

Модуляция воздействия четвертичных аммониевых соединений на модельные биомембраны посредством комплексообразования с органическим анионом

О. В. Ващенко, В. А. Пашинская¹, М. В. Косевич¹,
В. Д. Паникарская, Л. Н. Лисецкий

Институт скантillationных материалов НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины
Проспект Ленина, 60, Харьков, Украина, 61001

¹Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины
Проспект Ленина, 47, Харьков, Украина, 61103

olga_v@isma.kharkov.ua

Цель. Изучить модуляцию мембранотропной активности бисчетвертичных аммониевых соединений (БЧАС) декаметоксина и этония, обусловленную их взаимодействием с органическим анионом дигидроксibenзойной кислоты (ДНВ). *Методы.* Дифференциальная сканирующая калориметрия, масс-спектрометрия. *Результаты.* Обнаружено, что добавление индивидуальных БЧАС или ДНВ к фосфолипидным мембранам значительно снижает температуру перехода «гель–жидкий кристалл». При совместном введении БЧАС и ДНВ температура фазового перехода мембраны несколько повышается, что свидетельствует об отсутствии аддитивности действия этих веществ и встраивании в мембраны их комплексов. *Выводы.* ДНВ уменьшает эффективность дестабилизирующего эффекта БЧАС на мембраны, то есть является модулятором их активности. Возможный молекулярный механизм модуляции заключается в компенсации зарядов катиона БЧАС и органических анионов ДНВ при образовании их комплекса, взаимодействие которого с мембранными структурами отличается от такового ионных форм индивидуальных соединений.

Ключевые слова: мембранотропные агенты, фосфолипидные мембраны, бисчетвертичные аммониевые соединения, дигидроксibenзойная кислота, модуляция активности, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Введение. Известно, что эффективность фармакологических препаратов определяется не только их основным действующим веществом, но и модуляцией активности другими соединениями, присутствующими в лекарственной форме. Цель данного исследования состояла в установлении возможности модуляции влияния антимикробных препаратов на основе бисчетвертичных аммониевых соединений (БЧАС) за счет их связывания с органическими анионами. Одним из основных механизмов дей-

ствия мембранотропных БЧАС, относящихся к катионным поверхностно активным веществам (ПАВ), считается их связывание с цитоплазматическими мембранами микроорганизмов, приводящее к нарушению функционирования последних [1]. В серии наших предыдущих публикаций [2–4], посвященных систематическому изучению молекулярных механизмов действия антимикробных препаратов на основе БЧАС декаметоксина и этония (рис. 1, а, б), установлено, что данные препараты взаимодействуют с модельными фосфолипидными мембранами и образуют устойчивые некова-

