provo, Utah U.S.A., 1992, ST 10.

122. Herceg M., Weiss R. Structure cristalline et moléculaire du tétraoxa-1,7,10,16-diaza-4,13,-cyclooctadécane // Bull.Soc.Chim. France, 1972, N 2, p. 549-551.

123. Hinnen R., Miyamoto H., Racker E. Ca^{2+} -translocation in Ehrlich ascites tumor cells // J.Membrane Biol., 1979, v.81, p.538-542.

124. Hu J., Barbour L.J. and Gokel G.W. Sigma-donor, pi-donor, and anion competition in pi-complexation of alkali metal cations // Chem. Comm., 2002, p.1808-1809.

125. Hu J., Barbour L.J., Gokel G.W. Ferrocene Derivatives as Receptors to Explore Ammonium Cation-pi Interactions // New J. Chem., 2004, 28, p.907-911.

126. Iman Elidrisi, Negin S., Bhatt P.V., Govender T., Kruger H. G., Gokel G.W. and Maguire G.E.M. Pore Formation in Phospholipid Bilayers by Amphiphilic Cavitands // Organic and Biomolecular Chemistry, 2011, 9, p.4498-4506.

127. Izatt R.M., Rytting B.L., Nelson P.P., Haymore J.K., Christensen J.J., Binding of alkali metal ions by cyclic polyethers // Significance of ion transport processes, 1969, v.164, p.443-444.

128. Izatt R.M., Eatough D.J., Christensen J.J. Thermodynamics of cation-macrocyclic compound interaction // Struct. Bonding (Berlin), 1973, v.16, p.161-188.

129. Izatt R.M., Terry R.E., Nelson P.P. et al. Calorimetric titration study of the interaction of several uni and bivalent cations with 15-crown-5, 18-crown-6 & two isomers of dicyclohexa-18crown-6 in aqueous solution at 25°C $\text{MU}=0,1$ // J.Amer.Chem.Soc., 1976, v.98, p.7620.

130. Izatt R.M., Terry R.E., Nelson P.P., Chan Y., Eatough D.J., Bradshaw I.S., Christensen J.J. Calorimetric Titration Study of The Interaction of Some Uni- and Bivalent Cations Benzo-15-crown-5, 18-crown-8, Dibenzo-24-crown-8 and Dibenzo-27-crown-9 In Metanol-Water Solvents at 25°C and $\text{M}=0.1$ // J. Amer.Chem.Soc., 1976, v.98, p.7626-7630.

131. Izatt R.M., Lamb J.D., Assay E. etc. Unusual stability characteristics in methanol of the complexes of a new pyridine-substituted cyclic polyether-ester compound with Na, K, Ag & Ba - comparison with oxygen, sulfur & nitrogen analogues // J.Amer.Chem.Soc., 1977, v.99, p.6134-6136.

132. Izatt R.M., Lamb J.D., Christensen J.J. Selective complexation of cations by macrocycle compounds // First symp. on macr. comp., 1977, p.1.

133. Izatt R.M. Cation selectivities show by cyclic polyethers & their derivatives, Metal-ligand interaction // Organic chemistry & biochemistry, Dordrecht-Holland, 1977, p.337.

134. Izatt R.M., Terry R.E., Hansen L.D. etc. A calorimetric titration study of uni- & bivalent metal ion interaction with several thia derivatives of 9-crown-3, 12-crown-4, 15-crown-5, 18-crown-6, 24-crown-8 & with several oxathiapentadecanes in water or water-methanol solvents at 25°C // *Inorg.Chimical Acta*, 1978, N 30, p.1.
135. Izatt R.M., Lamb J.D., Christensen J.J. etc. Alkali & earth cation selectivity by cyclic polyether type ligands // *Sec. Symp. Macromol. Comp.*, 1978, v.1, p.41.
136. Izatt R.M., Lamb J.D., Hawkins R.T., Brown P.R., Izatt S.R., Christensen J.J. Selective $\text{Me}^+ - \text{H}^+$ coupled transport of cations through a liquid membrane by macrocyclic calixarene ligands // *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, v.105, p.1782.
137. Izatt S.R., Hawkins R.T., Christensen J.J., Izatt R.M. Cation transport from multiple alkali cation mixtures using a liquid membrane system containing a series of calixarene carriers // *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, v.107, p.63.
138. Izatt R.M., Bradshaw J.S., Nielsen S.A. etc. Thermodynamic & kinetic data for cation-macrocyclic interaction // *Chem. Rev.*, 1985, 85, p.271-339.
139. Iwasa T., Iwasa Y., Krishnazaj R. A high-affinity $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATP-ase in plasma membranes of rat ascites hepatoma AH 109 A cells // *Biochem. Biophys. Acta*, 1983, 731, p. 229-238.
140. Jason L.A., Patel M.B., Cusumano Z. and Gokel G.W. Enhancement of Antimicrobial Activity by Synthetic Ion Channel Synergy // *Chem. Commun.*, 2010, v.46, N 43, p. 8166-8167.
141. Joseph W. Meisel and Gokel G. W. A Simplified Direct Lipid Mixing Lipoplex Preparation: Comparison of Liposomal-, Dimethyl Sulfoxide-, and Ethanol-Based Methods // *Scientific Reports*, 6, Article number: 27662 (2016); doi:10.1038/srep27662.
142. Jóźwiak M. Thermochemical behaviour of crown ethers in the mixtures of water with organic solvents: Part V. Enthalpy of solution of 12-crown-4 and 18-crown-6 ethers in the mixtures of water with dimethylsulfoxide or N,N-dimethylformamide at 298.15 K // *Journal of Molecular Liquids*, 2003, v.107, p.169-183.
143. Kaifer A., Durst H.D., Echegoyen L., Dishong D.M., Schultz R.A., Gokel G.W. Dynamics of sodium cation complexation by carbon- and nitrogen-pivot lariat ethers // *J. Org. Chem.*, 1982, 47, p.3195.
144. Kaifer A., Echegoyen L., Gokel G.W. Evidence for side-arm involvement in lariat ether complexes: a lanthanide shift reagent study // *J. Org. Chem.*, 1984, 49, p.3029.
145. Kaifer A.E., Gustowski D.A., Echegoyen L., Gatto V.J., Schultz R.A., Clearly T.P., Morgan C.R., Goli D.M., Gokel G.W. Electrochemical

switching of lariat ethers. Survey of cation binding by neutral and reduced forms of one-armed and two-armed carbon-pivot lariat ethers // J. Am. Chem. Soc., 1985, 107, p.1958.

146. Kaifer A.E., Echegoyen L. One-electron electrochemical reduction of nitro-benzen // In Cation Binding by Macrocycles: Complexation of Cationic Species by Crown Ethers. Inoue Y., Gokel G.W. Eds., Marsel Dekker; New York, 1990, Chapter 8, p. 363.

147. Kashanian S., Shamsipur M. Complex formation of alkaline earth cations with benzo-15-crown-5 and some 18-crowns in methanol, dimethylformamide and dimethyl sulfoxide solutions // Inorg. Chem. Acta, 1989, 155, N 2, p. 203-206.

148. Kingston Y.E., Chen Z., Beer P. "Cleft-like" ditopic cobalticinium ligands designed to chelate anions//XX ISMC, 1995, Jerusalem, Israel, 10.

149. Kimura E. etc. The formation of complexes of crown-ether with some enzyme substrates // J. Amer.Chem.Soc., 1981, 103, p.3041-3046.

150. Kimura E. etc. The formation of complexes of crown-ethers with nucleotides // J.Amer.Chem. Soc., 1982, 104, p. 3182-3187.

151. Kimura E., Zassi Y. The formation of complexes of macrocyclic polyamines with organic acids // J.Amer. Chem. Soc., 1982, v.104, p. 701-705.

152. Kimura E., Watanade A., Kodama M. GACOD complexes as container for drugs // Amer. Chem. Soc., 1983, v.105, p.2063-2067.

153. Kimura K., Ishikava T., Tamura H., Shono T. Lipophilic bis crown-ether derivatives of 15-crown-5 & 18-crown-6 as neutral carriers of ion-selective electrodes // J. Chem.Soc.Perkin Trans II, 1984, N 2, p.447-450.

154. Kimura K., Shono O. Alkali metal ion-selective electrodes based on bis (crown ether) derivatives containing nitrogen atom // Nippon Kagakukaishi, 1987, N 3, p.277-282.

155. Kobuke Y., Hamachi I. Facilitated electron transfer from NADH to flavolipid-bound in ammonium bilayer // J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1989, p.1300.

