

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА СЕРЕБРА НА ФАЗОВОЕ СОСТОЯНИЕ МОДЕЛЬНЫХ МУЛЬТИБИСЛОЙНЫХ МЕМБРАН

© 2015 г. О.В. Ващенко, Ю.Л. Ермак*, А.О. Красникова, Л.Н. Лисецкий

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

**University of South Bohemia in Ceske Budejovice, 37005 Ceske Budejovice, Branisovska, 31, Czech Republic*

E-mail: olga_v@isma.kharkov.ua

Поступила в редакцию 18.11.13 г.

После доработки 02.10.14 г.

Для изучения влияния нитрата серебра на фазовое состояние модельных липидных мембран методом дифференциальной сканирующей калориметрии были получены параметры фазовых переходов мультибислойных мембран на основе L- α -дипальмитоилфосфатидилхолина и водных растворов AgNO₃ в широком диапазоне концентраций (до 30 масс. %). Показано, что присутствие AgNO₃ приводит к повышению температуры основного фазового перехода T_m мультибислоев L- α -дипальмитоилфосфатидилхолина и появлению дополнительного пика перехода T'_m , что свидетельствует о повышении плотности и неоднородности липидного бислоя. Установлено также, что индивидуальное действие нитрат-иона (NO₃⁻) имеет противоположную направленность (разрыхляет бислои), таким образом, интегральный эффект от AgNO₃ можно отнести непосредственно к действию ионов серебра. По мере повышения концентрации AgNO₃ наблюдается тенденция к перераспределению интенсивностей пиков с температурами T_m и T'_m таким образом, что при концентрации AgNO₃ около 26 масс. % пик T_m исчезает. В области терапевтических концентраций ионов серебра (2 масс. %) существенных изменений фазового состояния модельных мембран не обнаруживается, что может быть одной из причин отсутствия повреждающего действия препаратов серебра на клетки организма-хозяина при выраженном бактерицидном эффекте.

Ключевые слова: нитрат серебра, модельные мультибислойные мембраны, фосфолипиды, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Широчайший антибактериальный и антимикотический спектр действия ионов серебра обусловил его многотысячелетнее применение в терапевтических целях. Наиболее сильную конкуренцию препаратам серебра составили лишь антибиотики, однако в последние десятилетия в связи с установлением таких побочных действий антибиотиков, как подавление иммунитета, дисбактериоз, токсическое действие на внутренние органы, а также появлением резистентных штаммов микроорганизмов, интерес к препаратам серебра вновь усилился [1,2]. Большим преимуществом препаратов серебра является отсутствие привыкания к ним в сочетании с высокой эффективностью действия, не уступающей многим антибиотикам [3]. В то же время в литературе имеется ряд све-

дений о негативном воздействии различных форм серебра [3–5].

На сегодняшний день действие серебра изучено достаточно подробно [4]. Установлено несколько основных молекулярных механизмов его действия: воздействие на белки, ДНК, а также интенсификация формирования активных форм кислорода. Связывая –COOH- и –SH-группы белков, а также азотистые основания и фосфатные группы ДНК, серебро приводит к нарушению их пространственной структуры и, как следствие, потере или искажению их биологической функции [6,7]. Основными мишенями оказываются белки, участвующие в процессах дыхания, окислительного фосфорилирования, поддержания осмотического давления клетки и др. [4,8]. Формирование активных форм кислорода, в свою очередь, приводит к разрушению клеточной стенки, нарушению структуры ДНК и белков [9].

Сокращения: ДПФК – L- α -дипальмитоилфосфатидилхолин, ДМФК – L- α -димиристоилфосфатидилхолин, ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия.

Существует мнение [10,11], что широкий спектр антимикробного действия серебра и отсутствие привыкания к нему обусловлены структурной (а не видовой) специфичностью его действия. Она связана прежде всего с повреждением клеточной стенки микроорганизмов (белково-углеводного кора), при котором нарушается функциональная целостность мембраны и ионы серебра получают доступ к другим жизненно важным структурам. При этом около 40% поступившего Ag^+ остается связанным с внешней стороной клеточной стенки [12].

По сравнению с уровнем разработки вопроса о взаимодействии серебра с белковыми и нуклеиновыми структурами, в литературе содержится намного меньше сведений о его влиянии на еще один важнейший компонент клеточной мембраны – липидный бислой. (Это вполне понятно, поскольку изначально изучение действия серебра проводилось на микроорганизмах, для которых характерно наличие белкового кора поверх бислоя.) При этом из всего многообразия используемых в настоящее время в медицине фармпрепаратов на основе серебра – растворов, мазей, сплавов (ляпис), коллоидного серебра, наночастиц с различным покрытием – наиболее изучено действие на бислой именно последней формы, появившейся только сравнительно недавно. Имеющихся данных достаточно, чтобы заметить существенную разницу в мембранотропном действии ионной и дисперсной форм серебра: для первой литературные источники сообщают об уплотнении бислоя, тогда как для второй – о его разжижении [13–16], а также о накоплении наночастиц в клеточной стенке и внутри клетки [3,17,18].

