

УДК 577.352.26

# Механизмы действия производных трииндолилметана на липидные мембраны

С. С. Ефимова<sup>1\*</sup>, Т. Е. Тертычная<sup>1</sup>, С. Н. Лавренов<sup>2</sup>, О. С. Остроумова<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, 119435, Москва, Большая Пироговская ул., 11

\*E-mail: efimova@incras.ru

Поступила в редакцию 12.04.2019

Принята к печати 18.07.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-38-45

**РЕФЕРАТ** Исследовано действие новых синтетических антибактериальных агентов *трис*(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорида (ЛХТА-1975) и (1-(4-(диметиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-ил)-1*H*-индол-3-ил)бис(1-пропил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорида (ЛХТА-2701) на модельные липидные мембраны. Изучена способность тестируемых веществ формировать трансмембранные поры, влиять на электрическую стабильность липидных бислоев и плавление насыщенных фосфохолинов, а также вызывать деформацию, слияние или деление липидных везикул. Установлено, что оба соединения проявляют детергентные свойства в отношении модельных мембран. Результаты, полученные методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и путем измерения трансмембранного напряжения, при котором в присутствии тестируемых соединений происходит разрушение липидных бислоев, указывают, что оба производных вызывают разупорядочивание мембранных липидов. Показан синергизм разобцающего действия тестируемых производных и алкалоида капсаицина на модельные липидные мембраны. Пороговая концентрация вещества, вызывающая увеличение ионной проницаемости липидного бислоя, зависит от липидного состава мембраны. В случае отрицательно заряженных липидных бислоев она на порядок ниже, чем у электрически нейтральных. Это может быть обусловлено положительным зарядом молекул тестируемых агентов. При этом ЛХТА-2701 характеризуется большей эффективностью по сравнению с ЛХТА-1975. ЛХТА-2701 не только обладает детергентным действием, но и способен индуцировать ион-проницаемые трансмембранные поры, функционирование которых выражается в появлении ступенеобразных флуктуаций трансмембранного тока. Различие механизмов действия определяется особенностями строения этих веществ: в молекуле ЛХТА-1975 все три заместителя при атомах азота индольных циклов одинаковы и представляют собой *n*-алкильные группы (пентильные), а ЛХТА-2701 содержит наряду с двумя алкильными заместителями (*n*-пропильными) малеинимидный цикл. Полученные результаты важны для понимания механизмов действия новых антибактериальных агентов, отличий в селективности их действия на микроорганизмы-мишени и токсичности в отношении клеток человека, а также показывают целесообразность использования модельных липидных мембран для дальнейшего изучения направлений модификации и совершенствования структуры новых антибактериальных средств.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антимикробные агенты, антибиотики, ион-проницаемые поры, липидные бислои, липосомы, турбомицин А.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЛХТА-1975 – *трис*(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорид; ЛХТА-2701 – (1-(4-(диметиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-ил)-1*H*-индол-3-ил)бис(1-пропил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорид; ДОФС – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин; ДОФЭ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин.

## ВВЕДЕНИЕ

Основными проблемами современной антибиотикотерапии являются побочные эффекты от применения антибактериальных средств и растущая устойчивость болезнетворных бактерий к ним, что приводит к утрате клинической значимости ряда лекарственных средств. Одним из перспективных способов преодоления этих трудностей считается модификация природных антибиотических соединений с целью создания на их основе полусинтетических производных, проявляющих не только выраженную активность в отношении резистентных микроорганизмов, но и характеризующихся расширенным спектром действия по сравнению с исходными препаратами.

Антибиотик турбомицин А, впервые выделенный в качестве продукта метаболизма *Saccharomyces cerevisiae*, обладающий относительно невысокой активностью в отношении грамположительных бактерий [1], является солью *трис*(индол-3-ил)метилия [2]. Показано, что введение алкильных заместителей по атомам азота индольных циклов антибиотика приводит к резкому увеличению антибактериальной активности, расширению спектра действия и появлению противоопухолевых свойств [3, 4].