156. Kollenz G., Smouning K., Wentrup C. Synthesis and Complexation properties of novel lariat-crown ethers and molecular tweezers // XXV ISMC, 2000, Scotland, U.K., p.90.

157. Konig B., Pelka M., Zieg H., Ritten T. Photoinduced electron transfer in a phenothiazine-riboflavin aggregate in water under physiological conditions // XXIV ISMC, 1999, Barcelona, OS4-4.

158. Koppel J.A., Palm V.A. Influence of the solvent on organic reactivity // In: Advances in linear free energy relationships (N.B.Chapman), London-New York, 1972, p.203-280.

159. Kulikov O.V., Negin S., Rath N.P. and Gokel G.W. Morphologies of branched-chain pyrogallol [4] arenes in the solid state // *Supramolecular Chem.*, 2014, 26, p.506.
160. Lamb J.D., Izatt R.M. Thermodynamics & kinetics of cation macrocycle interaction // In *Coord.Chem.Macr.Comp. Part 2*, 1979, p. 180.
161. Lamb J.D., Izatt R.M., Swain E.A. etc. A systematic study of the effect of macrocycle size & donor atom type on the lgK, H and T S of reactions at 25° in methanol of mono- & divalent cations with crown ethers // *J.Amer.Chem.Soc.*, 1980, v.102, N 2, p.475-479.
162. Lardy H.A. Influence of antibiotics and cyclic polyethers on ion transport in mitochondria // *Federat. Proc.*, 1968, v. 27, p. 278.
163. Leevy W.M., Donato G.M., Goldman W.E., Schlesinger P.H., Gokel G.W. Synthetic hydrophile channels of appropriate length kill *E. coli* // *J. Am.Chem.Soc.*, 2002, 124, p.9022-9023.
164. Leevy W.M., Huettnner J.E., Pajewski R., Schlesinger P.H., Gokel G.W. Synthetic Ion Channel Activity Documented by Electrophysiological Methods in Living Cells // *J.Am.Chem.Soc.*, 2004, 126, p.15747-15753.
165. Leevy W.M., Weber M.E., Schlesinger P.H., Gokel G.W. NMR and Ion Selective Electrode Studies of Hydrophile Channels Correlate with Biological Activity in *E. coli* and *B. subtilis* // *Chem.Comm.*, 2005, p.89-91.
166. Leevy W.M., Weber M.E., Gokel M.R., Hughes-Strange G.B., Daranciang D.D., Ferdani R., Gokel G.W. Correlation of Bilayer Membrane Cation Transport and Biological Activity in Alkyl-substituted Lariat Ethers // *Org.Biomol.Chem.*, 2005, 3, p.1647-1652.
167. Lehn J.M., Sauvage J.P., Dietrich B. Quantum chemical calculation on structure and bonding of macrocyclic complexes // *J.Amer. Soc.*, 1970, v. 92, p. 2916-2921.
168. Lehn J.M. Design of organic complexing agents strategies towards properties // *Structure-Bonding*, 1973, v.16, p.1.
169. Lehn J.M. Quantum chemical calculation on the macrocyclic effects // *Pure Appl.Chem.*, 1977, v. 49, N 5, p. 857- 864.
170. Lehn J.M. Design of organic complexing agents strategies towards properties // *Acc. Chem. Res.*, 1978, v.11, N 1, p.49-57.
171. Lehn J.M. Chemistry of transport processes - design of synthetic carrier molecules // *Physic.Chemic.Transmembrane Ion Motions.*, 1983, N 1, p.181-206.
172. Lehn, J.M., Potvin, P.G. Anion coordination chemistry. Molecular recognition and catalysis by anion receptor molecules // *Progr.Macrocyclic Chem.*, 1987, 3, p.1969.

173. Liesegang G., Eyring E.M. In: Synthetic Multidentate Macrocyclic Compounds (Ed. R.Izatt, J.Christensen) N.Y., San Francisco - London, Academic Press, 1978, p.245-254.
174. Mc Nally B.A., Leevy W.M. and Smith B.D. Recent Advances in Synthetic Membrane Transporters // *Supramol. Chem.*, 2007, 19, p. 29-37.
175. Mackil P.R., Benniston A.C., Peacock R.D. Cation chelating [2] catenanes and cyclophanes and their photophysical and redox properties // *Incl. Phen.*, 1998, p.135.
176. Mallinson P.R., Truter M.R. Crystal structures of complexes between alkali metal salts & cyclic polyethers. Part V, The 1:2 complex formed between potassium iodide & benzo-15-crown-5 // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1972, N 12, p.1818-1823.
177. Mallinson P.R. Crystal structures of complexes between alkali metal salts & cyclic polyethers. Part VIII Complexes formed by calcium thiocyanate with (7R, 9R, 18S, 20S) tetramethyl-dibenzo-18-crown-6 (isomer F) & its (18R, 20R) isomer (isomer G) // *J.Chem.Soc. Perkin Trans.*, 1975, N 4, p.261.
178. Marini-Bettolo G.B. Phytohormones // *Recent advances in Receptor Chemistry*. New York, 1979, p. 147.
179. Mashiko T., Reed C.A., Haller K.J. Nature of iron (I) & iron (O) tetraphenyl-porphyrin complexes. Synthesis & molecular structure of (dibenzo-18-crown-6) bis (tetrahydrofuran) Sodium (meso-tetraphenylporphinato) ferrate & bis /tris (tetrahydrofuran) sodium (meso-tetraphenylporphinato) ferrate // *Inorg. Chem.*, 1984, v. 23, p. 3192-3196.
180. Massaux J., Desreux I., Duyckaerts G. Electrochemical studies on alkali metal complexes with the small macrocycle 1,4,7,10-tetraoxacyclododecane. Polarographic & potentiometric determination on the stability constants in propylene carbonate // *J.Chem.Soc.Dalton Trans.*, 1980, p.865.
181. Massaux I., Roland G., Desreux I. F. A systematic study of the effect of macrocycle ring size & donor atom type on the lgK, H, T, S of reaction at the 25°C in methanol of mono & divalent cations with crown ethers // *Inorg.Chem.act.*, 1982, v.60, p.129.
182. McLaughlin S.G.A., Szabo G., Eizenman G. etc. Surface change & conductance of phospholipid membranes // *Proc.Nat.Acad.Sci., USA*, 1970, v.67, N 3, p.1268-1275.
183. McLaughlin S.G.A., Szabo G., Eisenman G. etc. The effect of a cyclic polyether on the electrical properties of phospholipid bilayer membranes // *Membr. Biol.*, 1972, 9, N 1, p. 3-36.
184. Morrison P.W.J., Porfiryeva N.N., Chahal S., Salakhov I.A., Lacourt C.,

Semina I.I., Moustafin R.I. and Khutoryanskiy V.V. Crown-ethers: Novel Permeability Enhancers for Ocular Drug Delivery? // *Mol. Pharm.*, 2017, v.14, N 10, p.3528-3538.

185. Medina J.C., Li C., Bott S.G., Atwood J.I., Gokel G.W. "Cleft-like" complexation of ferrocene // *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, p.366.

186. Menger M., Truter M.R. Crystal structures of complexes between alkali metal salts & cyclic polyethers. Part VII Complex formed between benzo-24-crown-8 & two molecules of potassium isothiocyanate // *J. Chem.Soc.DaltonTrans.*, 1973, N 21, p.2469-2473.

187. Menger B.M., Truter M.R. Crystal structures of complexes between alkali metal salts & cyclic polyethers. Part VI, Complex formed between dicyclohexyl-18-crown-6, isomer B & sodium bromide // *J.Chem.Soc. Dalton Trans.*, 1973, N 21, p. 2215-2220.

188. Menger F.M., Davis D.S., Persichetti R.A., Lee J.J. Synthetic channelforming compounds in vesicle systems. Synthetic flux-promoting compounds, exceeding the ion transporting ability of gramicidin // *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, p.2451.

189. Meisel J.W., Patel M.H. and Gokel G.W. Condensation of plasmid DNA by benzyl hydrophiles and lariat ethers: dependence on pH and chain length // *Supramolecular Chem.*, 2017, A29, p.167.

190. Mosgaard L.D., Heimburg T. Lipid Ion Channels and Role of Proteins // *Acc.Chem.Res.* 2013, 46, N 12, p. 2966-2976.

191. Mirkhodjaev U.Z. Membrane active properties of crown ethers: ionophores and channelformers // *Abs. of XV-th Intern. Symp. on Macromol. Chem.*, Odessa, 1990, p. 237.