Очень важными являются две особенности, связанные с фармацевтической формой серебра (см. обзор [3] и ссылки в нем):

1) только ионная форма серебра (Ag^+) обладает бактерицидным действием;

2) «олигодинамическое действие» (эффективность в малых концентрациях) ионной формы, которое отсутствует у металлического (неионного) и коллоидного серебра. Это свойство серебра объясняют его связыванием с белковыми структурами, приводящем к их дисфункции.

Таким образом, в связи с активизацией разработок различных препаратов серебра, в том числе и для внутреннего применения, а также недостаточностью сведений о его проникновении в эукариотические клетки весьма актуальным представляется вопрос его воздействия на липидную компоненту мембраны.

Настоящая работа посвящена изучению воздействия ионной формы серебра (так называемого мембранотропного действия) на модельные мембраны, сформированные из фосфолипидов, составляющих основную долю липидов в мембранах человека. В работе используется системный подход, позволяющий получать сведения о мембранотропном действии определенного иона в ряду других ионов той же химической группы (подгруппы) [19]. В качестве источника Ag^+ был выбран водный раствор нитрата серебра как наиболее широко распространенная форма серебра в фармацевтическом [3] и экологическом плане (загрязнение серебром окружающей среды) [16].

Установление вклада нитрат-иона (NO_3^-) в мембранотропное действие нитрата серебра являлось дополнительной задачей данного исследования, поскольку данных о воздействии нитрат-иона на фазовое состояние липидного бислоя в литературе обнаружено не было.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования в данной работе были выбраны системы, воспроизводящие жидкокристаллическую упорядоченность биологических мембран, – модельные мембраны на основе лиотропных жидкокристаллических фаз фосфатидилхолинов. Исследованные модельные системы представляют собой гидратированные (массовая доля воды 50%) мультибислои L- α -дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и L- α -димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) производства «Alexis Biochemicals» (Швейцария). Образцы были приготовлены на основе растворов $AgNO_3$ в концентрациях от 0,11 до 4,09 М (молярные соотношения липид:соль от 12:1 до 1:3). Использованы соли марки «ос. ч.».

Для приготовления образцов к фосфолипиду в кристаллической форме добавляли необходимое количество бидистиллированной воды либо соответствующего раствора. Затем образец термостатировали в течение нескольких суток при комнатной температуре, периодически прогревая выше температуры плавления, перемешивая и поддерживая относительное содержание воды постоянным.

Исследование методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили с помощью термоаналитической системы «Mettler TA 3000» (Швейцария). Исследуемые образцы в количестве 15–25 мг помещали в алюминевые тигли и запечатывали. Программируемая схема температурного сканирования со-

держала последовательные циклы нагревания и охлаждения со скоростью 2 К/мин. Параметры фазовых переходов из полученных термограмм определяли с помощью программного обеспечения прибора «Mettler TA 3000». Точность определения температуры фазовых переходов составляла 0,1°C, точность определения энтальпии – 1 кДж/кг.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования мембранотропного действия Ag^+ проводили для водных растворов AgNO_3 . Присутствие в системе нитрат-иона обусловило необходимость проведения дополнительных исследований его мембранотропного действия. Известно, что на клеточном уровне действие нитрат-иона токсично; существует мнение, что основным его токсическим проявлением является тканевая гипоксия, обусловленная нарушением сразу нескольких метаболических процессов [20].

Для выявления мембранотропного действия нитрат-иона был использован экспериментальный подход [19], в котором, в частности, была установлена линейная корреляция между сдвигом температуры основного фазового перехода липидных мультислойных структур (ΔT_m), содержащих соли металлов подгруппы IA, и ионными радиусами этих металлов (r_{cation}). Построение такой корреляции для ряда хлоридов позволило, в частности, сделать вывод о крайне незначительном вкладе хлорид-иона в мембранотропное действие исследованных солей в условиях эксперимента. Это согласуется с литературными данными, полученными другими методами [21,22]. Аналогичным образом были получены корреляции « $\Delta T_m - r_{\text{cation}}$ » для ряда нитратов металлов подгруппы IA (рис. 1).

Здесь необходимо уточнить, что исследования действия хлоридов проводили на мультислоях ДМФХ, или (14:0;14:0)-фосфатидилхолинов, тогда как действие нитратов было изучено на мультислоях ДПФХ, или (16:0;16:0)-фосфатидилхолинов. Удлинение углеводородных «хвостов» липидной молекулы на два метиленовых звена приводит к увеличению толщины гидрофобной области в бислоях ДПФХ (25,5 Å [23]) по сравнению с ДМФХ (23 Å [24]). Соответственно, больше оказывается и энергия гидрофобного взаимодействия «хвостов», и ее вклад в общее липид-липидное взаимодействие. Это изменение весьма существенно отражается на температурах переходов между ламеллярными фазами ($L_\beta \leftrightarrow L_\alpha$), которые по нашим данным составляют ~ 41,8 и 24,0°C соответственно.

