

УДК 577.352:615.2

ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ОРГАНИЧЕСКОЙ КИСЛОТЫ НА МОДЕЛЬНЫЕ ФОСФОЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ**О.В. Ващенко¹, В.А. Пашинская², М.В. Косевич², О.А. Боряк²,
Н.А. Касян¹, Л.Н. Лисецкий¹**

¹Институт сцинтилляционных материалов НТК «Институт монокристаллов НАН Украины»,
пр. Ленина, 60, Харьков, 61001, Украина;

olga_v@isma.kharkov.ua

²Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,
пр. Ленина, 47, Харьков, 61103, Украина

Поступила 20 июля 2010 г.

Принята 8 октября 2010 г.

Исследованы эффекты, связанные с совместным действием на модельные фосфолипидные мембраны нескольких мембранотропных агентов (МТА) различной природы. Обнаружен эффект существенного изменения активности, проявляемой индивидуальными МТА на основе солей четвертичных и бисчетвертичных аммониевых соединений (ЧАС, БЧАС) – декаметоксином, этонием, тетраметиламмонием – и органической 2,5-дигидроксibenзойной кислотой (ДНВ), при их совместном введении в мультислойные структуры гидратированного дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Данные дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) показали, что при наличии в системе двух МТА имеет место значительное отклонение от аддитивности измеряемых калориметрических параметров, что является свидетельством встраивания в модельные мембраны не индивидуальных МТА, а их комплексов. Данные масс-спектрометрии и квантово-химических расчетов показали возможность образования стабильных комплексов (ди)катионов четвертичных аммониевых оснований с анионом органической кислоты ДНВ. Построение квазибинарных фазовых диаграмм – зависимости температуры плавления мембран T_m от состава МТА – позволило установить оптимальную стехиометрию комплексов БЧАС с ДНВ, включающихся в мембраны. С помощью метода ДСК обнаружено, что включение в мембраны индивидуальных БЧАС с ДНВ, а также их комплексов со стехиометрией, обеспечивающей сохранение ионного состояния МТА, приводит к снижению T_m , и, соответственно, к разупорядочению структуры мембраны. В то же время, при соотношениях МТА, обеспечивающих образование нейтральных комплексов БЧАС с ДНВ, наблюдается некоторое повышение T_m , соответствующее упорядочению структуры мембраны, что можно рассматривать как дезактивацию БЧАС, т.е. модуляцию их активности в присутствии органической кислоты. Выявленную возможность ослабления мембранотропной активности БЧАС, используемых в качестве антимикробных агентов, при их совместном применении с органической кислотой, необходимо учитывать при разработке состава многокомпонентных лекарственных препаратов противомикробного действия на их основе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мембранотропные агенты, модельные фосфолипидные мембраны, бисчетвертичные аммониевые соединения, дигидроксibenзойная кислота, модуляция активности, дифференциальная сканирующая калориметрия, масс-спектрометрия.

ДОСЛІДЖЕННЯ СПІЛЬНОГО ВПЛИВУ ЧЕТВЕРТИЧНИХ АМОНІЄВИХ СПОЛУК ТА ОРГАНІЧНОЇ КИСЛОТИ НА МОДЕЛЬНІ ФОСФОЛІПІДНІ МЕМБРАНИ**О.В. Ващенко¹, В.А. Пашинська², М.В. Косевич², О.А. Боряк², Н.А. Касян¹, Л.Н. Лисецкий¹**

¹Інститут сцинтиляційних матеріалів НТК «Інститут монокристалів НАН України»,
пр. Леніна, 60, Харків, 61001, Україна

²Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,
пр. Леніна, 47, Харків, 61103, Україна

Досліджено ефекти, пов'язані зі спільною дією на модельні фосфоліпідні мембрани декількох мембранотропних агентів (МТА) різної природи. Виявлено ефект істотної зміни активності індивідуальних МТА на основі солей четвертинних і бисчетвертинних амонієвих сполук (ЧАС, БЧАС) – декаметоксину, етонією, тетраметиламмонією – і органічної 2,5-дигідроксibenзойної кислоти (ДНВ) при їх спільному входженні в мультишарові структури гідратованого

дипальмітоїлфосфатидилхоліну (ДПФХ). Дані диференціальної скануючої калориметрії (ДСК) показали, що за наявності в системі двох МТА має місце значне відхилення від аддитивності вимірюваних калориметричних параметрів, що є свідченням вбудовування в модельні мембрани не індивідуальних МТА, а їх комплексів. Дані мас-спектрометрії та квантово-хімічні розрахунки показали можливість утворення стабільних комплексів (ди)катионів четвертинних амонієвих основ з аніоном органічної кислоти ДНВ. Побудова квазібінарних фазових діаграм – залежності температури плавлення мембран T_m від складу МТА – дозволило встановити оптимальну стехіометрію комплексів БЧАС з ДНВ, що включаються в мембрани. За допомогою методу ДСК виявлено, що включення в мембрани індивідуальних БЧАС з ДНВ, а також їх комплексів зі стехіометрією, що забезпечує збереження іонного стану МТА, призводить до зниження T_m , і, відповідно, до розупорядкування структури мембрани. У той же час, при співвідношеннях МТА, які забезпечують утворення нейтральних комплексів БЧАС з ДНВ, спостерігається деяке підвищення T_m , що відповідає впорядкуванню структури мембрани. Це можна розглядати як дезактивацію БЧАС, тобто модуляцію їх активності в присутності органічної кислоти. Виявлену можливість послаблення мембранотропної активності БЧАС, що використовуються як антимікробні агенти, при їх спільному застосуванні з органічною кислотою, необхідно враховувати при розробці складу багатокomпонентних лікарських препаратів протимікробної дії на їх основі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мембранотропні агенти, модельні фосфоліпідні мембрани, бісчвертинні амонієві сполуки, дігідроксibenзойна кислота, модуляція активності, диференціальна скануюча калориметрія, мас-спектрометрія.

INVESTIGATION ON COMBINED EFFECT OF QUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS AND AN ORGANIC ACID ON MODEL PHOSPHOLIPID MEMBRANES

O.V. Vashchenko¹, V.A. Pashynska², M.V. Kosevich², O.A. Boryak², N.A. Kasian¹, L.N. Lisetski¹

¹*Institute for Scintillation Materials of STC "Institute for Single Crystals" of NAS of Ukraine, 60 Lenin Ave., 61001 Kharkov, Ukraine*

²*B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of NAS of Ukraine, 47 Lenin Ave., 61103 Kharkov, Ukraine*

Effects caused by combined inclusion of two membranotropic agents (MTA) of different nature into model phospholipid membranes have been examined. An effect of significant change in activity of individual MTA based on quaternary and bisquaternary ammonium compounds (QAC, BQAC) – decamethoxinum, aethonium, tetramethylammonium – and organic 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) on their combined incorporation into model multibilayer structures of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) is revealed. Differential scanning calorimetry (DSC) data have shown that, when both types of MTA are jointly present in the system, significant deviations from additivity values are noted for the measured calorimetry parameters. This shows that it is the MTA complexes, rather than individual MTAs, affect the model membrane properties. Mass-spectrometric and quantum chemistry calculations data have demonstrated a possibility of formation of stable noncovalent complexes including (di)cations of quaternary ammonium bases and anions of organic DHB acid.

Plotting of "membrane melting temperature (T_m) vs. MTA composition" quasi-binary diagrams permitted us to determine the optimal stoichiometry of the BQAC-DHB membrane-incorporated complexes. It was revealed by means of DSC that incorporation into membranes of individual ionic BQAC and DHB as well as their complexes with stoichiometry providing preservation of the ionic (charged) state of the MTAs causes decrease of T_m and, correspondingly, disordering of the membrane structure. At the same time, under MTA concentrations providing neutral complexes of BQAC and DHB, some increase in T_m is observed, corresponding to an ordering of membrane structure, which can be interpreted as deactivation of BQAC, i.e. modulation of their activity in the presence of the organic acid. The ascertained possibility of suppression of membranotropic activity of antimicrobial BQAC on their combined use with an organic acid is to be taken into account in design of multi-component antimicrobial drugs.

KEY WORDS: membranotropic agents, model phospholipid membranes, bisquaternary ammonium compounds, dihydroxybenzoic acid, activity modulation, differential scanning calorimetry, mass-spectrometry.

В отсутствие специальных переносчиков проникновение различных агентов в нативную клетку сопряжено с их взаимодействием с клеточной мембраной, и в частности, с её липидным бислоем. В качестве таких агентов могут выступать различные биологически активные соединения, включая фармакологические препараты. Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев их взаимодействие с бислоем либо остаётся за рамками рассматриваемого механизма биологического действия, либо считается минорным по сравнению с их действием внутри клетки. Однако, взаимодействие мембранотропных агентов (МТА) и поверхностно-активных веществ (ПАВ) с мембранами клеток микроорганизмов связано с механизмом их биологической активности, и изучение этого взаимодействия на

молекулярном уровне необходимо для усовершенствования стратегии разработки новых более активных препаратов [1].

Хорошо известно, что эффективность того или иного фармакологического препарата может определяться не только действием его основного вещества, но и модуляцией его активности другими соединениями. Поэтому изучение совместного действия различных препаратов, а также их совместимость с диетой во время лечения являются чрезвычайно важной, но, к сожалению, пока ещё недостаточно разработанной областью медицинской биофизики и фармакологии (хотя некоторые шаги в этом направлении уже успешно предпринимаются [2]).

