

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI

Əlyazması hüququnda

LİPİD MEMBRANLARINDA POLİEN ANTİBİOTİKLƏRİN YARATDIĞI İON KANALLARININ FİZİKİ-KİMYƏVİ XASSƏLƏRİNİN TƏDQIQI

İxtisas: 2406.01 – Biofizika

Elm sahəsi: Biologiya

İddiaçı: **Türkan Coşqun qızı Paşazadə**

Fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi
almaq üçün təqdim edilmiş dissertasiyanın

AVTOREFERATI

Bakı – 2024

Dissertasiya işi Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyinin Botanika İnstitutunun Eksperimental botanika şöbəsində və Azərbaycan Respublikası Səhiyyə Nazirliyinin V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutunun Mikrobiologiya şöbəsinin Bakteriologiya bölməsində yerinə yetirilmişdir.

Elmi rəhbər: AMEA-nın müxbir üzvü, professor
Xəlil Məmmədəli oğlu Qasimov

Rəsmi opponentlər: biologiya elmləri doktoru, professor
İradə Nurəddin qızı Əliyeva

fizika-riyaziyyat elmləri doktoru, professor
Əhməd Məhəmməd oğlu Hacıyev

biologiya elmləri üzrə fəlsəfə doktoru, dosent
Sevinc Haqverdi qızı Cəfərova



Azərbaycan Respublikası Prezidenti yanında Ali Attestasiya Komissiyasının Bakı Dövlət Universiteti nəzdində fəaliyyət göstərən FD 2.31 Dissertasiya şurası

Dissertasiya şurasının sədri:  biologiya elmləri doktoru, professor
Ralfrid Əhədoviç Həsənov

Dissertasiya şurasının elmi katibi:  biologiya elmləri üzrə fəlsəfə doktoru, dosent
Samira Cəfər qızı Salayeva

Elmi seminarın sədri:  fizika-riyaziyyat elmləri doktoru, professor
Eldar Əli oğlu Məsimov



GİRİŞ

Mövzunun aktuallığı və işlənmə dərəcəsi. Hüceyrənin ultrastrukturunu, fiziki və kimyəvi xüsusiyyətlərini öyrənməklə yanaşı hüceyrədə fəal və qeyri-fəal daşınmanın mexanizmlərinin tədqiq edilməsi, yəni hüceyrə membranlarında ionlar və üzvi birləşmələr üçün seçici keçiriciliyin molekulyar səviyyədə tədqiq edilməsi mühüm əhəmiyyət kəsb edir.

Amfoterisin B (AmB) kanalları kalium və natrium kanalları kimi ionların membrandan keçməsinə imkan yaradır, hüceyrənin daxili mühitindəki sabitliyi pozur və beləliklə də hüceyrənin ölümünə səbəb olur. Artıq elmə natrium, kalium və digər kanalların funksiyasının pozulması nəticəsində yaranan bir çox xəstəliklər - iflic, miotoniya, bruqada sindromu kimi fizioloji patologiyalar və epilepsiya, miqren, Lambert-Eaton sindromu, Alzheimer xəstəliyi, Parkinson xəstəliyi, şizofreniya kimi nevroloji xəstəliklər də məlumdur. Gələcəkdə belə xəstəliklərin daha effektiv müalicə olunması məqsədilə membranlar üzərində aparılan tədqiqatlar mühüm əhəmiyyət kəsb edir. Xüsusilə də bakteriya, virus və göbələk infeksiyalarına qarşı istifadə olunan polien antibiotiklərinin (PA) membranda yaratdığı ion kanallarının tədqiq olunması tibb elmi sahəsində əhəmiyyətlidir.

Ədəbiyyat məlumatlarının təhlili göstərir ki, AmB yalnız mövcud AmB və sterol (xolesterol və erqosterol) nisbəti çox olduqda hüceyrələr üçün zəhərlidir. Amfoterisin B toksikliyi yüksək olan antibiotiklərdən biri kimi tanındığına görə aktual məsələlərdən biri insan orqanizmi üçün toksik olmayan qatılığın təyin olunmasıdır. AmB-nin toksikliyini azaltmaq üçün üç əsas üsulu təklif edirik. Birinci üsul, ümumi membrandakı sterol və antibiotik nisbətini aşmamaq üçün aşağı dozada Amfoterisin B-nin istifadə edilməsidir. İkinci üsul, kanal əmələ gətirmə aktivliyini saxlayaraq toksikliyini azaltmaq üçün Amfoterisin B-ni sterol (erqosterol və ya xolesterol) ilə əvvəlcədən kompleksləşdirməkdir. Üçüncü üsul isə Amfoterisin B-nin və levorinin amin və karboksil qruplarının modifikasiya olunması ilə alınmış alkil törəmələrindən istifadə olunmasıdır.

Bütün yuxarıda qeyd edilən mexanizmlərin aydınlaşdırılması həm elmi, həm də praktiki olaraq böyük aktuallıq kəsb edir və bu istiqamətdə aparılan tədqiqat işləri və yuxarıda qeyd etdiyimiz üsulların tətbiq edilməsi müəyyən xəstəliklərin müalicəsində geniş perspektivlərin açılmasına köməklik edəcək.

Tədqiqatın məqsəd və vəzifələri. Dissertasiya işində əsas məqsəd bimolekulyar lipid membranlarında və bakterial membranlarda müxtəlif qatılıqlarda götürülən polien antibiotiklərin təsiri nəticəsində yaranan ion kanallarının fiziki və kimyəvi xassələrini müxtəlif metodlarla tədqiq edib, alınan nəticələrin müqayisəli təhlilini aparmaq olmuşdur.

Tədqiqat prosesində bu məqsədlərə nail olmaq üçün qarşıya aşağıdakı vəzifələr qoyulmuşdur:

1. Müxtəlif qatılıqda götürülmüş polien antibiotiklərinin ayrılıqda və xolesterinlə birlikdə yaratdığı komplekslərin struktur xüsusiyyətlərinin ultrabənövşəyi udma spektri ilə tədqiqi;
2. Antibiotiklərin təsiri nəticəsində yaranan ion kanallarının xüsusiyyətlərinin tədqiqi;
3. Perfuziya və kinetik relaksasiya metodu ilə Amfoterisin B-nin və levorinin alkil törəmələrinin membranlara təsirinə tədqiqi;
4. Antibiotiklərin bakteriyaların çoxalmasına təsiri və onların bakterial membranlarda yaratdığı ion kanallarının tədqiqi.

Tədqiqatın metodları. Tədqiqat üçün bimolekulyar lipid membranlarından (BLM) və bakteriya membranların alınması metodundan istifadə edilir. Antibiotiklərin membranlardan yuyulması perfuziya metodu və membranın inteqral keçiriciliyinin azalması isə kinetik relaksasiya metodu ilə təyin olunur.

Bakteriyalar üzərində tədqiqatlar aparılarkən test-obyekt və disk-diffuziya metodundan istifadə olunmuşdur. Təhlillər pClamp 8.2 programı vasitəsilə aparılmışdır.

Tədqiqat üçün Amfoterisin B, levorin və dimetilsulfoksiddən (DMSO) istifadə olunur və onların ultrabənövşəyi spektrləri T92 + UV / VIS Spektrometrindən istifadə edilərək alınmışdır.

Müdafiəyə çıxarılan əsas müddəalar:

1. Polien antibiotiklərinin təsiri altında bakteriya membranlarında BLM-də olduğu kimi polien-xolesterin kompleksi yaranır və membranın elektrik müqavimətinin dəyişməsinə səbəb olur.

2. Bakteriyalarda yaranan AmB kanalları, həm də BLM-də yaranan kanalların ion seçiciliyi, kanal keçiriciliyi, kanalların yaşama və açıq olma müddəti pH-dan və temperaturdan asılı olaraq dəyişir.

3. AmB və levorin xolesterinin ikiqat rabitələri ilə birləşərək ultrabənövşəyi udma spektrlərinin dəyişməsinə səbəb olur.

4. AmB və levorinin alkil törəmələrinin uzunluğunun artması antibiotik molekullarının membranda qalma müddətinin dəyişməsinə təsir göstərir.

Tədqiqatın elmi yeniliyi. *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps.aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*St.aureus*), *Candida albicans* (*C.albicans*) membranlarında AmB polien antibiotikinin (PA) kanal əmələ gətirmə fəaliyyətini öyrənmişik.

Ps.aeruginosa-da AmB kanallarının ion keçiriciliyini öyrənərkən kanalın qısa müddətdə tam açıq vəziyyətə keçdiyini aşkar etdik. Zamandan asılı olaraq - aşağı, orta və yüksək səviyyəli keçiriciliyə malik kanalların yarandığını müşahidə etdik.

St.aureus-da yaranan AmB kanalı neytral pH-da əsasən anion-selektiv görünür və aşağı pH-da həm kanal keçiriciliyi, həm də anion seçiciliyi artır. Antibiotikin artan qatılığı cərəyan gərginliyinin xarakteristikasının xətti asimmetriyasına və seçiciliyinin itirilməsinə səbəb olur. Daha yüksək temperatur elektrik keçiriciliyindəki dəyişikliklərlə paralel olaraq kanal keçiriciliyini artırır, lakin seçiciliyi dəyişmir.

*C.albicans*da aparılan təcrübələrdə 0,05 və 0,1 mM AmB tətbiqi membran müqavimətinin azalmasına səbəb olur və bu membranın sıxlığının azalması ilə əlaqələndirilə bilər. AmB müxtəlif konsentrasiyalarda *C.albicans* çoxalma qabiliyyətinin itirilməsinə və bir sıra morfo-fizioloji pozğunluqlara səbəb olur.

E.coli üzərində aparılan tədqiqatlarda AmB kanallarının altı növünü təsnif etməyə imkan verən yaxşı müəyyən edilmiş keçiricilik

spektrlərini müşahidə etdik. Eyni keçiriciliyə malik kanallar çox nadir hallarda müşahidə edildi və bu AmB-nin qatılığında güclü şəkildə asılıdır. Kanalların yaşama müddəti temperaturdan bir qədər asılıdır, lakin üç aşağı keçiricilik kanalı üçün hər iki membrana xolesterol əlavə edildikdə membran keçiriciliyində əhəmiyyətli dərəcədə azalma oldu. Bu, şübhəsiz ki, tezliyin artması ilə əlaqədardır. Böyük keçiriciliyə malik kanal qısa ömürlü idi. Xolesterolun əlavə edilməsi aşağı keçiriciliyə malik kanallarının meydana gəlməsini nəzərəcərpacaq dərəcədə azaldı. Erqosterolun əlavə edilməsi kanalların meydana gəlməsini artırdı. Xolesterolun əlavə edilməsi kanalların yaranmasına kömək etdi, lakin yaşama müddətlərini azaltdı. Temperaturun azalması buna oxşar davranış yaratdı, lakin bu dəfə kanalların açıq qalma müddəti artdı.

