

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИТРАТОВ НА МУЛЬТИБИСЛОЙНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ: ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

© 2017 г. О.В. Ващенко, А.О. Садченко, Л.В. Будянская, Л.Н. Лисецкий

Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, 61001, Харьков, пр. Ленина, 60, Украина;

E-mail: olga_v@isma.kharkov.ua

Поступила в редакцию 27.11.15 г.

После доработки 24.02.16 г.

Исследованы модельные мультибислойные мембраны на основе *L*- α -димиристоилфосфатидилхолина, содержащие нитраты серебра, натрия, калия и меди в виде пар $\text{AgNO}_3\text{--NaNO}_3$, $\text{AgNO}_3\text{--KNO}_3$ и $\text{AgNO}_3\text{--Cu(NO}_3)_2$. Для каждой из исследованных систем мольная доля нитратов по отношению к липиду сохранялась одинаковой (0,35), при этом мольная доля нитрата серебра (x_{Ag}) в каждой паре нитратов варьировалась от 0,0 до 1,0. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии определены термодинамические параметры основного фазового перехода и предперехода исследуемых систем. Для ряда параметров зарегистрировано положительное отклонение от аддитивности по x_{Ag} : для температуры основного фазового перехода – до 0,5°C, для температуры предперехода – до 2,7°C, для гистерезиса и полуширины основного перехода – до 30%. Обсуждаются физико-химические механизмы конкурентного взаимодействия катионов в мембранах на основе *L*- α -димиристоилфосфатидилхолина.

Ключевые слова: нитрат серебра, мультибислойные липидные мембраны, дифференциальная сканирующая калориметрия, совместное действие.

Мембрана живой клетки находится в окружении множества различных веществ, которые могут изменять ее свойства и функциональность [1–7]. Одним из постоянных компонентов примембранной среды являются ионы, оказывающие непосредственное влияние как на белково-углеводную часть мембраны, так и на липидный бислой [8–13]. Помимо участия в физиологических процессах, мембранотропное действие ионов может проявляться на уровне организма как терапевтическое либо токсическое. Так, бактерицидное действие ионов серебра, традиционно и широко используемого в фармацевтических препаратах [14], во многом обусловлено их взаимодействием с клеточной мембраной [15].

В фармакологии общепринятым является представление о том, что в присутствии различных веществ (лекарственных, пищевых, клеточных компонентов и др.) исходное действие фармацевтических препаратов может усиливаться либо ослабляться, что имеет крайне важное значение в фармакотерапии [16–18]. Механизмы совместного действия веществ можно условно разделить на прямое, непосредственное взаимодействие (образование соединений, ком-

плексов и др.) и не прямое, опосредованное взаимодействие (встраивание в один и тот же физиологический процесс, реакцию, изменение свойств среды и др.). Непосредственное взаимодействие фармпрепаратов проявляется уже на уровне липидного бислоя [19,20]. Проявления опосредованного совместного действия на уровне липидного бислоя представляют особый интерес, поскольку пока мало предсказуемы и могут быть установлены в основном экспериментально. Естественно, результаты модельных исследований не могут быть автоматически аппроксимированы на живой организм, однако они ценны тем, что позволяют выделять отдельные аспекты происходящих процессов. Плодотворность такого подхода подтверждается все более широким использованием модельных липидных систем в прикладных исследованиях [3–5].

Высокая реакционная способность ионов серебра существенно ограничивает круг веществ для изучения их опосредованного совместного действия. Одними из наиболее подходящих являются катионы металлов, отсутствие непосредственного взаимодействия между которыми гарантировано в силу электростатического отталкивания. Поскольку связывание ионов серебра с клеточной мембраной происходит в многокомпонентной ионной среде, содержащей, в ча-

Сокращения: ДМФХ – *L*- α -димиристоилфосфатидилхолин, ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия.