Антимикробные препараты на основе катионных ПАВ, и в частности, бисчетвертичных аммониевых соединений (БЧАС), обладают рядом существенных преимуществ по сравнению с антибиотиками: они менее токсичны, воздействуют на достаточно широкий спектр микроорганизмов, не вызывают привыкания и, в среднем, более дешевы. Одним из основных механизмов действия катионных ПАВ считается взаимодействие с плазматическими мембранами микроорганизмов, приводящее к нарушению их функционирования [3, 4].

В серии наших предыдущих исследований [5, 17] проводилось систематическое изучение физико-химических свойств и молекулярных механизмов действия антимикробных препаратов на основе БЧАС декаметоксина и этония (рис. 1, I и II) с использованием набора экспериментальных и теоретических методов. В результате было установлено, что данные препараты взаимодействуют с модельными фосфолипидными мембранами и образуют устойчивые нековалентные комплексы с фосфолипидами.

В ходе исследований методом матрично-активированной лазерной десорбционно/ионизационной масс-спектрометрии (МАЛДИ) [14] было обнаружено, что дикатион декаметоксина образует устойчивые комплексы не только с противоионом хлора, но и с анионом органической кислоты – 2,5-дигидроксибензойной кислоты (ДНВ) (V, рис.1) – используемой в МАЛДИ в качестве матрицы. В соответствии с литературными данными, четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) могут образовывать соли с органическими кислотами; в хлоридах ЧАС возможно замещение противоиона хлора на органический анион [17, 18]. Квантово-химические расчеты взаимодействия тетраметиламмония (ТМА) (III, рис.1), моделирующего основной структурный элемент ЧАС, с ДНВ в нейтральной и анионной (ДНВ–Н)[–] формах показали образование стабильных комплексов ТМА•(ДНВ – Н)[–] [16].

В связи со всем вышеизложенным возникает вопрос: возможно ли образование таких стабильных комплексов ЧАС/БЧАС с небольшими органическими анионами в фосфолипидных мембранах и приводит ли это к модуляции активности ЧАС/БЧАС? Для ответа на этот вопрос в качестве объектов исследования были выбраны системы, содержащие модельные мембраны на основе гидратированного фосфолипида дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) (VI, рис.1) с включением перечисленных выше соединений: ЧАС ТМА, БЧАС декаметоксина и этония по отдельности и в сочетании с ДНВ.

В задачи настоящей работы входило доказательство возможности образования комплексов ЧАС/БЧАС с анионом ДНВ, исследование влияния комплексообразования на параметры взаимодействия этих препаратов с модельными мембранами из ДПФХ и выявление модуляции биологической активности ЧАС/БЧАС вследствие их взаимодействия с органическим анионом.

Экспериментальные исследования проводили с использованием методов дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и масс-спектрометрии с

МАЛДИ и бомбардировкой быстрыми атомами (ББА). Метод ДСК, ставший классическим в изучении модельных липидных мембран [19-23] и к настоящему времени зарекомендовавший себя как весьма чувствительный и информативный метод изучения поведения в фосфолипидных мембранах различных фармакологических препаратов [24-26] и биомолекул [27-31], использовался нами и в предыдущих работах [9, 32, 33].

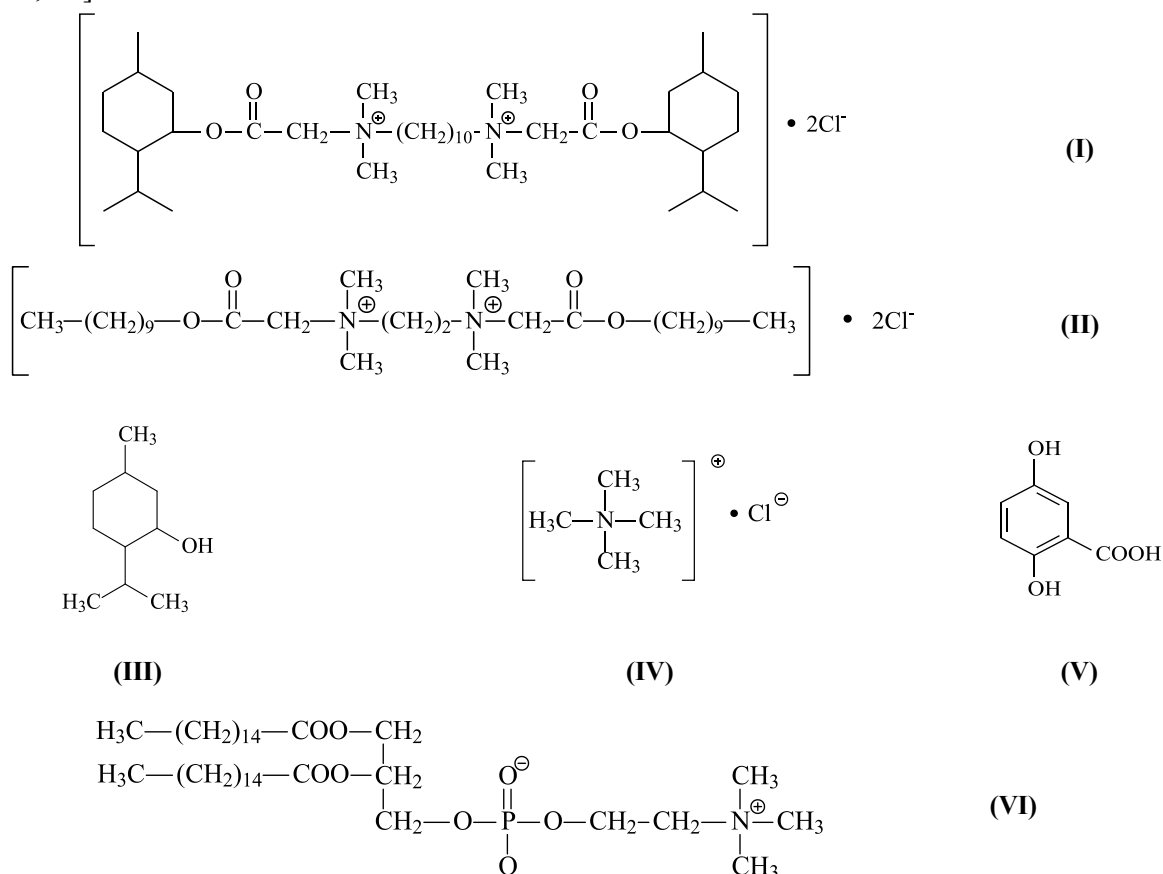


Рис. 1. Структурные формулы дихлоридов БЧАС декаметоксина (I) и этония (II), ЧАС хлорида тетраметиламмония (III), ментола (IV), 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (V) и дипальмитоилфосфатидилхолина (VI).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы препараты дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) фирмы «Alexis Biochemicals» (Швейцария), тетраметиламмония хлорида и 2,5-дигидроксibenзойной кислоты производства «Sigma» (Германия), ментола производства ОАО «Прилуцкий эфирно-масличный комбинат» (Украина), глицерина производства компании «Reanal» (Венгрия). Препараты декаметоксина и этония были синтезированы в Институте органической химии НАН Украины (Киев). При приготовления водных дисперсий ДПФХ для ДСК использовали дистиллированную воду; растворы для масс-спектрометрических экспериментов готовили с использованием деионизированной воды. Исследование методом ДСК проводилось с помощью термоаналитической системы «Mettler TA 3000» (Швейцария). При приготовлении образцов для анализа методом ДСК для лучшего встраивания МТА в структуру модельной мембраны ДПФХ и МТА смешивали в требуемой концентрации в кристаллическом состоянии и затем готовили 50 % водные дисперсии полученной композиции по стандартной методике, описанной ранее в работах [33, 34]. Исследования всех систем проводили при pH 7. Исследуемые образцы в количестве 15-

25 мг помещали в алюминиевые тигли с полузакрытым положением крышки. Программируемая схема температурного сканирования содержала последовательные циклы нагревания и охлаждения со скоростью 2 К/мин. На основе полученных термограмм с помощью соответствующего программного обеспечения прибора определяли параметры фазовых переходов. Размер кооперативного домена δ вычисляли согласно [35] по формуле:

$$\delta = \Delta H_{\text{ВГ}}/\Delta H_{\text{м}} \approx 7T_{\text{м}}^2/\Delta T \cdot \Delta H_{\text{м}}, \quad (1)$$

где $\Delta H_{\text{ВГ}}$ – энтальпия Вант-Гоффа, $T_{\text{м}}$, $\Delta H_{\text{м}}$ и ΔT – температура, энтальпия и полуширина пика основного перехода, соответственно.

В целях корректного сравнения результатов, полученных в системах (ДПФХ + МТА) различного состава, все концентрации вводимых добавок ЧАС и БЧАС были подобраны с таким расчётом, чтобы содержание аммониевых групп в них было одинаково и эквивалентно 5 масс. % ТМА. Поскольку в молекуле декаметоксина содержится равное количество четвертичных аммониевых и ментильных групп, то концентрация ментола в виде индивидуального вещества выбиралась по тому же принципу. При исследовании композиций из двух добавок сохранялась общая весовая концентрация, в пределах которой варьировалось мольное соотношение компонентов. В тех случаях, когда концентрация вводимых композиций выражалась в мольных величинах, молекулярную массу рассчитывали как средневзвешенное всех входящих компонентов.