Bakteriyalarda ion kanallarının parametrləri – seçicilik, keçiricilik, açıq və bağlı halda olan kanalların membranlarda yaşama müddəti polien molekullarının quruluş modifikasiyası vasitəsilə tənzim olunur.

Tədqiqatın nəzəri və praktiki əhəmiyyəti. Membranların öyrənilməsindən alınan nəticələr hal-hazırda biologiyadan başqa tibbdə, fiziologiyada, immunologiyada, ksenobiologiyada və ekologiyada tətbiq edilir.

AmB immunomodulyatordur və digər antifungal dərmanlarla birlikdə uyğun doza aralığında immunostimulyator kimi təklif oluna bilər. AmB tərkibli Fungizone və Ambisome kimi dərmanlar lipid tərkibli fosfolipidlərlə liposom və misel formasında hazırlanaraq tətbiq edilir. AmB intratekal yolla koksidioidomikozun, selikli leyşmaniozun, invaziv aspergillyozun, blastomikozun, kandidozun, koksidioidomikozun, HIV infeksiyası olan xəstələrdə kriptokok meningitinin, kriptokokkozun, ağır mərkəzi sinir sisteminin fungal infeksiyasının müalicəsində istifadə olunur. HIV infeksiyası olan xəstələrdə histoplazmoz, HIV infeksiyası olan xəstələrdə ağciyər kriptokokkoz, Basidiobolus infeksiyası, mukormikoz, sporotrikoz və sidik yollarının mikozu, kandidal vulvovaginit, dəri kandidozu, dəri və selikli dəri infeksiyası və qeyri invaziv mədə-bağırsaq kandidozunun müalicəsində istifadə olunur. Lakin, onların nisbi

toksikliyi, suda zəif həll olma qabiliyyəti və mikrofloranın rezistentliyi PA-nın tibbi praktikada istifadəsini məhdudlaşdırır. ¹

Ədəbiyyat məlumatları göstərir ki, AmB viral zülalların sintezinə və replikasiyasına mane olmaqla virusların çoxalmasının qarşısını alır. Məlumatların təhlili digər viruslarda olduğu kimi AmB-nin COVID-19 virusunun da replikasiyanı və zülal sintezini dayandıra biləcəyini deməyə əsas verir.

Aprobasiyası və tətbiqi. Dissertasiya işinin nəticələri VI Biophysical Congress (Russia, Sochi, 2019), Eurasian Scientific Congress. First International Scientific and Practical Conference (Barcelona, Spain, 2020), “Medicinal Herbs: from Past Experience to New Technologies” Proceedings of Ninth International Scientific and Practical Conference (Poltava, June, 29-30, 2021), AMEA-nın Botanika İnstitutu və Azərbaycan Botaniklər Cəmiyyətinin akad.V.İ.Ulyanişşevin 120 illiyinə həsr edilmiş simpoziumu (Bakı, 25 dekabr 2018), International Autumn school of young scientist (dedicated to the “Year of Heydar Aliyev”) (Baku, 2023), Scientific-Practical Conference “Modern Approaches in the study of the plant kingdom” (dedicated to the “Year of Heydar Aliyev”) (Baku, 2023) respublika və beynəlxalq konfranslarında dinlənilmiş və onların materiallarında dərc edilmişdir.

Dissertasiya işinin əsas müddəalarını əks etdirən 16 elmi iş dərc olunmuşdur ki, bunlardan 10-u məqələdir (4-ü beynəlxalq xülasələndirmə və indeksləmə bazasına daxil olan dövrü elmi nəşrlərdə dərc olunmuşdur).

Dissertasiya işinin yerinə yetirildiyi təşkilatın adı. Dissertasiya işi AR Elm və Təhsil Nazirliyinin Botanika İnstitutunun Eksperimental botanika şöbəsində və Azərbaycan Respublikası Səhiyyə Nazirliyinin V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi

¹ Пашазаде Т.Д. Действие химически трансформированных макроциклических полиеновых антибиотиков на опухолевые клетки / Вайнштейн В.А., Николаевич Л.Н., Султанова Г.Г., Багирова А.А. [и др.] // Журнал Экспериментальной биологии и медицины, -Москва, Россия: - 2019. т. 166, № 12, - с. 695-700. (T.J. Pashazade. The action of chemically transformed macrocyclic polyene antibiotics on tumor cells / V.A.Vainshtein, L.N. Nikolayevich, G.H.Sultanova, A.A. Baghirova [et al.] // J. Experimental biology and medicine, - Russia: -2019. v. 166, № 6, - s. 735-738.)

Profilaktika İnstitutunun Mikrobiologiya şöbəsinin Bakteriologiya bölməsində yerinə yetirilmişdir.

Dissertasiyanın struktur bölmələrinin ayrılıqda həcmi qeyd olunmaqla dissertasiyanın işarə ilə ümumi həcmi. Dissertasiya işi 248825 işarədən (mətndəki boşluqlar və şəkillər, cədvəllər, qrafiklər, əlavələr və ədəbiyyat siyahısı istisna edilməklə-201730), 52 şəkil və 10 cədvəldən ibarətdir. Dissertasiya işinin girişi-10530, ədəbiyyat icmal-59701 (mətndəki boşluqlar və şəkillər, cədvəllər istisna edilməklə-55942), tədqiqat metodikası-35310 (mətndəki boşluqlar və şəkillər istisna edilməklə-34713), tədqiqatın nəticələri-109377 işarədən (mətndəki boşluqlar, şəkillər və cədvəllər istisna edilməklə-100545) və ədəbiyyat siyahısından-28055 işarə və ixtisarlar-1039 işarədən ibarətdir. Ədəbiyyat siyahısında son 10 ilə aid olunan istinadlar 51 % -dən çox təşkil edir.

İŞİN ƏSAS MƏZMUNU

I FƏSİL. ƏDƏBİYYAT İCMALI

Dissertasiya işinin bu fəslində polien antibiotiklərinin ümumi xarakteristikası və kimyəvi quruluşuna, onların membrana təsir mexanizminə və ion kanallarının struktur-funksional xüsusiyyətlərinə aid elmi tədqiqatların və ədəbiyyat məlumatlarının xronoloji ardıcılıqla qısa şərh verilmişdir.

II FƏSİL. TƏDQIQATIN MATERIAL VƏ METODİKASI

Tədqiqat obyektləri olaraq Amfoterisin B, levorin və həmin antibiotiklərin Sankt-Peterburq Texnoloji Antibiotiklər və Fermentlər İnstitutunda prof. V.A.Vaynşteyn tərəfindən sintez edilən alkil törəmələrdən istifadə olunmuşdur. Levorinin alkil törəmələri onun amin və karboksil qruplarının modifikasiya olunması ilə alınmışdır və R nişanla alkil törəmələri göstərilib: R-CH₃: metillevorin; R-C₂H₅: etillevorin; R-C₃H₇: propilevorin; R-C₄H₉: butillevorin; R-C₅H₁₁: ammilevorin. Levorin A₂ levorin A - nın əsas tərkib hissəsi olaraq yüksək membran aktivliyi ilə seçilən komponentlərindən biridir. Amfoterisin B və levorinin alkil törəmələri DMSO da 1mq/ml qatılığında həll edilərək istifadə edilmişdir.

Tədqiqatlar BLM üzərində aparılmışdır və BLM-in alınması metodundan istifadə olunmuşdur. Membran üzərində aparılan tədqiqatlarda membran potensialının fiksasiya metodu (Clamp metodu), perfuziya və kinetik relaksasiya metodundan istifadə olunmuşdur. Polienlərin bioloji aktivliyinin təyin edilməsi üçün T92 + UV / VIS spektrometrdən istifadə edilmişdir. Bir sıra təhlillər Statistica 7.0 və pClamp 8.2 proqramı vasitəsilə aparılmışdır. Bakteriyaların çoxalmasını öyrənmək üçün test-obyekt və disk-diffuziya metodundan istifadə olunmuşdur.² Bakteriya membranlarını almaq üçün diferensial sentrifüqasiya və sonikasiya metodundan istifadə olunur.

III FƏSİL. NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

3.1. Müxtəlif qatılıqlarda polien antibiotiklərinin tədqiq edilən ultrabənövşəyi spektrləri

AmB-nin istifadəsinin əsas çatışmazlığı onun suda həll olunmamasıdır. Amfoterisin B üzvi həlledicilərdə, turşulaşdırılmış dimetil-formamiddə 60-80 mq/ml, dimetilsulfoksiddə (DMSO) 30-40 mq/ml, propilenqlikolda 2-5 mq/ml, həmçinin zəif qələvi məhlulunda, yaxud metanol turşusunda 2-5 mq/ml həll olur.³ Tədqiqat işimiz üçün AmB-ni DMSO məhlulunda həll edərək istifadə etmişik. DMSO molekulu amfifil və yüksək polyardır. DMSO molekullarında oksigen rabitələri olduğuna görə bir zəncir quruluşu var. 350 nm-dən 2200 nm dalğa uzunluğu diapazonunda DMSO absorbsiya spektrlərinin tədqiqi göstərir ki, DMSO göstərilən dalğa uzunluğu intervalında optik şəffafdır (şəkil 3.1.1.). Dimetilsulfoksid molekullarının göstərilən dalğalarda udma spektri disulfid S=O qrupunun mövcud olması ilə bağlıdır.⁴

² Вязьмин С.Ю. Электронная спектроскопия органических соединений / Рябухин Д.С., Васильев А.В. // - Санкт-Петербург, СПбГЛТА, - 2011, - с. 1-43.