192. Mueller P., Rudin P.O. Methods for the Formation of Single Bimolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution // *J.Phys. Chem.*, 1963, p. 534-535.

193. Mundy G.R., Cove D.H., Fiske R.A., Heath D.A. and Somers S. Primary hyperparathyroidism: changes in the pattern of clinical presentation // *Lancet*, 1980, p.1317-1320.

194. Murphy F., Coll K., Rich T., Williamson J. Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes / *J.Biol.Chem.*, 1970, p.6600-6608.

195. Myers R.T. Coordination and the size of ions and ligands // *Inorg. and Nucl. Chem. Lett.*, 1980, v.16, N 6, p.329-330.

196. Nakano A., Li Y., Geoffroy P., Kim M., Atwood J.L., Bott S., Zhang H., Echegoyen L., Gokel G.W. Cistulynes: Proton NMR and Single-crystal X-ray Evidence for Structure and Cation Encapsulation in a Rigid, Molecular Channel Model System // *Tetrahedron Letters*, 1989, p.5099-5102.

197. Nakano A., Xie Q., Mallen J.V., Echegoen L., Gokel G.W. Synthesis of a membrane-insertable sodium cation conducting channel, kinetic analyses by dynamic sodium // *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, p.1287.
198. Neevel J.G., Nolte R.J.M. Ion transport across vesicle bilayers mediated by an artificial channel compound // *Tetrahedron Lett.*, 1984, p.2263-2266.
199. Negin S., Patel M.H., Gokel M.R., Meisel J.W., Gokel G.W. Antibiotic Potency against *E. coli* is Enhanced by Channel-Forming Alkyl Lariat Ethers // *Chem BioChem*, 2016, 17, p.153.
200. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion // *Nature*, 1984, v.308, p.693-698.
201. Ogirala P., Negin S., Agena C., Schäfer C., Geisler T., Mattay J. and Gokel G.W. Properties of Long Alkyl-chained Resorcin[4]arenes in Bilayers and on the Langmuir Trough // *New J. Chem.*, 2013, 37, p.105.
202. Osher U. The lipophilic macrocyclic polyether dibenzo-12-crown-4: a selective ionophore for lithium ions // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1982, v.104, p. 4006.
203. Osipov V.V., Rostovtseva T.K., Lev A.A. Current-voltage characteristics of the single gramicidin A channels in glycerylmonooleat bilayers under asymmetrical and symmetrical ANS⁻ adsorption // *Internat. symp. "Membrane lipids-metabolism and organization"* Varna, 1987, p.30.
204. Ovchinnikov Yu.A. Selective binding and transmembrane ion transport in biological systems: Carriers and channels // *Sec. Symp. Macromol. Comp.*, 1978, v.1, p.25.
205. Oven I.D. Crystal structures of the benzo-15-crown-5 complexes bis-isothiocyanate (2,3,5,6,8,9,11,12-octahydro-1,4,7,10,13-benzoxa-15-cyclopentadecin)-magnesium-calcium methanol & calcium hydrate // *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1978, N 10, p. 1418-1423.
206. Oven J.D. Crystal structures of complexes between alkali metal salts & cyclic polyethers. Part 10. Complex formed between dibenzo-30-crown-10 & two molecules of sodium isothiocyanate // *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, 1979, N 10, p. 1831-1835.
207. Ozeki E., Kimura S., Imanishi Y. Electron transport by an anthraquinone crown ether conjugate through an organic liquid membrane controlled by complexation with a metal cation // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1988, p.1353.
208. Pajewski R., Ferdani R., Schlesinger P.H., Gokel G.W. Chloride Complexation by Heptapeptides. Influence of C- and N-Terminal Side-chains and Counterion // *Chem. Commun.*, 2004, p.160-161.
209. Pajewski R., Ferdani R., Pajewska J., Djedovic N., Schlesinger P.H., Gokel G.W. Evidence for dimer formation by an amphiphilic heptapeptide

that mediates chloride and carboxy fluorescein release from liposomes // *Org.Biomol.Chem.*, 2005, 3, p.619-625.

210. Pajewski R., Garcia-Medina R., Brody S.L., Leevy W.L., Schlesinger P.H. and Gokel G.W. A Synthetic Chloride-Selective Channel that Alters Chloride Transport in Epithelial Cells // *Chem. Commun*, 2006, p.329-331.

211. Pallavichini P. Selective anion binding by dimetallic macrocyclic receptors // XXI ISMC, 1996, Montecatini Terme, Italy, ICL 16.

212. Patai S., *The chemistry of Quinonoid Compounds*, Ed. Wiley, New York, 1974, v.1, p.2.

213. Patel M.B., Stavri A., Curvey N.S. and Gokel G.W. Hydraphile synthetic ion channels alter root architecture in *Arabidopsis thaliana* // *Chem. Commun.*, 2014, p.11562.

214. Patel M.B., Garrad E.C., Stavri A., Gokel M.R., Negin S., Meisel J.W., Cusumano Z. and Gokel G.W. Hydraphiles enhance antimicrobial potency against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus subtilis* // *Bioorg. & Med. Chem.*, 2016, v. 24, 12 p. 2864-2870.

215. Patterson B.C., Thompson D.H., Hurst J.K. Methyl viologen mediated oxidation reduction across dihexadecylphosphate vesicles involves transmembrane diffusion // *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, p.3656.

216. Pedersen C.J. Cyclic polyethers & their complexes with metal salts // *J.Amer. Chem. Soc.*, 1967, v.89, N 10, p. 2495-2496.

217. Pedersen C.J. Cyclic polyethers and their complexes with metal salts // *J.American Chem.Soc.*, 1967, v.89, N 26, p.7017-7036.

218. Pedersen C.J. Ionic complexes of macrocyclic polyethers // *Federat. Proc.*, 1968, v.27, N 6, p. 1305-1309.

219. Pedersen C.J. Crystalline salt complexes of macrocyclic polyethers // *J.Amer. Chem. Soc.*, 1970, v.92, N 2, p. 386-391.

220. Pedersen C.J. New macrocyclic Polyethers // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1970, v. 92, N 2, p.391-394.

221. Pedersen C.J. The discovery of crown-ethers // *J.Amer. Chem. Soc.*, 1988, v.6, N 4, p. 337-350.

222. Petranek J., Ryba O. Potassium selective electrodes based on macrocyclic polyethers. The effects of structure of the neutral carrier on selectivity // *Anal. Chim. Acta*, 1974, 72, N 2, p. 375.

223. Poonia N.S. Crown antibiotics: complexation with alkali & alkaline earth cations // *J.Sci. & Ind. Res.*, 1978, v.37, N 4, p. 202-205.

224. Poonia N.S. Chapter three multidentate macromolecules: principles of complexation with alkali & alkaline earth cations, *Progress in macrocyclic chemistry* Ed. by Izzat R.M., Christensen J.J. // Pergamon Press., 1979, v.1, p.115-155.

225. Poonia N.S., Bajaj A.V. Coordination chemistry of alkali & alkaline earth cations // *Chem. Rev.*, 1979, v.79, N 5, p. 389-438.
226. Pozzan T., Arslan P., Di V.F. Measurement of free cytoplasmic calcium concentration in Ehrlich and Yoshida ascites carcinomas // In: *Membrane in tumor growth*, 1982, p.353-358.
227. Pressman B.C. Properties of ionophores with broad range of cation selectivity // *Federat. Proc.*, 1973, .32, p. 1698-1703.
228. Pressman B.C. Biological applications of ionophores // *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, v.45, p.501-530.
229. Pressman B.C. Biological & pharmacological properties of carboxylic ionophores // *Sec. Symp. Macr. Comp.*, 1978, 1, p. 22.
230. Rebek Jr., Binding forces, equilibria and rates: new models for enzymic catalysis // *J. Acct.Chem. Res.*, 1984, 17, p. 258.
231. Rebek Jr., Costello T., Marshall J., Wattley R., Gadwood R.C., Onan K.J. Allosteric effects in organic chemistry. Binding cooperativity in a model for subunit interactions// *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, p.7481.
232. Rebek Jr. Model studies for molecular recognition // *J. Science*, 1987, 235, p.1478
233. Reed M.I. Transport of ammonium salts induced by 15K5, 18K6 and 21K7 // *J. Membrane Sci.*, 1981, 9, p.263.
234. Reibnegger G., Rode B.M. Quantum chemical calculations on the macrocyclic effect // *Inorg. Chim. Acta*, 1983, .72, p. 47.
235. Ren C., Shen J., Zeng H. Combinatorial Evolution of Fast-Conducting Highly Selective K⁺-Channels via Modularly Tunable Directional Assembly of Crown Ethers // *J Am Chem Soc.*, 2017, v.139 N 36:12338-12341 doi: 10.1021 / jacs. 7b 04335, Epub 2017.
236. Rubin H., Vidar C., Sanui H. Restoration of normal appearance growth behavior and calcium content to transformed 3T3 cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1981, v.78, p.2350-2354.
237. Saeedeh Negin, Smith B.A., Unger A., Leevy W.M. and Gokel G.W. Hydraphiles: A Rigorously Studied Class of Synthetic Channel Compounds with In vivo Activity // *International Journal of Biomedical Article discussed in Nanotechnology Weekly*, 2011, p.183.
238. Saeedeh Negin, Daschbach M.M., Kulikov O.V., Rath N. and Gokel G.W. Pore Formation in Phospholipid Bilayers by Branched-chain Pyrogallol[4]arenes // *J. Amer. Chem. Soc.*, 2011, 133, p.3234-3237.
239. Saeedeh Negin, Li R., Kulikov O.V., Daschbach M.M. and Gokel G.W. Ion Transport Through Bilayer Membranes Mediated by Pyrogallol [4] arenes // *Inorg. Chim. Acta*, 2014, 417, p. 177.
240. Saji T., Kinishita I. Electrochemical ion transport with ferrocene functionalized crown ether // *J. Chem. Soc. Commun*, 1986, p.716.