Исследования методом матрично-активированной лазерной десорбционно/ионизационной (МАЛДИ) масс-спектрометрии проводили на времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF AutoFlex (Bruker Daltonics, Германия). МАЛДИ масс-спектры положительных и отрицательных ионов получали по стандартной методике [14], используя линейный и рефлектронный режимы. МАЛДИ масс-спектры, записанные как минимум из трех точек подложки, показали высокую воспроизводимость. При приготовлении образцов 0,3 М водные растворы декаметоксина или этония и насыщенный водный раствор органической матрицы ДНВ смешивали в соотношении 5:1, полученную смесь выдерживали в течение получаса, затем наносили по 0,5 мкл на маркированные точки стальной подложки и высушивали при комнатной температуре. Отметим, что в данном случае один из объектов исследования – ДНВ, активно поглощающая свет в УФ-диапазоне – сам выполнял роль МАЛДИ-матрицы, что позволило избежать усложнения системы.

Масс-спектрометрические эксперименты мягкоионизационным методом с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА) выполняли на магнитном секторном масс-спектрометре МИ-1201Е («SELMИ», Сумы, Украина). В качестве бомбардирующего газа использовался аргон, энергия первичного ионного пучка составляла 4,5 кВ. В качестве жидкой матрицы для исследуемых веществ использовали глицерин. Равные объемные части глицериновой матрицы и водных растворов ТМА и ДНВ с различными концентрационными соотношениями смешивали для того, чтобы в исследуемом образце сохранялись интактные концентрации ТМА и ДНВ после испарения воды из образца в форвакуумной системе масс-спектрометра. ББА масс-спектры записывали в течение первых пяти минут после начала бомбардировки образца, помещенного на подложку источника ионов масс-спектрометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Масс-спектрометрическое исследование комплексов ЧАС/БЧАС с ДНВ

При смешении прозрачных растворов декаметоксина и ДНВ с целью приготовления образца для исследования методом МАЛДИ суммарный раствор

приобретал опалесцирующий характер, что указывает на образование коллоидной мицеллярной системы. Ранее нами было высказано предположение относительно возможной структуры таких мицелл, ядром которой может выступать комплекс дикатиона с анионом ДНВ, а последующие оболочки состоять из анионов ДНВ и хлора [17]. При высушивании раствора смеси декаметоксина и ДНВ возможно образование двух видов кристаллов: исходного хлорида (дикатион Cat^{2+} с двумя анионами хлора) и соли нового состава, в которой неорганические анионы хлора замещены на органический анион $(\text{ДНВ} - \text{H})^-$ [17].

В масс-спектрах МАЛДИ такого образца (рис. 2) наряду с ассоциатом дикатиона декаметоксина с одним анионом хлора $\text{Cat}^{2+} \cdot \text{Cl}^-$, m/z 657, являющегося характеристическим ионом в масс-спектрах чистого декаметоксина [13], появляется ассоциат дикатиона с анионом кислоты $\text{Cat}^{2+} \cdot (\text{ДНВ} - \text{H})^-$, m/z 775. При эквимолярном соотношении компонентов в исходном растворе, интенсивность ассоциата $\text{Cat}^{2+} \cdot (\text{ДНВ} - \text{H})^-$ в МАЛДИ масс спектрах значительно превышает интенсивность ассоциата $\text{Cat}^{2+} \cdot \text{Cl}^-$, что свидетельствует о конкуренции между органическим и неорганическим анионами и преимущественном связывании с дикатионом аниона $(\text{ДНВ} - \text{H})^-$.

Ассоциаты дикатиона этония с одним противоионом хлора, как было показано ранее [36], нестабильны в газовой фазе, и интенсивность соответствующего им пика во вторично-ионных и ББА масс-спектрах крайне незначительна. В согласии с этим, в МАЛДИ масс-спектрах положительных ионов системы (ДПФХ+этоний+ДНВ) ассоциаты дикатиона этония и с анионом хлора, и с депротонированной ДНВ зарегистрированы не были. Однако, более крупные комплексы с анионами оказываются более стабильными и их можно наблюдать в режиме отрицательных ионов. Так, во вторично-эмиссионных масс-спектрах декаметоксина и этония в глицериновой матрице были зарегистрированы однозарядные многокомпонентные ассоциаты, содержащие дикатион БЧАС и три аниона хлора: $\text{Cat}^{2+} \cdot 3\text{Cl}^-$ [36]. Являющиеся нейтральными, ассоциаты дикатиона с двумя анионами масс-спектрометрически не регистрируются, однако возможно наблюдение специфического иона $(\text{Cat} - \text{H})^+ \cdot 2\text{Cl}^-$.

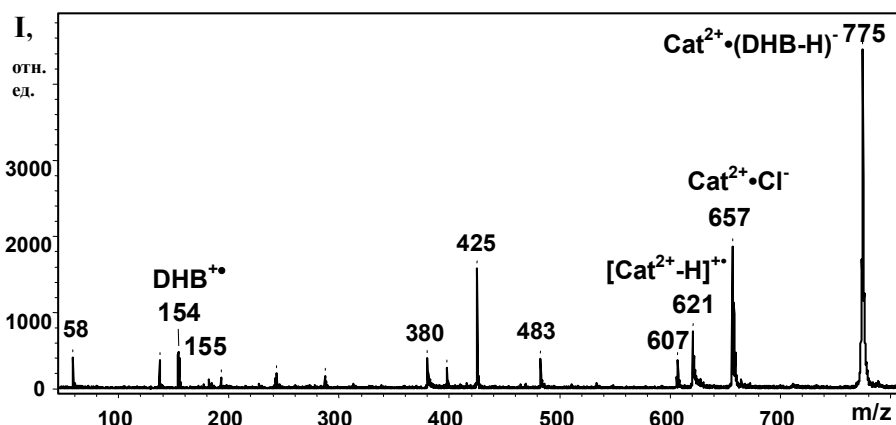


Рис. 2. МАЛДИ масс-спектр положительных ионов образца декаметоксина в матрице ДНВ, содержащий ассоциаты дикатиона декаметоксина с анионом хлора $\text{Cat}^{2+} \cdot \text{Cl}^-$ и анионом депротонированной ДНВ $\text{Cat}^{2+} \cdot (\text{ДНВ} - \text{H})^-$.

В МАЛДИ масс-спектрах отрицательных ионов для систем (ДПФХ+этоний+ДНВ) и (ДПФХ+декаметоксин+ДНВ) (рис. 3 а, б) ассоциаты дикатионов БЧАС с противоионами хлора зарегистрированы не были, однако были обнаружены кластеры $\text{Cat}^{2+} \cdot 3(\text{ДНВ} - \text{H})^-$ и $(\text{Cat} - \text{H})^+ \cdot 2(\text{ДНВ} - \text{H})^-$, что свидетельствует, во-первых, о возможности

образования комплексов с несколькими анионами и, во-вторых, о преимущественном конкурентном связывании дикатионов с органическими анионами.

Отметим, что ранее нами сообщалось об образовании кластеров дикатиона БЧАС с другим органическим анионом – анионом натриевой соли додецилсульфата (SDS) [36].

Таким образом, комплексы дикатионов БЧАС Cat^{2+} с анионом $(\text{DHB} - \text{H})^-$ оказываются стабильными в растворе, при кристаллизации вещества и при переводе в газовую фазу в условиях МАЛДИ. Также возможно образование более крупных ассоциатов, содержащих один дикатион и два-три аниона DHB.

Для углубления понимания молекулярных механизмов взаимодействия аниона органической соли DHB с четвертичными аммониевыми основаниями нами была изучена модельная система, содержащая ТМА хлорид, выступающий в качестве простейшего структурного элемента ЧАС. С помощью метода масс-спектрометрии с БА был исследован раствор ТМА и DHB в жидкой глицериновой матрице.

БА масс-спектр системы (ТМА + DHB), наряду с ионами, характерными для индивидуальных компонентов смеси, содержал пики ионов супрамолекулярных комплексов компонентов системы: $[\text{2Cat}\cdot\text{Cl}]^+$, m/z 183/185 и $[\text{2Cat}\cdot(\text{DHB}-\text{H})]^+$, m/z 301, что также подтверждает факт конкуренции анинов хлора и $[\text{DHB}-\text{H}]^-$ за связывание четвертичной группы, показанное в вышеописанных экспериментах с БЧАС. При повышении концентрации раствора и некотором избытке ТМА в масс-спектрах регистрируются более крупные ассоциаты вида $[(\text{Cat})_n^+\cdot\text{Cl}_{(n-1)}]^+$ ($n=1-4$) (рис. 4).

