

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ И АГРОХИМИИ

На правах рукописи

ВАФА ХАЛИЛ ГЫЗЫ ГАСЫМОВА

**ПУТИ РЕШЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИЕНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ
НА ПОЧВАХ АБШЕРОНА**

2426.01 – Экология

2422.01 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание научной степени
доктора биологических наук**

Баку – 2017

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

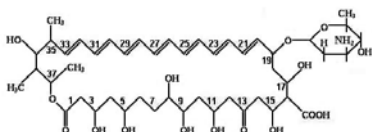
Актуальность темы. Защита живых организмов от патогенных инфекций является одной из важнейших и экономически значимых проблем сохранения и продления человеческой жизни. Экологические проблемы неразрывно связаны с состоянием почвенного покрова. Постановлением Президента Азербайджанской Республики Ильхама Алиева 2010 год - объявлен годом экологии, и последующие за ним годы связаны с решением экологических проблем. Социальный аспект сохранения чистоты экосистем предполагает создание эффективных способов борьбы с патогенными микроорганизмами. Важной задачей является разработка методов защиты живых организмов от патогенных инфекций с использованием безопасных, экологически чистых и экономически выгодных средств нового поколения. Загрязнение окружающей среды отрицательно влияет на человеческую деятельность и продуктивность растений. Среди обнаруженных инфекционных болезней растений – почти половина имеет вирусную природу. В связи с этим необходим новый подход для решения экологических задач, где особая роль принадлежит почвенным микроорганизмам. Для получения биологически-активных соединений используются определенные почвенные микроорганизмы, в частности *Actinomyces*. Среди смешанных культур почвенных микроорганизмов, существующих в почвах Абшеронского полуострова, особая роль принадлежит актиномицетам. Актиномицеты синтезируют антибиотические вещества, которые подавляют рост и развитие патогенных бактерий и грибов. Биотехнология предлагает новые подходы к разработке и производству лекарственных препаратов, которые ранее были малодоступны. Бурное развитие биотехнологии связано, прежде всего, с эрой производства антибиотиков и именно антибиотики относятся к самому большому классу лекарств, получаемых путем микробного синтеза. Для разработки эффективно действующих лекарственных соединений против патогенных микроорганизмов необходимо проведение исследований на молекулярном уровне с использованием мембраноактивных антибиотиков. С помощью современных биотехнологических методов из микроорганизмов можно получить молекулярно чистые антибиотики, обладающие высокой мембранной активностью и способностью избирательно поражать рост и развитие патогенных инфекций. Так, используя биотехнологические методы, из почвенных актиномицетов был

получен новый класс полиеновых макролидных антибиотиков. Основными представителями полиеновых антибиотиков (ПА) являются амфотерицин В, нистатин, микогептин, кандицидин D, леворин А₂ и перимицин, химическая структура которых представлена на рис. 1. Молекулы ПА содержат в своем составе лактонное кольцо, сопряженную систему двойных связей и гидрофильную цепь, состоящую из гидроксильных и карбонильных групп.

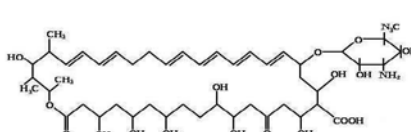
Основная идея и общая концепция данной работы состоит в том, что, исследуя физико-химические свойства ПА и их производных выявить новые вещества, способные избирательно подавлять вирусные, бактериальные и грибковые инфекции. Проведение исследований в данном направлении важно для решения экологических проблем, а именно, для предохранения окружающей среды от патогенных инфекций. Выбор ПА в качестве объекта исследования был не случаен. Исследования последних лет показали, что ПА обладают высокой биологической активностью и специфичностью своего действия на клеточные мембраны. Особенность ПА состоит в том, что это единственный в природе класс соединений, образующих в клеточных и липидных мембранах структурные ионные каналы. В основе механизма действия ПА лежит формирование ими в клеточных мембранах каналов молекулярных размеров, избирательно проницаемых для ионов и органических соединений. Растущий интерес ученых во всем мире к изучению механизма действия ПА стимулировало с нашей стороны необходимость проведения исследований механизма действия ПА на молекулярном уровне. Этому во многом способствовала расшифровка химической структуры ПА и разработка путей модификации полиеновой молекулы.

Синтез новых производных путем химической модификации функциональных групп молекул ПА и наряду с этим изучение их физико-химических свойств на липидных мембранах создали уникальную возможность для изучения молекулярного механизма ионной избирательности мембран и выяснения взаимосвязи структуры и функции внутри данного класса соединений. Химическая трансформация функциональных групп молекул ПА может дать важную информацию о биологических свойствах молекул ПА и о молекулярных процессах, протекающих в мембране. Исследования показали, что самыми эффективными из приведенных на рис. 1 антибиотиков являются амфотерицин В и леворин А₂. Особая роль в формировании проводящих амфотерициновых и левориновых каналов внутри мембраны принадлежит диметил-

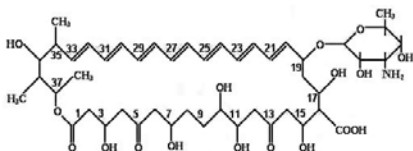
сульфоксиду (ДМСО). ДМСО обладает способностью резко усиливать биологическую активность ПА и индуцировать в мембранах избирательную проницаемость для ионов и органических соединений. Актуальность работы связана с исследованием молекулярного механизма функционирования в липидных мембранах амфотерицина В и леворина А₂, а также их алкильных производных, экспериментальному доказательству существования каналов молекулярных размеров, индуцирующих ионную проницаемость мембран и разработкой теоретических основ синтеза новых соединений с заданными свойствами.



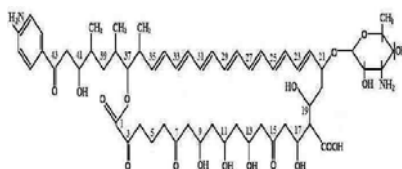
АМФОТЕРИЦИН В



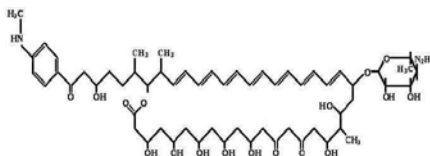
НИСТАТИН



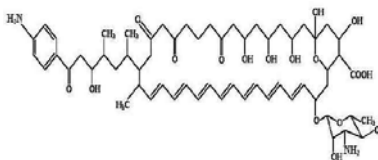
МИКОГЕПТИН



ЛЕВОРИН А₂



ПЕРИМИЦИН



КАНДИЦИДИН D

Рис. 1. Химическая структура полиеновых антибиотиков.

Цель и задачи работы.

Целью данной работы была разработка современных методов защиты окружающей среды с использованием ПА и проведение скрининга биологической активности антибиотиков с помощью метода регистрации электрических характеристик БЛМ в режиме фиксации потенциала и тока, а также установление связи между структурой антибиотиков и их функцией в мембранах.

Для достижения поставленной цели следовало решить ряд задач:

В задачу сохранения чистоты экосистем входит, в частности, защита человека от патогенных инфекций. Социальный аспект сохранения чистоты экосистем предполагает создание эффективных способов борьбы с патогенными микроорганизмами. Одним из таких способов является использование антибиотиков, обладающих высокой мембранной активностью и специфичностью своего действия на проницаемость мембран для ионов и органических соединений.

Одной из задач было - на примере ПА, продуцируемых почвенными микроорганизмами *Actinomyces*, используя ПА как тест-систему, проследить за взаимосвязью между свойствами образуемых антибиотиками ионных каналов и основными закономерностями их биологической активности при взаимодействии с мембранами. Особенность ПА состоит в том, что это единственный в природе класс соединений, образующие в клеточных и модельных мембранах в комплексе со стеринами структурные ионные каналы.

Задача работы состояла в установлении взаимосвязи между структурой молекул ПА и их функциональной активностью в бислоидных липидных мембранах (БЛМ).

Следующая задача состоит в получении биологически-активного соединения, разработанного на основе ПА, которые обладают высокой степенью избирательности действия по отношению к патогенным микроорганизмам.

Основной задачей работы было исследование механизма функционирования в липидных мембранах алкильных производных амфотерицина В и алкильных производных леворина А₂, а также экспериментальному доказательству существования полупор-каналов, индуцирующих ионную проницаемость липидных мембран.

Следующая задача состояла в том что особая роль в формировании проводящих амфотерициновых и левориновых каналов внутри

мембраны принадлежит диметилсульфоксиду (ДМСО), который обладает уникальной способностью резко усиливать биологическую активность ПА и индуцировать в мембранах избирательную проницаемость для ионов и органических соединений.

Защищаемые положения:

1. Теоретический анализ физико-химических свойств и биологической роли ДМСО в клеточных системах.
2. Физико-химические характеристики ПА при комплексном исследовании с ДМСО.
3. Проводимость БЛМ в зависимости от структуры каналоформирующих соединений.
4. Зависимость проводимости мембран от концентрации алкильных производных амфотерицина В.
5. Действие индивидуальных компонентов леворина А на проводимость бислойных мембран.
6. Эффект макролидного гептаенового антибиотика леворина А₂, вводимого с одной стороны мембраны.
7. Зависимость проводимости мембран от концентрации алкильных производных леворина А₂.
8. Теоретические аспекты использования ПА для защиты окружающей среды от носителей инфекций.
9. Роль ПА в решении экологических задач.

Объект исследования: Класс макролидных полиеновых антибиотиков (ПА), бислойные липидные мембраны (БЛМ), почвы Абшерона.

Методика исследования: Измерение электрических характеристик липидных мембран методом фиксации электрического потенциала и тока, изучение состава почвы методом почвенной градации, разработка метода по изучению эффекта действия препарата Инфанвир на инфекционные заболевания овощных культур.