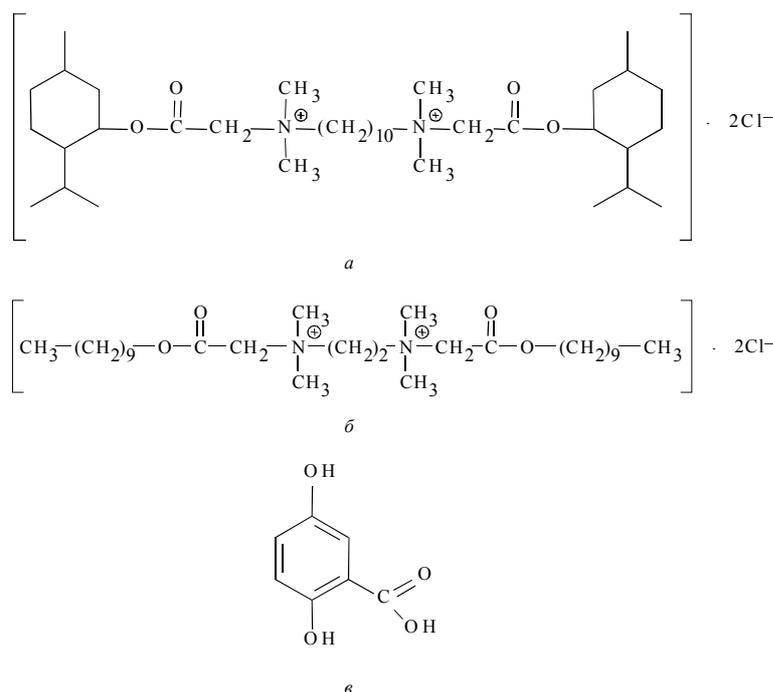


Рис. 1. Структурные формулы дихлоридов БЧАС декаметоксина (а), этония (б) и 2,5-дигидроксибензойной кислоты (в)

лентные комплексы с фосфолипидами. В ходе дальнейших масс-спектрометрических экспериментов нами обнаружено, что анион органической 2,5-дигидроксибензойной кислоты (ДНВ) способен замещать противоион хлора, формируя устойчивый комплекс с дикатионом декаметоксина. В связи с этим было высказано предположение о возможности образования таких комплексов при совместном воздействии этих двух веществ на фосфолипидные мембраны и о влиянии на мембранотропную активность дикатионов БЧАС их связывания с органическими анионами ДНВ. Для проверки этого предположения в качестве модельной системы выбраны водные дисперсии дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) – мультислойные ламеллярные структуры, состоящие из отдельных бислоев, разделенных прослойкой воды, – имитирующие фосфолипидные мембраны, в которые вводили БЧАС декаметоксин и этоний по отдельности и в сочетании с ДНВ. Отметим, что выбор ДНВ обусловлен ее использованием как соединения, моделирующего кислотные и ароматические группы ряда аминокислот [5]. Основным методом изучения служила дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), позволяющая устанавливать изменение калориметрических параметров фазовых переходов в модельных мембранах при воздействии на них мембранотропных агентов (МТА).

Материалы и методы. Исследование методом ДСК проводили с помощью термоаналитической системы «Mettler TA 3000» (Швейцария). Образцы массой 15–25 мг помещали в алюминиевые тигли с полуоткрытым положением крышки. Программируемая схема температурного сканирования состояла из последовательных циклов нагревания и охлаждения со скоростью 2 К/мин.

Для анализа образцов методом ДСК ДПФХ и БЧАС смешивали в кристаллическом состоянии и затем готовили водные дисперсии полученной композиции с массовым соотношением ДПФХ:вода 50:50 по стандартной методике, описанной в [6]. При совместном введении БЧАС и ДНВ выбирали концентрации, обеспечивающие соотношение четвертичных групп и ДНВ 2:1, 1:1 и 1:2, чему соответствуют молярные отношения 1:1, 1:2 и 1:4. Исследование всех систем осуществляли при pH 7, общая концентрация МТА, вводимых в фосфолипидную матрицу, составляла 5 масс. %.

Изучение методом матрично-активированной лазерной десорбционно/ионизационной (МАЛДИ) масс-спектрометрии проводили на времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF AutoFlex («Bruker Daltonics», ФРГ). В данных экспериментах один из компонентов исследуемых систем, а именно – ДНВ, выполнял одновременно и функции УФ-поглощающей матрицы для МАЛДИ.

Параметры фазовых переходов для систем «гидратированный ДПФХ + МТА»

Состав мембранотропных агентов	Нагревание		Охлаждение		Гистерезис ΔT , °C
	T_m , °C	ΔH_m , Дж/г	T_m , °C	ΔH_m , Дж/г	
Без МТА	41,5	23,4	41,4	40,3	0,1
DHB	37,1	20,3	36,1	23,9	1,0
Декаметоксин	35,7	15,8	35,2	24,5	0,5
Декаметоксин:DHB 1:1	37,9	15,3	35,0	26,0	2,9
Декаметоксин:DHB 1:2	41,8	15,8	40,5	17,7	1,3
Декаметоксин:DHB 1:4	41,7	24,5	41,5	5,0	0,2
Этоний	39,8	17,8	39,7	18,5	0,1
Этоний:DHB 1:1	40,0	13,7	39,5	16,6	0,5
Этоний: DHB 1:2	41,6	17,8	40,2	21,7	1,4
Этоний: DHB 1:4	41,6	18,8	40,9	30,8	0,7