241. Schori E., Jaguar-Grodzinsky J. A conductometric study of complexation of macrocyclic polyethers with sodium salts // *Isr. J.Chem.*, 1973, v.11, N23, p.243-253.
242. Schori E., Nal N., Jaguar-Grodzinsky J. Stability constants of complexes of a series of metal cations with dibenzo-18-crown-6 in aqueous solutions // *J. Chem.Soc. Dalton Trans.*, 1975, N 22, p. 2381-2386.
243. Scibona G., Scuppa B., Gabiani G., Pizzichini M. Non-isothermal potential of phospholipid bilayer films Influence of cholesterol and macrocyclic carrier effects. // *BBA*, 1978, v. 512, N 1, p.41-53.
244. Seymiya T., Onki Sh. Ionic structure of phospholipid membranes, and binding of calcium ions // *BBA*, 1973, v.298, N 3, p.546-561.
245. Shabany H., Ferdani R., Gokel G.W. Hydraphile Synthetic Channel Compounds: Models For Transmembrane, Cation-Conducting Transporters // *Supramolecular Chemistry*, 2001, 13, p.391-404.
246. Shaidanova L.G., Popesku L.G., Vertitskaya A.P. Macrocyclic metal complexes with some lariat ethers and their redox properties // *XXII ISMC*, 1997, Seoul, Korea, PA 5.
247. Shapovalov G., Skryma R., Prevarskaya N. Calcium channels and prostate cancer // *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, v. 8, N 1, 2013, p.18-26.
248. Shapovalov G., Ritaine A., Skryma R., Prevarskaya N. Role of TRP ion channels in cancer and tumorigenesis // *Seminars in Immunopathology*, v.38, Issue 3, 2016, p357-369.
249. Shinkai S., Inuzuka K., Hara K., Sone T., Manabe O. Redox-switched crown ethers. Cyclic-acyclic interconversion coupled with redox between dithiol and disulphide // *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, 57, p.2150.
250. Shinkai S., Manabe O. On-off switched crown ether-metal ion complexation by photoinduced intramolecular ammonium group tail-biting // *Top.Curr. Chem.*, 1984, 121, p. 67.
251. Shinkai S., Nakamura S., Tachiki S., Manabe O., Kajiyama T. Thermocontrol of ion permeation through ternane composite membranes composed of polymer-liquid crystal amphiphilic crown ethers // *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, p.3363.
252. Shinkai S. Switching-functionalized systems in biomimetic chemistry // *Pure & Appl. Chem.*, 1987, 59, p.425.
253. Shinkai S., Nakamura S., Ohara K., Tachiki S., Manabe O., Kajiyama T. Complete thermocontrol of ion permeation through ternane composite membranes composed of polymer-liquid crystal amphiphilic crown ethers // *Macromolecules*, 1987, 20, p.21.
254. Smith B.A., Gammon S.T., Xiao Sh., Wang W., Chapman S., McDermott R., Suckow M.A., Johnson J.R., Piwnica-Worms D., Gokel

- G.W., Smith B.D. and Leevy W.M. In Vivo Optical Imaging of Acute Cell Death Using a Near-Infrared Fluorescent Zinc-Dipicolylamine Probe // *Mol. Pharm.*, 2011, 8(2), p.583-590.
255. Stankovich C.J., Heinemann S.H., Achreiber, S.L. Immobilizing the gate of a tartaric acid-gramicidin A hybrid channel molecule by rational design // *J. Am.Chem.Soc.*, 1990, 112, p.3702.
256. Sturtevant J.M.: Some Applications of Calorimetry in Biochemistry and Biology // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1974, N3, p. 35.
257. Szabo G., Eisenman G., Ciani S. Ion distribution equilibria in bulk phases & the ion transport properties of bilayer membranes produced by neutral macrocyclic antibiotics // *J.Membr. Biol.*, 1970, 4, p. 81-137.
258. Szabo G., Eisenman G., McLaughlin S.G. etc. Ionic probes of membrane structures, In: *Membrane structure & its biological applications* // *Ann. N.Y. Acad.Sci.*, 1972, v.195, p.273-290.
259. Szabo G., Eisenman G., McLaughlin S.G. etc. Ionic probes of membrane structures In: *Membrane structure & its biological applications* // *Biol. Sci.*, 1980, v.77, N 6, p.3403-3407.
260. Takeda Y.A. Conductance study of 18-crown-6 & dibenzo-18-crown-6 complexes with K^+ in various solvents // *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1983, v.56, p.866-868.
261. Tashmukhamedov B.A., Gagelgans A.I., Shkinev A.V., Mirkhodjaev U.Z., Zamaraeva M.V., Tashmukhamedova A.K. The effect of some macrocyclic polyethers on biological & artificial membrane // In "Energet.Aspects of Membr.Transp". An CMEA Symp., Hungary, 1978, p.46-47.
262. Tashmukhamedova A.K., Stempnevskaya I.A., Shkinev A.V., Mirkhodjaev U.Z., Gagelgans A.I., Tashmukhamedov B.A. Effect of macrocyclic polyethers on the properties of biological & artificial membranes // *Studia biophys.*, 1978, v.74, p.53-54.
263. Tashmukhamedov B.A., Gagelgans A.I., Shkinev A.V., Mirkhodjaev U.Z., Zamaraeva M.V., Tashmukhamedova A.K. The study of ionophoric effects of some new derivatives of cyclic polyethers on artificial & biological membranes // In: *The Frontiers in Bioorgan. Chem. & Molec. Biol.*, Perg. Press., Oxford e.a., 1980, p. 439-444.
264. Tosteson D.C. Effect of macrocyclic compounds on the ionic permeability of artificial and natural membranes // *Federat. Proc.*, 1968, v. 27, p. 1269-1277.
265. Trafton J.E., Li C., Mallen J., Miller S.R., Nakano A., Schall O.F., Gokel G.W. Neutral Ionophores having Extraordinary Ca^{2+} Binding Strengths and Ca^{2+}/Na^+ -Selectivities in Aqueous Solution// *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, p.1266-1268.

266. Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T. T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes // *Nature*, 1982, v.295, p.68-71.
267. Tso W.W., Fung W.P. Correlation between the antibacterial and alkali metal ion transport efficiency of crown-ethers. *Ibid.*, 1981, 55, 129.
268. Tso W.W., Fung W.P., Tso W.M.Y. The action crown-ethers on microorganisms // *J.Inorg. Biochem.*, 1981, v.14, N 3, p.237-244.
269. Tummer B. etc. Complexes of macrocyclic polyethers and ion pairs // *J.Amer. Chem. Soc.*, 1979, v.45, N 9, p. 2588-2591.
270. Van Staveren C.J., Van Erden J., Van Veggel C.J.M., Harkema S., Reinhoudt D.N. Complexation of neutral guests and electrophilic metal-cations in synthetic macrocyclic hosts // *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, p.4994.
271. Vogtle F., Cyclomer complexes. // *Chimia*, 1979, v.33, N 2, p.239-248.
272. Vogtle F., Weber E. In: *The chemistry of the ether linkage*, ed. S.Patai, Supplement, Part 1, London, Wiley, 1981, p.59-68.
273. Vogtle, F., and Weber E. *Host-Gest Complex Chemistry Macrocycles*// Berlin, 1985, 421 p.
274. Vidar C., Rubin H. Magnesium sensitive alteration in calcium regulation associated with cell transformation // *J.Cell.Physiol*, 1982, v.113, p.398-404.
275. Vijayvergiya V., Ghosh P., Bera A.K., Das S. Bis [(benzo-15-crown-5)-15-yl methyl] pimelate forms ion channels in planar lipid bilayer: a novel model ion channel // *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1999, 31(2), p.93-102.
276. Wang W., Li R. and Gokel G.W. Membrane-length Amphiphiles Exhibiting Structural Simplicity and Channel Activity // *Chemistry-A European Journal*, 2009, 15, p. 10543-10553.
277. Weber E., Vogtle F. A new approach for classification of macrocyclic polyethers // *Inorg. Chim. Acta*, 1980, 45, L65, p. 345-349.
278. Weber E., Vogtle F. In: *Host-guest complex chemistry macrocycles*, ed. F.Vogtle, E.Weber. Berlin-Heidelberg-N.Y.-Tokyo, Springer-Verlag, 1985, 520 p.
279. Weber M.E., Schlesinger P.H., Gokel G.W. Dynamic Assessment of Bilayer Thickness by Varying Phospholipid and Hydrophile Synthetic Channel Chain Lengths // *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, p.636-642.
280. Weber M.E., Elliott E.K., Gokel G.W. Activity of Synthetic Ion Channels is Influenced by Cation-pi Interactions with Phospholipid Headgroups // *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2006, 4, p.83-89.
281. Wei Wang, Li R. and Gokel G.W. "Aplosspan": A Bilayer-length, Ion-selective Ionophore that Functions in Phospholipid Bilayers // *Chem. Comm.*, 2009, p.911-913.

282. West P., Mitchell J. Ion transport through chloroform-water border facilitated by crown-ethers // *Bioenerg.*, 1972, v.3, p. 445-449.
283. Whitesel R., Johnson R., Tarpley H., Regen D. Mitogen stimulated glucose transport of thymocytes // *J. Cell.Biol.*, 1977, v.72, p.456-469.
284. Wichman M. Crown-ethers facilitate transport amino compounds through border water-chlorophorm // *Chromatogr.*, 1982, v.235, p.129-132.
285. Wipff G., Weiner P., Kollman P. A molecular mechanics study of 18C6 & its alkali complexes: an analisis of structural flexibility, ligand & the macrocyclic effect // *J.Amer. Chem. Soc.*, 1984, v.104, N 2, p.3249.
286. Wong K.H., Yagi K., Smid J. Ion transport through liquid membranes facilitated by crown-ethers and their polymers // *J.Membrane Biol.*, 1974, v.18, p.379.
287. Yarishkin O.V., Mirkhodjaev U.Z., Tashmukhamedova A.K., Tashmukhamedov B.A. Cation channels based on sulfonic acid derivatives of dibenzo-18-crown-6 // *Abs. XXVIII ISMC, Gdansk, Poland, 2003*, p.142-143.
288. Yarishkin O.V., Mirkhodjaev U.Z., Tashmukhamedova A.K., Tashmukhamedov B.A. Characteristics of Single Ionic Channels Induced by Sulfonic Acid Derivatives of Dibenzo-18-crown-6 in Bilayers // *J. Incl. Phenom.*, 2004, N 49, p.139-144.
289. Yamnitz C.R., Gokel G.W.; "Synthetic, Biologically Active Amphiphilic Peptides," in C. Toniolo and H. Brückner (Eds.) *Peptaibiotics: Fungal Peptides Containing α -Diakyl α -Amino Acids*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009, p. 657-674.
290. Zhu C.Y., Izatt R.M., Dalley N.K. etc. Structure and conformation of pyridino- and diesterpyridino-18-crown-6 complexes with primary ammonium salts in solution and crystalline states // *Abs. XVII Intern. symp. of macrocyclic chemistry, Provo, Utah USA, 1992*, p.124.
291. Бабаков А.В., Мягков И.В., Сотников П.С., Терехов О.П. Измерение поверхностного потенциала монослоев методом вибрирующего электрода // *Ж. физ.химии*, 1972, т.46, с.1873-1876.
292. Барабой В.А., Чеботарева Е.Е. Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии. – К.: "Наукова думка", 1984, 56 с.
293. Бенкс Д. Названия органич.соединений, –М.: "Химия", 1980, с.4.
294. Блиох Ж.Л. Изучение роли катионов в механизме выделения квантов медиатора из моторных нервных окончаний. Канд. дисс., –М, 1970, 149 с.
295. Богатский А. В., Лукьяненко Н.Г., Назарова П.Ю. и др. Макроциклические полиамины как переносчики лекарственных препаратов // XII Межд. съезд по общей и прикладной химии. Баку, 1981, N 2, с.121-122.

296. Богатский А.В., Лукьяненко Н.Г., Назаров Е.И. Влияние макроциклических сложных эфиров на митохондриальные и фосфатидилхолиновые мембраны // Биофизика, 1982, т.27, в.1, с.68-70.
297. Богатский А.В. Достижения и новые тенденции в химии синтетических макроциклических комплексонов // Биоорг. химия, 1983, т.9, N11, с. 1445-1482.
298. Богатский А.В. и др. 15-краун-5 - новый стимулятор роста растений. // Физиол. растений, 1984, т.31, в.6, с.1180-1185.
299. Богатский А.В. и др. Влияние 15-краун-5 и 18-краун-6 на электровозбудимые мембраны // II Всесоюз. конф. по химии макроциклов, Одесса, 1984, с.183.
300. Богатский А.В. и др. Действие полиэфира 15-краун-5 на ионную проницаемость легковозбудимых мембран // Бюл.экспер.биол. и мед., 1984, №8, с.165.
301. Богатский А.В., Лукьяненко Н.Г., Кириченко Т.И. Краун-эфиры и криптанды // ЖВХО им. Д.И.Менделеева, 1985, т.30, N 5, с.487-499.
302. Богатский А.В., Назаров Е.И., Головенко Н.Я. Биологические аспекты действия краун-эфиров, криптандов и их аналогов // ЖВХО им. Д.И.Менделеева, 1985, т.30, N 5, с.593-599.
303. Бокий Г.Б., Голубкова Н.А. Введение в номенклатуру ИЮПАК. – М.: “Наука”, 1989, 184 с.
304. Брежестовский П.Д. Регуляция ионных каналов в нейронах ЦНС и клеток сосудов. Дисс. в виде науч.докл. на соиск. уч. ст. д.б.н., –М., 1991, 66 с.
305. Бурлакова Е.Б., Сторожок Н.М., Храпова Н.Г. О взаимосвязи активности антиоксидантов и окисляемости субстратов в липидах природного происхождения // Биофизика, 1988, т. 33, в.5, с.781-786.
306. Вапник В.Н. Алгоритмы и программы восстановления зависимостей, 1987, с.816.
307. Варнек А.А., Озерова Н.Р., Озеров Р.П. Анализ процесса комплексообразования краун-эфиров на основе распределения электростатического потенциала // Тр. МХТИ, 1984, в.134, с.77-86.
308. Варнек А.А., Озерова Н.Р., Озеров Р.П., Загорец П.А. Анализ процесса комплексообразования краун-эфиров на основе распределения электростатического потенциала // Коорд.химия, 1986, т.12, с.1599-1603.
309. Варнек А.А., Глебов А.С., Колычева Н.В. и др. Конформационные особенности, электронная структура и распределение электростатического потенциала диалкил-производных дибензо-18-краун-6 // Физ. методы в координац. химии: Тез.докл.9-го Всесоюз. совещания, Новосибирск, 1987, с.71.