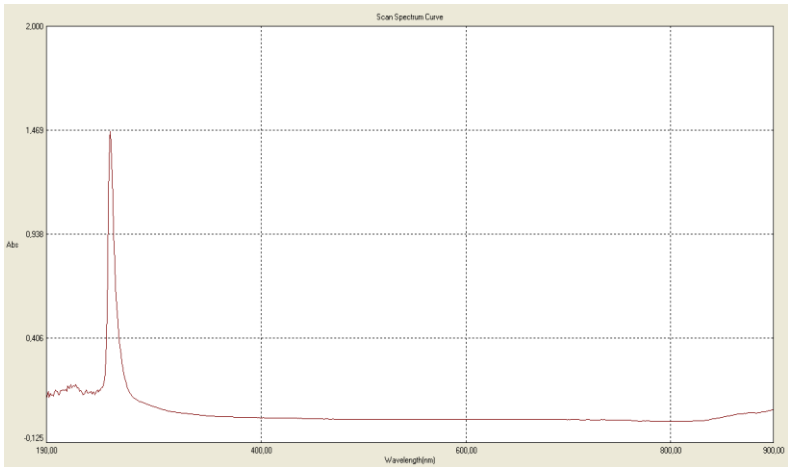
³ Cavassin F. B. Sixty years of Amphotericin B: An overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. / Luiz Bau-Carneiro J., Vilas Boas R.R., Queiroz-Telles F. // Infect. Dis. Ther., -2021, 10(1), - p. 115-147.

⁴ Fei H. Ion transport through dimethyl sulfoxide (DMSO) induced transient water pores in cell membranes / Weirong L., Shengchao Z., Li Z. [et al.] // Molecular Membrane Biology, -2012, 29(3-4) - p. 107-113.

DMSO-da antibiotiklər asanlıqla həll edilir. Amfoterisin B və levorin A₂-nin bioloji aktivliyi DMSO-da həll olunanda kəskin şəkildə artır. DMSO məhlulunda antibiotiklər ilk suda həll edilən formalarla müqayisədə təxminən 10-100 dəfə daha effektivdir. DMSO amfifilik, polyarlıq, yüksək rezorbsiya, molekulyar formaya və bir çox üzvi birləşmələri həll etmək bacarığı kimi xüsusiyyətlərə malikdir.

DMSO molekulları hüceyrələrə və insan dərisinə asanlıqla daxil olmaqla toxuma maneələrini aşar. DMSO molekullarının dielektrik sabiti onu göstərir ki, DMSO su və yağlar arasında yerləşir və toxumalara yüksək dərəcədə resorbsiyası ilə seçilir. Bu DMSO-nun müxtəlif dərman birləşmələrinin toxumalara nəql etmək üçün istifadə edilə biləcəyini göstərir. DMSO biomembranlar vasitəsi ilə çox sayda aşağı molekül çəkisi ilə fərqlənən maddələrin keçiriciliyini artırır, həmçinin hüceyrələrə daxil olma sürətini artırır.

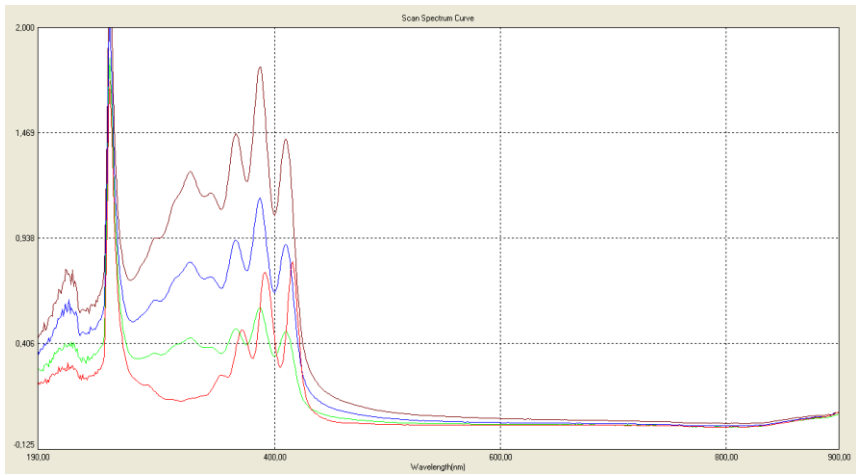
Şəkil 3.1.1.-də DMSO-nun udma spektri göstərilmişdir. Şəkil 3.1.1.-dən görüldüyü kimi DMSO-nun udma spektri yaxın UB udma oblastında özünü göstərir. DMSO-nun udma spektri 222 – 224 nm arasında özünü göstərir.



Şəkil 3.1.1. DMSO-nun UB diferensial udma spektri

PA-in əsas xüsusiyyəti ondadır ki, onlar üç maksimumla fərqlənən udma spektri yaradır. Levorin və Amfoterisin B spektrləri də üç əsas udma spektrləri ilə fərqlənir. Antibiotiklərin udma spektrləri 370 nm-430 nm aralığında dəyişir. UB-udma spektrləri polienlərin bu sinfə aid olan xarakterik spektrini və onların bioloji aktiv olmasını əks etdirir.

Amfoterisin B və levorinin kompleks şəklində fiziki-kimyəvi xassələri və onların konsentrasiyasından asılılığı müxtəlif nisbətlərdə öyrənilmişdir. Şəkil 3.1.2-də levorin və Amfoterisin B-nin müxtəlif konsentrasiyalarda UB udma spektri göstərilib.⁵ Şəkil 3.1.2.-də qırmızı əyri 3 ml DMSO həcmində küvetə daxil edilmiş 0,3 ml qatılıqda levorin ilə, mavi əyri 3 ml DMSO həcmində küvetə daxil edilmiş 0,2 ml qatılıqda levorindən, yaşıl əyri 3 ml DMSO həcmində küvetə daxil edilmiş 0,1 ml qatılıqda levorindən, parlaq qırmızı xətt isə 3 ml DMSO həcmində 0,01 ml amfoterisin B qatılığında alınmışdır.



Şəkil 3.1.2. Müxtəlif qatılıqda levorin və Amfoterisin B-nin UB udma spektrləri

⁵ T.C. Pashazade., X.M. Gasimov. Investigation of the interaction of polyene antibiotics with cholesterol // Journal of Life Sciences & Biomedicine, - 2021, v. 3(76), No 1, -p. 77-83.

Şəkil 3.1.2-dən də göründüyü kimi, antibiotiklərin qatılığı artdıqca ultrabənövşəyi udma spektrlərinin maksimumu da artır.

3.2. UB spektroskopiya üsulu ilə xolesterinin polienlərlə yaratdığı kompleksin tədqiqi

Xolesterin və ya digər sterinlərin PA su məhluluna əlavə edilməsi antibiotikin UB udma spektrinin azalmasına gətirib çıxarır, bu da xolesterinli PA kompleksinin yaranmasının nəticəsi olur. Sterinlərin mövcudluğu polienlərin udma maksimumunun dalğa uzunluğunu dəyişmir, yalnız udma maksimumunu dəyişir. PA-in xolesterinlə qarşılıqlı təsirinin effektivliyinə görə aşağıdakı sırada yerləşirlər: filipin > Amfoterisin B > etruskomisin > pimarisin > nistatin.⁶

Sterinlərin strukturu bir çox halda onların polienlərlə qarşılıqlı təsirinin effektivliyini müəyyən edir. Belə ki, tərkibində 3β -OH qrupu olan sterinlər polienlərə qarşı daha effektivdir nəinki tərkibində 3α -OH və ya 3-ketoqrup olan sterinlər. Polienlərin sterinlərlə qarşılıqlı təsirinin əsasında antibiotikin C_{17} karbon atomunun sterin molekuluğunun 3β -OH qrupu ilə hidrogen rabitəsi yaratması durur.⁷

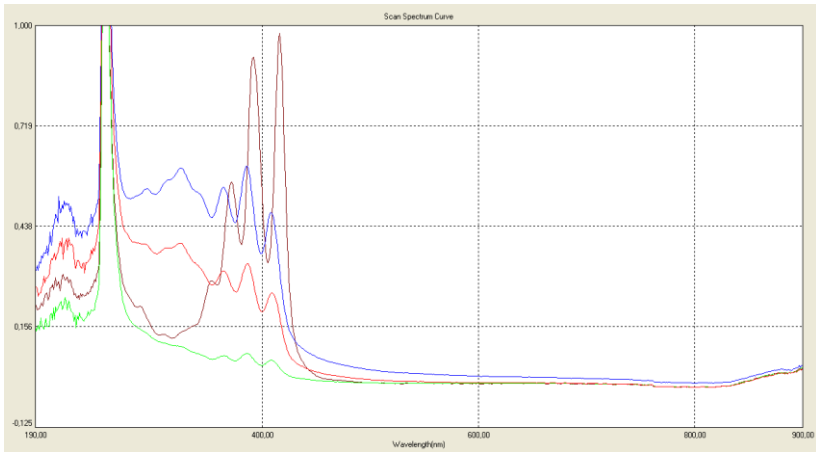
Şəkil 3.2.1-də Amfoterisin B-nin xolesterinlə qarşılıqlı əlaqəsi zamanı alınan udma spektrləri göstərilmişdir. Burada: tünd qırmızı xəttlə göstərilən spektr birinci kvarts küvetə 1 mq/ml DMSO-da həll olunan Amfoterisin B məhlulundan 0,03 ml həcmində götürülən Amfoterisin B 3 ml DMSO-ya əlavə edilməsi ilə; mavi xəttlə göstərilən spektr birinci kvarts küvetə 1 mq/ml DMSO-da həll olunan Amfoterisin B məhlulundan 0,03 ml həcmində götürülən Amfoterisin B və 0,5 mq etanolda həll olunmuş xolesterin 3 ml DMSO-ya əlavə edilməsi ilə;

⁶ Turkan Pashazade. The properties and clinical use of Polyene Antibiotics // Khazar Journal of Science and Technology, - 2023, v. 7, No 1, - p. 5-13.