В работе использованы препараты ДПФХ (5,45 % влажности) фирмы «Alexis Biochemicals» (Швейцария), 2,5-дигидроксибензойной кислоты производства «Sigma» (ФРГ). Препараты декаметоксина и этония синтезированы в Институте органической химии НАН Украины.

Результаты и обсуждение. Образование стабильного нековалентного комплекса дикатиона БЧАС декаметоксина с анионом DHB зарегистрировано в условиях МАЛДИ масс-спектрометрического эксперимента. В масс-спектрах МАЛДИ твердых образцов, полученных при высушивании водного раствора декаметоксина и DHB (рис. 2), наряду с ассоциатом дикатиона с одним анионом хлора $\text{Cat}^{2+} \cdot \text{Cl}^-$, m/z 657, являющегося характеристическим ионом в масс-спектрах чистого декаметоксина [2], появляется ассоциат дикатиона с анионом DHB $\text{Cat}^{2+} \cdot (\text{DHB-H})^-$, m/z 775. При эквимолярном соотношении компонентов в исходном растворе интенсивность ассоциата $\text{Cat}^{2+} \cdot (\text{DHB-H})^-$ в МАЛДИ масс-спектрах значительно превышает таковую ассоциата $\text{Cat}^{2+} \cdot \text{Cl}^-$, что свидетельствует о конкуренции между анионами и преимущественном связывании с дикатионом органического аниона (DHB-H)⁻.

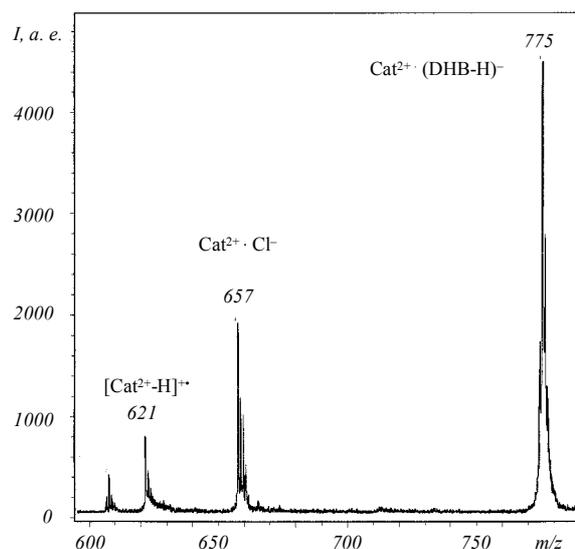


Рис. 2. Участок МАЛДИ масс-спектра образца декаметоксина в матрице DHB, содержащий ассоциаты дикатиона декаметоксина с анионом хлора $\text{Cat}^{2+} \cdot \text{Cl}^-$ и анионом депротонированной DHB $\text{Cat}^{2+} \cdot (\text{DHB-H})^-$

Методом ДСК определены калориметрические параметры фазовых переходов в модельных мембранах, лежащие в области физиологических температур, а именно – перехода из фазы геля в жидкокристаллическое состояние. Изучены водные дисперсии ДПФХ без добавок, с добавками БЧАС декаметоксина, этония и DHB, а также смеси БЧАС с DHB. В таблице представлены данные ДСК: температура (T_m) и энтальпия (ΔH_m) основного фазового перехода, определенные в режимах нагревания и охлаждения, а также гистерезис (ΔT).

Для анализа первичных данных и выяснения вопроса о стехиометрии возможных комплексов мы использовали метод квазибинарных систем [7, 8]. Суть его заключается в том, что фосфолипидная среда рассматривается как матрица, в которой происходит взаимодействие двух растворенных компонентов. 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.