Параметры фазовых переходов модельных мембран ДМФХ, содержащих нитраты

ДМФХ +	Основной переход				Предпереход			
	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_m, \text{кДж/кг}$	$\Delta T_m^{1/2}, ^\circ\text{C}$	$h_m, ^\circ\text{C}$	$T_p, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_p, \text{кДж/кг}$	$\Delta T_p^{1/2}, ^\circ\text{C}$	$h_p, ^\circ\text{C}$
–	24,7	16,4	0,82	1,0	15,6	2,9	1,51	2,7
AgNO ₃	25,1	15,6	0,71	1,2	17,8	2,0	1,27	7,4
NaNO ₃	24,3	16,7	0,68	0,9	12,3	1,6	2,25	5,6
KNO ₃	24,2	15,5	0,68	0,9	12,6	1,1	1,59	4,7
Cu(NO ₃) ₂	25,9	17,0	0,91	1,4	20,7	0,8	2,12	8,1

стности, катионы натрия и калия, представляло интерес установить эффекты совместного действия серебра с каждым из этих типов катионов. Еще одной задачей, интересной с практической точки зрения, является установление совместного действия катионов серебра и меди, также обладающей бактерицидными и мембранотропными свойствами [13,21,22].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве источника катионов были выбраны соли AgNO₃, NaNO₃, KNO₃ и Cu(NO₃)₂ марки «ос.ч.». Липидные мультибислоиные структуры – модельные мембраны – были приготовлены на основе *L*- α -димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) производства компании Sigma (США) и водных растворов соответствующих нитратов. Для этого к сухому ДМФХ добавляли бидистиллированную воду либо соответствующий солевой раствор. Затем образцы термостатировали при комнатной температуре в течение шести–семи суток, периодически прогревая до 50 $^\circ\text{C}$ и тщательно перемешивая. Содержание воды в образце составляло 65 масс. % и контролировалось в течение всего процесса приготовления и измерения (путем взвешивания образца на весах XP26 (Mettler Toledo, Швейцария) с точностью до 0,01 мг и добавления недостающего количества воды в случае необходимости).

Были исследованы модельные мембраны ДМФХ, содержащие следующие пары нитратов: AgNO₃–NaNO₃, AgNO₃–KNO₃ и AgNO₃–Cu(NO₃)₂ в общей мольной доле 0,35 от *L*- α -дипальмитоилфосфатидилхолина. Мольная доля AgNO₃ в каждой паре (x_{Ag}) варьировалась от 0,0 до 1,0.

Исследования проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью калориметра DSC-1 (Mettler, Швейцария). Исследуемые образцы в количестве 15–25 мг помещали в алюминиевые тигли и запечатывали. Для каждого образца прово-

дили два цикла «охлаждение – нагревание» со скоростью сканирования 2 К/мин, обычно используемой для таких систем [24]. На основании полученных ДСК-термограмм с помощью программного обеспечения калориметра DSC-1 были определены параметры фазовых переходов $L_{\beta'} \leftrightarrow P_{\beta'}$ (предпереход, индекс «р») и $P_{\beta'} \leftrightarrow L_{\alpha}$ (основной переход, индекс «т»): температура (T_m, T_p), энтальпия ($\Delta H_m, \Delta H_p$), гистерезис (h_m, h_p) и полуширина ($\Delta T_m^{1/2}, \Delta T_p^{1/2}$). Гистерезис фазовых переходов определяли как разницу температур переходов, полученных при сканировании в режимах нагревания и охлаждения: $h_m = T_m^{\text{нагр}} - T_m^{\text{охл}}$; $h_p = T_p^{\text{нагр}} - T_p^{\text{охл}}$. Экспериментальная ошибка измерения составляла: $\delta T = 0,1^\circ\text{C}$; $\delta H = 1,2 \text{ кДж/кг}$; $\delta \Delta T^{1/2} = 0,05^\circ\text{C}$; $\delta h = 0,1^\circ\text{C}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы были определены параметры модельных мембран ДМФХ в присутствии индивидуальных нитратов (таблица). Как можно видеть, NaNO₃ и KNO₃ снижают температуры фазовых переходов, а AgNO₃ и Cu(NO₃)₂ повышают их; при этом действие KNO₃ оказывается большим по абсолютному значению, чем NaNO₃, а действие Cu(NO₃)₂ – большим, чем AgNO₃. Предпереход более чувствителен к действию нитратов, чем основной переход. Гистерезис обоих переходов в присутствии AgNO₃ и Cu(NO₃)₂ существенно больше, чем в присутствии NaNO₃ и KNO₃. Для всех систем наблюдается корреляция изменений гистерезиса и полуширины перехода – параметров, отражающих степень упорядоченности молекул в бислое. Энтальпия переходов остается практически неизменной в пределах экспериментальной ошибки. Указанные изменения термодинамических параметров мембран ДМФХ с нитратами хорошо согласуются с результатами, полученными для мембран *L*- α -дипальмитоилфосфатидилхолина с нитратами [13] и мембран ДМФХ с хлоридами [25].