Большой интерес представляют новые гомологи турбомицина А, *трис*(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорид (ЛХТА-1975) и (1-(4-(диметиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-ил)-1*H*-индол-3-ил)*бис*(1-пропил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорид (ЛХТА-2701), синтезированные в НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе. ЛХТА-1975, кроме высокой антибактериальной активности в отношении мультирезистентных штаммов грамположительных бактерий, индуцирует также апоптоз опухолевых клеток посредством влияния на сигнальный путь NF-κB [3, 5, 6]. ЛХТА-2701, обладающий примерно таким же уровнем антибактериальной активности, как и ЛХТА-1975, значительно менее токсичен в отношении клеток человека (донорские фибробласты) [7]. В нашей работе изучены механизмы взаимодействия ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701 с липидными бислоями, в том числе имитирующими мембраны клеток-мишеней.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДОФЭ), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) (Avanti Polar Lipids, США); KCl, KOH, HEPES, пентан, этанол, гексадекан, диме-

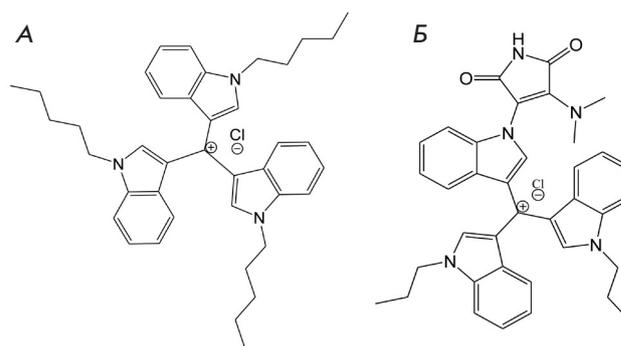


Рис. 1. Химические структуры производных трииндолилметана: ЛХТА-1975 (А) и ЛХТА-2701 (Б)

тилсульфоксид, капсаицин, кофеин (Sigma, США). Химические структуры производных трииндолилметана, ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701, синтезированных в Научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, представлены на рис. 1.

## Формирование плоских липидных бислоев и регистрация токов, протекающих через мембраны

Формирование бислоиных липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера [8] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстиях в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения – 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки – 10 мкм, диаметр отверстия – около 50 мкм. Перед началом формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Плоские липидные бислои формировали из ДФФХ или ПОФХ, а также из эквимолярной смеси ДОФС и ДОФЭ. Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе разделяемых мембраной водных растворов электролита (0.1 М KCl, pH 7.4). Кислотность растворов (pH 7.4) поддерживали буферной смесью 5 мМ HEPES–KOH.

Тестируемые вещества, ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701, добавляли из раствора 10 мг/мл в смеси диметилсульфоксид : H<sub>2</sub>O (1 : 1) в *цис*-отсек камеры до конечной концентрации, указанной в табл. 1. Для каждой системы «агент–липидный бислой» проведено не менее четырех независимых экспериментов (повторов).

Для подачи трансмембранного напряжения и измерения протекающего через мембрану тока были использованы хлорсеребряные электроды, которые соединяли с растворами камеры через мостики с 1.5% агарозой в растворе 2 М KCl. Положительным считали потенциал, вызывающий поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Для обработки данных использовали 8-полярный фильтр Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) и частоту фильтрации 1 кГц.

Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments). Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (Origin Lab., США).

Проводимость пор вычисляли как отношение силы тока, проходящего через одиночную пору, к трансмембранному напряжению. Гистограммы флуктуаций тока строили для значений трансмембранных токов, определяемых по изменениям амплитуды тока при открывании (закрывании) одиночных каналов. Для определения времени жизни каналов (времени их нахождения в открытом состоянии) рассматривали записи флуктуаций тока через мембраны с одним встроенным каналом. Для каждой из экспериментальных систем величины проводимости и времени жизни пор представляли как средние арифметические значения и их ошибки (среднее  $\pm$  SE).

Пороговые значения трансмембранного напряжения, которое вызывает разрушение мембран из ДФФХ до и после добавки производных трииндолилметана в мембраноомывающие растворы,  $V_{bd}$ , измеряли путем приложения к мембране напряжения в диапазоне от 0 до  $\pm V_{bd}$ . Не выявлено различий между положительным и отрицательным трансмембранным напряжением.