Научная новизна работы. Впервые изучена роль ПА в решении экологических задач. Впервые исследованы физико-химические свойства и биологическая роль ДМСО в комплексе с ПА, а также связь между структурой антибиотиков и их функцией в мембранах. Показано, что использование ПА в комплексе с ДМСО в 10-100 раз усиливает биологическую активность антибиотиков. Изучена зависи-

мость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В и леворина А₂, а также проводимость бислойных липидных мембран в зависимости от структуры каналоформирующих соединений, включая алкильные производные амфотерицина В, индивидуальные компоненты леворина А и алкильные производные леворина. Выявлен эффект макролидного гептаенового антибиотика леворина А₂, вводимого с одной стороны мембраны. Предложена молекулярная модель функционирования левориновых каналов в липидных мембранах. Впервые проведен теоретический анализ практических аспектов использования ПА с целью разработки экологической модели защиты окружающей среды.

Внедрение: Впервые, в результате испытания биологически активного препарата Инфанвир против патогенных микроорганизмов растений, выявлен эффект действия препарата Инфанвир на инфекционные заболевания овощных культур. Получен Международный Евразийский Патент на препарат против вирусных и грибковых заболеваний растений.

Практическое значение работы. Известно, что проблемы охраны здоровья человека в значительной степени зависят от обеспечения необходимыми медикаментами. Биотехнология предлагает новые подходы к разработке и производству лекарственных, профилактических и диагностических медицинских препаратов, а также позволяет производить в достаточных количествах широкий спектр лекарственных средств, которые ранее были малодоступны. Бурное развитие биотехнологии связано, прежде всего, с эрой производства антибиотиков. К самому большому классу лекарств, получаемых путем микробного синтеза, относятся антибиотики. Важной задачей является разработка методов защиты человека и животных от патогенных инфекций, а также интегрированной защиты растений с использованием безопасных, экологически чистых и экономически эффективных химических и биологических средств защиты нового поколения. В процессе проведения фундаментальных исследований впервые был разработан новый препарат Резорбин против вирусных, бактериальных и грибковых инфекций. Одной из основных проблем сельского хозяйства - почвоведения и экологии является поиск препаратов, защищающие овощные культуры от патогенных микроорганизмов. Существующие на данный момент защитные средства не способны полно-

стью предотвратить распространение вирусных и грибковых инфекций. Использование ПА в качестве основы для разработки эффективных противовирусных и противогрибковых препаратов не случаен. В настоящее время ПА являются самыми эффективными препаратами, используемые в клинической медицине для лечения глубоких системных грибковых инфекций. Биологическая активность ПА резко возрастает при растворении в ДМСО. ДМСО благодаря своим свойствам способствует более глубокому проникновению в клеточные мембраны. На основе проведенных исследований был разработан биологически активный препарат Инфанвир против патогенных микроорганизмов овощных культур. Эксперименты проводились в тепличных помещениях, а также в открытых грунтах, где выращивались огурцы, помидоры, баклажаны и перец. Проведенные исследования показали высокую эффективность действия препарата на патогенные микроорганизмы. Обработка растений и самой почвы, пораженных вирусной и грибковой инфекцией, путем опрыскивания зараженных участков, приводило к полному уничтожению растительных инфекций. Используемый препарат обладает способностью эффективно подавлять рост вируса табачной мозаики. Особый интерес к данному препарату состоит в том, что зараженные растения после обработки препаратом Инфанвир не только излечивались от вирусных и грибковых инфекций, но и происходила полная регенерация растений.

Апробация диссертационной работы. Результаты диссертационной работы докладывались на II-ой Республиканской научной конференции - “Актуальные проблемы физики” (Баку, 2001), на республиканских научных конференциях аспирантов и молодых ученых Азербайджана (Баку, 2002, 2003), на международном симпозиуме “Влияние ионизирующих излучений на формирование экологической обстановки стран Кавказского региона и бассейна Каспийского моря” (Баку, 2002), на Международном семинаре - “Радиационная безопасность региона Каспия” (Баку, 2003), на II-ой Российской конференции молодых ученых - “Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины” (Москва, 2001), на 4-ой Международной Конференции по биологической физике (Япония, 2001), на III-ем Съезде по радиационным исследованиям (Киев, 2003), на I-ом Съезде общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003), на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы

функционирования биосистем» (Минск, 2006), на VII Международном симпозиуме - «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, 2007), на Международной научно-практической конференции «Современные проблемы фитодизайна». (Белгород, 2007), on the International Council For a Scientific Development «Natural Cataclysms and Global Problems of the Modern Civilization. Special edition of Transactions of the International Academy of Science N&E» (Baku-Innsbruck, 2007), на II-ой Международной научно-практической конференции «Проблемы биологии, экологии, географии, образования, история и современность» (Санкт-Петербург, 2008), на Международной научно-практической конференции «Ботанические сады в 21 веке: сохранение биоразнообразия, стратегия развития и инновационные решения» (Белгород, 2009), Bakı Dövlət Universitetinin 90 illik yubileyinə həsr olunmuş Respublika Elmi Konfransının «Biologiya elmi nailiyyətləri» (Bakı, 2009), Das internationale symposium Ekologische technologische und rechtliche aspekte der lebensversorgung (Германия, Ganover, 2010), на Всероссийской научной конференции «Закономерности изменения почв при антропогенных воздействиях и регулирование состояния и функционирования почвенного покрова» (Санкт-Петербург, 2010). Изложенные в диссертации основные результаты докладывались и обсуждались на многих Республиканских и международных научных конференциях, съездах, симпозиумах, конгрессах и на семинарах кафедры экологии и почвоведения Бакинского Государственного Университета.

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 37 работ, получены 3 патента, из которых 2 Евразийских патента на лекарственные средства, обладающие способностью эффективно и избирательно подавлять рост патогенных вирусных, бактериальных и грибковых инфекций, как в животных, так и в растительных клетках.

Объем и структура диссертации: Диссертационная работа изложена на 263 страницах машинописного текста и содержит 23 рисунка и 18 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, методики исследования, экспериментальной части, практической ценности работы, обсуждения результатов и списка цитированной литературы, включающего 241 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Экологические условия Абшеронского полуострова. В данном разделе диссертации представлено географическое расположение Абшеронского полуострова, рельеф, геологическое строение и почвообразующие породы почвенного покрова, климатические и агроклиматические условия, растительный покров а также описана роль микроорганизмов в почвообразовательных процессах. Говоря о почвенном покрове Абшеронского полуострова, нельзя не сказать о почвах антропогенного происхождения - нефтезагрязненных, которые в настоящее время выделяют по современной классификации почв Азербайджана в самостоятельный тип . Серо-бурые почвы, пески, солончаки и нефтезагрязненные земли Абшеронского полуострова изучались рядом исследователей в течение многих лет для решения различных задач.

Глава 2. Полиеновые антибиотики – как модель экологической оценки почв. В данном разделе диссертации дана характеристика особенностей ПА, которая состоит в том, что это единственный в природе класс соединений, образующий в клеточных и модельных мембранах в комплексе со стеринами структурные ионные каналы. Проведение исследований в данном направлении важно для решения фундаментальных экологических проблем, а именно, для предохранения окружающей среды от вирусных и грибковых инфекций. Одним из таких способов является использование антибиотиков, обладающих высокой мембранной активностью и специфичностью своего действия на патогенные микроорганизмы. К ним относятся ПА. Основными представителями этого класса антибиотиков являются амфотерицин В, нистатин, микогептин, леворин, трихомицин, филиппин, для которых установлена химическая структура. Интерес к исследованию механизма действия ПА связан с тем, что они являются структурными каналоформерами. Исследования механизма действия антибиотиков проводилось методом БЛМ. БЛМ является лучшей моделью клеточных мембран, на которой воспроизводятся важные электрические свойства клеточных мембран. Исследования на БЛМ показали, что ПА формируют в мембранах в комплексе с холестерином и другими чувствительными к нему стеринами трансмембранные каналы молекулярных размеров. Данный метод позволяет исследовать основ-

ные параметры взаимодействия антибиотиков с мембранами.

Структура и биологическая функция полиеновых макролидных антибиотиков. Макролидные антибиотики представляют собой большую группу природных соединений, которые обладают высокой биологической активностью и используются в клинической практике как антибактериальные, противогрибковые, антипаразитарные и иммунодепрессивные препараты. В химической структуре всех ПА имеется макролидное кольцо, содержащее то или иное число сопряженных двойных связей, которые определяют хромофорные свойства данного вещества. Отсюда их общее название – «полиены». Благодаря жесткости полиеновой цепи, молекулы антибиотиков имеют вытянутую палочкообразную форму. Лактонное кольцо образовано, с одной стороны, цепью из сопряженных двойных связей (тетраены-октаены), а с другой стороны – цепочкой с гидрофильными радикалами, в основном гидроксильными и карбонильными группами. На одном конце молекул содержатся две заряженные группы: карбоксильная группа и аминсахар (микозамин), которые придают молекулам амфотерные свойства. Длина лактонного кольца молекул ПА составляет примерно 2,8 нм. Макролидное кольцо молекул ПА содержит жесткую гидрофобную область (сопряженные двойные связи хромофора) и гидрофильную область с различным числом группировок, как полярных, так и неполярных, которые обуславливают некоторые специфические свойства полиенов.

Физико-химические и биологические свойства леворина А и его производных. Леворин представляет собой аморфный порошок желтого цвета без четкой температуры плавления. По химической природе леворин относится к группе ароматических полиеновых макролидов. Макролактонное кольцо леворина включает в себя полиеновый хромофор с семью сопряженными двойными связями, что находит отражение в УФ спектре леворина. Также проводилось исследование механизма биологического действия ПА на клеточные и липидные мембраны.