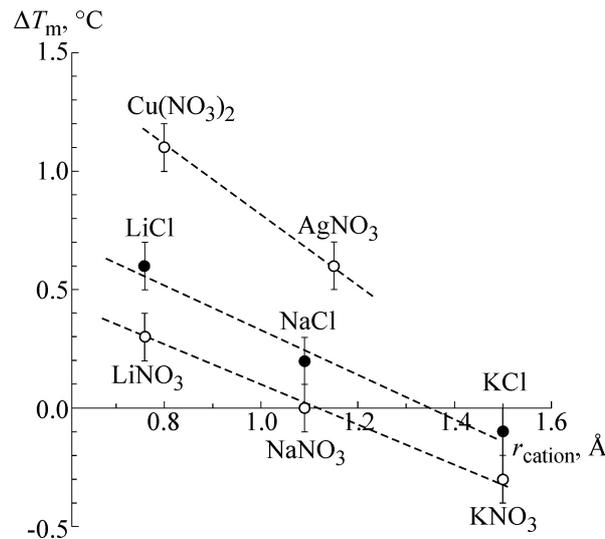


Рис. 1. Сдвиг температуры основного фазового перехода мультислоев ДПФХ (светлые символы) и ДМФХ (темные символы) в присутствии солей одновалентных металлов в молярном соотношении фосфатидилхолин:соль = 3:1 и ее корреляция с радиусами соответствующих катионов (по данным [26]).

Сравнение эффектов, наблюдаемых для двух видов фосфолипидных мембран, позволяет сделать выводы о влиянии толщины неполярной части мембраны на липид-ионное взаимодействие. Принимая, что воздействие ионов в основном ограничено гидрофильной областью и гидрофильно-гидрофобным интерфейсом, можно было предположить, что при увеличении вклада неполярной части все эффекты, связанные с изменением полярной части, ослабляются. Это выражалось бы в более пологом ходе корреляции наблюдаемых изменений температуры фазовых переходов и ионных радиусов катионов. Однако полученные корреляции для рядов нитратов в ДПФХ и хлоридов в ДМФХ оказываются практически параллельными друг другу. На наш взгляд, параллельность получаемых корреляционных прямых отражает глубокую взаимосвязь гидрофильной и гидрофобной областей бислоя, что наглядно показано и обосновано в работе [25].

Как можно видеть из рис. 1, для всех нитратов металлов подгруппы IA по сравнению с хлоридами имеет место вклад постоянной составляющей, приводящей к разупорядочению бислоя. Логично предположить, что именно эта составляющая отражает мембранотропное действие нитрат-иона.

Наблюдаемый эффект хорошо согласуется с выводами предыдущих исследований [19], в которых было показано, что хаотропные ионы при взаимодействии с липидным бислоем при-

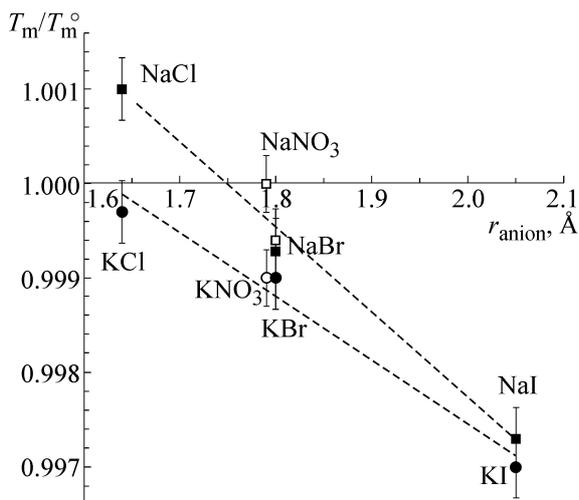


Рис. 2. Корреляция относительного сдвига температуры плавления мультибислоев ДМФХ (темные символы) и ДПФХ (светлые символы) при введении солей натрия и калия. Мольное соотношение липид:соль = 3:1.

водят к его разрыхлению, что выражается в снижении температуры плавления бислоя ($\Delta T_m < 0$), а космотропные – к уплотнению бислоя ($\Delta T_m > 0$). Согласно работе [27], в ряду хаотропных анионов нитрат-ион занимает место среди галогенов: $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^-$. Представлялось интересным установить, соблюдается ли этот порядок в мембранотропном действии указанных анионов в условиях эксперимента. С этой целью для всех исследованных солей натрия и калия были построены корреляции между относительной температурой основного фазового перехода (T_m/T_m^0) и радиусом аниона (рис. 2). Форма представления температурного параметра была выбрана так, как это принято в физике жидких кристаллов (см. обзор [28] и ссылки в нем), что дает возможность сопоставления результатов, полученных в системах различного состава, но с одинаковым типом надмолекулярного упорядочения. Величина T_m^0 представляет собой исходное значение абсолютной температуры плавления бислоя, а T_m – значение, полученное в присутствии соответствующей соли.

Полученные корреляции показывают, что с учетом погрешности эксперимента, наблюдаются близкие к линейным соответствия между радиусом аниона в электролите и изменением температуры плавления бислоя в растворе данного электролита.