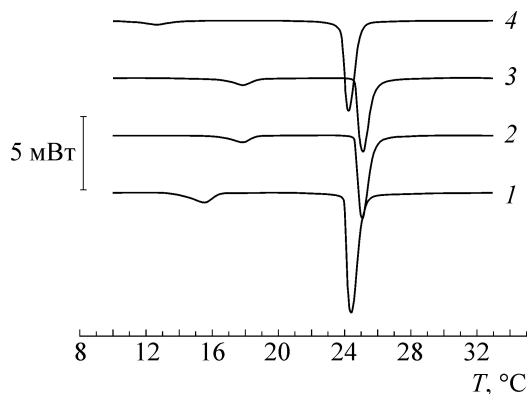


Рис. 1. ДСК-термограммы модельных мембран ДМФХ: 1 – без добавок, 2 – с добавлением AgNO_3 , 3 – с добавлением $\text{AgNO}_3 : \text{KNO}_3$ 1 : 1, 4 – с добавлением AgNO_3 .

При введении в мембрану ДМФХ эквимольного количества AgNO_3 и KNO_3 соответствующие ДСК-профили оказываются весьма схожими с полученными в присутствии только AgNO_3 (рис. 1, кривые 2, 3). Подобная картина наблюдалась и в других парах. Таким образом, можно предположить конкурентное связывание с липидной мембраной в исследуемых парах нитратов.

Для более подробного изучения этого явления был применен метод квазибинарных диаграмм [26]. Суть его заключается в том, что фосфолипидная среда рассматривается как матрица, в которой происходит взаимодействие двух введенных в нее компонентов. Согласно

работе [23], в отсутствие взаимодействия между вводимыми компонентами должна иметь место линейность различных параметров системы. Соответственно, отклонение параметров от аддитивности по содержанию компонентов свидетельствует о наличии специфических взаимодействий между ними.

Весьма чувствительным и в то же время хорошо воспроизводимым термодинамическим параметром является температура фазового перехода T_m . Для каждого из исследуемых нитратов параметр T_m аддитивен по мольной концентрации вплоть до 0,35 м.д. [25,27]. Связь аддитивности T_m и отсутствия специфических взаимодействий вводимых в мембрану компонентов была также описана в работе [28].

Сдвиг температуры основного перехода мембраны ДМФХ в присутствии нитратов (ΔT_m) как функция мольной доли AgNO_3 в общем количестве нитратов в мембране (x_{Ag}) представлен на рис. 2а. Линия аддитивности представляет собой прямую, соединяющую точки, соответствующие одинарным системам: содержащим только AgNO_3 ($x_{\text{Ag}} = 1$) и только второй нитрат ($x_{\text{Ag}} = 0$). Для всех исследованных систем зарегистрированы отклонения от линейности (δ_m), что более наглядно демонстрирует рис. 2б. Как можно видеть, для всех систем отклонения являются достоверными ($\delta_m = 0,2 \div 0,5^\circ\text{C}$) и происходят в сторону повышения температуры перехода. Для пары $\text{AgNO}_3\text{--Cu}(\text{NO}_3)_2$ максимальное отклонение зарегистрировано при $x_{\text{Ag}} \sim 0,3$, что соответствует