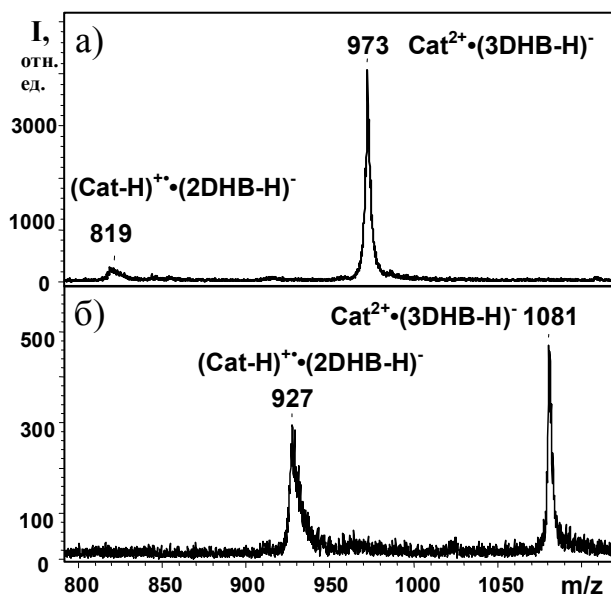


Рис. 3. Участки МАЛДИ масс-спектров отрицательных ионов для систем (ДПФХ + этоний + DHB) (а) и (ДПФХ + декаметоксин + DHB) (б), содержащие кластеры $\text{Cat}^{2+}\cdot 3(\text{DHB}-\text{H})^-$ и $(\text{Cat}-\text{H})^+\cdot 2(\text{DHB}-\text{H})^-$.

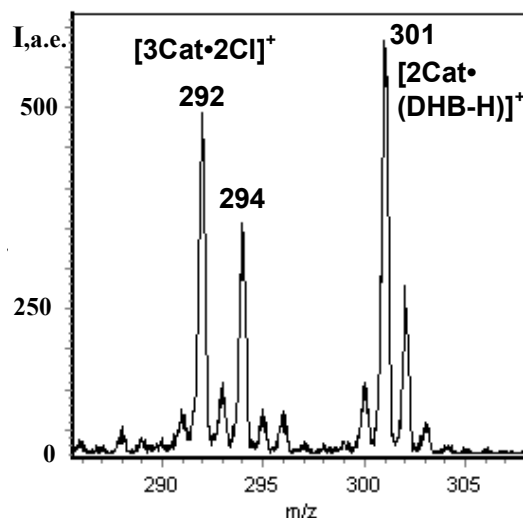


Рис. 4 Участок БА масс-спектра смеси $2\cdot 10^{-1}$ М ТМА хлорида и 10^{-1} М DHB в глицериновой матрице. Здесь Cat – катион ТМА.

В условиях МАЛДИ для образца, полученного при высушивании водного раствора эквимолярной смеси ТМА и DHB, были зарегистрированы только катион ТМА и анион DHB в масс-спектрах положительных и отрицательных ионов, соответственно [17]. Такой характер масс-спектров был объяснен распылением катиона и аниона соли $\text{TMA}^+(\text{DHB}-\text{H})^-$, образующейся вследствие реакции замещения аниона Cl^- на анион

органической кислоты (DHB-H)⁻. Ассоциаты TMA⁺ и (DHB-H)⁻ в условиях МАЛДИ зарегистрированы не были.

Высокая стабильность комплексов ЧАС/БЧАС с депротонированной DHB обеспечивается электростатическими взаимодействиями между катионом ЧАС/дикатионом БЧАС и анионом DHB, что было подтверждено в ходе системного модельного квантово-химического исследования. Результаты *ab initio* квантово-химических расчетов комплексов DHB с катионом TMA, моделирующим активный сайт всех ЧАС, изложены в работе [16]. В ходе расчетов было обнаружено, что оптимальной геометрией комплекса катиона TMA с анионом [DHB-H]⁻ является структура, в которой кислороды карбоксильной группы депротонированной дигидробензойной кислоты, несущие на себе частичный отрицательный заряд, взаимодействуют с метильными группами катиона TMA⁺, атомы водорода которых имеют высокую плотность частичного положительного заряда. Расчеты энергетических параметров комплекса, проведенные методом MP2/6-31++G** показали, что энергия взаимодействия в комплексе [TMA⁺ + (DHB-H)⁻] составляет -351,66 Дж/моль, что также указывает на электростатическую природу взаимодействий в комплексе [16].

Следующим шагом явилось выяснение возможности включения комплексов ЧАС/БЧАС с DHB как единого целого в модельные мембраны ДПФХ.

Дифференциальная сканирующая калориметрия

На основе опыта наших предыдущих исследований молекулярных механизмов взаимодействия БЧАС с модельными мембранами [11, 37] в качестве среды, моделирующей возможные условия молекулярных контактов в живой клетке, была выбрана система на основе 50 % водных дисперсий ДПФХ – мультислойные ламеллярные структуры, состоящие из отдельных бислоев, разделённых прослойкой воды. Использование ДПФХ для модельных мембранных структур в экспериментах по исследованию их взаимодействия с противомикробными лекарственными препаратами целесообразно также с учетом факта обогащенности молекулами данного вида мембран грамм-положительных бактерий, против которых направлено действие антимикробных агентов [38, 39]. Следует обратить внимание на то, что структурная организация выбранной модельной матрицы довольно сложна: в ней выделяются гидрофильные (поверхность), гидрофобные (внутренняя часть) и промежуточные области (т. н. области карбонильных групп), а также области воды различной степени связывания (от полностью связанной до свободной).

В дисперсии ДПФХ вводили ЧАС TMA, БЧАС декаметоксин и этоний – как индивидуально, так и в сочетании с DHB, а также ментол как одну из функциональных групп декаметоксина.

Исследование фазовых переходов модельных мембранных структур

При исследовании данных систем методом ДСК в сферу наших интересов входили фазовые переходы, лежащие в области физиологического интервала температур; к ним в данных системах относятся переходы из низкотемпературной фазы L_β (называемой гелевой фазой) в промежуточную P_β, и далее в высокотемпературную (жидкокристаллическую) фазу L_α, [20, 21, 40]. Первый из указанных переходов имеет в литературе название предпереход, второй – основной переход, или плавление мембраны.

Типичный вид ДСК-термограмм в виде температурной зависимости теплоёмкости при постоянном давлении (C_p) представлен на рис. 5. Различия в термограммах исследованных систем отражают влияние вводимых добавок на термодинамическое состояние липидных мультислоёв. На термограмме исходной матрицы ДПФХ (рис. 5,

линия 1) чётко видны оба пика: T_p предперехода $L_{\beta'} - P_{\beta}$ и T_m основного перехода $P_{\beta} - L_{\alpha}$. В присутствии МТА добавок БЧАС и ДНВ предпереход исчезает, а основной переход смещается в сторону более низких температур и существенно размывается. При совместном введении в систему БЧАС и ДНВ температура основного перехода отличается от T_m как чистого ДПФХ, так и его композитов с индивидуальными МТА, и находится в зависимости от соотношения ЧАС/БЧАС и ДНВ.

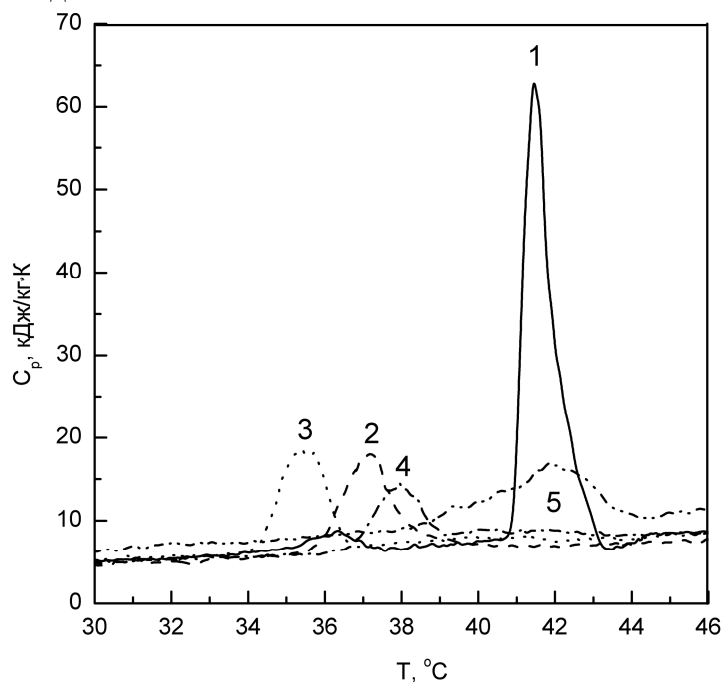


Рис. 5. Температурная зависимость удельной теплоёмкости водных дисперсий ДПФХ (50:50) в чистом виде (1), а также содержащих ДНВ (2), декаметоксин (3) и их композицию 1:1 (4) и 1:2 (5) по данным ДСК.

изменением числа границ доменов, коррелирующим с размером кооперативного домена, и изменением количества центров образования новой фазы, характеризующим степень микрогетерогенности образца, т. е., фактически, степень сродства вводимых МТА липидной матрице. В табл. 1 приведены также параметр кооперативности (размер кооперативного домена липидов δ), методика расчёта которого указана выше (1), и параметр активности МТА, выражающий величину смещения температуры пика основного перехода в расчёте на единицу массовой либо мольной концентрации. Выражение активности в мольных величинах имело целью в определенной степени учесть химическую природу добавки, в частности, её молекулярную массу, которая для исследуемого набора добавок различилась в несколько раз. Активность добавки имела положительный знак в том случае, когда её присутствие приводило к повышению температуры основного перехода, и, соответственно, отрицательный — в случае понижения.