⁷ Pashazade T.C. Biological Activity of Polyene Antibiotics and Their Use in Improving the Environment // International Journal of Science and Research (IJSR), -2022, v. 11, No.10, -p. 73-78.

açık qırmızı xəttlə göstərilən spektr isə birinci kvars küvetə 1 mq/ml DMSO-da həll olunan Amfoterisin B məhlulundan 0,03 ml həcmində götürülən Amfoterisin B və 1 mq etanolda həll olunmuş xolesterin 3 ml DMSO-ya əlavə edilməsi ilə;

yaşıl xəttlə göstərilən spektr isə birinci kvars küvetə 1 mq/ml DMSO-da həll olunan Amfoterisin B məhlulundan 0,03 ml həcmində götürülən Amfoterisin B və 2 mq etanolda həll olunmuş xolesterin 3 ml DMSO-ya əlavə edilməsi ilə alınmışdır. Hər bir spektr alınarkən ikinci kvars küvetdə 3 ml həcmində etanol məhlulu olmuşdur.

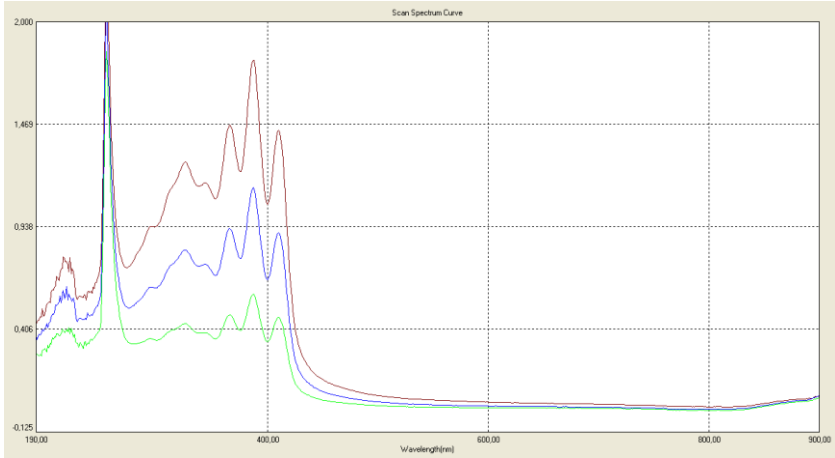


Şəkil 3.2.1. Amfoterisin B-nin xolesterinlə qarşılıqlı təsirindən yaranan komplekslərin UB udma spektrləri

Şəkil 3.2.2-də Levorinin xolesterinlə qarşılıqlı təsiri nəticəsində alınan UB udma spektrləri göstərilib.⁸ Burada: tünd qırmızı xəttlə göstərilən spektr birinci kvars küvetə 1 mq/ml DMSO-da həll olunan levorin məhlulundan 0,03 ml həcmində götürülən levorin 3 ml DMSO-ya əlavə edilməsi ilə; mavi xəttlə spektr birinci kvars küvetə 1 mq/ml DMSO-da həll olunan levorin məhlulundan 0,03 ml həcmində götürülən levorin və

⁸ Pashazade T.C., Study of physical and chemical properties of ion channels created by polyene antibiotics in lipid membranes // Advances in Biology & Earth Sciences, - 2022, v. 7, No.2, - p.128-134

0,5 mç etanolda həll olunmuş xolesterin 3 ml DMSO-ya əlavə edilməsi ilə;
yaşıl xətt - birinci kvarts küvetə 1 mç/ml DMSO-da həll olunan levorin məhlulundan 0,03 ml həcmində götürülən Amfoterisin B və 1 mç etanolda həll olunmuş xolesterin 3 ml DMSO-ya əlavə edilməsi ilə alınmışdır. Hər bir spektrin alınması zamanı ikinci kvarts küvetdə 3 ml həcmində etanol məhlulu olmuşdur.



Şəkil 3.2.2. Levorinin xolesterinlə qarşılıqlı təsiri nəticəsində alınan komplekslərin UB udma spektrləri

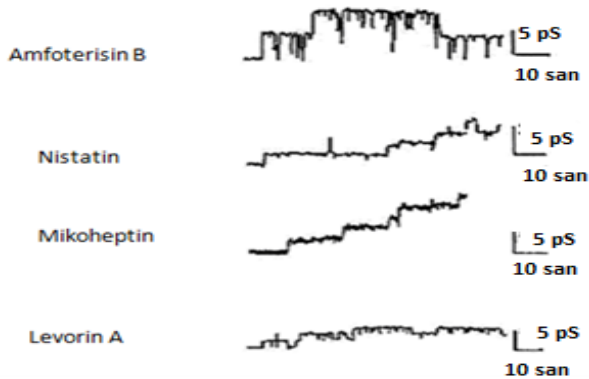
Amfoterisin B və levorin xolesterinlə kompleks yaradaraq UB udma spektrlərinin maksimumunu aşağı salır (şəkil 3.2.1. və şəkil 3.2.2.). Xolesterinin artan miqdarı UB udma spektrlərinin maksimumunu daha da aşağı salır. Xolesterinlə PA qarşılıqlı təsirinə spesifikliyini nəzərə alaraq, biz bu fikiri irəli sürmüşük ki, bioloji və lipid membranlarında xolesterinin miqdarını təyin etmək üçün polien antibiotiklərini flüoressensiya nişanı kimi istifadə etmək mümkündür.⁹

⁹ Pashazade T.C. Analysis of spectral characteristics of certain polyene antibiotics in the presence of DMSO and cholesterol (Анализ спектральных характеристик некоторых полиеновых антибиотиков в присутствии ДМСО и холестерина) /

3.3. Antibiotiklərin lipid membranlarına təsiri

Polien molekullarının lakton halqasının quruluşundan asılı olaraq ion kanallarının xüsusiyyətlərini təhlil etmək üçün fosfolipidlərin xolesterinlə qarışığından alınan lipid membranlarında tədqiqatlar aparılmışdır və nəticələr Amfoterisin B, nistatin və mikoheptinlə alınan kanalların xüsusiyyətləri ilə müqayisəli şəkildə göstərilmişdir (şəkil 3.3.1.).¹⁰

Bu antibiotiklərin molekulları yalnız lakton halqanın strukturu ilə fərqlənir. Polienlərin heptaen zənciri, məs. Amfoterisin B və mikoheptin üçün eynidir, nistatin molekulunda polien zəncirinin daxilində bir qoşa rabitəsi hidrogenləşdirilmişdir (tetraen). Lakton halqanın hidrofily zənciri hər üç antibiotik üçün fərqlidir. Hidrofil qrupların yalnız yerləri fərqlidir. Mikoheptində, əlavə olaraq, bir hidroksil qrupu bir karbonil qrupu ilə əvəz olunur.



Şəkil 3.3.1. PA-nın iştirakı ilə lipid membranlarında vahid ion kanallarının yazısı

Vahid ion kanalların alınmasında Amfoterisin B-nin qatılığı $2 \cdot 10^{-8}$ M, nistatinin $1 \cdot 10^{-7}$ M, mikoheptinin $2 \cdot 10^{-8}$ M və levorinin qatılığı isə $5 \cdot 10^{-9}$ M-dur. Heptanda həll olunmuş fosfolipidlərin və

Sultanova G.G., Kasumov Kh.M. // Антибиотики и Химиотерапия, - Россия: -2023. т. 68, № 11-12, -с.10-18.

¹⁰ Pashazade T.C. The action of nystatin and amphotericin B on the thin lipid membranes, Действие нистатина и амфотерицина В на бислоиные липидные мембраны // VI Biophysical Congress, - Russia, Sochi, - 2019, v. 1, - p. 178-179.

xolesterinin 20:1 çəki nisbətində götürülmüş mayedən membranlar alınmışdır. 2 M KCl sulu məhlulunda pH 7.0, $t = 22^{\circ}\text{C}$ şəraitində membran potensialı 200 mV təşkil edirdi.

Amfoterisin B kanalı ən yüksək keçiriciliyə malikdir (6.5 pS). Nistatin kanalı daha aşağı keçiriciliyə malikdir (2 pS). Mikoheptin kanalı minimal keçiriciliyi (0,5 pS) nümayiş etdirir. Levorin kanalının keçiriciliyi daha da aşağı (0.2-0.3 pS) olur.

3.4. Amfoterisin B alkil törəmələrinin membranda qalma zamanının təyini

PA-nin bioloji effektivliyini səciyyələndirən parametrlərdən biri antibiotiklərin induksiya olunan keçiricilik səviyyəsi və BLM-dən antibiotikin yuyulması zamanı keçiriciliyinin daimi sabit vaxtı ilə ölçülür. Tədqiqat işlərində amin və karboksil qrupları üzərində modifikasiya olunmuş Amfoterisin B və onların alkil törəmələri, levorin və onların alkil törəmələri istifadə edilmişdir. Amfoterisin B alkil törəmələrinin konsentrasiyasını on dəfə artırmaqla membranın keçiriciliyi bir neçə dəfə artırılmasını müşahidə etmək mümkündür.

İnduksiya edilmiş keçiriciliyin relaksasiyası 100-1000 arasında dəyişməsi baş verir. Beləliklə, PA-nın bioloji effekti onun konsentrasiyası ilə geniş çərçivədə tənzimlənə bilər.

Antibiotikin membrandan yuyulması zamanı, membranın antibiotikdən keçiriciliyinin effektivliyi və sabit relaksasiya vaxtı membranın sterin tərkibindən çox asılıdır. Sabit relaksasiya vaxtının əhəmiyyətli dərəcədə azaldılması ilə Amfoterisin B-nin alkil törəmələrinin toksiklik dərəcəsi aşağı düşür (Cədvəl 3.4.1.).¹¹

Tədqiq edilmiş törəmələr tez bir zamanda xolesterin tərkibli membranlardan yuyulur, lakin erqosterin tərkibli membranlardan antibiotiklər yavaş-yavaş yuyulur. Metamfosin müqayisəli şəkildə 10

¹¹ Пашазаде Т.Д., Касумов Х.М. Свойства ионных каналов, образованных при одностороннем действии амфотерицина и N-метилпроизводного амфотерицина В в бислойных липидных мембранах // Ж. Биофизика, -2021, т. 66, № 3. - с. 504-510.

dəfə təbii amfoterisindən daha az toksikdir. Bu da, membrandan metafosinin tez çıxma dərəcəsi ilə bağlı ola bilər.¹²

Bu sürətin qiymətləndirilməsi üçün Amfoterisin B alkil törəmələrinin membranın tərkibindən çıxması vaxtı tədqiq edilə bilər. Bunun üçün keçiriciliyin relaksasiya metodu istifadə edilir. Hidrokarbon zəncirinin bir CH₂ qrupunun uzadılması təxminən 4 dəfə sabit relaksasiya vaxtını azaldır.¹³

Bu asılılığın təbii amfoterisinə uyğun olan n=0-a ekstrapolyasiya edilməsi $\tau=160$ saniyə ölçüsünü verir. Karbohidrogen zəncirinin müxtəlif uzunluğu olan alkil törəmələri ilə membranları induksiya edərək - R = CH₃-metil; R = C₂H₅ - etil; R = C₃H₇ - propil; R = C₄H₉ - butil; R = C₅H₁₁ - amil membranlarda antibiotiklərin yaşama müddətini təyin etmək mümkün olur. Cədvəl 3.4.1.-də membranın bir tərəfindən amfoterisinin alkil törəmələrin yuyulmasında BLM keçiriciliyinin sabit relaksasiya zamanı (τ_r) təyin edilmişdir.