На рис. 3 представлены квазибинарные фазовые диаграммы для систем, содержащих гидратированный ДПФХ с добавками БЧАС декаметоксина и

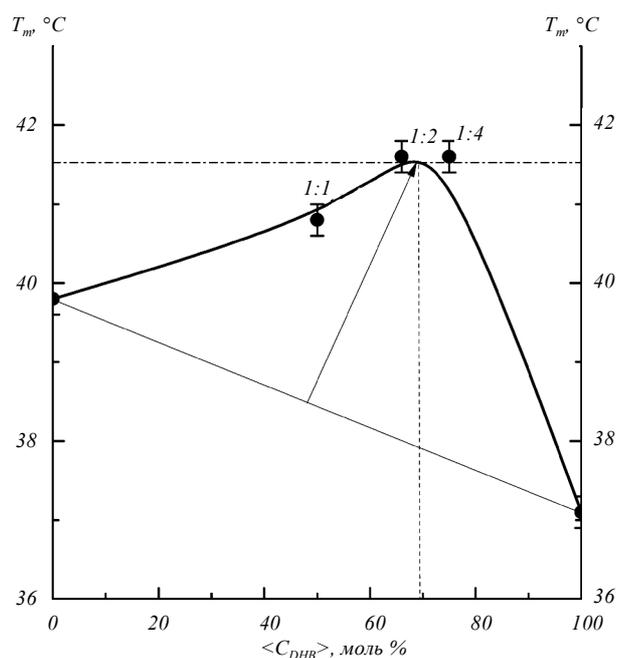
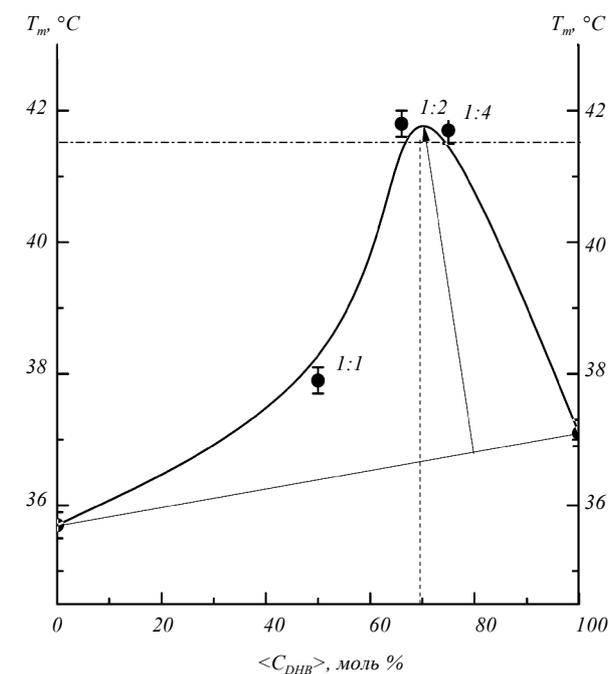


Рис. 3. Фазовые диаграммы квазибинарных систем декаметоксин–ДНВ (а), этоний–ДНВ (б) в среде гидратированного ДПФХ (суммарная концентрация МТА во всех системах равна 5 масс. %). Соответствующие молярные соотношения МТА указаны в маркировках экспериментальных точек

этония, а также кислоты ДНВ. На диаграммах прямая линия, соединяющая две крайние точки, соответствующие T_m БЧАС и ДНВ, показывает вид диа-

граммы при наличии аддитивности параметра T_m . Отрезок перпендикуляра, опущенного из максимума экспериментальной кривой на эту линию, характеризует отклонение от аддитивности; положение максимума кривой – наиболее выгодную стехиометрию комплексов, включенных в мембрану.