Наглядное представление о роли соотношения компонентов ЧАС, БЧАС и ДНВ, вводимых в дисперсию ДПФХ, даёт диаграмма относительного изменения температуры плавления ΔT_m модельной мембраны в присутствии различных агентов (рис. 6), где $\Delta T_m = \Delta T_m(\text{ДПФХ}) - \Delta T_m(\text{ДПФХ} + \text{МТА})$. Значения ΔT_m , полученные при охлаждении, отличаются не более чем на $1,5^\circ\text{C}$ для всех образцов за исключением системы ТМА:ДНВ 2:1, для которой гистерезис составляет $8,5^\circ\text{C}$ (см. табл. 1).

Более общую термодинамическую картину процессов, происходящих в исследуемых фосфолипидных системах в присутствии различных МТА, даёт сводная таблица 1. В ней представлены исходные данные ДСК — температуры T_m , T_p и энтальпии ΔH_m , ΔH_p фазовых переходов, определенные в режимах нагревания и охлаждения, а также такие параметры основного фазового перехода, как полуширина пика плавления ΔT и гистерезис. Величина гистерезиса, согласно [41], характеризует изменение скорости распространения фронта низкотемпературной фазы. Его изменение связывают, в основном, с двумя факторами [42]:

На основе анализа полученных данных (табл. 1, рис. 5 и 6) можно сделать следующие заключения.

1) Изменение термодинамических параметров модельных мембран при введении индивидуальных МТА в водную дисперсию ДПФХ свидетельствует о взаимодействии всех исследованных МТА с фосфолипидными бислоями. Характер наблюдаемых изменений зависит от природы МТА.

2) При введении в водную дисперсию ДПФХ индивидуальных МТА – ДНВ, БЧАС декаметоксина, этония – температура основного перехода $P_{\beta} - L_{\alpha}$, значительно понижается, что указывает на разупорядочение фосфолипидного бислоя.

3) Поскольку четвертичные аммониевые основания и кислота ДНВ диссоциируют в водном растворе, логично предположить, что данные МТА встраиваются в мембрану в форме ионов: катиона ТМА, дикатионов декаметоксина и этония и аниона (ДНВ – Н)⁻. Такое предположение согласуется с литературными данными о снижении температуры фазового перехода при приобретении мембранами отрицательного заряда и увеличения степени ионизации [43], а также нашими более ранними данными относительно снижения T_m при введении в мембраны катионных БЧАС [11].

Таблица 1. Параметры фазовых переходов для систем «гидратированный ДПФХ + МТА».

| Добавка МТА | Нагревание | | | | Охлаждение | | Гисте-резис, °С | Активность МТА | | Размер кооперативного домена δ |
|----------------------|------------|---------------------|------------|-------------------|------------|---------------------|-----------------|----------------------|------------------|---------------------------------------|
| | T_p , °С | ΔH_p , Дж/г | T_m , °С | ΔH , Дж/г | T_m , °С | ΔH_m , Дж/г | | массо-вая, К/масс. % | моль-ная, К/м.д. | |
| ДПФХ без добавок | 36,4 | 4,0 | 41,5 | 23,4 | 41,4 | 40,3 | 0,1 | - | - | 124 |
| ТМА | - | - | 42,5 | 32,0 | 41,7 | 32,1 | 0,8 | 0,38 | 6,7 | 39 |
| ДНВ | - | - | 37,1 | 20,3 | 36,1 | 23,9 | 1,0 | -1,54 | -36,2 | 81 |
| ТМА:ДНВ 1:1 | 37,3 | 5,7 | 42,0 | 17,7 | 41,5 | 21,2 | 0,5 | 0,16 | 6,4 | 158 |
| ТМА:ДНВ 2:1 | 29,4 | <1,0 | 42,9 | 19,4 | 34,4 | 21,3 | 8,5 | 0,29 | 25,8 | 109 |
| Декаметоксин | - | - | 35,7 | 15,8 | 35,2 | 24,5 | 0,5 | -0,95 | -95,5 | 128 |
| Декаметоксин:ДНВ 1:1 | - | - | 37,9 | 15,3 | 35,0 | 26,0 | 2,9 | -1,04 | -93,0 | 102 |
| Декаметоксин:ДНВ 1:2 | - | - | 41,8 | 15,8 | 40,5 | 17,7 | 1,3 | 0,08 | 10,2 | 75 |
| Декаметоксин:ДНВ 1:4 | - | - | 41,7 | 24,5 | 41,5 | 5,0 | 0,2 | 0,06 | 10,1 | 59 |
| Этоний | - | - | 39,8 | 17,8 | 39,7 | 18,5 | 0,1 | -0,32 | -27,0 | 71 |
| Этоний:ДНВ 1:1 | - | - | 40,0 | 13,7 | 39,5 | 16,6 | 0,5 | -0,28 | -29,3 | 70 |
| Этоний: ДНВ 1:2 | - | - | 41,6 | 17,8 | 40,2 | 21,7 | 1,4 | 0,04 | 5,0 | 75 |
| Этоний: ДНВ 1:4 | - | - | 41,6 | 18,8 | 40,9 | 30,8 | 0,7 | 0,03 | 3,3 | 86 |
| Ментол | - | - | 33,0 | 2,5 | 31,4 | 5,1 | 1,6 | -3,36 | -79,5 | 802 |

Отметим, что присутствие в системе анионов Cl^- не препятствует проявлению мембранотропной активности БЧАС.

4) Совместное введение БЧАС и ДНВ в дисперсию ДПФХ также вызывает изменение ее термодинамических параметров, однако аддитивности эффектов БЧАС и

DHB по концентрации вводимых компонентов не наблюдается. (Согласно данным работ [44, 45], при отсутствии взаимодействия между добавками, вводимыми в фосфолипидную матрицу, любое термодинамическое свойство системы, выраженное в соответствующих единицах, будет аддитивно по относительным концентрациям компонентов и, напротив, специфическое взаимодействие между ними будет проявляться как отклонение от аддитивности.) Наблюдаемое существенное отклонение от аддитивности для систем (ДПФХ + БЧАС + DHB) указывает на наличие в фосфолипидной матрице комплексов БЧАС с DHB, формирующихся, по всей видимости, за счет кулоновского взаимодействия между соответствующими катионами и анионами.

5) Степень влияния совместно вводимых БЧАС с DHB на калориметрические параметры системы находится в сильной зависимости от соотношения компонентов. При мольном отношении БЧАС к DHB 1:1 параметры трехкомпонентной системы (ДПФХ + БЧАС + DHB) практически не отличаются от таковых для бинарной системы (ДПФХ + БЧАС) (см. столбцы 5, 6 и 9, 10 на рис. 6 для систем, содержащих декаметоксин и этоний, соответственно). При отношении БЧАС к DHB 1:2 и 1:4 наблюдаются качественные изменения: сдвиг температуры основного перехода меняет знак, т. е. T_m повышается, хотя и незначительно (см. столбцы 7, 8 и 11, 12 на рис. 6).

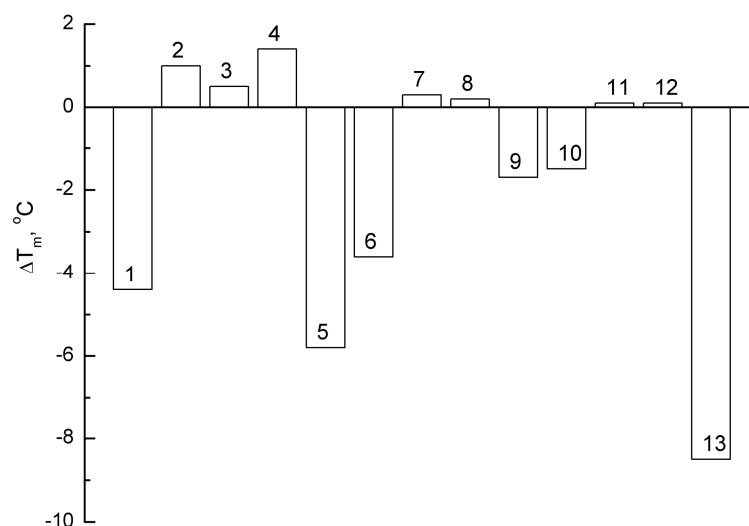


Рис. 6. Диаграмма относительного изменения температуры плавления ΔT_m модельной мембраны в присутствии различных мембранотропных агентов и их смесей: 1 – DHB; 2 – TMA; 3 – TMA:DHB 1:1; 4 – TMA:DHB 2:1; 5 – декаметоксин; 6 – декаметоксин:DHB 1:1; 7 – декаметоксин:DHB 1:2; 8 – декаметоксин:DHB 1:4; 9 – этоний; 10 – этоний:DHB 1:1; 11 – этоний:DHB 1:2; 12 – этоний:DHB 1:4; 13 – ментол.

Последний эффект можно рассматривать как дезактивацию воздействия БЧАС на мембраны в присутствии определенных концентраций DHB. Таким образом, можно говорить о DHB как о модуляторе действия БЧАС. С другой стороны, образование комплексов с БЧАС снижает активность и самой DHB.