Xolesterini membranlarda erqosterinlə əvəz etdikdə sabit relaksasiya zamanı (τ_r) dramatik şəkildə artır. Antibiotikin sabit konsentrasiyası olduğu zaman xolesterin tərkibli membranlarda keçiricilik qabiliyyətinin dəyişməsini 40-50 dəqiqə ərzində müşahidə etmək mümkün olmur.

Təsvir edilən məlumatlar, amfoterisin B və levorinin alkil törəmələrinin erqosterin tərkibli göbələk hüceyrələrinə yüksək və effektiv təsiri olduğunu göstərir.

¹² Пашазаде Т.Д., Касумов Х.М. Свойства ионных каналов, образованных при одностороннем действии амфотерицина и N-метилпроизводного амфотерицина В в бислоидных липидных мембранах // Ж. Биофизика, -2021, т. 66, № 3. - с. 504-510.

¹³ Пашазаде Т.Д. Поиск мембраноактивных препаратов на основе алкильных производных амфотерицина В для профилактики растительных инфекций // Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям. Материалы девятой Международной научно-практической конференции Полтава. (Medicinal Herbs: from Past Experience to New Technologies Proceedings of Ninth International Scientific and Practical Conference) -2021, - с. 139-141.

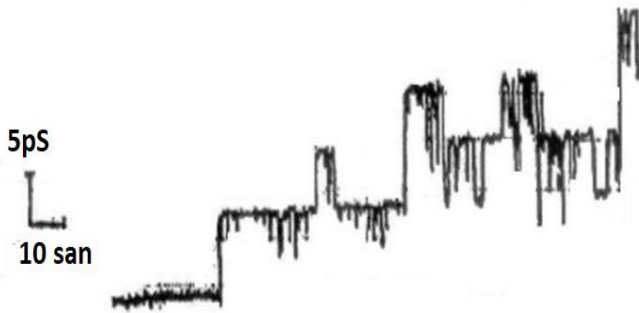
Cədvəl 3.4.1.

**Membranın bir tərəfindən amfoterisinin alkil törəmələrin
uyulmasında BLM keçiriciliyinin sabit relaksasiya zamanının
(τ_r) təyini**

Antibiotik	Membranın tərkibi	Konsentrasiya, M	pH	Zaman, dəq.	Qeydiyyat
Metamfosin	Etqosterin: fosfolipid = 0,05	$3 \cdot 10^{-7}$	7,0	30	30 dəqiqə ərzində keçiricilik dəyişikliyi qeydə alınmayıb.
Etamfosin	«-----»	$1,5 \cdot 10^{-7}$	7,0	-	30 dəqiqə ərzində keçiricilik dəyişikliyi qeydə alınmayıb.
Propamfosin	«-----»	$3 \cdot 10^{-7}$	7,0	-	30 dəqiqə ərzində keçiricilik dəyişikliyi qeydə alınmayıb.
Butamfosin	«-----»	$3 \cdot 10^{-7}$	7,0	-	50 dəqiqə ərzində keçiricilik dəyişikliyi qeydə alınmayıb.
Amfoterisin B	Xolesterin fosfolipid = 0,5	$5 \cdot 10^{-7}$	7,0	160	Keçiricilik dəyişikliyi qeydə alınmayıb
Metamfosin	«-----»	$5 \cdot 10^{-7}$	7,0	38	
Etamfosin	«-----»	$5 \cdot 10^{-7}$	7,0	84	
Propamfosin	«-----»	$5 \cdot 10^{-7}$	7,0	0,46	
Amfoterisin B*	«-----»	$3 \cdot 10^{-6}$	3,0	-	30 dəqiqə ərzində keçiricilik dəyişikliyi qeydə alınmayıb.
Metamfosin *	«-----»	10^{-6}	3,0	10,6	
Butamfosin *	«-----»	10^{-5}	3,0	5,1	19°C
Butamfosin *-	«-----»	10^{-5}	3,0	2,6	27°C

3.5. Antibiotiklərin birtərəfli təsiri nəticəsində yaranan ion kanallarının xüsusiyyətlərinin tədqiqi

Amfoterisin B 10^{-6} M qatılığında olduğu zaman membranın hər iki tərəfinə daxil edərkən membranların keçiriciliyinin (elektrodların keçiriciliyinə qədər) kəskin artması müşahidə edilmişdir. Araşdırmalar göstərir ki, Amfoterisin B $5 \cdot 10^{-4}$ M qatılığında xolesterin olan membranların bir tərəfinə daxil edərkən membranın keçiriciliyi uzun müddət dəyişməmiş qalmışdır (≥ 1 saat). Lakin, Amfoterisin B xolesterin olan membranların bir tərəfində olduqda və membranların tərkibində fosfolipid 10 mq/ml və pH 3,0 aşağı olan zaman ətraflı tədqiq edilmiş və bu zaman ion kanallarının fəaliyyəti tədqiq edilmişdir və membranların yüksək keçiriciliyi tədqiqat işlərində özünü göstərmişdir. Amfoterisin B $2 \cdot 10^{-8}$ M konsentrasiyasında membranın bir tərəfinə daxil edən zaman membranda ion kanallarının yaranmasına gətirib çıxartmışdır. Şəkil 3.5.1-də Amfoterisin B membranın bir tərəfində olduğu zaman yaranan tək ion kanallarının qeydiyyatı göstərilir. Təcrübələr pH 3.0, $t=22^{\circ}\text{C}$ şəraitində 2 M KCl məhlulunda membran potensialı +200 mV ilə aparılıb və membranın tərkibi isə 1 mq heptanda 10 mq fosfolipid və 4 mq xolesterindən ibarətdir. Şəkil 3.5.1.-də tək vahid ion kanalların işləmə dinamikası göstərilib.



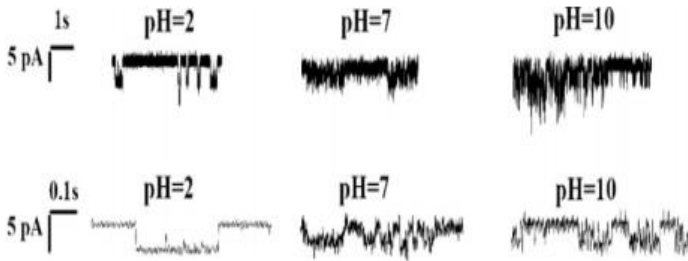
Şəkil 3.5.1. Amfoterisin B-nin $2 \cdot 10^{-8}$ M qatılığında membrana təsiri nəticəsində membranın bir tərəfində formalaşan tək ion kanallarının işləmə dinamikası

2 pS-dən 20 pS-ə qədər tək kanalların keçiriciliyinin böyük bir dispersiyası görünür. 7 pS-dən - 10 pS-ə qədər olan kanallar ən yüksək ehtimalı ilə görünür. Kanalların yığılma vaxtı membranın elektrik sahəsinin ölçüsündən və istiqamətindən asılı deyil. Amfoterisin B-nin birtərəfli tədqiqi zamanı membranların seçici keçiriciliyi təyin edilmişdir və göstərilmişdir ki, membranın seçici keçiriciliyi əsasən anionalar üçündür və membranda xolesterinin qatılığından asılı deyil.

Xolesterinlə zəngin membranın pH=3 keçiriciliyinin Amfoterisin B konsentrasiyasından həm də metamfosinin neytral pH-da konsentrasiyasından bir tərəfli modifikasiyası zamanı membranın keçirici əmsalı eyni $n=4$ dərəcəsini göstərir. Metamfosinin birtərəfli modifikasiyası zamanı membranların seçici keçiriciliyi əsasən anionalar üçündür və membranda xolesterinin konsentrasiyasından asılı deyildir.

Digər təcrübə isə Amfoterisin B antibiotikinin pH –dan asılı olaraq ikiqat lipid membranının xüsusiyyətlərinə təsirini və yaranan vahid ion kanallarının xüsusiyyətlərini öyrənməklə bağlı olmuşdur (şəkil 3.5.2.). İkiqat lipid membranlarının sis və trans tərəfindəki pH eyniləşdirilmişdir və pH 7 götürülmüşdür. pH HCl və ya KOH az miqdarda konsentrasiyalı məhlulların əlavə edilməsi ilə tənzimlənmişdir. 40 və 20 voltda pH membranın sis tərəfində 6-ya endirildikdən sonra tək kanalın cərəyan amplitududası azaldı, tək kanalın cərəyan amplitudası pH-ı sis tərəfdə 7-dən 8-ə artırıqda dəyişmədi. pH 7 və 8 üçün keçiricilik müvafiq olaraq 500 və 560 pS idi. Sis tərəfdə pH 6-a qədər azalması ilə tək kanal keçiriciliyi 250 pS-ə düşdü. pH 6, 7 və 8-də müvafiq olaraq trans tərəfdəki potensial 35, 36 və 40 mV idi. Göründüyü kimi trans tərəfdə kanalın açıq olma ehtimalı pH 7 və 8-də 40 mV-dan yuxarı olan potensialda artmışdır; sis tərəfdə pH-ın 6-ya endirilməsi ilə bütün gərginliklərdə kanalın açıq olma ehtimalı azalmışdır və bunu da AmB kanalında məsamənin mexaniki daralması ilə izah edirik.¹⁴

¹⁴ Pashazade T.C., Study of physical and chemical properties of ion channels created by polyene antibiotics in lipid membranes // *Advances in Biology & Earth Sciences*, - 2022, v .7, No.2, - p.128-134.