Глава 3. Методы исследования биологической активности полиеновых антибиотиков. В данном разделе диссертации описаны методы исследования биологической активности ПА. Метод БЛМ основан на способности ПА резко усиливать проницаемость липидных мембран для соответствующих ионов путем регистрации изменения

электрической проводимости мембран. Из всех методов исследования биологической активности ПА метод БЛМ является самым чувствительным методом. Метод последовательных разведений используется для определения биологической активности стандарта антибиотика. Биологическая активность ПА определяется также методом диффузии в агар. Применяются методы исследования избирательной проницаемости БЛМ для ионов и неэлектролитов в присутствии амфотерицина В, леворина А₂ и их аналогов. Также используется методика определения постоянной времени функционирования ионных каналов исходного леворина и его аналогов в БЛМ методом отмывки антибиотиков из примембранного раствора.

Определение биологической активности полиеновых антибиотиков методом измерения проводимости бислойных липидных мембран. Данная методика основана на исследовании биологической активности и избирательной проницаемости БЛМ для ионов и неэлектролитов в присутствии амфотерицина В, леворина А₂ и их алкильных аналогов. Метод основан на способности ПА резко повышать проницаемость липидных мембран для соответствующих ионов путем регистрации изменения электрической проводимости мембран. Исследования интегральной проводимости и измерение мембранного потенциала проводилось методом сравнения падения напряжения на сопротивлении эквивалента и на мембране. Сопротивление мембран регистрировали с помощью усилителя постоянного тока У5-9, а кинетику изменения мембранного потенциала и сопротивления мембран с помощью электронного самописца КСП-4. Для измерения бионных потенциалов и селективности мембран на градиент соли была разработана методика непрерывной смены раствора электролита с одной стороны мембраны. Этот метод является достаточно точным и удобным. Его преимущества резко выражены при работе с электролитами большой концентрации (3-6 М). Для изменения условий, окружающих мембрану, использовали метод отмывки антибиотика в градиенте плотности сахарозы. Отмывающий раствор, содержащий 10% сахарозы, подается с помощью перистальтического насоса ко дну кюветы, а исходный раствор синхронно отсасывается сверху. При малой скорости подачи растворы разной плотности не перемешиваются и граница между ними хорошо видна. Для определения избирательной проницаемости мембран в присутствии амфотерицина В и леворина А₂, а

также их алкильных аналогов используется методика измерения потенциала, возникшего на мембране в ответ на десятикратное изменение концентрации проникающего иона с одной стороны мембраны, как показано на рис. 2.

Увеличение концентрации проникающего иона с одной стороны мембраны (обычно с наружной) в десять раз по сравнению с внутренней стороной мембраны при идеальной проницаемости мембран для одновалентного иона на мембране будет регистрироваться потенциал с величиной 58 мВ. Проницаемость мембран для неэлектролитов изучена осмотическим методом (Никольский, Трошин, 1973).

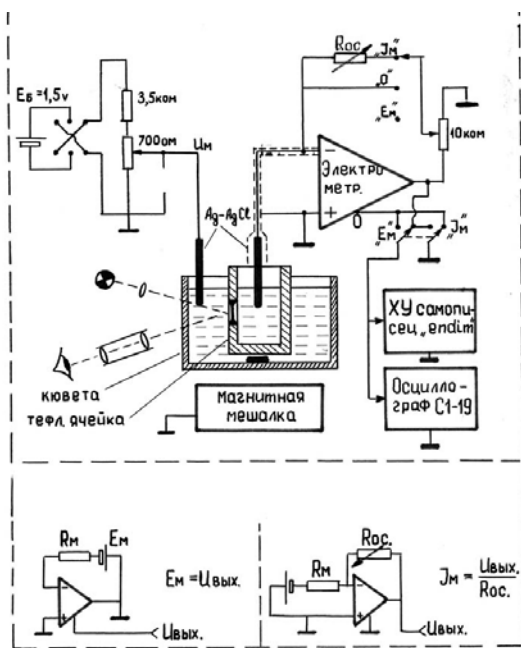


Рис.2. Принципиальная комбинированная схема измерения электрических характеристик липидных мембран в режиме фиксации тока и напряжения мембраны. Слева изображена схема измерения потенциала мембраны (E_m) в режиме фиксации тока, справа – измерения тока (I_m) мембраны в режиме фиксации напряжения. Водные растворы, окружающие мембрану, перемешивались с помощью магнитной мешалки.

Глава 4. Исследование физико-химических свойств и биологической роли диметилсульфоксида (ДМСО). В данном разделе диссертации описаны сравнительные физико-химические характеристики ДМСО, рассмотрены эффекты независимого действия ДМСО на проницаемость мембран, изложены результаты собственных экспериментальных исследований физико-химических характеристик ДМСО в водных растворах и в мембранах, а также описаны практические аспекты использования ДМСО. На рис. 3 показано схематическое изображение молекулярной структуры ДМСО. Молекула ДМСО амфифильна и высокополярна. Молекулы ДМСО имеют цепочечное строение, обусловленное кислородными связями. Исследования спектров поглощения ДМСО в интервале длин волн 350 нм - 2200 нм показали, что ДМСО в указанном интервале длин волн оптически прозрачен. ДМСО хорошо растворяется в воде. Биологическая активность амфотерицина В и леворина А₂ резко возрастает при растворении в ДМСО. Антибиотики в растворе ДМСО по сравнению с исходными водорастворимыми формами примерно в 10-100 раз эффективнее. ДМСО присущи такие свойства как высокая резорбция и способность растворять многие органические соединения до молекулярной формы.

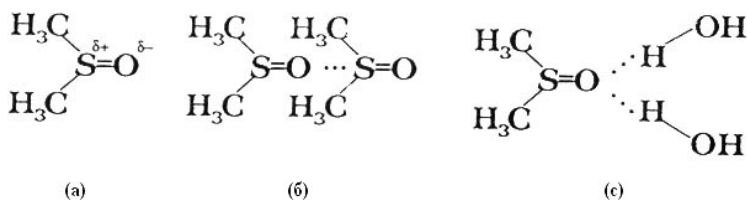


Рис. 3. Схематическое изображение молекулярной структуры ДМСО с полярной S=O связью: (а) – структура ДМСО; (б) - полимерносвязанная форма молекул ДМСО; (с) - водородная связь между молекулами ДМСО и молекулами воды.

Молекулы ДМСО способны быстро проникать через биологические мембраны и преодолевать тканевые барьеры, включая кожу человека. Структура липидного бислоя, равно как и структура самих проникающих молекул, является важным фактором, обуславливающим проницаемость для растворимых в воде соединений. Молекулы

ДМСО обладают высокой степенью резорбции благодаря тому, что величина диэлектрической проницаемости ДМСО находится между водой и жирами. Это свидетельствует о том, что ДМСО можно использовать для транспорта различных лекарственных соединений. ДМСО усиливает проницаемость большого числа низкомолекулярных веществ через биомембраны, а также способствует достаточно глубокому их проникновению внутрь клетки. Исследована зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В и леворина А₂. Амфотерицин В резко усиливает проницаемость мембран для ионов, воды, не электролитов и органических соединений, когда находятся по обе стороны мембраны. Зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В растет пропорционально 8-10-ой степени и эта степень зависит от структуры молекул ПА. При рН=3,0 и при уменьшении концентрации фосфолипидов вдвое в мембрано-формирующем растворе амфотерицин В эффективно увеличивает проводимость с одной стороны мембраны. В этом случае зависимость проводимости мембран оказывается пропорциональной 3-4-ой степени концентрации амфотерицина В. Резкая зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В позволяет предположить, что ионная проницаемость связана с образованием в мембранах полиеновых каналов олигомерной структуры. Думается, что система, ответственная за избирательную проницаемость мембран, локализована в гидрофильной цепи молекулы амфотерицина В. Было показано, что после формирования в мембранах проводящего олигомерного комплекса полиеновый канал имеет тенденцию к автономной разборке внутри мембраны и перехода его в непроводящее состояние. Собранный проводящий канал может разбираться пономерно или димерно. При увеличении концентрации ДМСО увеличивается эффективность сборки полиеновых каналов и стабилизируется работа канала в проводящем состоянии в течении длительного времени. Модификация аминной или карбоксильной группы молекул амфотерицина В (алкилирование или блокирование зарядов), находящихся у входа в канал, существенно уменьшает среднее время жизни канала в проводящем состоянии. Амфотерицин В при концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М в 10^5 - 10^6 раз понижает исходное удельное сопротивление мембран, приготовленных из общих фосфолипидов. На рис. 4. показана зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В при различных концентрациях холестерина в мембранах, кривые 1 и 2.

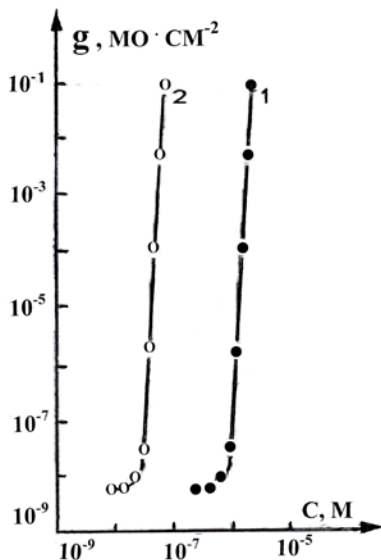


Рис. 4. Зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В. Кривая 1 получена на мембранах из фосфолипидов с холестерином в весовом соотношении 20:1, кривая 2 – 2:1. Мембраны образовывались в растворе 10 mM KCl, pH=6.5, $t=22^{\circ}\text{C}$.

Глава 5. Исследование проводимости бислойных липидных мембран в зависимости от концентрации алкильных производных амфотерицина В и леворина А₂. В данном разделе диссертации проведено исследование кинетики проводимости БЛМ в зависимости от структуры каналоформирующих соединений, которое позволяет судить о молекулярных перестройках ионного канала, вызывающих изменение проводимости мембран, о механизме их сборки и разборки и, наконец, о физико-химических свойствах ионных каналов внутри мембраны. В работе были использованы амфотерицин В и их алкильные производные, модифицированные по аминной и карбоксильной группам, как показано на рис. 5 на примере амфотерицина В, где R соответствует лактонному кольцу: R= CH₃: метамфоцин ($\epsilon = 1375$); R = C₂H₅: этамфоцин ($\epsilon = 1440$); R= C₃H₇: пропамфоцин ($\epsilon = 1400$); R= C₄H₉: бутамфоцин ($\epsilon = 1375$).