310. Вассерман А.Н. Ионная проницаемость бислойных мембран из фосфатидных кислот в области фазового перехода. Автореф. на соиск. уч.ст. к.б.н., –Т., 1983, 19 с.
311. Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран // Биофизика, 1987, т.32, N 5, с.830-844.
312. Воробьев Л.Н., Егорова Н.Н. Активная Н-секреция и протонная емкость апопласта // В сб.: Структура и функции биологических мембран растений, –М.: “Наука”, 1985, с.43-47.
313. Глебов Р.Н., Крыжановский Г.Н. Функциональная биохимия синапсов. –М.: “Медицина”, 1978, 328с.
314. Ермишкин Л.Н., Зильберштейн А.Я., Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. В сб. Итоги науки и техники, т.2. Ионные каналы и их модели. ВИНТИ. –М.: 1982, 2, 130 с.
315. Ермишкин Л.Н., Зильберштейн А.Я. Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. В сб. Итоги науки и техники, т.2. Ионные каналы и их модели. ВИНТИ. –М.: 1982, 2, 154 с.
316. Жамалетдинов Ф.Г., Лю Б.Н. Влияние антиоксидантов, прооксидантов, ингибиторов дыхания и субстратов на формирование автономных вторичных колоний у *Fusarium bulbigenum* var. *Blasticola* // Микробиология, 1987, т.56, в.3, с.387-392.
317. Зайцев С.Ю., Луценко В.В., Зубов В.П. Получение и исследование мономолекулярных слоев на основе производных дибензо-18-краун-6 // Биоорганическая химия, 1983, т.9, N 4, с.567-568.
318. Замараева М.В., Ключев С.Н., Гагельганс А.И. и др. Стабилизирующее действие дивторбутил-производного дибензо-18-краун-6 и валиномицина на мембрану саркоплазматического ретикулума // Биологические мембраны, 1987, т.4, N3, с.249-253.
319. Замараева М.В., Ключев С.Н., Гагельганс А.И. др. Антиоксидантная активность синтетического ионофора дивторбутил-дибензо-18-краун-6 // Биологические мембраны, 1989, т. 6, N 4, с.420-429.
320. Иванов И.Н., Рубин А.Б. Молекулярные механизмы стабилизации мембрн природными липидными антиоксидантами // Своб. радикалы и биостабилизаторы, 1 Советско-болгарский симпозиум, София, тез. докл., 1987, с.64.
321. Иванов Э.И., Полищук А.А., Карасева Т.Л., Иванова Т.Ю. Синтез и противосудорожная активность новых производных дибензо-18-краун-6 // Хим.фарм.ж., 1987, N 4, с.425-428.
322. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. –М.: “Наука”, 1982, 224 с.

323. Карасева Т.Л. Макрогетероциклы – новые соединения с нейрорепродуктивной активностью // Автореф. на соиск. уч. ст. д.б.н., –К., 1992, 51 с.
324. Каримов З., Талипов С.А., Ибрагимов Б.Т., Ташмухамедова А.К., Гребенюк А.Д., Арипов Т.Ф. Рентгеноструктурное исследование строения натриевого комплекса 4-бензо-15-краун-5-сульфо-кислоты // Кристаллография, 1998, 43, N3, с.482-486.
325. Кейтс М. Техника липидологии. –М.: “Мир”, 1975, 324 с.
326. Коноплев В.П. Модели и методы экспериментальной онкологии. – М.: “Наука”, 1960, 266 с.
327. Конуп И.П., Назаров Е.И., Ионтов И.А., Ионтова Р.А., Вонгай В.Г. Взаимодействие валиномицина и краун-эфиров в монослоях // Биологические мембраны, 1989, т.6, N11, с.1222-1226.
328. Костюк П.Г., Крышталь О.А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. –М.: “Наука”, 1981, 204 с.
329. Кравченко Н.С., Милый В.В., Рыбакова Ю.Н., Богатский А.В., Лукьяненко Н.Г., Кулыгина Е.Ю. Регулятор роста растений. Авт. свид. 936861 (СССР) МКИ А 01 N 43/24. Оpubл. в Б.И., 1982, N23.
330. Крам Д.Дж., Хелгесон Р.С., Соуса Л.Р. и др. Хиральное соответствие при комплексообразовании у гетероциклических структур // Химия природных соединений, 1975, N 10, с.1299-1318.
331. Кравченко Н.С., Милый В.В., Рыбакова Ю.Н., Богатский А.В., Лукьяненко Н.Г., Кулыгина Е.Ю. Регулятор роста растений. Авт. свид. 936861 (СССР), МКИ А 01 N 43/24. Оpubл. в Б.И., 1982 N23.
332. Курамшин Э.М., Кочинашвили М.В., Кулак Л.Г. Окисление краун-эфиров молекулярным кислородом и озоном // Докл. АН СССР, 1986, т.288, N 5, с.1120-1123.
333. Ладыгина Г.А., Тенцова А.И., Зизина О.С. Использование липосом для направленной доставки лекарственных веществ к органам и тканям // Фармация, 1978, т.27, с.52-57.
334. Ласкорин Б.Н., Якшин В.В. Применение краун-эфиров и криптанов для концентрирования и разделения ионов металлов // ЖВХО им. Д.И.Менделеева, 1985, т.30, в.5, с.579-584.
335. Лебедев А.В. Липиды, ионофоры и каналоформеры. Итоги науки и техники ВИНТИ. –М.: 1990, 33, 148 с.
336. Лев А.А., Бужинский Э.П. Катионная специфичность модельных бимолекулярных фосфолипидных мембран с введенным в них валиномицином // Цитология, 1967, т.9, N 1, с.102-106.
337. Лев А.А. Моделирование ионной избирательности клеточных мембран. –Л.: “Наука”, 1976, 210 с.

338. Литвинова Л.А., Денисенко Р.В., Андронати С.А. Синтез и свойства новых биологически активных краун-эфиров на основе флуоренона и антрахинона // Тез.докл. 2 Всесоюзн. конф. по химии макроциклов. Одесса, 1984, с.189.
339. Лукин Ю.Л. Разработка метода электро-хемилюминесценции и его применение для изучения антирадикальных свойств липидов печени крыс различных возрастных групп // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н., 1980, 19 с.
340. Лукоянов Н.В., Раевский О.А., Штепанек А.С., Кудря Т.Н. Перенос ионов щелочных и щелочноземельных металлов через бислойные липидные мембраны в присутствии некоторых фосфор содержащих макроциклов // Биологические мембраны, 1984, т.1, N 4, с.379-383.
341. Лукоянов Н.В., Ванькин Г.И., Сапегин А.М., Раевский О.А., Моделирование связи структура-активность. V. Антигипоксическая и противосудорожная активность краун-эфиров // Хим-фарм. ж., 1990, T 24, N 1, с.48-51.
342. Лукьяненко Н.Г., Назаров Е.Н., Богатский А.В. и др. Биологическая активность макрогетероциклов. 2. О механизме совместного действия строфантина и краун-эфиров на сердечную ткань // Биологические мембраны, 1985, т.2, N 6, с.588-592.
343. Максимов А.П., Мумладзе Р.К. Предварительные усилители микроэлектродных отведений биопотенциалов // В кн.: Приборы и методы для микроэлектродных исследований клеток. Пушкино, 1975, с.103-115.
344. Малкова Т.И., Бутин М.К., Кнутов В.И., Воронков М.Г. Антимикробная активность некоторых N, S-содержащих макроциклов // Тез.докл. 2 Всесоюзн. конф. по химии макроциклов. Одесса, 1984, с.199.
345. Мамаджанов Л. Комплексообразующие, экстракционные и ионофорные свойства мембраноактивных краун-эфиров // Автореф. дисс. на соискание уч. ст. к.б.н., –Т.: 1984, 24 с.
346. Мамедова Ю.Г., Шабанов А.Л., Бабаев Г.А., Бабазаде А.М. Экстракция пикратов щелочных металлов диалкилзамещенными производными дибензо-18-краун-6 // Ж.Аналит. химии, 1983, т.38, с. 1578-1583.
347. Маркин В.С., Чизмаджев Ю.А. Индуцированный ионный транспорт –М.: “Наука”, 1974, 251 с.
348. Мирходжаев У.З., Мамаджанов Л., Сайфуллина Н.Ж., Ташмухамедова А.К. Мембранная активность на липидных бислоях и константы комплексообразования краун-эфиров // Узб.биол.ж., 1984, N 6, с.8-11.