Для проверки корректности такого представления представлялось логичным сопоставить мембранотропные эффекты одного и того

же электролита в двух разных матрицах (ДПФХ и ДМФХ) в предложенной системе координат. Для этого был выбран NaBr как представитель приведенного выше ряда хаотропных анионов, оказывающий среднее по величине возмущающее действие на бислой. Как можно видеть из рис. 2, наблюдается весьма хорошее совпадение величины мембранотропного эффекта NaBr в обеих системах, что подтверждает корректность использования предложенной системы координат.

Следует отметить, что как для солей калия, так и для солей натрия наблюдается соответствие степени хаотропности аниона и степени его мембранотропного действия. С учетом погрешности измерения порядок анионов по мере возрастания их мембранотропного эффекта в бислое для двух типов солей выглядит следующим образом: $\text{Cl}^- < \text{NO}_3^- \sim \text{Br}^- < \text{I}^-$. Таким образом, по своему мембранотропному действию NO_3^- оказывается близким к Br^- .

Возникает вопрос о причинах явно не параллельного хода корреляций, получаемых для солей натрия и калия (они условно обозначены прямыми, чтобы подчеркнуть общую тенденцию). Очевидно, что это не связано со способом представления температурного параметра, для которого было использовано только линейное преобразование. Визуально это легко проверить, если оставить для рассмотрения только точки, соответствующие хлоридам и нитратам: для этих двух пар ход корреляций остается таким же, как и на рис. 1. Наблюдаемую непараллельность можно объяснить, если предположить, что катион и анион электролита, связываясь с бислоем, уже не являются практически независимыми друг от друга, как в разбавленных водных растворах, а совместно воздействуют на гидратационные, электрические и другие свойства бислоя.

Возвращаясь к мембранотропному действию катионов (рис. 1), необходимо отметить еще два интересных эффекта. Прежде всего, это существенная разница в мембранотропном действии нитратов металлов подгрупп IA и IB. Как можно видеть, для металлов подгруппы IB наблюдается значительное упорядочивающее влияние на бислой. Возможно, это свидетельствует об ином механизме их действия, к примеру, о более глубоком проникновении в бислой.

Другим неожиданным результатом является то, что величина ΔT_m в присутствии $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ оказывается большей, чем в присутствии AgNO_3 , несмотря на то, что на один катион в нитрате меди приходится два нитрат-иона, ко-

торые, как было показано выше, вносят разупорядочивающий вклад в общее мембранотропное действие соли. Это указывает на существенно более сильное мембранотропное действие иона Cu^{2+} по сравнению с ионом Ag^+ . Данный факт можно объяснить повышением поверхностной плотности заряда вследствие повышения валентности иона.

В то же время эксперименты на клеточных культурах (дифтерийная и тифозная палочки, стафилококк и др.) неизменно показывают, что бактерицидная активность ионов меди ниже либо совпадает с активностью ионов серебра. Это противоречие можно объяснить следующим образом. Известно, что серебро, как и другие представители тяжелых металлов (кадмий, мышьяк, ртуть, алюминий и др.), обладает способностью замещать основные металлы организма в структуре ферментов, а также в метаболических и электрофизических процессах, вызывая токсический эффект и гибель клеток. В работе [19] нами была показана существенная разница мембранотропного действия ионов K^+ и Cs^+ , который может замещать ионы K^+ в организме, что является одной из составляющих токсического действия цезия. На основании близости значений радиусов гидратированного и дегидратированного ионов серебро считают аналогом натрия. Помимо других своих важных функций, натрий является также широко распространенным противоионом, стабилизирующим структуру макромолекул. В результате замещения противоионов Na^+ на Ag^+ может происходить деформация их гидратной оболочки, приводящая, в свою очередь, к дестабилизации пространственной структуры и нарушению их функционирования. Катион Cu^+ по ионному радиусу близок к Li^+ (см. рис. 1), относительное содержание которого в организме по сравнению с Na^+ невелико. При этом все литературные источники сообщают о существенно меньшей антимикробной активности золота; этот же вывод следует из рис. 1, если экстраполировать верхнюю прямую к значению $1,35 \text{ \AA}$ (ионный радиус Au^+ [25]).

Таким образом, можно предполагать, что мембранотропное действие ионов в исследуемых системах убывает в ряду медь > серебро > золото, т.е. согласно их расположению в периодической системе элементов. (Связь биологических свойств этих элементов с их расположением в таблице Менделеева отмечали еще С.С. Боткин и др. [29,30].)

На рис. 3 представлены температурные зависимости теплоемкости мультибислоев ДПФХ, содержащих нитрат серебра в различных концентрациях. С увеличением содержания AgNO_3

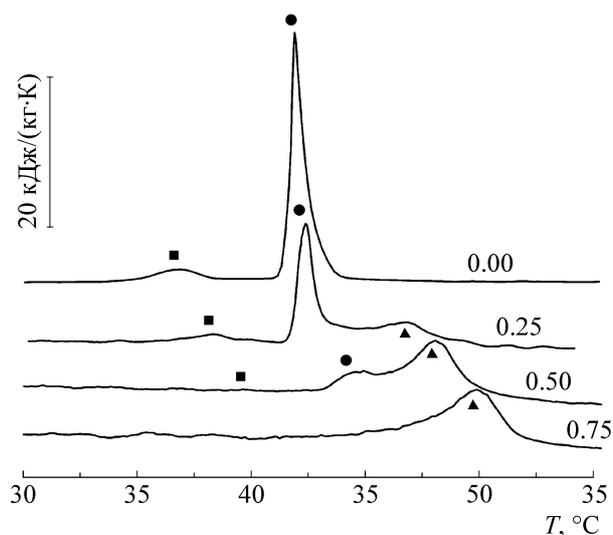


Рис. 3. Удельная теплоемкость мультибислоев ДПФХ + AgNO_3 (нагревание) в области фазовых переходов T_p (квадраты), T_m (кружки) и T'_m (треугольники). В подписях указана мольная доля AgNO_3 относительно безводной массы образца.