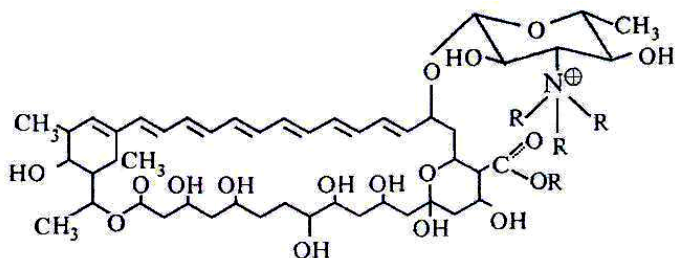


Рис. 5. Структура алкильных производных амфотерицина В. Буквой R обозначено место, где производилось алкилирование полярной и карбоксильной группы молекулы амфотерицина В.

Исследования показали, что кроме трех состояний канал может иметь еще одно – четвертое непроводящее разобранное состояние канального комплекса внутри мембраны. Важную информацию о механизме функционирования канального комплекса в мембране можно получить с помощью кинетических и релаксационных экспериментов. Изучена кинетика интегральной проводимости мембран, содержащих амфотерицин В и его алкильные производные при одной и той же концентрации антибиотиков. При исследовании проводимости мембран со многим числом каналов наблюдается немонотонная кинетика зависимости проводимости от концентрации алкильных производных амфотерицина В, рис. 6. Наблюдаемая инактивация проводимости мембран может быть обусловлена тремя основными причинами: 1) уменьшением проводимости одиночных каналов; 2) уменьшением времени жизни канала в проводящем состоянии, и, наконец, 3) уменьшением общего числа проводящих каналов. Последняя версия является наиболее предпочтительной. В пользу этого говорят результаты, полученные при исследовании метилированного аналога амфотерицина В, который способен немонотонным образом менять во времени проводимость бислоя. Приняв за основу механизм электростатического взаимодействия заряженных аминных и карбоксильных групп соседних молекул амфотерицина В в канале, можно показать, что метамфоциновые полупоры, как и полупоры других алкильных производных, менее стабильны, чем полупоры исходного амфотерицина В.

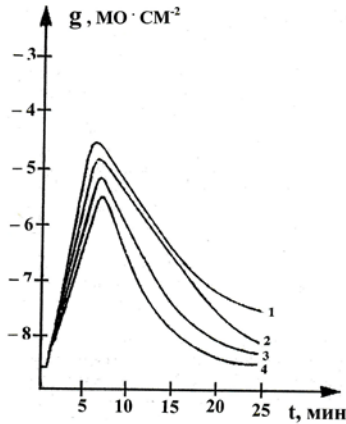


Рис. 6. Флуктуация проводимости мембран в зависимости от времени в присутствии алкильных производных амфотерицина В при одной и той же концентрации каждого антибиотика $5 \cdot 10^{-8}$ М в водных растворах при pH=6,5, 2 М КСl: 1 – метилированный амфотерицин В; 2 – этилированный амфотерицин В; 3 – пропилированный амфотерицин В; 4 – бутилированный амфотерицин В., $t=24^{\circ}\text{C}$. Мембраны формировались из раствора фосфолипидов с холестерином в весовом соотношении 2:1.

Сила электростатического взаимодействия между молекулами амфотерицина В очень велика и велико значение времени отмывки антибиотика. Однако, когда теряется один из зарядов на полярных группах, как в случае алкильных производных, у которых отсутствует отрицательный заряд на карбоксильной группе, электростатическое взаимодействие между молекулами нарушается и канал легко может разобратся до непроводящих мономеров или димеров. В пользу доказательства данного предположения могут служить эксперименты, выполненные в неводных растворах ПА. Известно, что маточные растворы антибиотиков содержат ДМСО. Проводимость мембран в растворах чистого ДМСО, содержащие ПА, очень низка. Исследование зависимости проводимости мембран от концентрации ПА при фиксированных концентрациях ДМСО в водных солевых растворах показало, что проводимость мембран зависит от концентрации ДМСО в водном растворе. По мере увеличения концентрации ДМСО чувстви-

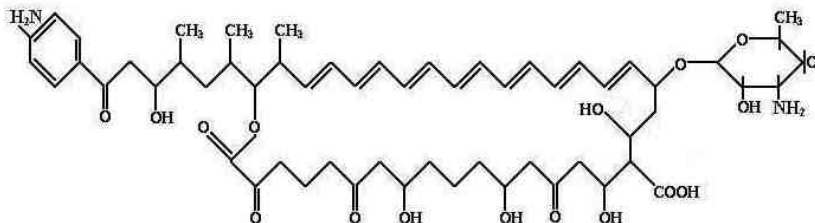
тельность мембран к антибиотикам уменьшается, хотя угол наклона зависимости проводимости мембран от концентрации антибиотиков при этом не меняется. Приведенные данные показывают, что постепенное увеличение концентрации ДМСО в водном растворе способствует переходу молекул ПА из дисперсной, т.е. ассоциированной формы в мономолекулярную форму и в этой форме молекулы ПА оказываются биологически неактивными. Отсюда следует, что молекулы ПА, находясь в ассоциированной форме, обладают очень высокой мембранной активностью, а распад проводящего комплекса в мембране означает переход канала из олигомерной структуры в мономерно-димерную и потере им проводимости.

Работа одиночных каналов, формируемых с одной стороны мембраны леворином A_2 , показана на рис. 6. Проводимость каждого канала составляет $\sim 0.4-0.5$ пС. Эта величина соответствует проводимости одиночных левориновых каналов, формируемых в мембранах при симметричном введении антибиотика. Проводимость одиночных амфотерициновых каналов при идентичных условиях в 10 раз выше левориновых каналов и составляет величину 5 пС. Проницаемость мембран, модифицированных леворином A_2 , увеличивается для нейтральных молекул в порядке возрастания гидродинамического радиуса молекул, образуя ряд проницаемости: вода > мочевины > ацетамид > глицерин > рибоза > арабиноза > глюкоза > сахароза.

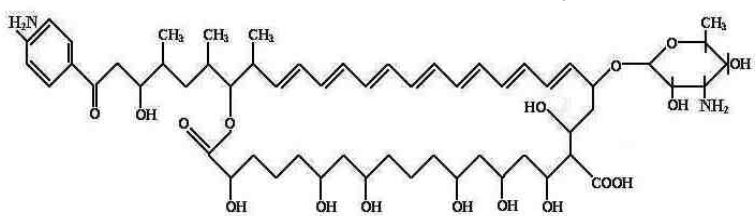


Рис. 7. Запись флуктуаций тока, протекающего через мембрану, при односторонней модификации леворином A_2 . Концентрация антибиотика с одной стороны мембраны $5 \cdot 10^{-8}$ М. Водные растворы с обеих сторон мембраны содержат 2М КСI, рН 6.5, $t=22^{\circ}\text{C}$. Мембраны получали в смеси фосфолипида с холестерином в весовом соотношении 20:1. Стрелкой обозначен уровень проводимости немодифицированной мембраны.

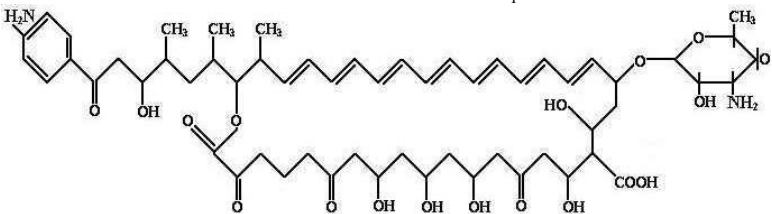
Эти данные показывают, что левориновый канал имеет эффективный радиус $\sim 4 \text{ \AA}$. Мембраны, модифицированные леворином A_2 и другими компонентами леворина A , структура которых показана на рис. 8, обладают катионной селективностью.



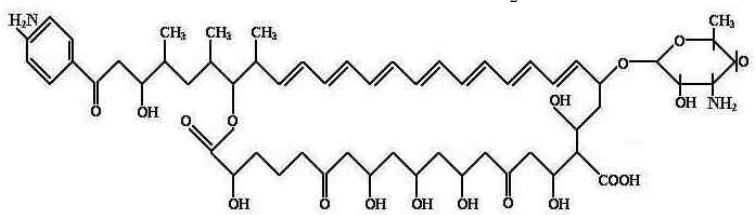
ЛЕВОРИН A_0



ЛЕВОРИН A_1



ЛЕВОРИН A_2



ЛЕВОРИН A_3

Рис.8. Химическая структура индивидуальных компонентов леворина A .

Мембраны в присутствии амфотерицина В избирательно проницаемы для одновалентных анионов. Однако, при исследовании ароматических антибиотиков было обнаружено, что в отличие от амфотерицина В, леворин А₂ вызывает избирательную проницаемость не для анионов, а для катионов щелочных металлов. Этот антибиотик отличается от нистатина, амфотерицина В и микогептина наличием в молекулах дополнительной ароматической группировки- ρ -аминоацетофенона, в которой содержится положительно заряженный азот.

Поэтому трудно думать, что избирательная проницаемость для катионов связана с образованием в мембранах, содержащих холестерин, отрицательно заряженных пор. Скорее, перенос катионов через границу мембраны осуществляется с помощью комплекса “ион-антибиотик-холестерин”. На рис. 9 приведены зависимости проводимости мембран от концентрации леворина при введении в водные солевые растворы. Леворин увеличивает проводимость только тех мембран, в составе которых содержатся стеринны определенной структуры. Увеличение концентрации холестерина в мембране повышает эффективность леворина А₂. Как в случае амфотерицина В, увеличение концентрации холестерина в мембранном растворе сдвигает кривую влево, т.е. в сторону более эффективных концентраций антибиотика, как показано на рис. 8, кривые 1 и 2. При увеличении концентрации антибиотика проводимость мембран растет пропорционально 4-ой степени концентрации леворина. Исследования зависимости проводимости мембран от концентрации ароматического антибиотика и холестерина привели к предположению о наличии в мембранах многомолекулярных комплексов антибиотик-холестерин, индуцирующих ионную проницаемость. Существенную информацию о механизме проницаемости мембран в присутствии ароматических антибиотиков можно извлечь из данных о переносе через мембрану малых ионов, таких как гуанидин и гидразин. В присутствии леворина А₂ эти ионы проникают через мембрану значительно лучше, чем ионы К⁺ и Na⁺.