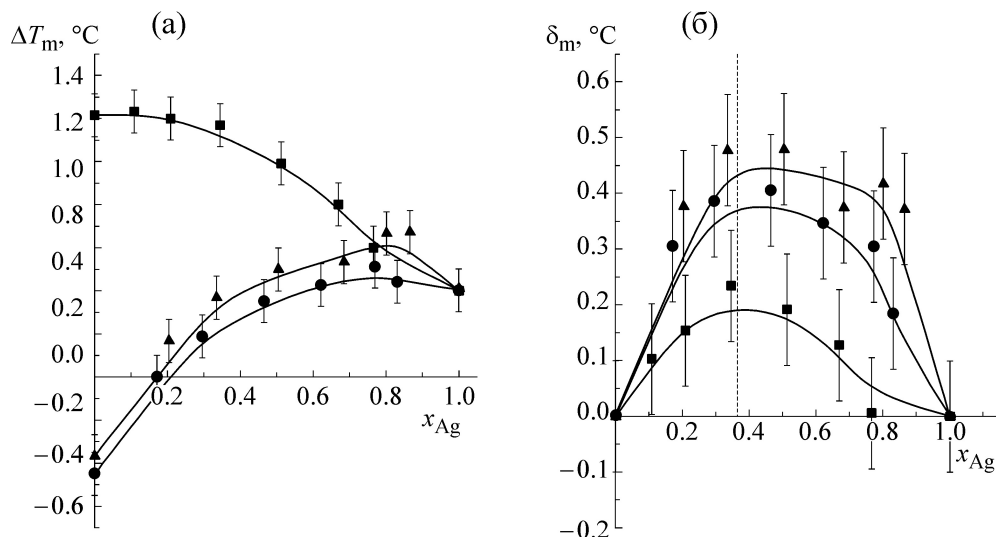


Рис. 2. Температура основного фазового перехода в зависимости от мольной доли нитрата серебра в общем количестве нитратов (x_{Ag}) для мембран ДМФХ, содержащих пары $\text{AgNO}_3\text{--Cu}(\text{NO}_3)_2$ (квадраты), $\text{AgNO}_3\text{--NaNO}_3$ (треугольники) и $\text{AgNO}_3\text{--KNO}_3$ (кружки): (а) – ΔT_m – сдвиг по сравнению с мембраной ДМФХ; (б) – δ_m – отклонение от линейности зависимости $\Delta T_m(x_{\text{Ag}})$. Пунктирной линией отмечен $\delta_m(x_{\text{Ag}})$ для пары $\text{AgNO}_3\text{--Cu}(\text{NO}_3)_2$.

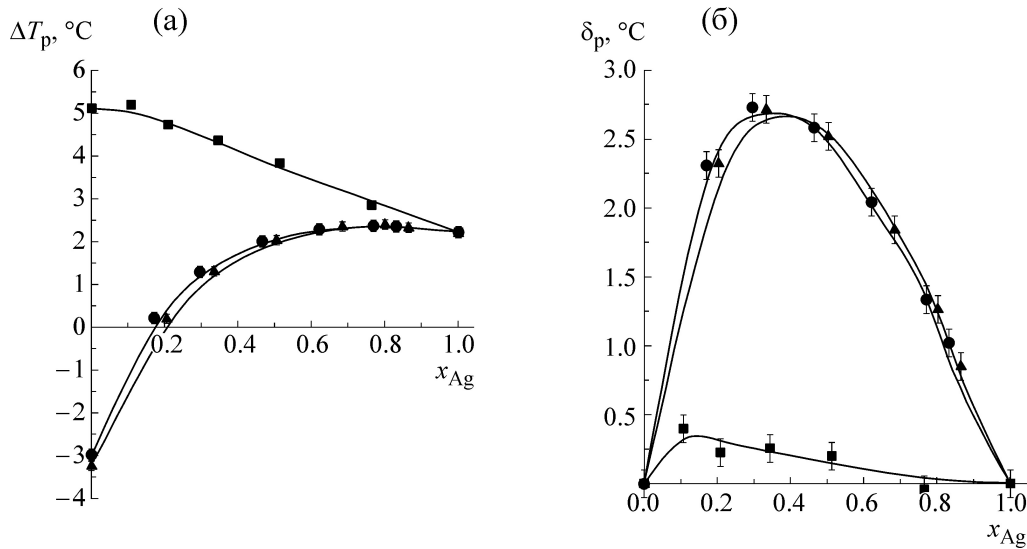


Рис. 3. Температура предперехода в зависимости от мольной доли нитрата серебра в общем количестве нитратов (x_{Ag}) для мембран ДМФХ, содержащих пары $AgNO_3-Cu(NO_3)_2$ (квадраты), $AgNO_3-NaNO_3$ (треугольники) и $AgNO_3-KNO_3$ (кружки): ΔT_p – сдвиг по сравнению с мембраной ДМФХ (а); δ_p – отклонение от линейности зависимости $\Delta T_p(x_{Ag})$ (б).