На основе анализа полученных данных можно сделать следующие заключения. Изменение термодинамических параметров модельных мембран при введении индивидуальных МТА в водную дисперсию ДПФХ свидетельствует о взаимодействии всех исследованных МТА с фосфолипидными бислоями. Добавление МТА значительно снижает температуру основного фазового перехода, то есть вызывает разупорядочение фосфолипидного бислоя. Поскольку четвертичные аммониевые основания и кислота ДНВ диссоциируют в водном растворе, можно предположить, что данные МТА встраиваются в мембрану в форме ионов: дикатионов декаметоксина и этония Cat^{2+} и аниона $(\text{ДНВ}-\text{H})^-$.

Совместное введение БЧАС и ДНВ в дисперсию ДПФХ также изменяет ее термодинамические параметры, однако аддитивности эффектов БЧАС и ДНВ по концентрации вводимых компонентов не наблюдается. Существенное отклонение от аддитивности в системах (ДПФХ + БЧАС + ДНВ) является свидетельством специфического взаимодействия между добавками, вводимыми в фосфолипидную матрицу. Комплексы БЧАС и ДНВ формируются, по всей видимости, подобно комплексам $\text{Cat}^{2+} \cdot (\text{ДНВ} - \text{H})^-$, зарегистрированным в масс-спектрометрическом эксперименте (рис. 2), за счет кулоновского взаимодействия между соответствующими катионами и анионами.

Прием построения квазибинарных диаграмм позволил установить стехиометрию комплексов БЧАС:ДНВ 1:2, для которой отмечено наибольшее отклонение от аддитивности (рис. 3). В таких комплексах каждой из двух аммониевых групп в составе БЧАС соответствует по одному аниону ДНВ.

Степень влияния совместно вводимых БЧАС и ДНВ на calorиметрические параметры системы находится в сильной зависимости от соотношения компонентов. При молярном отношении БЧАС к ДНВ 1:1 T_m трехкомпонентной системы (ДПФХ + БЧАС + ДНВ) незначительно отличаются от T_m для бинарной системы (ДПФХ + БЧАС). При отношении БЧАС к ДНВ 1:2 и 1:4 наблюдаются качественные изменения: сдвиг температуры основного

перехода меняет знак по отношению к T_m недопированного ДПФХ, однако по абсолютной величине повышение T_m незначительно. Подобный эффект можно рассматривать как дезактивацию разупорядочивающего воздействия БЧАС на мембраны в присутствии определенных концентраций ДНВ. Таким образом, можно говорить о ДНВ как о модуляторе действия БЧАС. С другой стороны, образование комплексов с БЧАС снижает активность и самой ДНВ.

В качестве наиболее вероятного молекулярного механизма описанного выше эффекта модуляции активности БЧАС можно предложить нейтрализацию заряда дикатиона БЧАС при формировании его комплекса с ДНВ. Предположение основано на том факте, что переход от понижения к повышению температуры плавления T_m в системе (ДПФХ + БЧАС + ДНВ) происходит при содержании ДНВ, равном или превышающем таковое положительно заряженных аммониевых групп (по две на молекулу БЧАС), то есть достаточном для их нейтрализации при образовании комплексов. При молекулярном отношении БЧАС к ДНВ 1:1 в среднем один из положительных центров дикатиона остается «некомпенсированным» анионом ДНВ и характер изменения калориметрических параметров продолжает оставаться соответствующим воздействию на мембрану ионных МТА.

Отметим, что вопрос о зависимости мембранотропной активности ПАВ на основе БЧАС от их структуры – природы гидрофобного «хвоста» и расстояния между положительно заряженными атомами четвертичного азота, отчетливо проявляющийся на примере декаметоксина и этония, – рассмотрен нами ранее [2, 3]. Структура дикатиона этония, включающая полярную «головку» из двух близко расположенных аммониевых групп и две гидрофобные углеводородные цепи, в целом подобна структуре молекул ДПФХ, что обеспечивает встраивание дикатиона этония в мембрану вследствие замещения молекулы ДПФХ. Более сложная структура гидрофобных «хвостов» декаметоксина, содержащих ментильные остатки, а также достаточно большое расстояние между положительно заряженными аммониевыми группами обеспечивают его более сильное дестабилизирующее действие на мембраны в сравнении с этонием.