наблюдается повышение температур основного (T_m) и предперехода (T_p) мультибислоев ДПФХ, сопровождающееся значительным размыванием ДСК-пиков. Это размывание особенно существенно для пика предперехода, который исчезает при содержании AgNO_3 выше 0,5, соответствующем мольному соотношению ДПФХ: AgNO_3 , равному 1:1. Помимо этого, в присутствии AgNO_3 наблюдается появление дополнительного высокотемпературного пика фазового перехода с температурой перехода T'_m , свидетельствующее о латеральном фазовом разделении в мембране и образовании участков с более плотной упаковкой липидных молекул. При увеличении содержания AgNO_3 в мультибислоях наблюдается перераспределение интенсивностей обоих пиков таким образом, что при мольном соотношении ДПФХ: AgNO_3 , равном 1:3, остается лишь пик T'_m . Исходя из этого, можно примерно оценить состав высокотемпературной фазы: на одну молекулу липида приходится три молекулы нитрата серебра. Интересно, что это соотношение сходно со стехиометрией ортофосфата серебра (Ag_3PO_4) [31], а в ДПФХ именно отрицательно заряженный остаток ортофосфорной кислоты является наиболее вероятным местом связывания ионов серебра. Этот же фрагмент в основном обеспечивает гидратацию поверхности бислоя [32]; ортофосфат серебра, напротив, является труднорастворимым соединением. Таким образом, связывание Ag^+ с остатком ортофосфорной кислоты, по всей видимости, приводит к частичной дегидратации мо-

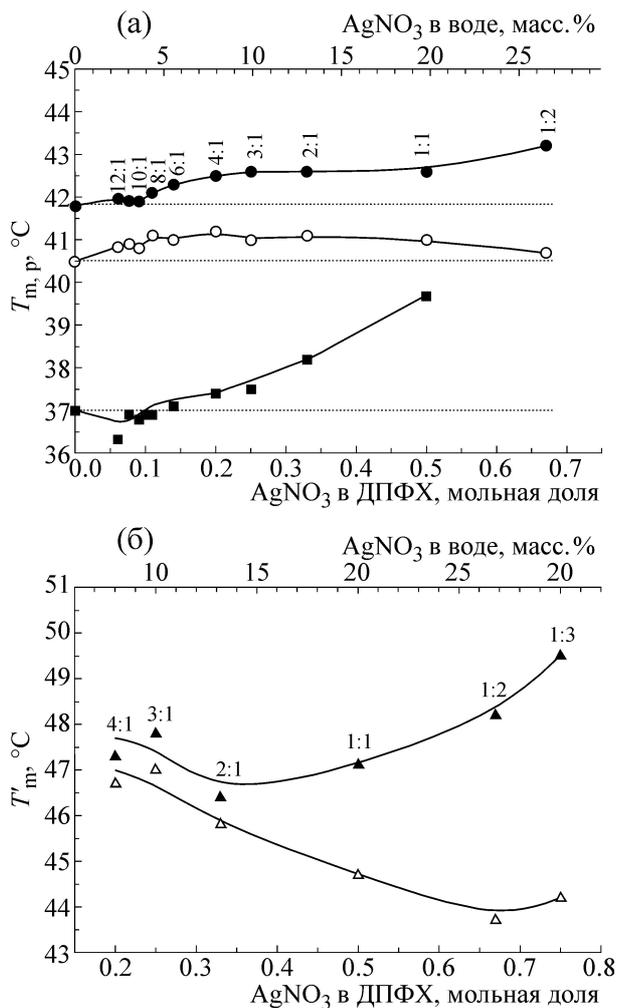


Рис. 4. Зависимости значений температуры пиков фазовых переходов мультибислоев ДПФХ от содержания нитрата серебра: (а) – T_m (кружки) и T_p (квадраты); (б) – $T_{m'}$ (треугольники) при нагревании (темные символы) и охлаждении (светлые символы). Пунктирными линиями отмечены значения T_m и T_p для чистого ДПФХ. В подписях экспериментальных точек указаны молярные соотношения ДПФХ: AgNO_3 .

лекулы липида, что, согласно работе [33], приводит к появлению участков бислоя с повышенной температурой плавления (T_m'), т.е. к фазовому разделению.