мольному соотношению нитратов 2 : 1 (пунктирная линия на рис. 2б). Для пар $AgNO_3-NaNO_3$ и $AgNO_3-KNO_3$ максимум отклонения примерно соответствует эквимольному содержанию нитратов в системе. Отметим, что именно такое соотношение $AgNO_3$ и KNO_3 используется в ляписном карандаше [19].

Температура предперехода во всех исследуемых системах также претерпевает положительные отклонения от линейности (δ_p), причем существенно бóльшие, чем δ_m ($\delta_p = 0,3 \div 2,7^\circ C$) (рис. 3). Интересно, что максимумы δ_p соответствуют меньшему значению x_{Ag} по сравнению с максимумами δ_m . Это может быть следствием различного распределения ионов в мембране в $L_{\beta'}$ - и L_{α} -фазах.

Отклонения от линейности наблюдаются и для других термодинамических параметров исследуемых систем. На рис. 4 представлены значения гистерезиса и полуширины основного перехода для пары $AgNO_3-Cu(NO_3)_2$. На графике наблюдаются отклонения обеих величин от линейности до 30%, причем максимумы $h_m(x_{Ag})$ и $\Delta T_m^{1/2}(x_{Ag})$ соответствуют мольному соотношению 2 : 1, такому же, как для ΔT_m (см. рис. 2). Положительный знак отклонений свидетельствует о снижении упорядоченности липидов в мембране, что может являться дополнительным фактором бактерицидного действия. Для пар $AgNO_3-NaNO_3$ и $AgNO_3-KNO_3$ также наблюдались отклонения этих параметров, однако выраженные менее четко.

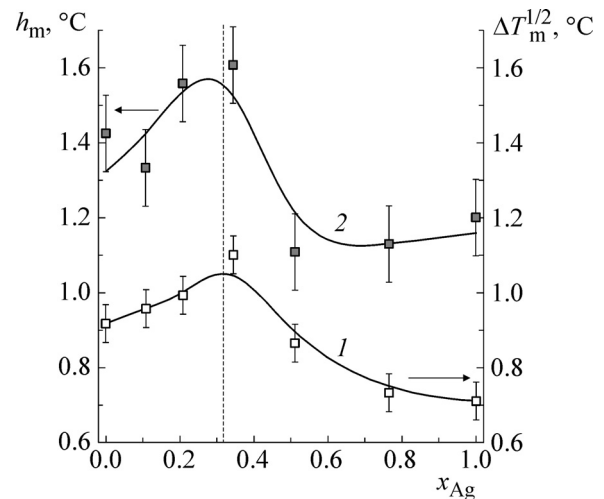


Рис. 4. Зависимость полуширины (кривая 1) и гистерезиса (кривая 2) основного фазового перехода мембран ДМФХ от мольной доли нитрата серебра в общем количестве нитратов (x_{Ag}) в паре $AgNO_3-Cu(NO_3)_2$. Пунктирной линией отмечено максимальное отклонение от линейности.

Таким образом, во всех парах нитратов обнаружено отклонение от аддитивности ряда термодинамических параметров, которое проявляется тем сильнее, чем больше различия их индивидуального мембранотропного действия. Следует отметить, что при используемой в эксперименте концентрации нитраты полностью растворены в воде, т.е. катионы и анионы относительно независимы друг от друга. Тогда их мембранотропное действие формально мож-

но представить как суперпозицию мембранотропного действия катионов и анионов, что было установлено для нитратов и хлоридов щелочноземельных металлов [25].

Попытаемся очертить картину распределения ионов вблизи поверхности мембраны. Из литературных данных известно, что катионы имеют преимущество в адсорбции на поверхности мембраны фосфатидилхолинов вследствие большей доступности отрицательно заряженной фосфатной группы [20,21]. Анионы же, контактируя с центром положительного заряда, экранированным метильными группами ($N(CH_3)_4^+$), располагаются немного дальше от середины бислоя [22]. Катионы Na^+ , Ag^+ , Cu^{2+} относятся к космотропным, а K^+ – к хаотропным ионам [23]; первая группа индуцирует повышение T_m и T_p , тогда как вторая – их снижение [25]; NO_3^- индуцирует снижение T_m и T_p [13]. Учитывая, что анион NO_3^- является общим для каждой пары, а непосредственный контакт катионов исключен в силу электростатического отталкивания, наблюдаемые отклонения параметров мембраны можно связать с адсорбцией на ее поверхности именно катионов.