б) В качестве наиболее вероятного молекулярного механизма описанного выше эффекта модуляции активности БЧАС можно предложить механизм нейтрализации комплексов БЧАС с DHB путем образования ионных пар. Предположение основано на том факте, что переход от понижения к повышению температуры плавления T_m в системе (ДПФХ + БЧАС + DHB) происходит при содержании DHB, равном или превышающем содержание положительно заряженных аммониевых групп (по две на

молекулу БЧАС). При молекулярном отношении БЧАС к ДНВ 1:1 один из положительных центров дикатиона (в среднем) остается «нескомпенсированным» анионом ДНВ, и характер изменения калориметрических параметров продолжает оставаться соответствующим воздействию на мембрану ионных МТА.

Ряд литературных данных [17] свидетельствует о том, что при взаимодействии галогенидов четвертичных аммониевых оснований с органическими кислотами, подобными ДНВ, анион галогена вытесняется органическим анионом, что приводит к образованию новой соли. Приведенные выше масс-спектрометрические данные показывают, что анион (ДНВ – Н)⁻ вытесняет анион Cl⁻ в ионной паре с дикатионом декаметоксина. Степень диссоциации комплексов (ионных пар) с органическим анионом, как правило, ниже, чем с галогеном. Можно было бы предположить, что растворимость ионной пары в липидном матриксе ниже, чем индивидуальных ионов, однако в таком случае смесь БЧАС с ДНВ 1:2 не должна была бы оказывать влияние на калориметрические параметры мембраны, а смесь 1:4 с избытком ДНВ – вызывать снижение температуры перехода, что противоречит результатам эксперимента. По всей видимости, нейтральные комплексы БЧАС с ДНВ встраиваются в липидный бислой и, в отличие от индивидуальных ионных МТА, несколько повышают температуру перехода, т.е. стабилизируют мембрану.

7) Известный факт зависимости характера влияния на липидные мембраны поверхностно активных веществ (ПАВ) на основе БЧАС от их структуры [1, 3] – природы гидрофобного «хвоста» и расстояния между положительно заряженными четвертичными азотами – отчетливо проявляется на примере декаметоксина и этония (см. рис. 1). Структура молекулы этония – наличие полярной «головки», состоящей из двух близко расположенных аммониевых групп, и двух гидрофобных углеводородных цепей – в целом подобна структуре молекул ДПФХ, что может обеспечить встраивание дикатиона этония в мембрану путем замещения молекулы ДПФХ [11]. Более сложная структура гидрофобных «хвостов» декаметоксина, включающих ментильные остатки, а также большая разнесенность положительно заряженных аммониевых групп, обуславливают его более сильное дестабилизирующее действие на мембраны в сравнении с этонием, в частности, большее снижение T_m и увеличение размера кооперативного домена.

Важным структурным фактором является различие в расстояниях между атомами четвертичных азотов в исследуемых БЧАС. Согласно данным работы [46], встраивание молекул, содержащих несколько ионов аммония, расположенных с определённым периодом, существенно зависит от величины этого периода: наблюдались варианты от полного «игнорирования» до полноценного встраивания. Учитывая цвиттерионную природу головки ДПФХ, а, следовательно, и всей поверхности липидного бислоя, можно предположить, что здесь играет роль соответствие подобных периодов центров заряда в липидной матрице и в добавляемом агенте.

8) Полученные в настоящей работе данные ДСК для ментола (см. табл. 1) позволяют оценить вклад ментильных остатков в суммарную активность дикатиона декаметоксина. Действие ментола в целом сходно с действием канонических анестетиков, подробно описанным в литературе [41]. Ментол вызывает резкое снижение температуры и энтальпии плавления модельной мембраны, т.е. оказывает существенное разупорядочивающее действие на бислой, а также значительное повышение показателя степени кооперативности, что можно интерпретировать как повышение степени латеральной гомогенности.

9) Отдельный интерес представляет взаимодействие с мембранами так называемого гидрофобного катиона ТМА. С одной стороны, ТМА служит простейшей моделью полярных групп катионных ПАВ, однако, отсутствие у него гидрофобного «хвоста»

приводит к качественно иному механизму действия на мембраны. В отличие от БЧАС декаметоксина и этония, ТМА вызывает повышение T_m (см. линию 2 на рис. 6) и энтальпии основного перехода, что указывает на повышение степени упорядоченности мембраны. Соответствующий пик на термограмме значительно размывается, а кооперативность перехода снижается.

Учитывая зарядовое состояние ТМА, а также соотношение его геометрических размеров с размерами молекулы ДПФХ, можно сделать предположение о локализации катиона ТМА в области карбонильных групп ДПФХ (несущих частичный отрицательный заряд), промежуточной между гидрофильной областью фосфолипидных «головок» и гидрофобной областью углеводородных «хвостов» ДПФХ.

10) При совместном введении ТМА и ДНВ в дисперсию ДПФХ сдвиг T_m в сторону повышения температуры перехода сохраняется. Аддитивность calorиметрических параметров, как и в случае БЧАС с ДНВ, не наблюдается, что свидетельствует об образовании комплексов ТМА с ДНВ. В соответствии с предложенным выше механизмом нейтрализации, соотношение однозарядных ионов $TMA^+ : (DNB-H)^- 1:1$ достаточно для образования нейтральных комплексов. Такие в сумме нейтральные комплексы, подобно рассмотренным выше нейтральным комплексам БЧАС, оказывают стабилизирующее действие на мембраны. Речь о дезактивации или, наоборот, повышении активности ТМА в данном случае не идет, однако комплексообразование устраняет дестабилизирующее действие ДНВ на мембраны. Встраивание катиона TMA^+ , а также комплекса $TMA^+ : (DNB-H)^-$ в полярную область мембраны в низкотемпературной фазе, по всей видимости, создает своеобразный барьер для проникновения индивидуальных анионов $(DNB-H)^-$ в более глубокие слои мембраны.

Анализ данных о гистерезисе в исследуемых системах

Интересную информацию предоставляет анализ данных о гистерезисе – различии значений T_m , зарегистрированных при нагревании и охлаждении исследуемых систем (см. табл. 1). Встраивание ТМА в мембраны повышает температуру перехода $P_{\beta'} - L_{\alpha}$ на $1^\circ C$, однако при охлаждении нагретого образца значение $T_m = 41,7^\circ C$ практически возвращается к значению, характерному для чистого ДПФХ $T_m = 41,4^\circ C$, а величина гистерезиса $0,8^\circ C$ достаточно высока. Можно предположить, что ТМА менее растворим в высокотемпературной фазе L_{α} и высвобождается из мембраны при повышении температуры, что и обеспечивает регистрацию T_m , близкую к таковой для чистого ДПФХ при охлаждении образца. Для системы (ДПФХ + ДНВ) гистерезис составляет $1^\circ C$, что, совместно с понижением T_m на $1^\circ C$ при охлаждении образца, указывает на некоторое повышение растворимости ДНВ в высокотемпературной фазе.

Аномально высокое значение гистерезиса $8,5^\circ C$, зарегистрированное только в одном случае для системы (ДПФХ + ТМА + ДНВ) при соотношении ТМА:ДНВ 2:1, оказалось неожиданным и требует дальнейшего, более глубокого исследования. В качестве предварительного объяснения можно предложить следующий механизм. При избытке ТМА возможно образование тройных комплексов $2TMA^+ \cdot (DNB-H)^-$, о чем свидетельствуют приведенные выше данные масс-спектрометрии (см. рис. 4) и квантово-химических расчетов [47]. В низкотемпературную фазу встраиваются преимущественно нейтральные комплексы $TMA^+ \cdot (DNB-H)^- 1:1$, однако, в высокотемпературной фазе растворимость заряженных комплексов $2TMA^+ \cdot (DNB-H)^- 2:1$, предположительно, может быть выше. При нагреве образца до $T > T_m = 42,9^\circ C$ некоторое количество TMA^+ и его нейтральных комплексов высвобождается из мембраны, что делает возможным замещение их на комплексы $2TMA^+ \cdot (DNB-H)^-$, локализация которых в бислое может отличаться от локализации TMA^+ .

Дестабилизирующее действие на мембраны таких заряженных комплексов двух катионов и одного аниона согласуется с рассмотренным выше эффектом ионных комплексов БЧАС с одним анионом ДНВ. Отметим, что для систем, содержащих ТМА декаметоксин и ДНВ в соотношении 1:1, допускающем образование однозарядных комплексов $\text{Cat}^{2+} \cdot (\text{ДНВ} - \text{H})^-$, аналогичных комплексам $2\text{TMA}^+ \cdot (\text{ДНВ} - \text{H})^-$ по соотношению зарядов, также наблюдается повышенное значение гистерезиса $1,9^\circ\text{C}$ (см. табл. 1).

Для систем (ДПФХ + БЧАС + ДНВ) гистерезис, в целом, намного меньше. Для тройных систем, содержащих этоний, взаимодействие гидрофобных «хвостов» БЧАС с неполярной областью мембран препятствует высвобождению при нагреве как дикатионов БЧАС, так и их комплексов с ДНВ. Судя по данным ДСК, включение таких комплексов в мембраны более предпочтительно, чем индивидуальных анионов ДНВ, даже при избытке последних. Таким образом, как ЧАС ТМА, так и БЧАС препятствуют индивидуальному встраиванию аниона ДНВ в фосфолипидные мембраны.