Наличие определенного числа двойных связей в хромофоре амфотерицина В и леворина А₂ является важным фактором, определяющим их чувствительность к холестеринсодержащим мембранам. Наблюдается прямая зависимость между числом двойных связей в хромофоре и биологической активностью антибиотиков - чем выше число двойных связей в хромофоре ПА, тем выше их биологическая ак-

тивность. Результаты проведенных экспериментов дают основание предположить, что механизм избирательного действия основан на специфическом взаимодействии аминной группы молекул антибиотиков с 3β -ОН группой молекул стероидов с образованием водородной связи между ними. По сравнению с исходным амфотерицином В, биологическая активность производного амфотерицина В, модифицированного по аминной группе, значительно меньше.

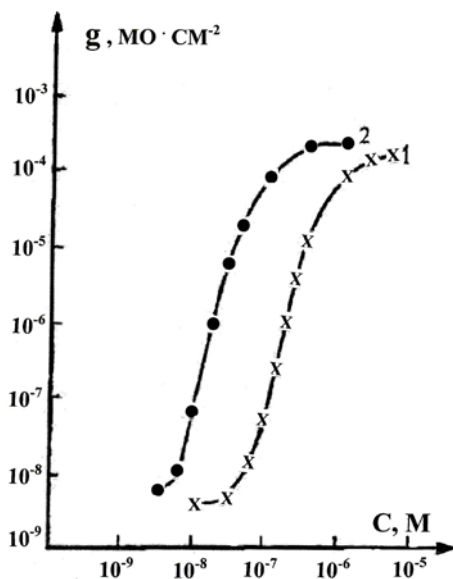


Рис. 9. Зависимость проводимости липидных мембран от концентрации леворина A_2 , кривые 1 и 2, в растворах 10 мМ КСl, рН=6.5, $t=22^\circ\text{C}$. Кривая 1 получена на мембранах из фосфолипидов с холестеринем в весовом соотношении 20:1, а кривая 2 в весовом соотношении 2:1.

Изучение зависимости проводимости мембран от концентрации исходного леворина A_2 и его алкильных производных (структура алкильных производных приведена на рис.10) показало, что с увеличением длины алкильной цепи молекул леворина A_2 мембранная актив-

ность антибиотиков возрастает. Алкильная модификация молекулы леворина не приводит к изменению угла наклона кривых, но определяет только время пребывания антибиотика в мембране. Одинаковая проводимость и селективность одиночных каналов, образующиеся при одно- и двухстороннем введении леворина A_2 , позволяет сделать предположение об идентичной стехиометрии леворинового канала и что избирательная проницаемость левориновых каналов определяется молекулярной структурой гидрофильной цепи, выстилающей внутреннюю полость канала. На основании этих данных предложена гипотетическая молекулярная модель формирования левориновых каналов. Канал представляет собой олигомерную структуру, которая состоит из нескольких, чередующихся между собой, молекул антибиотика и холестерина.

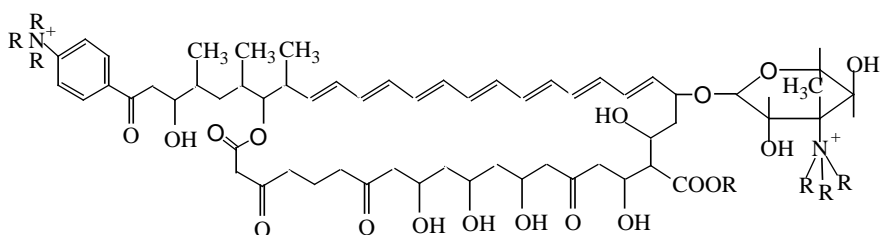


Рис.10. Химическая структура алкильных производных леворина A_2 . Буквой - R обозначено место, где проводилось алкилирование левориновой молекулы. R- CH_3 : метилированный леворин A_2 ; R- C_2H_5 : этилированный леворин A_2 ; R- C_3H_7 : пропилированный леворин A_2 ; R- C_4H_9 : бутилированный леворин A_2 .

Глава 6. Роль полиеновых антибиотиков в решение экологических задач. В настоящее время интенсивно ведется поиск биологически активных соединений эффективно подавляющих растительные инфекции. Негативное воздействие вирусов на различные растения было выявлено более ста лет тому назад. Все виды растений, как однолетние, так и многолетние заражаются вирусами, что приводит к большим потерям. Объектом данного исследования является поиск

веществ, способных избирательно воздействовать на растительные инфекции. Антибиотики обладают всеми свойствами, которые необходимы для лечебных препаратов, применяющихся в растениеводстве. В литературе имеются многочисленные сообщения об успешном использовании антибиотиков в борьбе с различными заболеваниями растений. При этом показано, что антибиотики не только предохраняют растения от поражений, но и оказывают лечебное действие при наличии инфекций (фитопатогенные грибы и вирусы). Антибиотические препараты испытаны при лечении заболеваний фруктовых деревьев, хлопчатника, зерновых и овощных культур, декоративных растений, как в лабораторных, так и в производственных условиях. Особенно широкое распространение в растениеводстве антибиотики получили после того, как стали очевидными неблагоприятные последствия использования ядохимикатов, которые наряду с подавлением фитопатогенной микрофлоры отравляют полезные виды птиц и животных, питающихся опыленными растениями. Антибиотики обладают рядом ценных преимуществ в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами по сравнению с другими веществами. Антибиотики обладают избирательностью действия и, подавляя развитие фитопатогенных бактерий и грибов, практически безвредны для растений. При выборе антибиотика необходимым условием является отсутствие токсичности. Антибиотики, используемые в лечебных дозах, нетоксичны для растений. Выбор ПА в качестве объекта исследования был случаен, т.к. позволяет вести исследования на молекулярном уровне. Проведены исследования с целью создания биологически активного препарата для защиты растений от вирусных и грибковых инфекций. Данная работа связана с изучением действия антибиотика леворина А на растительные инфекции. Проведенные исследования в данном направлении позволили выявить из группы ароматических ПА новое соединение (условное название Инфанвир), которое обладает способностью эффективно и избирательно подавлять вирусные и грибковые инфекции. До настоящего времени не найдено эффективного соединения, которое обладало бы способностью полностью подавлять развитие инфекций у растений. С этой точки зрения актуальность проводимых исследований не вызывает сомнений. Биологическое действие ПА связано с изменением проницаемости липидных и клеточных мембран для ионов и органических соединений. С целью поиска био-

логически активного препарата для защиты растений от патогенных инфекций изучено действие ароматического антибиотика на растительные инфекции. Для определения эффективно действующей концентрации антибиотика была изучена зависимость проводимости мембран от концентрации ароматического антибиотика (рис. 11). Как видно из рис. 10, максимальная активность антибиотика наблюдается при концентрации 10^{-7} - 10^{-6} М.

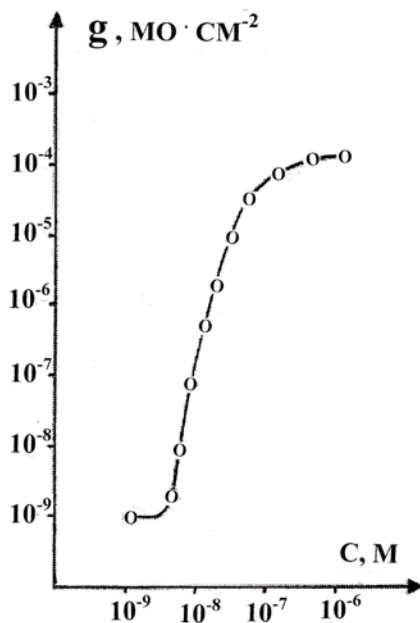


Рис. 11. Зависимость проводимости липидных мембран от концентрации ароматического антибиотика. Мембраны формировались из смеси фосфолипид:холестерин 20:1 в водных солевых растворах, содержащих 10^{-1} М КСI при pH 6.5, $t = 22^{\circ}\text{C}$.

Исходя из этих данных, рассчитана минимальная концентрация антибиотика, которая соответствует максимальной его биологической активности. Это было показано при проведении эксперимен-

тов в тепличных помещениях, а также в открытых грунтах нескольких фирм: «AGRI BIO ECOTEN», «REAL PLUS», «РЕАЛ ПЛЮС МП», «МП АГРО», которые расположены на Апшеронском полуострове в поселке Мардакан. На опытных участках указанных фирм выращивались огурцы, помидоры, баклажаны и перец. В результате лабораторных исследований образца почвы, на которой выращивались овощные культуры, было установлено, что в этой почве для питания растений содержатся следующие минеральные вещества: малое количество азота, высокое количество фосфора и малое количество калия, рН образца почвы слабо щелочная (рН нормальной почвы нейтральный 6,5 – 7,0). В образце данной почвы наблюдается повышенная соленость. В таб. 7.1.2. приведены данные состава почвы по минеральным элементам на основе почвенной градации. С целью повышения урожайности растений в данном образце почвы необходимо внести в нее недостающие минеральные элементы и вещества. Для этого перед посадкой растений в грунт под вспаханную почву предлагается ввести следующие химические и органические удобрения для обеспечения баланса минеральных веществ в почве. На 10 соток почвы предлагается добавка следующих минеральных удобрений: азот - 40 кг, сульфат калия - 35 кг, либрел ВМХ (смесь микроэлементов) - 1 кг, нитрат кальция - 10 кг, хелатор - 500 гр, нитрокол дуст - 10 кг (против гниения корневых волосков), цинк - 1 кг, сульфат бора - 2 кг, сульфат железа - 2 кг, нитрат магнезиума - 10 кг. Для обеспечения почвы нейтральным рН на каждые 10 тонн поливной воды предлагается ввести 100 мл азотной кислоты. В таб.1 приведены данные состава почвы по минеральным элементам на основе почвенной градации. Несмотря на недостающие минеральные элементы в почве, где выращивались овощные культуры, проведенные исследования показали высокую эффективность действия препарата на патогенные микроорганизмы овощных культур.