Отклонения получаемых параметров в сторону определенного катиона указывают на его преимущество в конкурентном взаимодействии при связывании с липидной мембраной. Так, в паре $Ag^+ - Cu^{2+}$ преимущество в связывании с мембраной имеют катионы Cu^{2+} , что объясняется их большим зарядом. Здесь необходимо отметить, что удвоенное количество молей нитрат-иона в составе $Cu(NO_3)_2$, вносящее дополнительный отрицательный вклад в ΔT_m , входит в мембранотропное действие нитрата меди (см. рис. 2, $x_{Ag} = 0$) и, следовательно, не должно рассматриваться как самостоятельный фактор.

Конкурентное взаимодействие в парах $Ag^+ - Na^+$ и $Ag^+ - K^+$ может быть объяснено эмпирическим правилом Пескова–Фаянса. Согласно этому правилу преимущество в конкурентной адсорбции имеет, в частности, тот ион, который может образовывать с одним из ионов, входящим в состав адсорбента, малорастворимое соединение [34]. Ионом, связывающим катионы на поверхности мембраны, является остаток ортофосфорной кислоты, при этом растворимость фосфата серебра в воде существенно меньше растворимости фосфатов калия и натрия [35]. Таким образом, в парах $Ag^+ - Na^+$ и $Ag^+ - K^+$ преимущество в связывании с липидной мембраной имеют катионы Ag^+ .

В целом предлагаемая методика представляется информативной при изучении квазибинарных систем даже в случае отсутствия воз-

можности непосредственного взаимодействия компонентов.

ВЫВОДЫ

Получены термодинамические параметры фазовых переходов модельных мембран ДМФХ, содержащих пары $AgNO_3 - NaNO_3$, $AgNO_3 - KNO_3$, и $AgNO_3 - Cu(NO_3)_2$ при одинаковом общем содержании нитратов. Зарегистрированы отклонения от аддитивности значений температуры основного и предпереходов, а также их полуширины и гистерезиса. Полученные данные свидетельствуют о конкурентной адсорбции катионов на поверхности раздела липид–вода. Преимущество в связывании с мембраной ДМФХ в паре $Ag^+ - Cu^{2+}$ имеет катион меди, а в парах $Ag^+ - Na^+$ и $Ag^+ - K^+$ – катион серебра. Особый интерес вызывает состав с соотношением $AgNO_3 : Cu(NO_3)_2$, равным 2 : 1, который индуцирует возрастание неоднородности липидной мембраны, что может являться дополнительным фактором бактерицидного действия.

Авторы выражают искреннюю благодарность к. ф.-м. н. Н.А. Касян за ценные замечания при обсуждении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. П. Харакоз, Успехи биол. химии **41**, 333 (2001).
2. В. Т. Манчук, В. П. Терещенко, С. Ю. Терещенко и др., Бюл. СО РАМН **2**, 12 (2003).
3. M. T. Le, J. K. Litzenberger, and E. J. Prenner, in *Advances in Biomimetics*, ed. by M. Cavrak (InTech, N.-Y., 2011).
4. C. Peelta, A. Stine, and V. Labhasetwar, *Mol. Pharm.* **6** (5), 1264 (2009).
5. R. Pignatello, T. Musumeci, L. Basile, et al., *J. Pharm. Bioallied Sci.* **3** (1), 4 (2011).
6. S. A. Jewell, *Liq. Cryst.* **38** (11–12), 1699 (2011).
7. L. S. Hirst, P. Uppamoochikkal, and C. Lor, *Liq. Cryst.* **38** (11–12), 1735 (2011).
8. А. А. Веренинов и И. И. Марахова, *Транспорт ионов у клеток в культуре* (Наука, Л., 1986).
9. R. Bartucci and L. Sportelli, *Coll. & Polymer Sci.* **271** (3), 262 (1993).
10. H. Petrache, S. Tristram-Nagle, D. Harries, et al., *J. Lipid Res.* **47**, 302 (2006).
11. A. Przychyna, B. Różycka-Roszka, and M. Z. Langner, *Naturforsch.* **57**, 712 (2002).
12. M. Rappolt, K. Pressl, G. Pabst, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1372**, 389 (1998).
13. О. В. Ващенко, Ю. Л. Ермак, А. О. Красникова и др., *Биофизика* **60** (2), 307 (2015).
14. А. Б. Щербаков, *Фармацевт. журн.* **5**, 45 (2006).