Что касается значений энтальпий основного фазового перехода в модельных мембранах, опреде-

ленных в режиме нагрева образца, то для них характерна общая тенденция к уменьшению при введении в систему МТА. Данный факт, в первом приближении, отражает необходимость меньших затрат энергии на разупорядочение мембран при наличии в их составе дестабилизирующих агентов. Процессы, происходящие при охлаждении системы, связаны с особенностями включения МТА в жидкокристаллическую структуру мембран, которые требуют дальнейшего изучения, выходящего за рамки данного сообщения.

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

Данные ДСК показали, что при одновременном добавлении в водную дисперсию гидратированного ДПФХ смесей ДНВ с БЧАС декаметоксином и этонием 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 показывают возможность образования стабильных комплексов катионов четвертичных аммониевых оснований с анионом ДНВ.

Анализ калориметрических параметров исследованных систем выявил, что включение в мембраны индивидуальных компонентов, находящихся, по всей видимости, в ионном состоянии за счет диссоциации в растворе, приводит к снижению температуры основного перехода и, соответственно, к разупорядочению структуры мембраны. Аналогичный эффект уменьшения температуры плавления мембраны наблюдается и при добавлении смесей МТА в соотношении, обеспечивающем сохранение заряженного состояния комплексов МТА. При соотношении компонентов МТА, отвечающих образованию нейтральных комплексов дикатионов БЧАС с анионом ДНВ, отмечено повышение температуры основного перехода и упорядочение мембраны. Этот эффект можно рассматривать как дезактивацию БЧАС, то есть модуляцию активности БЧАС посредством органической кислоты. В качестве молекулярного механизма модуляции предложена нейтрализация ионных МТА за счет образования комплексов катионов с анионами.

Виявленню можливість ослаблення мембранотропної активності антимікробних агентів на основі БЧАС при їх спільному використанні з органічної кислотою необхідно врахувати при розробці складу багатокомпонентних лікарських препаратів протимікробного дії. Представлений у роботі підхід до дослідження спільного дії фармакологічних препаратів на основі БЧАС і органічної кислоти на модельні біомембрани може бути використаний більш широко як тестовий метод вивчення комбінованого дії МТА різної природи.

O. V. Vashchenko, V. A. Pashynska, M. V. Kosevich,
V. D. Panikarskaya¹, L. N. Lisetski

Modulation of bisquaternary ammonium agents effect on model biomembranes by complex formation with an organic anion

Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine
60, Prospekt Lenina, Kharkiv, Ukraine, 61085

¹Institute for Low Temperature Physics and Engineering
NAS of Ukraine

47, Prospekt Lenina, Kharkiv, Ukraine, 61103

Summary

Aim. To study membranotropic activity modulation of bisquaternary ammonium compounds (BQAC) decamethoxinum and aethonium determined by their interaction with dihydroxybenzoic acid (DHB) organic anion. **Methods.** Differential scanning calorimetry, mass spectrometry. **Results.** Doping phospholipid membranes with individual BQAC or DHB leads to a considerable decrease in the membrane melting temperature. At the same time, when BQAC and DHB are introduced together, a certain increase in the membrane melting temperature is observed, implying non-additivity of their action and incorporation of their complexes into the membranes. **Conclusions.** DHB decreases the efficiency of BQAC destabilizing action on the membranes, i. e. DHB is a modulator of their membranotropic activity. A possible molecular mechanism of the modulation consists in the compensation of charges of the BQAC dications by organic DHB anions on the complex formation; parameters of the complex interaction with the membrane structures differ from those of individual ionic compounds.

Key words: membranotropic agents, phospholipid membranes, bisquaternary ammonium compounds, dihydroxybenzoic acid, activity modulation, differential scanning calorimetry.