Несмотря на недостающие минеральные элементы в почве, на которой выращивались овощные культуры проведенные исследования показали высокую эффективность действия препарата на патогенные микроорганизмы. Обработка растений, а также почвы, пораженных вирусной и грибковой инфекцией, путем опрыскивания зараженных участков раствором Инфанвир из расчета 100 мл исходного раствора растворенного в 10 литрах воды при 15-35° С приводит к

уничтожению вирусных и грибковых инфекций. Следует отметить, что препарат Инфанвир обладает способностью полностью подавлять рост вируса табачной мозаики (*Tobacco mosaic virus*). Необходимо отметить также, что инфицированные растения после обработки препаратом Инфанвир не только излечиваются, но и происходит регенерация увядших от инфекции растений. Более того, обработанные препаратом растения имели примерно в 1,5 раза больше урожая, чем экспериментальные. Антибиотик Инфанвир может быть использован как в тепличных условиях, так и в открытых грунтах против возбудителей растительных инфекций. Исследования показали, что Инфанвир, созданный на базе ароматических гептаеновых полиеновых антибиотиков, является эффективным средством борьбы с вирусными и грибковыми заболеваниями растений. Характерной особенностью Инфанвира является его способность эффективно подавлять размножение вируса табачной мозаики (*Tobacco mosaic virus*). Инфицированные растения после обработки препаратом Инфанвир не только излечиваются, но и происходит их полная регенерация. Основной проблемой сельского хозяйства-почвоведения и экологии является поиск препаратов, защищающие овощные культуры от патогенных микроорганизмов, задерживающих рост и развитие растений. Имеющиеся на данный момент в наличии защитные средства не способны полностью предотвратить распространение вирусных и грибковых инфекций. Во всем мире идет поиск биологически активных соединений против растительных инфекций. Однако до сих пор не найдено ни одного препарата, который обладал бы способностью останавливать и полностью подавлять развитие вирусных и грибковых инфекций у растений. Имеющиеся в настоящее время в наличии средства, защищающие растения от патогенных инфекций, обладают недостаточной эффективностью действия и не способны предотвратить распространение растительных инфекций. Созданное лекарственное средство содержит в своем составе ДМСО и активный компонент полиеновый антибиотик леворин А. Указанное средство позволяет повысить эффективность лечения вирусных и грибковых заболеваний и полностью способствует регенерации увядших от инфекций овощных культур.

Таблица 1.

Состав почвы по минеральным элементам на основе почвенной градации.

	Название образца	рН	Степень обеспечения почвы минеральными элементами на основе почвенной градации			ЕС сольность (мС)	NaCl (ппм) Норма 150-300	KCl (ппм) Норма 350-700
			Азот 40-120 мг/кг	Фосфор 15-60 мг/кг	Калий 300-600 мг/кг			
			Показатель обеспечения минеральными элементами образца					
			Азот N/NH ₃ мг/кг	Фосфор P ₂ O ₅ мг/кг	Калий K ₂ O мг/кг			
1	Почва	7,55	7,76	133,32	212,08	1,18	520	516

Глава 7. Обсуждение результатов. Загрязнение окружающей среды отрицательно влияет на человеческую деятельность и продуктивность растений. Экологические проблемы неразрывно связаны с состоянием почвенного покрова. Важной задачей является разработка методов защиты человека и животных от патогенных инфекций, а также интегрированной системы защиты растений с использованием безопасных, экологически чистых и экономически эффективных биологических средств нового поколения. Социальный аспект сохранения здоровья человека в значительной степени зависит от обеспечения необходимыми лечебными препаратами, эффективные в борьбе с патогенными микроорганизмами. Для разработки эффективно действующих лекарственных соединений необходимо проведение исследований на молекулярном уровне с использованием мембраноактивных антибиотиков. Для получения биологически-активных соединений используются почвенные *актиномицеты*, способные синтезировать антибиотические вещества. Используя современные биотехнологические методы, был получен новый класс мембраноактивных полиеновых антибиотиков (ПА). В основе механизма действия ПА лежит формирование ими в клеточных мембранах каналов молекулярных размеров, избирательно проницаемых для ионов и органических соединений. В результате формирования каналов в цитоплазматической

мембране происходит утечка основных метаболитов из клеток, что приводит в конечном итоге к лизису клеток. Целью настоящей работы является разработка современных методов защиты окружающей среды от патогенных инфекций с использованием мембраноактивных ПА. Исследуя физико-химические свойства ПА и их алкильных производных на липидных мембранах можно выявить новые соединения, способные избирательно поражать вирусные, стафилококковые и грибковые инфекции. Проведен скрининг биологической активности ПА с помощью метода регистрации электрических характеристик БЛМ в режиме фиксации потенциала. Самыми эффективными из изученных ПА оказались амфотерицин В и леворин А₂, продуцируемые соответственно почвенными микроорганизмами *Actinomyces nodosus* и *Actinomyces levoris*. Показана роль амфотерицина В и леворина А₂ в решении экологических задач. Представлен теоретический анализ практических аспектов использования ПА с целью разработки экологической модели защиты окружающей среды от носителей инфекции. Установлена связь между структурой антибиотиков и их функцией в мембранах. Впервые изучены физико-химические свойства и биологическая роль диметилсульфоксида (ДМСО) в комплексе с ПА. Обнаружено, что использование амфотерицина В и леворина А₂ в комплексе с ДМСО усиливает биологическую активность исходных антибиотиков. Исследована зависимость проводимости липидных мембран от концентрации амфотерицина В и леворина А₂, а также проводимость липидных мембран в зависимости от структуры каналформирующих соединений, включая индивидуальные компоненты леворина А и алкильные производные амфотерицина В и леворина А₂. Установлено, что изученные антибиотики обладают крутой зависимостью проводимости от их концентрации, что позволило выявить эффективно действующие концентрации каждого из них в формировании ионных каналов. Проведенные исследования позволили теоретически обосновать и представить практические рекомендации к целенаправленному синтезу ПА и их производных с заданными свойствами. Так, например, алкилирование полярной части молекул ПА способствует повышению биологической активности и избирательности их действия на клеточные мембраны. В результате проведенных исследований впервые удалось выявить новое соединение *Инфанвир*, которое обладает способностью эффективно и избирательно подавлять рост патогенных вирусных инфекций в растительных клетках. На разработанный препарат получен Евразийский патент.

ВЫВОДЫ

1. Впервые рассмотрены теоретические аспекты использования полиеновых антибиотиков (ПА), продуцируемых почвенными микроорганизмами *Actinomycetes* с целью защиты окружающей среды от носителей инфекций, а также изучена их роль в решении экологических задач.
2. Проведен скрининг биологической активности ПА с помощью метода регистрации электрических характеристик бислойных липидных мембран в режиме фиксации потенциала. Показано, что из всех изученных антибиотиков наибольшей биологической эффективностью обладают амфотерицин В и леворин А₂. Установлена связь между структурой антибиотиков и их функцией в мембранах.
3. Впервые изучены физико-химические свойства и биологическая роль диметилсульфоксида (ДМСО) в комплексе с ПА. Показано, что использование ПА в комплексе с ДМСО в 10-100 раз усиливает биологическую активность антибиотиков полиеновой структуры.
4. Показано, что амфотерицин В резко увеличивает проницаемость мембран для ионов, воды, неэлектролитов и органических соединений. Выявлено, что зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В растет пропорционально 8-10-ой степени и эта степень зависит от структуры молекул ПА. Рост проводимости мембран связан с образованием в мембранах полиеновых каналов олигомерной структуры.
5. Изучена зависимость проводимости мембран от концентрации гептаенового антибиотика леворина А₂ и его алкильных производных. Показано, что с увеличением длины алкильной цепи леворина А₂ мембранная активность антибиотиков возрастает. Сделано предположение об идентичной стехиометрии канала, образованных производными леворина и что избирательная проницаемость этих каналов определяется молекулярной структурой гидрофильной цепи, выстилающей внутреннюю полость канала. Предложена молекулярная модель функционирования левориновых каналов в липидных мембранах.
6. Установлено, что введение леворина А₂ при малых концентрациях в бислойные мембраны приводит к появлению одиночных ионных каналов, проводимость которых составляет 0,4-0,5 пС. Показано, что проницаемость мембран, модифицированных этим антибиотиком, увеличивается для нейтральных молекул в порядке возрастания

тания гидродинамического радиуса молекул, образуя ряд проницаемости: вода > мочеви́на > ацетамид > глицерин > рибоза > арабиноза > глюкоза > сахароза. Каналы, образованные в мембранах леворином А₂ и другими производными леворина А, имеют эффективный радиус ~ 4Å, которые обладают катионной селективностью.

7. Проведенные исследования позволили теоретически обосновать и представить практические рекомендации к целенаправленному химическому синтезу антибиотиков и их производных с заданными свойствами. Показано, что алкилирование полярной части молекул ПА способствует повышению активности и избирательности их действия на клеточные мембраны.
8. Выявлена эффективно действующая концентрация ($10^{-7} - 10^{-6}$ М) ароматического антибиотика на проводимость мембран и изучено его действие на растительные инфекции. На основе проведенных исследований был разработан новый препарат (Евразийский Патент), против вирусных и грибковых инфекций овощных культур, который был апробирован на почвах Абшерона.
9. При исследовании почвы, где выращивались овощные культуры, было установлено, что в этой почве по сравнению с нормой имеется малое количество азота (7,76 мг/кг) и калия (212,08 мг/кг), высокое количество фосфора (133,32 мг/кг). Несмотря на недостающие минеральные элементы в почве, наблюдается высокая эффективность действия препарата на патогенные микроорганизмы, а также на рост и продуктивность растений.