349. Мирходжаев У.З., Таринова М.В., Касымов М.М., Ташмухамедова А.К. Комплексообразующие свойства мембраноактивных диацилпроизводных дибензо-18-краун-6 //Мат.П Всесоюз. конф. по химии макроциклов, Одесса, 1984, с.164.
350. Мирходжаев У.З., Ахмедов Т.Р., Ташмухамедова А.К. Магниева проводимость БЛМ, модифицированных структурными изомерами дивторбутил-дибензо-18-краун-6 //Мат. П Всесоюз.конф. по химии макроциклов, Одесса, 1984, с.190.
351. Мирходжаев У.З., Сайфуллина Н.Ж., Ташмухамедова А.К. Калий-натриевая избирательность БЛМ, модифицированных краун-эфиром // Узб.биол.ж., 1985, N 5, с.6-8.
352. Мирходжаев У.З., Сайфуллина Н.Ж., Ташмухамедова А.К. Проводимость БЛМ для ионов аммония в присутствии краун-эфиров // Узб.биол.ж., 1985, N 1, с 63-65.
353. Мирходжаев У.З., Болдырев В.А., Ташмухамедова А.К., Ташмухамедов Б.А. Ионные каналы проводимости бислов из фосфолипидов саркомы-45 // Узб. биол. ж., 1986, N6, с.41.
354. Мирходжаев У.З., Абдуллаев Х., Попова В.П., Ташмухамедов Б.А. Ca^{2+} -каналы проводимости, индуцируемые псевдоциклическим аналогом ДБ18К6 на бислоях и импрегнированных фильтрах // Узб. биол. ж., 1986, N6, с.42.
355. Мирходжаев У.З., Таринова М.В., Ташмухамедова А.К. Комплексообразование диацилпроизводных дибензо-18-краун-6 // Узб.биол. ж., 1986, N 2, с.6-8.
356. Мирходжаев У.З., Туйчибаев М.У., Кушмурадов О.О., Ташмухамедов Б.А. Каналоформерные свойства фосфолипазы A_2 из яда *Vespa orientalis* // Мат. I конф. биохимиков Узбекистана, –Т.: 1986, с.110.
357. Мирходжаев У.З., Ахмедов Т.Р., Расулов А.С., Ташмухамедова А.К. Эффект блокирования диацетил-дибензо-18-краун-6 ионных каналов проводимости бислов, индуцированных мембраносвязанной глутаминсинтетазой из хлоропластов водорослей // Мат. I конф. биохимиков Узбекистана, Ташкент, 1986, с.56.
358. Мирходжаев У.З., Болдырев В.А., Гаппаров А.А., Ташмухамедов Б.А. Ca^{2+} -каналы проводимости бислов из фосфолипидов саркомы-45// Мат. I конф.биохимиков Узбекистана, Ташкент, 1986, с.57.
359. Мирходжаев У.З., Болдырев В.А., Ташмухамедова А.К., Ташмухамедов Б.А. Ионные каналы проводимости бислов из фосфолипидов карциномы Уокера // Узб.биол.ж., 1986 N 6, с.41.
360. Мирходжаев У.З., Абдуллаев Х.Ф., Попова В.А., Ташмухамедов Б.А. Ca^{2+} -каналы проводимости, индуцированные псевдоциклическим

аналогом дибензо-18-краун-6 на бислоях и импрегнированных фильтрах // Узб.биол.ж., 1986, N 6, с.42.

361. Мирходжаев У.З., Болдырев В.А., Ташмухамедова А.К., Ташмухамедов Б.А. Действие диацилпроизводных дибензо-18-краун-6 на ионные каналы бислоев из фосфолипидов саркомы-45 // Доклады АН РУз, 1986, N 12, с.36-37.

362. Мирходжаев У.З., Гагельганс А.И., Попова В.П., Ташмухамедов Б.А. Проницаемость митохондрий, индуцированная N-замещенными диамино-ДБ18К6 // Узб. биол. ж., 1988, N 1, с.13-17.

363. Мирходжаев У.З., Абдуллаев Х.Ф., Касымов М.М., Ташмухамедова А.К. Влияние краун-эфиров – индукторов Ca^{2+} -проводимости мембран на сократительную функцию изолированного сердца лягушки // Мат. IV съезда физиологов Узбекистана, –Т.: 1988, с.178-179.

364. Мирходжаев У.З. Биологические эффекты краун-эфиров // В сб. научных трудов ТашГУ, 1988, с.5-14.

365. Мирходжаев У.З., Ташмухамедова А.К., Болдырев В.А., Попова В.А., Ташмухамедов А.К. Ионная проводимость импрегнированных фильтров, индуцированная краун-эфирами различной структуры // Биофизика, 1988, т.33, N 1, с.159-160 (Деп.ВИНИТИ за 4305-B87 от 12.06.1987 г.)

366. Мирходжаев У.З., Каликулов Д., Усманов П.Б., Ташмухамедов Б.А. Индукция краун-эфирами спонтанного выделения медиатора // Биологические мембраны, 1988, т.5, N6, с.643-647.

367. Мирходжаев У.З., Таринова М.В., Попова В.П., Подгорная И.В., Федорова О.В., Ташмухамедов Б.А. Мембраноактивные свойства N-замещенных диамино-дибензо-18-краун-6//Узб.биол.ж.,1988, N3,с.9-12.

368. Мирходжаев У.З., Смолякова Н.Г., Ташмухамедова А.К. Адсорбция мембраноактивных краун-эфиров на границе раздела фаз вода-воздух // Мат. II Всесоюз. конф. по химии макроциклов. Одесса, 1984, с.182.

369. Мирходжаев У.З. Псевдоциклический аналог дибензо-18-краун-6 – новый синтетический каналоформер // Мат. III Всесоюз. конф. по химии и биохимии макроциклических соединений, Иваново, 1988, с.85.

370. Мирходжаев У.З. Каналоформерные свойства краун-эфиров и их аналогов// Мат.Всесоюз. симп. “Одиночные ионные каналы в биологических мембранах”, Кара-Даг, 1989, с.70.

371. Мирходжаев У.З., Каликулов Д., Усманов П.Б., Ташмухамедов Б.А. Действие синтетического Ca^{2+} -каналоформера на спонтанную активность нервно-мышечного синапса // Биологические мембраны, 1989, т.6, N 4 с.424-427.

372. Мирходжаев У.З., Болдырев В.А., Ташмухамедов Б.А., Ташмуха-

медова А.К., Татарский В.П., Димант И.Н. Ионные каналы проводимости бислов из фосфолипидов саркомы-45 // Биофизика, 1989, т.34, N 2, с. 235-240.

373. Мирходжаев У.З., Кушмурадов О.О., Багдасарова Э.С. Влияние диацилпроизводных дибензо-18-краун-6 на рецептор-зависимое повышение свободного Ca^{2+} в тромбоцитах человека // Узб.биол.ж., 1990, N 3, с.70

374. Мирходжаев У.З., Лукоянов Н.В., Китова И.И., Абдуллаев Х.Ф., Раевский О.А., Ташмухамедова А.К. Взаимосвязь структуры и K^+ -ионофорной активности краун-эфиров // Узб.биол.ж., 1991, 1, с.8-13.

375. Мирходжаев У.З., Кушмурадов О.О., Багдасарова Э.С., Ташмухамедов Б.А. Исследование действия диацилпроизводных дибензо-18-краун-6 на дигидропиридиновые рецепторы // Узб. биол. ж., 1991, N 1, с.73.

376. Мирходжаев У.З. Мембраноактивные свойства краун-эфиров. Автореф. дисс. докт. биол. н., Ташкент, 1993, 37 с.

377. Мыськив М.Г., Гловяк Т., Телятник А.И. и др. Кристаллическая и молекулярная структура комплекса дибензо-18-краун-6 с семигидратом иодида калия // Кристаллография, 1980, т.25, в.4, с.866-870.

378. Мясоедова Т.Г., Иконников М.Ю., Глебов А.С., Варнек А.А. Влияние природы заместителей дибензо-18-краун-6 на его комплексообразующую способность // III Всесоюз.конф. по химии макроциклических соединений: Тез. докл., Иваново, 1988, ч.1, с.87.

379. Норов Ш.К. Взаимосвязь комплексообразующих, экстракционных и мембраноактивных свойств краун-эфиров // Журн. аналит. химии, 1987, т.42, N 3, с.429-435.

380. Норов Ш.К. Комплексообразующие и мембраноактивные свойства краун-эфиров. Под.ред. Б.А.Ташмухамедова, Ташкент, Фан, 1991, 105 с.

381. Овчинников Ю.А., Иванов В.Т., Шкроб А.М. Мембраноактивные комплексоны // -М.: "Мир", 1974, 463 с.

382. Овчинников Ю.А. Ионный транспорт в мембранах и проблема ионофоров // Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии, -М.: "Наука", 1978, с.128-168.

383. Педерсен К.Д., Френсдорф Х.К. Макроциклические полиэфиры и их комплексы // Успехи химии, 1973, т.42, N 3, с.492-509.

384. Раевский О.А., Сапегин А.М. Моделирование связи структура-активность. Системный физико-химический подход к конструированию биологически активных веществ // Хим-фарм. ж., 1990, т. 24, N 1, с.43-46.