Фазовое разделение приводит к появлению многочисленных границ раздела, на которых имеют место дефекты надмолекулярной упаковки липидов и, следовательно, повышение неспецифической проницаемости мембраны, что может быть одной из составляющих токсического действия ионов серебра. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными о повышении проницаемости мембраны для ионов Na^+ и K^+ в присутствии ионов

Ag^+ [34], а также об индуцировании фазового разделения в липидном бислое *in vivo* другим представителем подгруппы IV – медью [35].

Для каждого из трех зарегистрированных пиков (T_p , T_m и T_m') были получены концентрационные зависимости в широком диапазоне содержания нитрата серебра (рис. 4), имеющие ряд важных особенностей для каждого из типов переходов. Так, для пика предперехода (T_p) наблюдается значительное размывание и при этом гораздо более резкий ход указанной зависимости по сравнению с основным переходом T_m (рис. 4а). Более существенный сдвиг T_p по сравнению с T_m обычно имеет место при связывании молекул именно с поверхностью бислоя. Также можно отметить некоторое пороговое значение концентрации AgNO_3 в ДПФХ (0,1 моль/моль), ниже которого не наблюдается существенных изменений T_p и T_m при нагревании (т.е. на уровне липидной компоненты олигодинамическое действие серебра не зарегистрировано, как и следовало ожидать). Для этой подпороговой области наблюдается небольшое размывание пика T_m , отражающее снижение кооперативности, а также затягивание его высокотемпературного плеча, свидетельствующее о большем сродстве Ag^+ к высокотемпературной фазе. Тем важнее отмечаемое наряду с этим четкое уменьшение гистерезиса основного перехода (разности температур перехода при нагревании и охлаждении), что может объясняться повышением латеральной однородности бислоя.

Для дополнительного пика перехода (T_m') наблюдается существенное различие хода концентрационных зависимостей при нагревании и охлаждении. Резкое повышение значений гистерезиса при увеличении концентрации AgNO_3 (рис. 4б) отражает не только сниженную кооперативность новой фазы по сравнению с основной, но и, по всей видимости, значительно большую степень ее неоднородности.

Примечательно, что терапевтические концентрации ионов серебра в водных растворах (2 масс. %) лежат именно в подпороговой области мембранотропного действия (см. верхнюю ось абсцисс на рис. 4а). Таким образом, при терапевтических концентрациях ионов серебра бислои нейтральных липидов не являются мишенью его действия.

Здесь стоит остановиться на связи действия серебра и различия в составе клеточных мембран клеток млекопитающих и бактерий. Помимо бактериальной клеточной стенки, являющейся эффективным местом связывания серебра (см. введение), эти различия касаются и липид-

ного состава мембран. Бактериальные мембраны обогащены отрицательно заряженными липидами (фосфатидилглицерин, кардиолипин и др.), тогда как мембраны млекопитающих – нейтральными липидами (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин) [33,36]. Логично предположить, что связывание катионов с отрицательно заряженной мембранной поверхностью должно происходить более эффективно, чем с электронейтральной. Следовательно, бактериальные мембраны сразу по нескольким показателям являются лучшими мишенями для катионов серебра, нежели мембраны млекопитающих. Таким образом, при некоторой концентрации возможно проявление бактерицидного действия серебра без ущерба для функционирования клеток организма-хозяина, что является давно установленным свойством серебра [10,37]. При этом важно, что патологические отклонения в функционировании клетки зачастую коррелируют с изменением состава мембран (как липидной, так и нелипидной компоненты) [38], что может напрямую влиять на процессы связывания с ними ионов серебра.

Уплотняющее мембранотропное действие серебра на клеточном уровне должно проявляться как низкая проникающая способность серебра, что объясняет некоторые его известные свойства: оно крайне плохо проникает через неповрежденную кожу (эпидермис), в несколько раз лучше – через раневую поверхность (лишенную эпидермиса), а будучи введенным внутривенно – на 90% не усваивается [3].

На основании полученных данных интересно проанализировать различия в мембранотропном действии ионной и дисперсной форм серебра. Уплотнение бислоя, индуцированное Ag^+ , приводит к затруднению диффузии ионов серебра внутрь клетки, даже по сравнению с другими одновалентными ионами. Это приводит к адсорбции и накоплению большого количества ионов серебра на внешней стороне клеточной мембраны, что согласуется с литературными данными [12]. Для наночастиц серебра сообщается о разжижении бислоя [16,17], т.е. их проникновение в клетку облегчено и, видимо, варьирует в зависимости от природы покрытия, непосредственно контактирующего с клеточной стенкой, а также размеров наночастицы. После проникновения наночастицы внутрь клетки осуществляется собственно бактерицидное действие серебра – по мере высвобождения ионов Ag^+ в цитоплазму [3]. При этом происходит связывание Ag^+ с ДНК, белками цитоплазмы, мембранами клеточных органелл, а также внутренней поверхностью бислоя, отличающейся от наружной по своему со-

ставу (что особенно существенно для бактериальных клеток). Следовательно, если для ионной формы затруднена доставка ионов серебра внутрь клетки, то для наночастиц – их выведение из клетки, усугубляемое эффектами агрегации [16] (действительно, сейчас активно обсуждается новая проблема, связанная с накоплением наночастиц в тканях животных и растениях). При этом имеются данные сравнительных экспериментов на растениях и клеточных культурах, согласно которым для достижения одинакового биологического эффекта требовалась в три-четыре раза меньшая концентрация серебра в ионной форме по сравнению с наночастицами [39]. Очевидно, что столь существенные отличия мембранотропного действия различных фармацевтических форм серебра важно учитывать при разработке и применении препаратов на его основе.