Список работ, опубликованных по теме докторской диссертации.

1. Ibragimova V.Kh., Aliev D.I., Alieva I.N. Biophysical and Medicobiological Aspects of Application of Polyene Antibiotics in Combination with Dimethyl Sulfoxide. Biophysics (USA), 2002, v. 47, № 5, p. 774-781.
2. Ибрагимова В.Х., Алиев Д.И. Радиорезистентность и противоопухолевые свойства полиеновых антибиотиков в сочетании с диметилсульфоксидом. Журнал “Антибиотики и химиотерапия”, Россия, 2002, т. 47, № 9, с. 3 – 8.
3. Ибрагимова В.Х., Алиев Д.И., Алиева И.Н. Биофизические и медико-биологические аспекты использования полиеновых антибиотиков в сочетании с диметилсульфоксидом. Журнал “Биофизика”, Россия, 2002, т. 47, № 5, с. 833 – 841.
4. Ибрагимова В.Х., Алиев Д.И., Алиева И.Н. Радиопротектор. Ав-

- торское свидетельство № 20020035, 2002, Баку.
5. Ибрагимова В.Х., Алиева И.Н., Алиев Д.И. Инактивация проводимости амфотерициновых каналов. Журнал “Цитология” Россия, 2003, т. 45, № 8, с. 804-811.
 6. Ibragimova V., Alieva I., Kasumov Kh., Khutorsky V. Transient permeability induced by alkyl derivatives of amphotericin B in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, v. 1758, p. 29-37.
 7. Ибрагимова В.Х., Алиева И.Н., Касумов Х.М. Эффект макролидного гептаенового антибиотика леворина A_2 , вводимого с одной стороны мембраны. Биологические мембраны. 2006, т. 23, № 6, с. 493-502.
 8. Касумов Х.М., Ибрагимова В.Х., Алиева И.Н. Полиеновые антибиотики растительного происхождения, продуцируемые микроорганизмами *Streptomyces*. Структура и функция. Сборник трудов Института Ботаники АМЭА, 2006, с. 474-481.
 9. Ибрагимова В.Х., Алиева И.Н., Касумов Х.М. Физико-химические свойства и биологическая роль диметилсульфоксида в комплексе с полиеновыми антибиотиками. Известия НАН Азербайджана (серия биологических наук), 2006, № 1-2, с. 130-151.
 10. Ибрагимова В.Х. Исследование зависимости физико-химических параметров ионных каналов от структуры молекул полиеновых макролидных антибиотиков. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», VII съезд БООФиБ, Минск, 2006, т. 1, с. 247-249.
 11. Gasimov Kh., Mamedov A., Sultanova G., Samedova A., Babaev R., Ibragimova V., Zeinalova N. “A study of molecular-genetic and pharmacological characteristics of Saffron species”. VII Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Материалы симпозиума, Пущино, 2007, т III, с. 146 –148.
 12. Курбанов О.Г., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Гусейнова К.Ф., Ибрагимова В.Х., Мамедов Г., Касумов Х.М. Механизм действия полиеновых макролидных антибиотиков природного происхождения. Практические аспекты их использования. Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы фитодизайна». Россия. Белгород, 2007, с. 167-170.
 13. Ibragimova V. The creation of monitorings method and estimation of ecological situation in Azerbaijan Republic. International Council For Scientific Development. “Natural Cataclysms and Global Problems of the Modern Civilization. Special edition of Transactions of the International Academy of Science H&E. Baku-Innsbruck, 2007, p. 684-688.

14. Ибрагимова В.Х., Мамедов Г.Ш., Мамедова С.З., Мустафаева З.Р., Гасанова Р.А., Холина Т.А., Шабанов Д.А. Экоэтические проблемы почв Большого Кавказа (в пределах Азербайджана). "Естествознание и гуманизм" Международный сборник научных трудов. Томск, 2007, т. 4, № 4, с. 75-77.
15. Ибрагимова В.Х. Сохранение чистоты экосистем и создание эффективных способов борьбы с патогенными микроорганизмами. «Естествознание и гуманизм» Международный сборник научных трудов. Томск, 2007. т. 4, № 4, с. 62-63.
16. Ibragimova V., Alieva I., Kasumov Kh. Radioprotective properties and antitumoral activity of the polyene antibiotics in complex with dimethyl sulfoxide. – J. Qafqaz University (Azerbaijan), 2008, № 23, p. 109-120.
17. Ибрагимова В.Х. Экологические аспекты и методы управления плодородием почв Абшеронского полуострова. "Проблемы Биологии, экологии, географии, образования, история и современность" Материалы I I Международной научно-практической конференции. Санкт-Петербург, 2008, с. 185-186.
18. Ibrahimova V.X., Mammadov. Q.Sh., Mustafayeva Z.R., ,Shabanov C.A., Kholina T.A. Ecological value landscape complexes of the Big caucasus and their protection "The Caspian sea" Internationale Journal, B.S.U., Baku, 2008, № 2, p. 44-52.
19. Ибрагимова В.Х. Теоретические аспекты мониторинга окружающей среды для оценки экологической обстановки. Материалы международной научно-практической конференции «Ботанические сады в 21 веке: сохранение биоразнообразия, стратегия развития и инновационные решения». Белгород, 2009, с. 41-43.
20. Ибрагимова В.Х., Садыгова Л.Н., Касумов Х.М. Эффект мембраноактивного соединения «Резорбин» природного происхождения на возбудителей патогенных инфекций. Материалы международной научно-практической конференции «Ботанические сады в 21 веке: сохранение биоразнообразия, стратегия развития и инновационные решения». Белгород, 2009, с. 365-367.
21. Ибрагимова В.Х. Мониторинг окружающей среды для оценки экологической обстановки с использованием полиеновых антибиотиков "Biologiya elmi nailiyyətlər" Bakı Dövlət Universitetinin 90 illik yubileyinə həsr olunmuş Respublika Elmi konfransının materialları, B.D.U., 2009, s. 324-326.
22. Ибрагимова В.Х. Оценка влияния препарата «Инфанвир» на ряд инфекционных заболеваний овощных культур. Ibragimova V.Kh.

- Estimation of influence of the “Infanvir” preparation on the several infectious diseases of the vegetables plants. Успехи современного естествознания № 12 15-18 ноября г. Москва, 2010, с. 50.
23. Ibragimova V.X. The effect of membrane active channelforming INFANVIR preparation on pathogenic infections of vegetable plants. Das internationale symposium Ekologische technologische und rechtliche aspekte der lebensversorgung .Ganover, 2010, p. 43.
 24. Ибрагимова В.Х., Шабанов Дж.А., Холина Т.А., Залова Р.Б. Изменение показателей плодородия лесных почв Большого Кавказа в зависимости от антропогенного воздействия. Закономерности изменения почв при антропогенных воздействиях и регулирование состояния и функционирования почвенного покрова. Материалы Всероссийской научной конференции, 2010, с. 181-183.
 25. Ибрагимова В.Х., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Касумов Х.М. Антивирусное и антигрибковое действие антибиотика инфанвир при заболевании овощных культур. Известия НАНА, Серия биологических наук, 2012, т. 67, № 2, с. 34-37.
 26. Ибрагимова В.Х., Алиев Н.Н., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Касумов Х.М. Низкомолекулярный пептид-антибиотик, обладающий высокой эффективностью действия на вирусные, грибковые и стафилококковые инфекции. В материалах Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологической и химической экологии. Москва, 2012, с. 198-201.
 27. Gasimov Kh., Sultanova G., Samedova A., Ibragimova V. The development of molecular trans-membrane channel systems for delivery ions and carbohydrates to heart muscle cells at pathology. 5th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery (WCDATD), Sweden, Uppsala, 2013, p. 59.
 28. Ибрагимова В.Х. Теоретические и практические аспекты разработки эффективных противогрибковых препаратов на основе полиеновых антибиотиков. В материалах VI Всероссийского Конгресса по Медицинской Микологии. Успехи Медицинской Микологии, 2014, т. XII, с. 398-401.
 29. Ibragimova V.Kh, Samedova A.A., Sultanova G.G., Gasimov Kh.M. The antiviral and antifungal action of INFANVIR antibiotic at the vegetable crops. The First EUROPEAN Conference on Biology. Section 2. Physico-chemical Biology and Medical Sciences, Austria, Vienna, 2014, p. 45-50.
 30. Ибрагимова В.Х. Международный Евразийский патент. Средство,

- обладающее антивирусным и антигрибковым действием при заболевании овощных культур. Евразийский патент № 022438, заявка № 201200707/28, 2015, с. 1-14.
31. Ибрагимова В.Х., Касумов Х.М. Международный Евразийский патент. Лекарственное средство, обладающее антивирусным, антибактериальным, антигрибковым, противоожоговым действием и способ его получения. Евразийский патент № 022317, заявка № 201200710/28, 2015, с. 1-17.
 32. Ибрагимова В.Х. Разработка современных методов решения экологических проблем с использованием полиеновых антибиотиков, продуцируемых почвенными актиномицетами. В Материалах 3-го Международного Микологического Форума, 2015, т. 5, с 307-309.
 33. Гасымова В.Х. (Ибрагимова). Использование полиеновых макролидных антибиотиков в сочетании с диметилсульфоксидом при вирусных и грибковых заболеваниях растений. Известия НАНА, Серия биологических наук, 2015, т. 70, № 2, с. 109-113.
 34. Гасымова В. Эффект влияния мембраноактивного каналаобразующего соединения на инфекционные заболевания сельскохозяйственных культур. В Материалах пятой Международной научно-практической интернет конференции "Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям". К 100-летию системного изучения лекарственных растений в Украине. Раздел 2. Изучение растений природной флоры. Интродукция, биология и культивирование лекарственных растений, 2016, стр. 52-54.
 35. Гасымова В.Х., Х.М. Касумов. Разработка метода усиления биологической активности полиеновых антибиотиков и его использование для решения экологических задач. Сборник трудов института ботаники посвященный 80-летию Института Ботаники НАНА, 2016, т. 36, с. 88-94.
 36. Гасымова В.Х. Практические аспекты мониторинга окружающей среды на примере актиномицетов – продуцентов полиеновых антибиотиков. В Материалах 4 Съезда Микологов России, 2017, т. 7, с. 258-259.
 37. Sultanova G., Samedova A., Qasimova V., Kasumov Kh., Nikolayevich L. The action of some antineoplastic medicines on growth and metabolism of tumor cells *in vitro*. Sylwan Journal, 2017, v.161 (1), p. 161-169.