385. Россоти Ф., Россоти Х. Определение констант устойчивости и некоторых других констант равновесия в растворах. –М.: “Мир”, 1965, 564 с.
386. Ростовцева Т.К., Осипов В.В., Лев А.А. Зависимость проводимости одиночных грамицидиновых каналов от потенциала, задаваемого адсорбцией 1-анилинонафталин-8-сульфоната на липидных мембранах // Биологические мембраны, 1987, т.4, N 9, с.955-964.
387. Ростовцева Т.К. Одиночные ионные каналы в бислойных липидных мембранах, индуцированные перекисным окислением липида // Тез.докл.молодеж. конфер., –Л.: 1988, с.70-73.
388. Ростовцева Т.К. Исследование дискретных флуктуаций ионной проводимости бимолекулярных липидных мембран при изменениях поверхностного потенциала и структуры бислоя. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. физ.-мат. н. –Л.: 1989, 24 с.
389. Рид Р., Праусниц Дж., Шервуд Т. Свойства газов и жидкостей. –Л. “Химия”, 1982, 430 с.
390. Садыкова К.А. Регуляция транспорта ионов в корневой системе хлопчатника. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н., Ташкент, 1989, 21 с.
391. Сапегин А.М., Раевский О.А. Моделирование связи структура-активность. IV. Алгоритм построения классонных моделей прогноза биологической активности // Хим-фарм. ж., 1990, т. 24, N 1, с.46-48.
392. Станкевич М.И., Станкевич И.В., Зефилов Н.С. Топологические индексы в органической химии // Усп. Химии, 1988, т.57, с.337.
393. Сталл Д., Вибран Э., Зинке Т. Химическая термодинамика органических соединений. –М.: “Мир”, 1971, 560 с.
394. Таринова М.В. Комплексообразование и некоторые биологические эффекты краун-эфиров. Автореф. дисс. к.б.н., Ташкент, 1993, 23 с.
395. Ташмухамедов Б.А., Ггельганс А.И., Ташмухамедова А.К., Мирходжаев У.З., Замараева М.В., Шкинев А.В., Норов Ш.К. Синтез, мембраноактивные свойства и биологические эффекты краун-эфиров. –Т: “ФАН”, 1987, 264 с.
396. Ташмухамедова А.К. Синтез и свойства функционализированных бензокраун-эфиров. Дисс. в виде научн. Докл. на соиск. уч. ст. д.х.н., Ташкент, 1989, 50с.
397. Туйчибаев М.У. Основные токсические компоненты яда большого шершня *Vespa Orientalis*. Структурно-функциональное исследование. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. д.б.н. –Т., 1985, 36 с.

398. Фегтле Ф., Вебер Э. Химия комплексов “гость-хозяин”. –М.: “Мир”, 1988, 360 с.
399. Фегтле Ф., Зигер Х., Мюллер В.М. Образование комплексов нейтральных молекул и анионов с краун - подобными хозяевами. В кн. Химия комплексов “гость-хозяин” (под ред. Ф.Фегтле и Э.Вебера). –М.: “Мир”, 1988, с.382-444.
400. Фиалков Ю.Я., Тарасенко Ю.А., Крюков В.В. Влияние свойств полярного растворителя на термодинамику ионной ассоциации солей калия и макроциклических систем // Укр.хим.ж., 1989, т.4, N 8, с.808-810.
401. Хираока М. Краун-соединения, –М.: “Мир”, 1986, 363 с.
402. Храмцов Ю.В., Симонова Т.Н., Суханов С.В., Барсуков Л.И. Термоиндуцируемые структурные и фазовые переходы в смешанной системе димиристоилфосфатидилхолин-холат натрия по данным турбидиметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии // Биофизика, 2008, т.9, с.138-149.
403. Цивадзе А.Ю., Трофимов В.А., Генералова Н.Б. Колебательные спектры комплексов щелочных и переходных металлов с краун-эфирами // Тез.докл. 2 Всесоюзн. конф. по химии макроциклов, Одесса, 1984, с.81
404. Цивадзе А.Ю., Генералова Н.Б., Пятова Е.П. Исследование конформационных изменений 18-краун-6 в комплексах лития, натрия и калия методами колебательной спектроскопии // Ж.Неорг. химии, 1986, т.31, с.17-24.
405. Цивадзе А.Ю., Варнек А.А., Хуторский В.Е. Координационные соединения металлов с краун-лигандами. –М.: “Наука”, 1991, 397 с.
406. Шарафутдинова У.Т., Косимбетов П.Г., Салахутдинов Б.А., Мирходжаев У.З. Действие сульфопроизводных ДБ18К6 на термотропные свойства ДМФХ // Актуальные проблемы биологии, экологии и почвоведения, –Т.: 2006, с.16.
407. Шарафутдинова У.Т., Косимбетов П.Г., Салахутдинов Б.А., Мирходжаев У.З. Действие сульфопроизводных ДБ18К6 на термотропные свойства липидных дисперсий // Узб.биол. ж., 2007, 2, с.20-23.
408. Шарафутдинова У.Т., Ташмухамедова А.К., Мирходжаев У.З. Исследование термодинамических параметров комплексообразования (G, H, S) диацилпроизводных-ДБ18К6 // Тез. докл. “Физикавий-кимёвий биология ва биотехнологиянинг истикболлари”, Андижан, 2007, с.131-132.
409. Шарафутдинова У.Т., Салахутдинов Б.А., Ташмухамедова А.К., Мирходжаев У.З. Изучение комплексообразующих свойств водорас-

творимых сульфопроизводных- ДБ18К6 // Мат. XIII межд. экологической студ. конф., Новосибирск, 2008, с.97.

410. Шарафутдинова У.Т. Особенности комплексообразования и взаимодействия с мультиламелярными слоями мембраноактивных краун-эфиров. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н, –Т.: 2009, 23 с.

411. Экклс Дж. Физиология синапсов. –М.: “Наука”, 1966, 266 с.

412. Ярышкин О.В., Ташмухамедова А.К., Мирходжаев У.З., Ташмухамедов Б.А. Свойства ионных каналов проводимости, индуцированных сульфопроизводными дибензо-18-краун-6 в бислоях // Узб. биол. ж., 2002, N4, с. 84-87.

413. Ярышкин О.В., Ташмухамедова А.К., Мирходжаев У.З. К механизму образования ионных каналов проводимости сульфопроизводными дибензо-18-краун-6 в бислоях // Известия ВУЗов, 2002, N2-4, с.65.

414. Ярышкин О.В., Ташмухамедова А.К., Мирходжаев У.З. Избирательность одиночных ионных каналов проводимости в бислоях, модифицированных сульфопроизводными дибензо-18-краун-6 // 7-ая Межд.конф.молод.уч., Пущино, 2003, с.81.

415. Ярышкин О.В. Ионные каналы проводимости, индуцированные сульфопроизводными ДБ18К6 в липидном бислое // Автореф.дисс.на соиск.уч.ст. к.б.н. –Т.: 2004, 20 с.

416. Яцимирский К.Б., Лампека Я.Д. Физикохимия комплексов металлов с макроциклами. –К.: “Наукова думка”, 1984, 256 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Глава I. Комплексоны.....	8
Глава II. Ионифоры.....	40
Глава III. Каналоформеры.....	64
Глава IV. Взаимодействие краун-эфиров, различающихся механизмами мембранного действия, с мультисаммельными слоями.....	104
Глава V. Биологическое действие краун-эфиров.....	135
Заключение.....	182
Литература.....	184

УЛУГБЕК ЗАКИРОВИЧ МИРХОДЖАЕВ

**МЕМБРАНОАКТИВНЫЕ
КРАУН-ЭФИРЫ**

(монография)

Редактор М.А.Хакимов

В монографии приведены данные о структуре и свойствах мембраноактивных краун-эфиров, проявляющих комплексонные, ионофорные и каналоформерные свойства. Эти краун-эфиры исследованы на плоских бимолекулярных и мультислойных слоях. Установлены различия во взаимодействии комплексонных, ионофорных и каналоформерных краун-эфиров с мультислойными слоями. Рассматриваются основные принципы организации и функционирования двух типов ионных каналов, индуцированных краун-эфирами на бислоях. На биомембранах изучены ионофорные и каналоформерные свойства краун-эфиров, исследовано биологическое действие и определены некоторые области их использования. Монография рассчитана на биологов, химиков, физиков, работающих на стыке наук, а также бакалавров, магистров и преподавателей соответствующих специальностей.



У.З. Мирходжаев-профессор кафедры биофизики НУУз им. М.Улугбека. Научные интересы связаны с исследованием механизмов трансмембранного переноса ионов, индуцированных краун-эфирами, изучение их биологического действия. От ионных каналов и ионофоров до биологического использования в онкологии, в искусственном питании тутового шелкопряда и т.д.



978-613-9-82419-9