O. B. Ващенко, В. А. Паши́нська, М. В. Косевич,
В. Д. Панікарська, Л. М. Лісецький

Модуляція впливу бісчетвертинних амонієвих сполук на модельні біомембрани внаслідок комплексоутворення з органічним аніоном

Резюме

Мета. Вивчити модуляцію мембранотропної активності бісчетвертинних амонієвих сполук (БЧАС) декаметоксину та етонію, зумовлену їхньою взаємодією з органічним аніоном ди-

гідроксибензойної кислоти (ДНВ). **Методи.** Диференційна скануюча калориметрія, мас-спектрометрія. **Результати.** Виявлено, що додавання індивідуальних БЧАС або ДНВ до фосфоліпідних мембран значно знижує температуру фазового переходу «гель-рідкий кристал». При одночасному введенні БЧАС і ДНВ температура фазового переходу мембрани децю підвищується, що свідчить про відсутність адитивності дії цих речовин та інкорпорацію у мембрани утворених ними комплексів. **Висновки.** ДНВ зменшує ефективність дестабілізуючої дії БЧАС на мембрани, тобто слугує модулятором їхньої активності. Ймовірний молекулярний механізм модуляції полягає у компенсації зарядів дикатіона БЧАС та органічних аніонів ДНВ при утворенні їхнього комплексу, взаємодія якого з мембранними структурами є відмінною від такої іонних форм індивідуальних сполук.

Ключові слова: мембранотропні агенти, фосфоліпідні мембрани, бісчетвертинні амонієві сполуки, дигідроксибензойна кислота, модуляція активності, диференційна скануюча калориметрія.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Vievskij A. N. Cationic surfactants: New perspectives in medicine and biology // Tenside, Surfactants, Detergents.–1997.–**34**, N 1.–P. 18–21.
2. Pashynska V. A., Kosevich M. V., Gomory A., Vashchenko O. V., Lisetski L. N. Mechanistic investigation of the interaction between bisquaternary antimicrobial agents and phospholipids by liquid secondary ion mass spectrometry and differential scanning calorimetry // Rapid Commun. Mass Spectrom.–2002.–**16**, N 18.–P. 1706–1713.
3. Korzovskaya O. V., Pashinskaya V. A., Kosevich M. V., Lisetski L. N. Interaction of antimicrobial agents decamethoxinum and aethonium with model membranes // Proc. Kharkiv State Univ., Biophys. Bull.–1999.–**450**, N 2.–P. 35–39.
4. Pashynska V. A., Kosevich M. V., Van den Heuvel H., Cuyckens F., Claeys M. Study of non-covalent complexes formation between the bisquaternary ammonium antimicrobial agent decamethoxinum and membrane phospholipids by electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry // Proc. Kharkiv State Univ., Biophys. Bull.–2004.–**637**, N 1–2 (14).– P. 123–130.
5. Pashynska V., Kosevich M., Stepanian S., Adamowicz L. Non-covalent complexes of tetramethylammonium with chlorine anion and 2,5-dihydroxybenzoic acid as models of the interaction of quaternary ammonium biologically active compounds with their molecular targets. A theoretical study // J. Mol. Struct.: THEOCHEM.–2007.–**815**, N 1–3.–P. 55–62.
6. Korzovskaya O. V., Lisetski L. N., Panikarskaya V. D. UV-spectroscopy and structural features of model membranes and liquid-crystalline biomimetic systems // Proc. Kharkiv State Univ., Biophys. Bull.–1998.–**422**, N 2.–P. 85–89.
7. Fialkov Yu. Ya., Zhitomirskij A. N., Tarasenko Yu. A. Physical chemistry of non-aqueous solution.–Leningrad: Khimiya, 1973.–376 p.
8. Solutions of non-electrolytes in liquids.–Moskva: Nauka, 1989.–264 p.

UDC 577.352:615.2

Received 29.03.10