15. Л. А. Кульский, *Серебряная вода* (Наук. думка, Киев, 1987).
16. Я. Я. Балткайс и В. А. Фатеев, *Взаимодействие лекарственных веществ* (Медицина, М., 1991).
17. А. П. Викторов, В. Г. Передрий и А. В. Щербак, *Взаимодействие лекарств и пищи* (Здоровья, Киев, 1991).
18. И. М. Перцев, Г. С. Башура, М. Т. Алюшин и др., *Фармация* **5**, 67 (1973).
19. V. Caruso, J. M. Sánchez, D. A. Garsía, et al., *Cell Biochem. Biophys.* DOI 10.1007/s12013-012-9494-3 (2012).
20. N. A. Kasian, V. A. Pashynska, O. V. Vashchenko, et al., *Mol. BioSyst.* **10**, 3155 (2014).
21. О. В. Попова, N. M. Sanina, G. N. Likhatskaya, et al., *Russ. J. Marine Biol.* **34** (3), 179 (2008).
22. Е. М. Егорова, А. А. Рёвина, Т. Н. Ростовщикова и др., *Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия* **42** (5), 332 (2001).
23. Ю. Я. Фиалков и др., *Физическая химия неводных растворов* (Химия, Л., 1973).
24. T. M. Mavromoustacos, *Methods Mol Biol.* **400**, 587 (2007).
25. О. В. Ващенко, Ю. Л. Ермак и Л. Н. Лисецкий, *Биофизика* **58** (4), 663 (2013).
26. O. Vashchenko, V. Pashynska, M. Kosevich, et al., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **507**, 155 (2011).
27. О. В. Ващенко, *Biophys. Bull.* **2**, 53 (2013).
28. L. N. Lisetski, A. O. Krasnikova, and S. I. Torgova, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **623**, 113 (2015).
29. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства* (Новая волна, М., 2005).
30. H. Binder and O. Zschörnig, *Chem. Phys. Lipids* **115**, 39 (2002).
31. K. D. Collins, *Biophys. Chem.* **119**, 271 (2006).
32. S. A. Pandit, D. Bostick, and M. L. Berkowitz, *Biophys. J.* **84**, 3743 (2003).
33. K. D. Collins, *Methods*, **34**, 300 (2004).
34. Р. А. Хмельницкий, *Физическая и коллоидная химия* (Выш. шк., М., 1988).
35. А. И. Ефимов, *Свойства неорганических соединений* (Химия, Л., 1983).

Joint Action of Nitrates on Multilayer Lipid Membranes: Thermodynamic Effects

O.V. Vashchenko, A.O. Sadchenko, L.V. Budianska, and L.N. Lisetski

*Institute for Scintillation Materials, National Academy of Sciences of Ukraine,
prosp. Lenina 60, Kharkov, 61001 Ukraine*

Model multilayer membranes based on *L*- α -dimyristoylphosphatidylcholine containing nitrates of silver, sodium, potassium and cuprum in pairs $\text{AgNO}_3\text{--NaNO}_3$, $\text{AgNO}_3\text{--KNO}_3$ and $\text{AgNO}_3\text{--Cu(NO}_3)_2$ were studied. In every explored system the molar fraction of nitrates with respect to the lipid remained unchanged (0.35), herewith, the molar fraction of silver nitrate (x_{Ag}) within each pair varied from 0.0 to 1.0. Thermodynamic parameters of the main phase transition and pre-transition of the model membranes were determined using differential scanning calorimetry. A number of the parameters exhibited positive deviations from additivity versus x_{Ag} : the main phase transition temperature deviated up to 0.5°C, the pre-transition temperature changed up to 2.7°C and the percent deviation for hysteresis and half-width of the main phase transition reached up to 30%. Physicochemical mechanisms of the competitive interaction between cations in membranes composed of *L*- α -dimyristoylphosphatidylcholine are under discussion.

Key words: silver nitrate, multilayer lipid membranes, differential scanning calorimetry, joint action