Исследование методом квазибинарных систем

Для дальнейшего анализа данных и выяснения вопроса стехиометрии возможных комплексов использовался метод квазибинарных систем. Суть его заключается в том, что фосфолипидная среда рассматривается как матрица, в которой происходит взаимодействие двух растворённых компонентов. Как уже упоминалось выше, специфическое взаимодействие между компонентами будет проявляться как отклонение калориметрических параметров от аддитивности [43], причём его максимум будет указывать на наиболее вероятную (наиболее энергетически выгодную) стехиометрию образующегося комплекса.

С этой точки зрения рассмотрим квазибинарные фазовые диаграммы для систем, содержащих гидратированный ДПФХ с добавками ЧАС, БЧАС и ДНВ в различных соотношениях (рис. 7). Обратим внимание на то, что на представленных диаграммах относительные концентрации компонентов выражены в молях; аналогичные зависимости наблюдаются и при весовом выражении концентрации (рис. 7 в).

На диаграммах прямая линия, соединяющая две крайние точки, соответствующие T_m ЧАС/БЧАС и ДНВ, показывает вид диаграммы при наличии аддитивности параметра T_m . Отрезок перпендикуляра, опущенного из максимума экспериментальной кривой на эту линию, характеризует отклонение от аддитивности. Положение максимума кривой характеризует наиболее выгодную стехиометрию комплексов, включенных в мембрану.

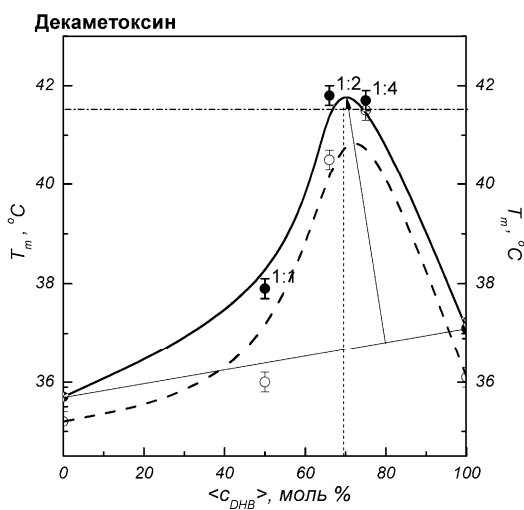
Для исследованных систем (ДПФХ + БЧАС + ДНВ) максимальное отклонение от аддитивности температуры основного перехода имеет место при соотношении компонентов БЧАС:ДНВ 1:2, которое наблюдается как при нагревании, так и при охлаждении образца (рис. 7 а, б). Близкие значения отклонения получаются и для соотношения компонентов 1:4. При обоих соотношениях компонентов каждой из двух аммониевых групп в составе БЧАС соответствует, по крайней мере, по одному аниону ДНВ. В случае соотношения 1:4 избыток ДНВ, по всей видимости, остается в растворе. Таким образом, наиболее выгодным комплексам соответствует стехиометрия 1:2. Такие комплексы являются в сумме электронейтральными. Для заряженных комплексов БЧАС:ДНВ со стехиометрией 1:1 отклонение от аддитивности несколько меньше.

Подобная зависимость, хотя и менее чёткая, наблюдается также и для величин энтальпии плавления. Отметим, что при указанной стехиометрии для параметров активности и кооперативности также наблюдаются аномальные значения.

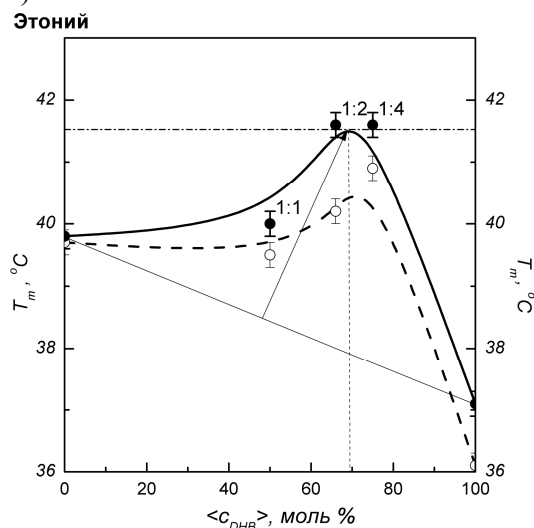
Обращает на себя внимание тот факт, что системам с наиболее вероятным комплексообразованием соответствует максимальное значение гистерезиса. Причём,

только в случае систем с декаметоксином это коррелирует с избыточным уменьшением размера кооперативного домена; в остальных системах этот параметр скорее имеет тенденцию увеличиваться. Следовательно, наблюдаемый эффект логичнее связать с латеральным перераспределением и повышением степени микрогетерогенности исследуемых систем, что может быть интерпретировано как разобшение доменов мембраны.

а)



б)



в)

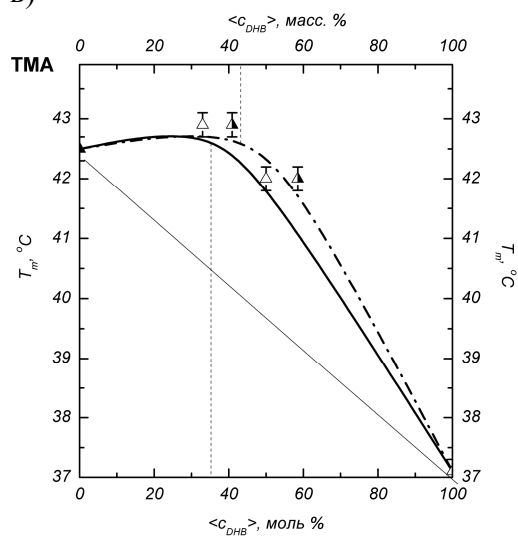


Рис. 7. Бинарные фазовые диаграммы систем декаметоксин + ДНВ (а), этоний + ДНВ (б) и ТМА + ДНВ (в) в среде гидратированного ДПФХ. Сплошная линия – данные получены при нагревании системы, пунктирная – при охлаждении. Значения концентраций выражены в мольных долях, за исключением штрих-пунктирной линии, соответствующей массовым единицам. По оси абсцисс указана относительная концентрация ДНВ, соответствующие мольные соотношения МТА – в маркировках экспериментальных точек.

В заключение хотелось бы отметить известный из литературы факт, что исследуемая в данной работе 2,5-ДНВ (гентибиновая кислота), являясь метаболитом ацетилсалицилловой кислоты (аспирина), обладает широким спектром биологического действия [48, 49], в том числе противовоспалительным и жаропонижающим. Учитывая это, проблема её совместного действия с исследуемыми в данной работе антимикробными БЧАС представляется весьма актуальной.

ВЫВОДЫ

Рассмотрена возможность модуляции активности МТА на основе солей ЧАС/БЧАС при их совместном введении с органической кислотой ДНВ в модельные фосфолипидные мембраны.

Данные ДСК показали, что при совместном введении в водную дисперсию гидратированного ДПФХ смесей ДНВ с БЧАС декаметоксином и этонием, а также с ЧАС ТМА, аддитивность калориметрических параметров, характерных для модельных мембран с включением индивидуальных МТА, отсутствует. Этот экспериментальный факт является свидетельством встраивания в мембраны не индивидуальных МТА, но их комплексов.

Данные масс-спектрометрии с МАЛДИ и ББА, а также квантово-химических расчетов показывают возможность образования стабильных комплексов катионов четвертичных аммониевых оснований с анионом ДНВ.

Анализ калориметрических параметров исследованных систем показал, что включение в мембраны индивидуальных компонентов (за исключением ТМА), находящихся, по всей видимости, в ионном состоянии вследствие диссоциации в растворе, приводит к снижению температуры основного перехода $P_{\beta} - L_{\alpha}$ и, соответственно, к разупорядочению структуры мембраны. Аналогичный эффект снижения температуры плавления мембраны наблюдается и при добавлении смесей МТА в соотношении, обеспечивающем сохранение заряженного состояния комплексов МТА. При соотношении компонентов МТА, обеспечивающих образование нейтральных комплексов катионов ЧАС/БЧАС с анионом ДНВ, наблюдается повышение температуры основного перехода и упорядочение мембраны. Этот эффект можно рассматривать как модуляцию активности ЧАС посредством органической кислоты. В качестве молекулярного механизма модуляции предложена нейтрализация ионных МТА путём образования комплексов катионов с анионами.

Метод квазибинарных систем для случая двух различных МТА в фосфолипидной матрице позволил установить стехиометрию комплексов БЧАС:ДНВ 1:2, для которой наблюдается наибольшее отклонение от аддитивности. В таких комплексах каждой из двух аммониевых групп в составе БЧАС соответствует по одному аниону ДНВ.

Проанализировано влияние ряда структурных особенностей МТА на параметры их взаимодействия с фосфолипидными мембранами. Показано, что наличие в составе дикатиона декаметоксина двух остатков ментола, индивидуально проявляющего себя как типичный анестетик, приводит к более сильному дестабилизирующему влиянию на мембраны декаметоксина в сравнении с этонием. Определенную роль играет также различие в расстоянии между четвертичными атомами азота в дикатионах декаметоксина и этония, задающее различие в геометрических параметрах встраивания дикатионов в мембраны.