Şəkil 3.5.2. Bimolekulyar lipid membranlarında Amfoterisin B-nin yaratdığı vahid ion kanallarının tipik cari qeydləri, membranın sis tərəfində bufer məhlullarda müxtəlif pH qiymətlərində potensialları

3.6. Bakteriya və bakteriya membranı üzərində aparılan təcrübələr

Bakterial membran canlı hüceyrə modelinə bioloji cəhətdən uyğundur və antibiotikləri sınaqdan keçirməyə daha yaxşı kömək edə bilər.¹⁵

1 mq/ml levorin *E.coli*-yə antimikrob təsiri göstərir, 1 mq/ml Amfoteritsin B ilə təsir etdikdə 30 və 60 dəqiqəlik ekspozisiya müddətində antimikrob təsiri olmasa da, 120 və 180 dəqiqəlik ekspozisiya müddətində antimikrob təsiri göstərib. 1 mq/ml Amfoteritsin B-nin tünd rəngli maddəsi ilə təsir etdikdə bütün ekspozisiya müddətlərində antimikrob təsiri göstərir. 10 mq/ml Amfoteritsin B ilə təsir etdikdə bütün ekspozisiya müddətində antimikrob təsiri göstərir. 10 mq/ml levorin bütün ekspozisiya müddətlərində antimikrob təsiri göstərib. Karbolevorin və İzolevorin bütün ekspozisiya müddətlərində antimikrob təsiri göstərib.

Ps.aeruginosa-ya 1mq/ml levorinlə təsir göstərdikdə 30 və 60 dəqiqə ekspozisiya müddətlərində antimikrob təsiri göstərməyib, 120

¹⁵ Pashazade T.C., Sultanova G.H. Effect of Polyene Antibiotics on a bacteria and bacterial membrane // International Autumn school of young scientist dedicated to the year of Heydar Aliyev - Baku – 2023, -p. 104-105.

və 180 dəqiqə ekspozisiya müddətlərində isə antimikrob təsiri göstərib. 1 mq/ml Amfoteritsin B ilə təsir göstərdikdə 30 və 60 dəqiqə ekspozisiya müddətlərində antimikrob təsiri göstərməyib, 120 və 180 dəqiqə ekspozisiya müddətində isə təsir edib. Amfoteritsin B-nin 1 mq/ml tünd rəngli məhlulunda, 10 mq/ml Amfoteritsin B və 10 mq/ml levorin, karbolevorin və izolevorinlə təsir etdikdə bütün ekspozisiya müddətlərində antimikrob təsiri göstərib.

St.aureus-a 1 mq/ml levorinlə təsir etdikdə 30 dəqiqə müddətində antimikrob təsiri yoxdur. 60 və 120 dəqiqə ekspozisiya müddətində bakteriostatik təsir göstərib. 180 dəqiqə müddətində isə mikrob hüceyrələri yenidən inkişaf edib çoxalma getmişdir. 1 mq/ml Amfoteritsin B ilə təsir göstərdikdə 30, 60, 120 dəqiqə müddətində təsir göstərməyib ancaq 180 dəqiqə ekspozisiya müddətində isə antimikrob təsiri göstərib. Amfoteritsin B-nin 1 mq/ml tünd rəngli məhlulu, 10 mq/ml levorin, 10 mq/ml Amfoteritsin B-nin bütün ekspozisiya müddətlərində təsir göstərib. Ancaq karbolevorin və izolevarin isə heç bir təsir göstərməyib.

C.albicans-a 1 mq/ml levorin, 1 mq/ml Amfoteritsin B, Amfoteritsin B-nin 1 mq/ml tünd rəngli məhlulu, 10 mq/ml levorin və izolevorin bütün ekspozisiya müddətlərində təsir göstərib. Karbolevorinlə təsir zamanı isə 30 dəqiqə müddətində heç bir təsiri olmadığı halda 60, 120 və 180 dəqiqə müddətlərində təsir göstərib.

Təcrübələrdən görə bilərik ki, 10 mq/ml Amfoteritsin B, 10 mq/ml levorin, 1 mq/ml Amfoteritsin B ən yaxşı antimikrob təsiri göstərən maddələrdən biridir. Kontrol test kultura üçün götürülmüş DMSO özü də antimikrob xassəsinə malikdir.

Gəlin əvvəlcə *Ps.aeruginosa* üzərində aparılan təcrübələri daha geniş nəzərdən keçirək. AmB *Ps.aeruginosa*-ya antimikrob təsiri göstərir və AmB-nin dozasından və zamandan asılı olaraq effektivliyi yəni letal effekt daha da artır (Cədvəl 3.6.1.).

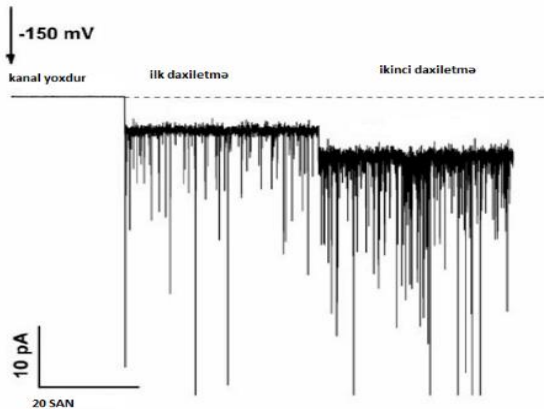
BLM də ion kanalının yenidən qurulması metodikasından istifadə edərək, *Ps.aeruginosa*-da AmB polien antibiotikinə kanal əmələ gətirmə fəaliyyətini araşdırdıq, bunu antibiotiki iki fərqli formada – həm bir tərəfli həm də ikitərəfli daxil etməklə öyrəndik. Tək tərəfli daxilətmədə biz yaxşı müəyyən edilmiş keçiricilik səviyyələri olan hər hansı kanalın əmələ gəlməsini aşkar edə

bilmədik. Biz yalnız nadir halda kanal meydana gəlməsini gördük. Bununla belə, AmB-ni müxtəlif konsentrasiyalarda daxil etdikdə təkrarlanan keçiriciliyə malik kanalların yarandığını müşahidə etdik. Tək AmB kanallarının ion keçiriciliyi öyrənərkən kanalın qısa müddətə tam açıq vəziyyətə keçdiyini aşkar etdik. Zamanın asılı olaraq müxtəlif səviyyəli-aşağı, orta və yüksək keçiriciliyə malik kanalların yarandığını müşahidə etdik (Şəkil 3.6.2.).

Cədvəl 3.6.1.

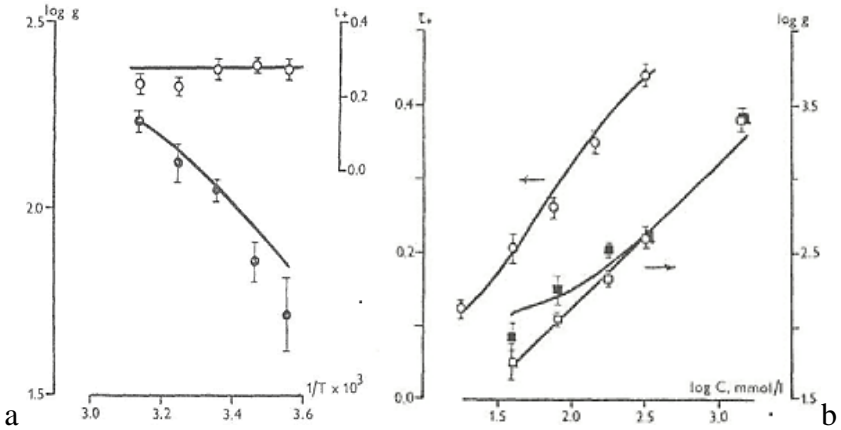
Amfoteritsin B-nin dozasından asılı olaraq *Ps.aeruginosa* hüceyrələrinin sağqalma faizi

Amfoteritsin B-nin istifadə olunan dozası, mq/ml	Sağ qalanlar %-lə
20	39.4±24.3
5	59.1±20.1
1	86.7±19.3
0.2	90.6±19.1
Kontrol	100±16.2



Şəkil 3.6.1. 1,5 ml DMSO-lu məhlula 50 mq AmB əlavə edilməsindən sonra membranda əldə edilən tipik ion cərəyanının qeydi

St.aureus-da yaranan AmB kanalı neytral pH-da əsasən anion-selektiv görünür və aşağı pH-da həm kanal keçiriciliyi, həm də anion seçiciliyi artır. Artan antibiotik konsentrasiyası cərəyan gərginliyi xarakteristikasının xətti asimetriyasına və seçiciliyin itirilməsinə səbəb olur. Daha yüksək temperatur və pH elektrik keçiriciliyindəki dəyişikliklərlə paralel olaraq kanal keçiriciliyini artırır, lakin seçiciliyi dəyişmir (Şəkil 3.6.3.).

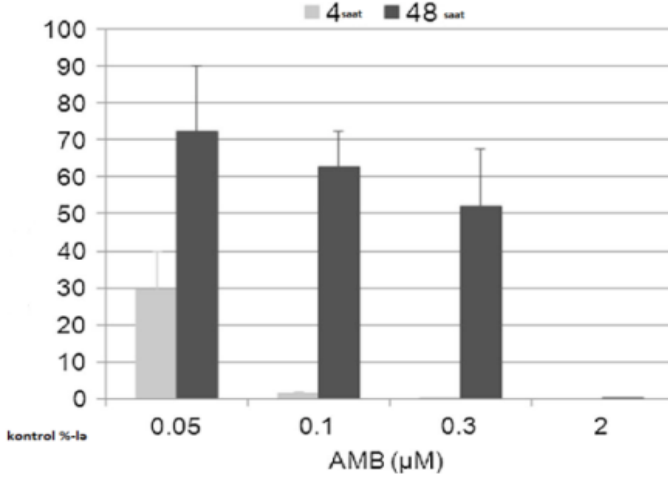


Şəkil 3.6.2. Temperaturun (a) və AmB-nin aktivliyinin (b) *St.aureus*-dakı AmB kanalların keçiriciliyinə və kation-anion seçiciliyinə təsiri (pH=7,5)

Candida albicans bakterial membranı üzərində aparılan tədqiqatlar aşağıdakı qrafiklərdə öz əksini tapmışdır.