Содержание серебра в тканях и органах человека указывает на его широкое распределение внутри организма; особенно его много в клетках мозга, ядрах нервных клеток, в железах эндокринной системы и радужной оболочке глаз [3]. Между тем из всего вышесказанного понятно, что усвоение серебра при поступлении в организм извне малоэффективно как в его ионной форме (по причине высокой реакционной и низкой проникающей способности), так и в форме наночастиц (поскольку последние не являются природной формой серебра). Становится очевидным, что наиболее приемлемой формой усвоения и распределения серебра являются его комплексы с органическими веществами.

Одним из известных путей распространения серебра в организме человека считаются комплексы серебра с белками, к примеру, глобулином и гемоглобином [3]. Однако они, очевидно, не могут доставлять серебро в мозговую ткань и ядра нервных клеток, поскольку гематоэнцефалический барьер и ядерные мембраны для них непроницаемы. Кроме того, серебро в таких соединениях находится в сильно связанном состоянии и потому химически менее активно [3]. В то же время известны устойчивые комплексы серебра со многими другими органическими молекулами, в том числе с насыщенными и ненасыщенными углеводородами, карбоновыми кислотами, аминокислотами, содержащимися, к примеру, в растениях [30].

Таким образом, для разработки новых, более эффективных препаратов серебра перспективным представляется использование его органических комплексных соединений, в том числе и экстрагированных из растительных источников. Действительно, в работе [3] сообщается

об очень высокой антимикробной активности соединений серебра на основе различных комплексных органических соединений (к примеру, L-цистеина).

ВЫВОДЫ

Понимание молекулярных механизмов действия всех форм серебра важно для разработки лекарственных препаратов на его основе. Для ионной формы серебра нами установлено четкое уплотняющее действие на модельные мультислойные мембраны, в отличие от дисперсной формы (коллоидное серебро, наночастицы), для которой сообщается только о разрыхляющем действии. На основании этих различий для дисперсной формы серебра более вероятными мишенями представляются внутриклеточные структуры, тогда как для его ионной формы наиболее вероятно связывание с наружной поверхностью клетки.

Действие ионной формы серебра на мультислой фосфатидилхолина характеризуется также появлением уплотненной фазы с температурой основного фазового перехода на 6–7°C выше, чем у основной фазы, и значительно более мелкодоменной. При этом основная фаза при повышении концентрации серебра также несколько уплотняется и становится менее однородной. Сосуществование основной и уплотненной фазы, с постепенным перераспределением в сторону последней при повышении концентрации серебра, наблюдается в широком диапазоне содержания AgNO_3 в исследуемых системах (5–30 масс. % водных растворах). Подобная индуцированная неоднородность бислоя может быть одним из основных факторов повреждающего действия ионов серебра на бислой нейтральных фосфолипидов.

В области меньших концентраций (терапевтический водный раствор – 2 масс. %) существенных изменений фазового состояния липидного бислоя не обнаруживается, что может быть напрямую связано с отсутствием повреждающего действия препаратов серебра на клетки организма-хозяина при выраженном бактерицидном эффекте. Логично предположить, что при указанных концентрациях основной биологический эффект серебра обусловлен его взаимодействием с нелипидными компонентами клеточной мембраны, что согласуется с широко известными различиями в действии препаратов серебра на мембраны прокариот и эукариот.

Учитывая эти особенности, можно сделать вывод, что для разработки новых, более эффективных препаратов серебра, обеспечивающих его широкое распределение в организме,