Обнаруженную возможность ослабления мембранотропной активности антимикробных агентов на основе БЧАС при их совместном применении с органической кислотой необходимо учитывать при разработке состава многокомпонентных лекарственных препаратов противомикробного действия.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования НАН Украины «Мас-спектрометричний комплекс з лазерною десорбцією та іонізацією MALDI-TOF Autoflex II» при Институте химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helenius A., Simons K. // Biochim. Biophys. Acta, Reviews on Biomembranes. 1975. V. 415. Iss. 1. P. 29-79.
2. Evstigneev M.P. Mizhmolekuljarni vzajemodii' biologichno aktyvnyh aromatychnyh rehovyn i DNK u vodnomu rozchyni. – Avtoref. diss. – Kharkov, 2006.
3. Vievsky A.N. Mehanizmy biologicheskogo vliyaniya kationnyh poverhnostno-aktivnyh veschestv. - M.: V.I., 1991. 250 p.

4. Vievsky A. // *Tenside, Surfactants, Detergents*. 1997. V. 34, N. 1. P. 18-21.
5. Suhodub L.F., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Volyanskiy Yu.L. // *Antibiotiki i himioterapiya*. 1989. V. 34, N 11. P. 823-827.
6. Kosevich M.V., Pashinskaya V.A., Shilagi Z., Vekey K., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. // *Visn. Khark. Univ, Biofizichnyi visnik*. 1998. V. 422, N 2. P. 15-23.
7. Kosevich M.V., Pashinskaya V.A., Stepanian S.G., Shelkovsky V.S., Orlov V.V., Blagoy Yu.P. // *Proc. Kharkov State Univ., Biophysical Bulletin*. 1999. V. 434, N. 1. P. 31-38.
8. Pashinskaya V.A., Kosevich M.V., Stepanian S.G. // *Visnik problem biologii i meditsini*. 1999. V. 9. P. 118-125.
9. Korzovskaya O.V., Pashinskaya V.A., Kosevich M.V., Lisetski L.N. // *Biophysical Bulletin* 1999. V.450, No 2. P. 35-39.
10. Pashynskaya V.A., Kosevich M.V., Gomory A., Vekey K., Korzovskaya O.V., Lisetski L.N., Blagoy Yu.P. // *Visn. Khark. Univ., Biofizichnyi visnik*. 1999. V. 450, N. 2. P. 59-62.
11. Pashynskaya V.A., Kosevich M.V., Gomory A., Vashchenko O.V., Lisetski L.N. // *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2002. V. 16. N. 18. P. 1706-1713.
12. Pashynska V.A., Kosevich M.V., Van den Heuvel H., Cuyckens F., Claeys M. // *Proc. Kharkov State Univ., Biophysical Bulletin*. 2004. V. 637, N. 1-2(14). P. 123-130.
13. Pashynska V.A., Kosevich M.V., Gomory A., Szilagy Z., Vekey K., Stepanian S.G. // *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2005. V. 19, N. 6. P. 785-797.
14. Pokrovsky V.A., Kosevich M.V., Osaulenko V.L., Chagovets V.V., Pashynska V.A., Shelkovsky V.S., Karachevtsev V.A., Naumov A.Yu. // *Масс-спектрометрия*. 2005. Т. 2, N. 3. С. 183-192.
15. Pashynska V.A., Kosevich M.V., Van den Heuvel H., Claeys M. // *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2006. V. 20, N 5. P. 755-763.
16. Pashynska V., Kosevich M., Stepanian S., Adamowicz L. // *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*. 2007. V. 815, N. 1-3, P. 55-62.
17. Kosevich M.V., Boryak O.A., Chagovets V.V., Pashynska V.A., Orlov V.V., Stepanian S.G., Shelkovsky V.S. // *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2007. V. 21, N. 11. P. 1813-1819.
18. Almeida Paz F.A., Soares-Santos P.C.R., Nogueira H.I.S., Trindade T., Klinowski J. // *Acta Cryst.* 2003; E59: o506.
19. Singer S., Nicolson G. // *Science* 1972. V. 175, N. 4023. P. 720-731.
20. Buligan I. *Zhidkokristallicheskiy poryadok v biologicheskikh membranah. V sb. Zhidkokristallicheskiy poryadok v polimerah.* – M.: Mir, 1981.
21. Albertini G., Ponzi-Bossi M.G., Rustichelli F. Modification of the phase transitions of model membranes by exogenous molecules. In: *Phase Transitions in Liquid Crystals*. Ed. S. Martelucci, A.N. Chester. - New York: Plenum Press, 1992.
22. Minami H., Inoue T. // *J. Coll. Interf. Sci.* 1998. V. 206. P. 338-341.
23. Albertini G., Bertoli E., Curatola G., Mariani P., Rustichelli F., Zolese G. // *Chem. Phys. Lipids*. 1989. V. 50. P. 143-153.
24. Kyrikou I., Hadjikakou S. K., Kovala-Demertzi D., Viras K., Mavromoustakos T. // *Chem. Phys. Lipids*. 2004. V. 132. P. 157-169.
25. Li S., Lin H. N., Wang G., Huang C. // *Biophys. J.* 1996. V. 70. P. 2784-2794.
26. Balasubramanian S. V., Straubinger R. M., Morris M. E. J. // *Pharm. Sci.* 1997. V. 86. P. 199-204.
27. Bedu-Addo F. K., Huang L. // *J. Pharm. Sci.* 1996. V. 85. P. 714-719.
28. Cannon B., Hermansson M., Gyorke S., Somerharju P., Virtanen J. A., Cheng K. H. // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 933-942.
29. Carrer D. C., Maggio B. // *J. Lipid Res.* 1999. V. 40. P. 1978-1989.
30. Castelli F., Trombetta D., Tomaino A., Bonina F., Romeo G., Uccella N., Saija A. // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 1997. V. 37. P. 135-141.
31. Castelli F., Caruso S., Uccella N. // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 851-855.
32. Korzovskaya O.V., Lisetski L.N., Panikarskaya V.D. // *Izvestiya RAN* 1998. V. 62. N 8. P. 1695-1697.
33. Korzovskaya O.V., Lisetski L.N., Panikarskaya V.D. // *Visn. Khark. Univ., Biofizichnyi visn.* 1998. V. 422, N 2. P. 85-89.
34. Virnik K. M., Korzovskaya O.V., Lisetski L.N., Panikarskaya V.D. // *Ukr. biohim. zhurn.* 1998. V. 70. N6. P. 85-90.
35. Antonov V.F., Smirnova E.Yu., Shevchenko E.V. *Lipidnye membrany pri fazovykh prevrascheniyah.* - M.: Nauka, 1992.
36. Kosevich M.V., Chagovets V.V., Shelkovsky V.S., Boryak O.A., Orlov V.V., Gomory A., Vegh P. // *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2007. V. 21. P. 466-478.

37. Lisetski L.N., O.V. Vashchenko, A.V. Tolmachev, K.B. Vodolazhskiy. Effect of membranotropic agents on mono-, multilayers of dipalmitoylphosphatidylcholine // *Eur. Biophys. J.* 2002. V. 31. P. 554-558.
38. Ovchinnikov Yu.A. *Bioorganicheskaya himiya*. - M.: Prosveschenie, 1987.
39. *Vvedenie v biomembranologiyu* / Pod red. A.A. Boldyreva. - M.: Izd-vo MGU, 1990.
40. Gordienko E.O., Tovstyak V.V. *Fizika biomembran*. - K.: Nauk. dumka, 2009.
41. Ivkov V.G., Berestovskiy G.N. *Dinamicheskaya struktura lipidnogo bisloya*. - M.: Nauka, 1981.
42. Kharakoz D.P. // *Uspehi biol. himii*. 2001. V. 41. P. 333-364.
43. Gennis R. *Biomembrany: molekulyarnaya struktura i funktsii*. - M.: Mir, 1997. - 624 p.
44. Fialkov Yu.Ya., Zhitomirskiy A.N., Tarasenko Yu.A. *Fizicheskaya himiya nevodnykh rastvorov*. - L: Himiya, 1973.
45. *Rastvory neelektrolitov v zhidkostyah* / M.Yu. Nikiforov, G.A. Al'per, V.A. Durov i dr. - M.: Nauka, 1989.
46. Sitnikova T.A., Rahnyanskaya A.A., Yaroslavova E.G., Sergeev-Cherenkov A.N., Homutov G.B., Grinberg V.Ya., Burova T.V., Yaroslavov A.A. // *Vysokomolek. soed.* 2009. V. 51. N 6. P. 954-961.
47. Pashynska V., Boryak O., Kosevich M.V., Stepanian S., Adamovicz L. // *Eur. Phys. J. D.* 2010. V. 58. P. 287-296.
48. Aitipamula S., Chow P.S., Tan R.B.N. // *Acta Cryst.* 2009. E65, o2126-o2127.
49. Ashidate K, Kawamura M., Mimura D., Tohda H., Miyazaki S., Teramoto T., Yamamoto Y., Hirata Y. // *Eur. J. Pharmacology.* 2005. V. 513. Iss. 3. P. 173-179.