Candida albicans-la aparılan tədqiqat göstərdi ki, 0,05 və 0,1 mM AmB tətbiqi müqavimətinin azalmasına səbəb olub. Bu membranın sıxlığının azalması ilə əlaqələndirilə bilər. 0,05 mM konsentrasiyasında tətbiq olunan AmB həmçinin kanallarının sayının azalmasına səbəb oldu, lakin onların açıq olma ehtimalını əhəmiyyətli dərəcədə dəyişmədi. AmB müxtəlif konsentrasiyalarda *C.albicans* hüceyrələrinin sayının sürətlə azalmasına səbəb olmadı. Bununla belə, çoxalma qabiliyyətinin əhəmiyyətli dərəcədə itirilməsi

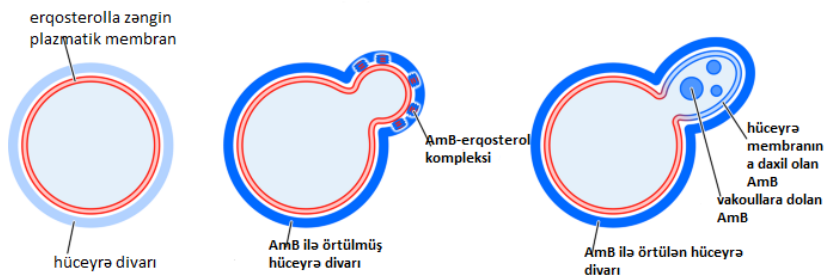
və çoxsaylı morfoloji və fizioloji pozğunluqlar, o cümlədən sitoplazmanın kiçilməsi, və oksidləşdirici stress baş verdi (Şəkil 3.6.4. və Şəkil 3.6.5.).



Şəkil 3.6.3. AmB ilə təsir göstərilən nəzarət kulturmasının çoxalma qabiliyyəti

C.albicans kulturmasının amfoterisin mühitdə B artan qatılığı ilə dəfələrlə yetişdirilməsi zamanı Amfoterisin B təsirinə davamlı olan ştam ayrılmışdır. Həm də aydın oldu ki, həssas ştamda bakteriya membranları üçün xarakterik olan erqosterin əvəzinə rezistent ştam hüceyrələrində 212-242 nm sahədə hopdurulan və PA ilə qarşılıqlı əlaqədə olmayan heterogen sterin komponent var. Ştam 50 mkq/ml Amfoterisin B-ə qarşı, 5 mkq/ml levorinə qarşı qarşı dayanıqlıdır. Amma *C.albicans* PA-ə qarşı antibiotikin zəif qatılığı zamanı az dayanıqlılığa malik idi: Amfoterisin B (0.35 mkq/ml), levorin (0.15 mkq/ml). Rezistent ştam hüceyrələri morfoloji xüsusiyyətinə görə ilk kulturadan fərqlənmiş və antibiotiksiz mühitdə az miqdarda biokütlə yaradırlar.

Candida albicans

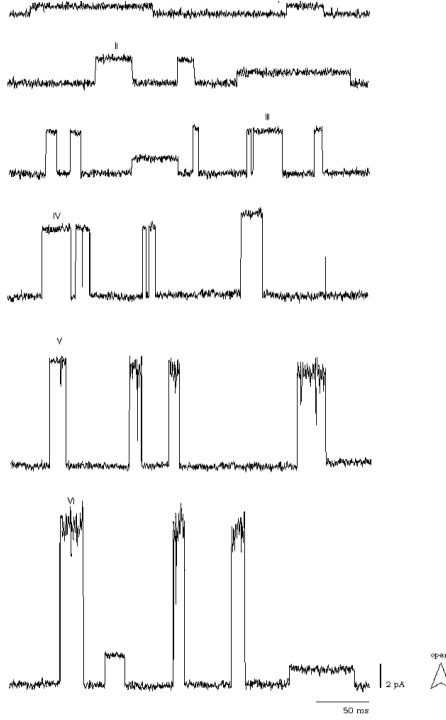


Şəkil 3.6.4. Amfoteritsin B-nin *Candida albicans*a təsir etmə modeli

Bundan əlavə *E. coli* -nin membranlarında tək ion kanallarının bir sıra parametrləri öyrənilmişdir.

AmB kanallarının altı növünü təsnif etməyə imkan verən yaxşı müəyyən edilmiş keçiricilik spektri müşahidə etdilmişdir. Təcrübə 2 M KCl və 1 mM CaCl₂ bufer məhlullarında, pH 8.0, 200 mV-da aparılmışdır. Bu müxtəlif keçiriciliklər tək bir AmB kanalının alt halları kimi təyin edilə bilməz. Bunun səbəbi odur ki, üst-üstə düşən keçiriciliyə malik kanallar çox nadir hallarda müşahidə edildi və bu AmB-nin konsentrasiyasından güclü şəkildə asılı olub hadisələrin müstəqil olduğunu göstərir. I kanal üçün keçiricilik 1.5 ilə 4.2 pS arasında; kanal II üçün 4.3-dən 12.5 pS-ə qədər; kanal III üçün 12,6 ilə 25,0 pS; kanal IV üçün 25.1 - 47.5 pS; kanal V üçün 45,6 - 58,0 pS; və kanal VI üçün 58.1 - 75.0 pS arasında dəyişir (Şəkil 3.6.6.).

Kanalların yaşama müddəti temperaturdan bir qədər asılıdır, lakin üç aşağı keçiricilik kanalı üçün hər iki membrana xolesterol əlavə edildikdə membran keçiriciliyində əhəmiyyətli dərəcədə azalma oldu. Bu, şübhəsiz ki, tezliyin artması ilə əlaqədardır. Böyük keçiriciliyə malik kanal qısa ömürlü idi. Xolesterolun əlavə edilməsi aşağı keçiriciliyə malik kanallarının meydana gəlməsini nəzərəcarpacaq dərəcədə azaldı. Erqosterolun əlavə edilməsi kanalların meydana gəlməsini artırdı. Xolesterolun əlavə edilməsi kanalların yaranmasına kömək etdi, lakin yaşama müddətlərini azaltdı. Temperaturun azalması oxşar davranış yaratdı, lakin bu dəfə kanalların açıq qalma müddəti artdı.



Şəkil 3.6.5. *E.coli*-nin membranlarında altı növ AmB kanalının tipik ion qeydləri

3.7. Polien antibiotiklərin COVID-19-un müalicəsində antiviral dərman kimi təklif olunması

PA virusların hüceyrəyə nüfuz etməsinə təsir göstərə və onların reproduktiv fəaliyyətinə maneə törədə bilər. Son zamanlar AmB və levorin antiviral maddə kimi tədqiqatlarda istifadə olunur. Laboratoriyamızda edilən təcrübələrə əsasən levorin kiçik konsentrasiyalarda (10^{-7} - 10^{-6} M) *Salmonella typhimurium* (I), *Salmonella typhimurium* (II), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* kimi göbələk və bakteriyalarla yanaşı həmçinin Koksaki A20 və ECHO 9 kimi virus əleyhinə təsirə malikdir. Levorinin viruslara təsiri insan embrionlarının fibroblastlarında öyrənilmişdir. İlkin hüceyrə

kulturasında lipid komponentləri ilə əlaqəyə girərək virusun inkişafı dayanır və mühitin sarı rəngli reaksiyası virusun inkişafının dayanmasına işarə edir. Levorinin eyni zamanda virus və göbələk infeksiyalarını məhv etmə qabiliyyətinə malikdir, buna görə də bioloji aktiv maddə kimi terapevtik məqsədlə istifadə edilə bilər.

Levorin kimi AmB-nin də laborator şəraitdə yuxarıda göstərilən bakteriya və göbələklərə qarşı təsirli olması göstərilib. Bununla yanaşı hal-hazırda bir çox tədqiqatlar insan immu çatışmazlığı virusu (HIV), herpes virusu (HSV), Yapon ensefaliti virusu, məxmərək virusu, hepatit B, enterovirus 71 də daxil olmaqla viruslara qarşı AmB törəmələrinin müxtəlif təsir mexanizmlərinə və potensial terapevtik təsirinə yönəlmişdir.

Ədəbiyyat məlumatları göstərir ki, AmB viral zülalların sintezinə və replikasiyasına maneə olmaqla virusların çoxalmasının qarşısını alır. Məlumatların təhlili digər viruslarda olduğu kimi AmB-nin COVID-19 virusunun da replikasiyasını və zülal sintezini dayandıra biləcəyini deməyə əsas verir. AmB-nin təsirinin öyrənilməsi və klinik sınaqlar zaman tələb etsə də, AmB-nin müxtəlif viruslara qarşı unikal xüsusiyyətləri və effektivliyi ilə bağlı əvvəlki tədqiqatların nəticələrinə əsaslanaraq, AmB-nin tək və ya kombinasiya rejimlərində tətbiqinin dərmanların yan təsirlərinin azaldılmasında, eyni zamanda COVID-19-a yoluxmuş xəstələrin yaxşılaşdırılmasında təsirli ola biləcəyini deyə bilərik.

3.8. Görülən işin nəzəri və praktiki əhəmiyyəti

Amfoterisin B nisbətən aşağı qatılıqda (0,2-3,7mkq/ml), insan, heyvan və bitkilərdə xəstəliklərə səbəb olan bir çox göbələklərin inkişafını dayandırır. Onun 0,03-1 mkq/ml qatılığı, göbələklər əleyhinə başqa antibiotiklərin yüksək dozasının təsir edə bilmədikləri *Cryptococens*, *Blastomyces*, *Histoplasma*-ya qarşı fəallıq nümunəsi göstərir. Amfoterisin B-nin təsirinə *Actinomyces*, *Nocardia* və ibtidailər də davamlılıq göstərirlər.¹⁶

¹⁶ Pasha-zade T.C. Pharmacology of amphotericin B // Eurasian Scientific Congress. First International Scientific and Practical Conference, - Barcelona, Spain, - 2020, - p. 33-38.