перспективными представляются его органические комплексные соединения, возможно, растительного происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Sh. Savadyan, V. M. Melnikova, and G. P. Belikova, *Antibiotiki i chimioterapiya* **11**, 874 (1989).
2. H. H. Lara, E. N. Garza-Trevico, L. Ixtepan-Turrent, and D. K. Singh, *J. Nanobiotechnol.* **9**, 30 (2011).
3. А. Б. Щербakov, *Фармацевт. журн.* **5**, 45 (2006).
4. N. R. Panyala and E. M. Peña-Méndez, *J. Appl. Biomed.* **6**, 117 (2008).
5. G. A. Hartung and G. A. Mansoori, *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.* **2**, 3 (2013).
6. G. McDonnell and A. D. Russell, *Clinical Microbiol. Rev.* **12** (1), 147 (1999).
7. P. D. Bragg and D. J. Rainnie, *Canadian J. Microbiolog.* **20**, 881 (1974).
8. J. J. Abramson, J. L. Trimm, L. Weden, and G. Salama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (6), 1526 (1983).
9. Е. Е. Крисс и К. Б. Яцимирский, *Успехи химии* **35** (2), 347 (1966).
10. Л. А. Кульский, *Серебряная вода* (Наук. думка, Киев, 1987).
11. В. С. Брызгунов, В. Н. Липин и В. Р. Матросова, *Научн. тр. Казанского мед. ин-та* **14**, 121 (1964).
12. K. V. Holt and A. J. Bard, *Biochemistry* **44**, 13214 (2005).
13. G. D. J. Bothun, *Nanobiotechnology* **6**, 13 (2008).
14. Д. С. Орлов, О. В. Шамова, О. Ю. Голубева и др., *Цитокины и воспаление* **9** (2), 32 (2010).
15. S. H. Park, S. G. Oh, J. Y. Mun, and S. S. Han, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **44** (2–3), 117 (2005).
16. R. Chen, P. Choudhary, R. N. Schurr, et al., *Appl. Phys. Lett.* **100**, 013703 (2012).
17. I. Sondi and B. Salopek-Sondi, *J. Coll. Interf. Sci.* **275**, 177 (2004).
18. K.-J. Kim, W. S. Sung, B. K. Suh, et. al., *Biometals* **22**, 235 (2009).
19. О. В. Ващенко, Ю. Л. Ермак и Л. Н. Лисецкий, *Биофизика* **58** (4), 663 (2013).
20. И. И. Брехман, *Человек и биологические активные вещества* (Наука, М., 1980).
21. H. Binder and O. Zschörnig, *Chem. Phys. Lipids* **115**, 39 (2002).
22. R. Bartucci and L. Sportelli, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* **1195** (2), 229 (1994).
23. P.-W. Yang, T. L. Lin, Y. Hu, and U-S. Jeng, *Chinese J. Phys.* **50** (2), 349 (2012).
24. M. R. R. de Planque and J. A. Killian, *Mol. Membr. Biol.* **20**, 271 (2003).
25. M. S. Giammarinaro and S. Micciancio, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **76**, 35 (1981).
26. С. С. Бацанов, *Журн. структур. химии* **3**, 616 (1962).
27. R. L. Baldwin, *Biophys. J.* **71**, 2056 (1996).

28. P. K. Mukherjee, *Liq. Cryst.* **22**, (3), 239 (1997).
29. С. С. Боткин, Дис. из лаб. И.П. Павлова (1888).
30. А. П. Виноградов, Труды биохим. лаб. АН СССР **4**, 91 (1938).
31. И. В. Пятницкий и В. В. Сухан, *Аналитическая химия серебра* (Наука, М., 1975).
32. K. D. Collins, *Methods* **34**, 300 (2004).
33. В. Г. Ивков и Г. Н. Берестовский, *Липидный бислой биологических мембран* (Наука, М., 1982).
34. В. С. Коне, М. Kaleta, and S. R. Gullans, *J. Membr. Biol.* **102** (1), 11 (1988).
35. О. В. Попова, N. M. Sanina, G. N. Likhatskaya, and I. P. Bezverbnaya, *Russ. J. Marine Biol.* **34** (3), 179 (2008).
36. Р. Геннис, *Биомембраны. Молекулярная структура и функции* (Мир, М., 1997).
37. R. Doerr and W. Bergner, *Biochem. Zeitschr.* **31**, 351 (1922).
38. C. Peetla, A. Stine, and V. Labhasetwar, *Mol. Pharm.* **6** (5), 1264 (2009).
39. Y.-K. Jo, B. H. Kim, and G. Jung, *Plant Dis.* **93**, 1037 (2009).

Effects of Silver Nitrate on the Phase State of Model Multibilayer Membranes

O.V. Vashchenko*, Yu.L. Iermak**, A.O. Krasnikova*, and L.N. Lisetski*

**Institute for Scintillation Materials of Science, Institute for Single Crystals, National Academy of Sciences of Ukraine, pr. Lenina 60, Kharkiv, 61001 Ukraine*

***University of South Bohemia in Ceske Budejovice, 37005 Ceske Budejovice, Branisovska, 31, Czech Republic*

In order to study the effects caused by silver nitrate (AgNO_3) on model lipid membranes, we studied multibilayer membranes based on L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and AgNO_3 aqueous solutions in a wide concentration range (up to 30 wt%) by means of differential scanning calorimetry. It has been shown that the presence of AgNO_3 leads both to an increase in the main phase transition temperature (T_m) and appearance of an additional phase transition peak (T'_m), suggesting increasing of both density and heterogeneity of the lipid membrane. The effect of nitrate ions (NO_3^-) was shown to be of the opposite nature (bilayer fluidizing), so the integral densifying effect of AgNO_3 can be referred solely to the action of silver ions (Ag^+). With increasing AgNO_3 concentration, the tendency was observed to opposite changes in T_m and T'_m peaks intensity, thereby at about 26 wt% of AgNO_3 the initial peak (T_m) disappeared. In the range of Ag^+ therapeutic concentrations (up to 2 wt%) no significant changes in the DPPC membrane were revealed. This can be one of the reasons of the absence of a damaging effect of silver drugs on a host organism with simultaneous pronounced bactericidal effect.

Key words: silver nitrate, model multibilayer membranes, phospholipids, differential scanning calorimetry