VƏFA XƏLİL QIZI QASIMOVA

POLIEN ANTİBİOTİKLƏRDƏN İSTİFADƏ ETMƏKLƏ ABŞERON TORPAQLARINDA EKOLOJİ PROBLEMLƏRİN HƏLL EDİLMƏSİ YOLLARI

XÜLASƏ

Ətraf mühitin çirklənməsi insan fəaliyyətinə və bitkilərin məhsuldarlığına mənfi təsir göstərir. Ekoloji problemlər torpaq örtüyünün vəziyyəti ilə sıx bağlıdır. İnsanları və heyvanları patogen infeksiyalardan qorumaq üçün yeni metodların işlənilib yaradılması əsas məsələlərdən biri olur və bununla bərabər bitkilərin müdafiəsi üçün təhlükəsiz, ekoloji təmiz və iqtisadi cəhətdən səmərəli olan bioloji vasitələrinin yeni nəslinin yaradılmasıdır. İnsanın sağlamlığının sosial aspekti patogen mikroorqanizmlərə qarşı lazımlı dərman preparatlarından əhəmiyyətli dərəcədə asılıdır. Yüksək təsirli dərman preparatlarının işlənilib hazırlanması üçün membranlara həssas olan antibiotiklərin istifadəsi ilə bərabər tədqiqatların molekulyar səviyyədə aparılması zəruri sayılır. Bioloji aktiv maddələrin yaradılması üçün torpaq aksinomisetlərindən istifadə olunur və bunlar antibiotik maddələrini ifraz etmək qabiliyyətinə malikdirlər. Müasir biotexnoloji üsullardan istifadə edərək membranlara həssas olan polien antibiotiklərin yeni sinfi alınmışdır. Polien antibiotiklərinin təsirinin əsasında hüceyrə membranlarında molekulyar ölçüdə kanalların yaradılması durur və bunlar ionlar və üzvü birləşmələr üçün seçici keçiriciliyə malikdir. Membranlarda kanalların yaradılması hüceyrələrdən əsas metabolitlərin çıxmasına səbəb olur və nəticədə hüceyrələrin məhv olunmasına qətirib çıxarır. Təqdim olunan işin əsas mahiyyəti membranlara təsirli polien antibiotiklərdən istifadə edərək ətraf mühiti patogen infeksiyalardan qoruyan muasir metodların hazırlanmasındadır. Lipid membranların üzərində polien antibiotiklərin və onların alkil törəmələrinin fiziki-kimyəvi xassələrini tədqiq edərək viruslara, irin və göbələk infeksiyalarına qarşı yeni maddələrin yaradılmasıdır. Polien antibiotiklərin bioloji aktivliyinin təyini bimolekulyar lipid membranlarında potensialın fiksasiya metodu ilə aparılmışdır. Tədqiq olunan polien antibiotiklərin arasında ən yüksək bioloji aktivliyi ilə seçilən amfoterisin B və levorin A₂ molekullarıdır. Bu antibiotiklər müvafiq olaraq *Actinomyces nodosus* və *Actinomyces levoris* torpaq *aksinomisetləri* tərəfindən ifraz olunur. Ekoloji məsələlərin həll edilməsində amfoterisin B və levorin A₂ rolu geniş tədqiq

edilmişdir. Ətraf mühiti infeksiya daşıyıcılarından qorumaq üçün ekoloji modelin yaradılması məqsədə uyğundur və ona görə də polien antibiotiklərinin praktiki aspektlərinin nəzəri analizi işlənib hazırlanmışdır. Polien antibiotiklərin quruluşundan asılı olaraq membranlarda göstərdiyi funksiyalar arasında bağlantı təyin olunmuşdur. İlk dəfə olaraq polien antibiotikləri dimetilsulfoksidlə kompleks şəklində istifadə edilmişdir və onların fiziki-kimyəvi xassələri tədqiq edilmişdir. İlk antibiotiklərə nisbətən amfoterisin B və levorin A₂ kompleks şəklində istifadəsi onların bioloji aktivliyini kəskin artırır. Amfoterisin B və levorin A₂ antibiotiklərinin konsentrasiyasından asılı və bununla belə kanalyaradıcı birləşmələri, levorin A komponentləri və onların alkil törəmələrini daxil etməklə, onların təsiri altında lipid membranların seçici keçiriciliyi tədqiq edilmişdir. Təyin olunmuşdur ki, membranların keçiriciliyi antibiotiklərin konsentrasiyasından kəskin asılıdır və bununla antibiotiklərin effektiv təsiredici konsentrasiyası təyin edilmişdir. Aparılan tədqiqat işləri nəzəri cəhətdən əsaslandırılmışdır və polien antibiotiklərin törəmələrinin məqsədyönlü təsiredici şəkildə alınması üçün praktiki tövsiyə verilməsinə yol açmışdır. Belə ki, polien molekullarının amin, yaxud karboksil polyar hissələrində alkil qruplarının əlavə yaradılması antibiotiklərin hüceyrə membranlarına qarşı bioloji aktivliyinin və seçici təsirinə artmasına səbəb olur. Tədqiqat işlərinin nəticəsində yeni preparatların aşkar edilməsinə qətib çıxartmışdır. Yaradılan preparatlar heyvan və bitki hüceyrələrində mövcud olan virus, stafilokok və göbələk patogen infeksiyalarına qarşı effektiv və selektiv təsir göstərərək onları qısa bir zamanda məhv etmə qabiliyyətinə malikdirlər və bunlara Beynəlxalq Evraziya Patentləri verilmişdir.

WAYS OF SOLVING ENVIRONMENTAL PROBLEMS USING
POLYENE ANTIBIOTICS ON ABSHERON SOILS

SUMMARY

Environmental problems adversely affect human activity and crop productivity. Ecological problems are closely linked to a soil cover condition. Developing new methods to protect people and animals from pathogenic infections and creating new generation of safer, environmentally friendly and economically efficient biological means for plant protection are the key issues. The social aspect of human health significantly depends on the medical preparations, which are efficient against pathogenic microorganisms. By using modern biotechnological methods, a new class of polyene antibiotics sensitive to membranes has been obtained. The mechanism of the action of polyene antibiotics is based on the formation of cell membrane channels of molecular size selectively permeable for ions and organic compounds. As a result of the formation of cytoplasmic membrane channels, leakage of the main metabolites occurs, which leads to cell lysis.

The aim of the present work was developing modern methods to protect the environment from pathogenic infections using polyene antibiotics (PA). New compounds can be revealed using physicochemical properties of PA and their alkyl derivatives, capable of selectively affect viral, staphylococcal and fungal infections on lipid membranes. Screening of biological activity of PA has been performed using electrical characteristics. The most effective PA appears to be amphotericin B and levorin A₂, induced by soil microorganisms *Actinomyces nodosus* and *Actinomyces levoris*, respectively. The roles of amphotericin B and levorin A₂ have been shown in solving ecological tasks. Theoretical analysis of practical aspects of the use of PA for developing ecological model of the protection of environment from carriers of infection has been presented. A relation between the structure of antibiotics and their function has been detected in membranes. For the first time physicochemical properties and biological role of dimethyl sulfoxide have been studied in conjunction with PA. The use of amphotericin B and levorin A₂ in conjunction with dimethyl sulfoxide has been found to intensify biological activity of the initial antibiotics. The dependence of lipid membrane conduction on concentrations of amphotericin

B and levorin A₂, on the structure of channel-forming compounds, including individual components of levorin A and alkyl derivatives of amphotericin B and levorin A₂ has also been studied.

It was established that the conduction of the studied antibiotics are strongly dependent on their concentrations, which allowed revealing an effective concentration of each antibiotic in forming ion channels. The researches allowed theoretically substantiating and submitting practical recommendations for the purposeful synthesis of PA and their derivatives with given properties. Thus, for example, alkylation of the polar part of PA molecules promotes an increase in biological activity and selectivity of their action on cell membranes. For the first time, two new preparations are discovered, which have the ability of effective and selective inhibition of the growth of pathogenic viral, staphylococcal and fungal infections have been identified both in animal and plant cells. Eurasian patents have been obtained for the developed preparations.

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
TORPAQŞUNASLIQ VƏ AQROKİMYA İNSTİTUTU

Əlyazma hüququnda

VƏFA XƏLİL QIZI QASIMOVA

POLİEN ANTİBİOTİKLƏRDƏN İSTİFADƏ ETMƏKLƏ
ABŞERON TORPAQLARINDA
EKOLOJİ PROBLEMLƏRİN HƏLL EDİLMƏSİ YOLLARI

2426.01 – Ekologiya

2422.01 – Biotexnologiya

Biologiya üzrə elmlər doktoru elmi dərəcəsi
almaq üçün təqdim edilmiş dissertasiyasının

AVTOREFERATI

Bakı – 2017

Формат бумаги 60x84 1/16. Тираж 10.

«Издательство Бакинский Университет», Баку, AZ 1148, ул. З.Халилова, 23.