Amfoterisin B rifampisin və tetrasiklinlə kombinasiyalı tətbiqi onun göbələklər əleyhinə təsirini xeyli gücləndirir. Amfoterisin B rifampisinlə birləşmiş preparat forması *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidiodes*, *Immitis*, *Blastomyces*, *Dermatitidis* və başqalarına, tetrasiklinlə *Histoplasma* və *Capsulatum*-a qarşı birləşmiş formada tətbiqi sinergid əhəmiyyət kəsb edir. Amfoterisin B terapevtik qatılığı göbələklərə fungistatik təsir göstərir, fungisid təsiri *in vitro* mühitin pH 4,0 qatılığı 3 mkq/ml miqdarından bir az artıq götürüldükdə aşkara çıxır və təsiri 12 saatdan da çox olur.

Amfoterisin B-yə qarşı xəstəliyin törədicisində davamlılıq ləng inkişaf edir. Nistatin və digər göbələklər əleyhinə antibiotiklərlə birlikdə tətbiq edildikdə törədicidə ona qarşı çarpazlı davamlılıq müşahidə olunur. Mühitin pH-ı 5,5-7,0-yə çatdıqda optimal təsiri üzə çıxır. Bu antibiotikin fəallığı, mühitə sistein, maqnezium və kalsium ionları daxil edildikdə zəifləyir. Başqa polien antibiotiklər kimi Amfoterisin B də hüceyrənin tərkibində olan sterol ilə birləşdikdə onun göbələk hüceyrəsi membranına keçməsi zəifləyir.

Peroral tətbiq edilən Amfoterisin B bədənə pis sorulur. İşlədilən yüksək dozasının (3-7 q) qan zərdabında səviyyəsi 0,3-1,9 mkq/ml təşkil edir. Vena daxilinə 0,5-1 mk/kq hesabı ilə yeridilən preparatın qanda konsentrasiyası 2-3 mkq/ml olur, bu səviyyədə qanda ancaq 6-8 saat qala bilir. Amfoterisin B böyrəklərdə çox gec yəni tətbiq edilən dozasının 5%-i birinci 24 saat ərzində, 20-40% -i isə 7 gün ərzində xaric olunur.

Bizim apardığımız tədqiqat işində təklif etdiyimiz üsullar AmB-nin toksikliyi azaltmağa köməklik etməklə yuxarıda göstərilən xəstəliklərin effektiv müalicə olunması və yeni dərman preparatlarının yaradılması üçün geniş imkanlar yaradır.

NƏTİCƏLƏR

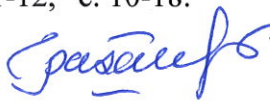
1. Bimolekulyar lipid membranlarında olduğu kimi bakteriya membranlarında da polien-xolesterin kompleksi əmələ gəldiyindən polien antibiotiklərinin təsiri altında membranın elektrik müqaviməti kəskin azalır.
2. Həm bimolekulyar lipid membranlarında, həm də bakteriyalarda yaranan Amfoterisin B kanalları neytral pH-da anionlar üçün seçici keçiriciliyə malikdir, lakin levorin kanalları karbonil və karboksil qruplarının sayından asılı olaraq kation daşıyıcılarıdır. Aşağı pH-da həm kanal, həm də ion seçiciliyi artır, lakin yüksək temperaturda isə kanal keçiriciliyi artsa da ion seçiciliyi dəyişmir.
3. Amfoterisin B kanallarının açıq olma müddəti həm bimolekulyar lipid membranlarında, həm də bakteriya membranlarında pH 7 və 8-də artıb, pH-ın 6-ya endirilməsi ilə azalıb, yaşama müddəti isə 3-5 millisaniyə təşkil edib. Polien antibiotiklərinin qatılığı kanalların açıq olma müddətinə təsir etməsə də, temperatur dəyişməsi təsir göstərir.
4. Amfoterisin B və levorin xolesterinin ikiqat rabitələri ilə birləşərək ultrabənövşəyi udma spektrlərinin maksimumunu aşağı salır.
5. Amfoterisin B-nin və levorinin alkil törəmələrinin uzunluğu artdıqca molekulların membranda qalma müddəti azalır.
6. Metamfosinlə təsir zamanı membran kanalları anionlar üçün seçici keçiriciliyə malikdir və membranda xolesterinin konsentrasiyasından asılı deyildir. Metamfosin membranın keçiriciliyinin neytral pH-da artmasına səbəb olur.
7. Karbolevorin və izolevorin 1 mq/ml və 10 mq/ml qatılığında 30 dəq-120 dəq müddətində *St.aureus*-a antimikrob təsiri göstərmir.

DISSERTASIYA MÖVZUSUNA AID ÇAP EDİLMİŞ ELMİ ƏSƏRLƏRİN SİYAHISI

1. **Pasha-zade T.J.** The action of ultrasound waves and polyene antibiotics on red blood cells hayemolysis / Kasumov Kh.M., Sultanova G.H., Qasimova V.Kh. // The reports of National Academy of Sciences of Azerbaijan, – Baku: – 2018. v. LXXIV. № 2, – p. 58-62.
2. **Пашазаде Т.Д.** Исследование структурно-функциональных взаимоотношений полиеновых макролидов в липидных мембранах и их прикладное значение / Гафар-заде М.Ф., Гусейнова И.М., Касумов Х.М. // Юбилейный съезд микологов России, Сборник трудов в Ж. "Успехи медицинской микологии", – Россия: – 2018. т. XVIII, – с. 185-187.
3. **Пашазаде Т.Д.** Сравнительный анализ механизма действия макроциклических полиеновых антибиотиков в борьбе с вирусными инфекциями / Багирова А.А., Гасимова В.Х. // Юбилейный съезд микологов России, Сборник трудов в Ж. "Успехи медицинской микологии", – Россия: – 2018. т. 18, – с. 226-229.
4. **Pashazade T.C.** Some experiment on bimolecular lipid membranes // АМЕА-nın Botanika İnstitutu və Azərbaycan Botaniklər Cəmiyyətinin akad.V.İ.Ulyanişşevin 120 illiyinə həsr edilmiş simpozium. -Bakı: – 2018, – s.82.
5. **Пашазаде Т.Д.** Действие химически трансформированных макроциклических полиеновых антибиотиков на опухолевые клетки / Вайнштейн В.А, Николаевич Л.Н., Султанова Г.Г., Багирова А.А. [и др.] // Журнал Экспериментальной биологии и медицины, -Москва, Россия: – 2019. т. 166, № 12, – с. 695-700. (T.J. Pashazade. The action of chemically transformed macrocyclic polyene antibiotics on tumor cells / V.A.Vainshtein, L.N. Nikolayevich, G.H.Sultanova, A.A. Baghirova [et al.] // J. Experimental biology and medicine, - Russia: – 2019. v. 166, № 6, – s. 735-738.)

6. **Pashazade T.C.** The action of nystatin and amphotericin B on the thin lipid membranes, Действие нистатина и амфотерицина В на бислойные липидные мембраны // VI Biophysical Congress, - Russia, Sochi, – 2019, v. 1, – p. 178-179.
7. **Pasha-zade T.C.** Pharmacology of amphotericin B // Eurasian Scientific Congress. First International Scientific and Practical Conference, - Barcelona, Spain, – 2020, – p. 33-38.
8. **T.C. Pashazade., X.M. Gasimov.** Investigation of the interaction of polyene antibiotics with cholesterol // Journal of Life Sciences & Biomedicine, – 2021, v. 3(76), No 1, – p. 77-83
9. **Пашазаде Т.Д., Касумов Х.М.** Свойства ионных каналов, образованных при одностороннем действии амфотерицина и N-метилпроизводного амфотерицина В в бислойных липидных мембранах // Ж. Биофизика, – 2021, т. 66, № 3. – с. 504-510.
10. **Пашазаде Т.Д.** Поиск мембраноактивных препаратов на основе алкильных производных амфотерицина В для профилактики растительных инфекций // Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям. Материалы девятой Международной научно-практической конференции Полтава. (Medicinal Herbs: from Past Experience to New Technologies Proceedings of Ninth International Scientific and Practical Conference) – 2021, – с. 139-141.
11. **Pashazade T.C.,** Study of physical and chemical properties of ion channels created by polyene antibiotics in lipid membranes // Advances in Biology & Earth Sciences, – 2022, v. 7, No. 2, – p. 128-134.
12. **Pashazade T.C.** Biological Activity of Polyene Antibiotics and Their Use in Improving the Environment // International Journal of Science and Research (IJSR), – 2022, v. 11, No. 10, – p. 73-78.
13. **Turkan Pashazade.** The properties and clinical use of Polyene Antibiotics // Khazar Journal of Science and Technology, – 2023, v. 7, No. 1, – p. 5-13.

14. **Pashazade T.C.** Research of the functional activity of polyene antibiotics in different crops / Sultanova G.H., Qasimova V.X. // Scientific-Practical Conference Modern Approaches in the study of the plant kingdom dedicated to the year of Heydar Aliyev, Baku – 2023, – p. 184-186.
15. **Pashazade T.C.,** Sultanova G.H. Effect of Polyene Antibiotics on a bacteria and bacterial membrane // International Autumn school of young scientist dedicated to the year of Heydar Aliyev - Baku – 2023, – p. 104-105.
16. **Pashazade T.C.** Analysis of spectral characteristics of certain polyene antibiotics in the presence of DMSO and cholesterol (Анализ спектральных характеристик некоторых полиеновых антибиотиков в присутствии дмсо и холестерина) / Sultanova G.G., Kasumov Kh.M. // Антибиотики и Химиотерапия, - Россия: – 2023. т. 68, № 11-12, –с. 10-18.



Dissertasiyanın müdafiəsi 30 may 2024-cü il tarixində saat 14:00-da Bakı Dövlət Universitetinin nəzdində fəaliyyət göstərən FD 2.31 Dissertasiya şurasının iclasında keçiriləcək.

Ünvan: Bakı Dövlət Universiteti (Akademik Zahid Xəlilov küçəsi, 33), əsas tədris binası, IV mərtəbə, elmi kitabxana

Dissertasiya ilə Bakı Dövlət Universitetinin Elmi kitabxanasında tanış olmaq mümkündür.

Avtoreferatın elektron versiyası Bakı Dövlət Universitetinin rəsmi internet saytında yerləşdirilmişdir.

Avtoreferat 26 aprel 2024-cü il tarixində zəruri ünvanlara göndərilmişdir.

Çapa imzalanıb: 22.04.2024

Kağızın formatı: A5

Həcm: 39842

Tiraj: 100