#### Определение изменений электрического потенциала на границе мембрана/водный раствор при введении тестируемых производных

Ионофор нонактин добавляли в омывающие растворы с обеих сторон мембраны до конечной концентрации  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  М. Липидные мембраны формировали из ДФФХ, как описано выше, в 0.1 М KCl, 5 мМ HEPES–KOH, pH 7.4.

Проводимость бислоя ( $G$ ) находили по отношению стационарного трансмембранного тока к трансмембранному потенциалу, равному 50 мВ. Изменения электрического потенциала на границе мембрана/водный раствор при введении тестируемых производных ( $\Delta\phi_d$ ) определяли как:

$$\frac{G_m}{G_m^0} = \exp\left(\frac{e\Delta\phi_d}{kT}\right),$$

где  $G_m^0$  и  $G_m$  – значения стационарной  $K^+$ -проводимости бислоя, индуцированной нонактином до и после введения тестируемого агента.

Тестируемые вещества ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701 добавляли в *цис*-отсек экспериментальной камеры из смеси диметилсульфоксид :  $H_2O$  (1 : 1) до 300 и 150 мкМ соответственно.

#### Конфокальная флуоресцентная микроскопия липосом

Гигантские одноламеллярные липосомы формировали из ПОФХ в электрическом поле с использованием коммерческого прибора Nanion vesicle *prep pro* (Германия) на паре стекол, покрытых проводящей смесью оксида индия и оксида олова, со стандартным протоколом (переменное напряжение с амплитудой 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, температура 25°C) согласно [9].

Полученную суспензию липосом разделяли на аликвоты. В экспериментальные образцы вводили производные трииндолилметана в соотношении липид : агент = 10 : 1. Аликвоты уравнивали в течение 30 мин при комнатной температуре, 10 мкл полученной суспензии липосом помещали между предметным и покровным стеклами. Липосомы наблюдали в проходящем свете с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Германия). Проводили независимые эксперименты (от 3 до 5), определяли средний диаметр липосом в каждой из экспериментальных систем (среднее  $\pm$  SE).

#### Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия липосом

Гигантские одноламеллярные липосомы формировали из ДПФХ в электрическом поле как описано выше. Полученную суспензию липосом доводили до 800 мкл буферным раствором (5 мМ HEPES, pH 7.4). Конечная концентрация липида составляла 5 мМ. В экспериментальные образцы вводили ЛХТА-2701 и ЛХТА-1975 в соотношении липида к агенту 10 : 1 или 5 : 1. Контрольные образцы не модифицировали. Термограммы суспензий липосом получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра  $\mu$ DSC7 (Setaram, Франция). Нужное количество суспензии помещали в одну ячейку и нагревали с постоянной скоростью 0.2 К/мин, во вторую ячейку помещали эквивалентный объем буферного раствора. Воспроизводимость температурной зависимости теплоемкости достигали путем повторного нагревания образца сразу после охлаждения. Пики на термограммах характеризовали температурами предперехода ( $T_p$ ) и основного перехода ( $T_m$ ), шириной основного пика на полувысоте ( $T_{1/2}$ ), отвечающей кооперативности перехода ДПФХ из гель-состояния в жидкую фазу, а также изменением энтальпии главного фазового перехода ( $\Delta H$ ).

Таблица 1. Зависимость вида мембранной активности производных трииндолилметана от их концентрации в оmyвающих растворах (С, мкМ)

Вид активности	ЛХТА-1975			ЛХТА-2701		
	ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)	ДФФХ	ПОФХ	ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)	ДФФХ	ПОФХ
Отсутствие активности	< 15	< 315	< 200	< 8	< 55	< 30
Ион-проницаемые поры	–	–	–	8 – 25	55 – 135	30 – 130
Детергентное действие	> 15	> 315	> 200	> 25	> 135	> 130

Примечание: погрешность в измерении концентрации составляет не более 10%.

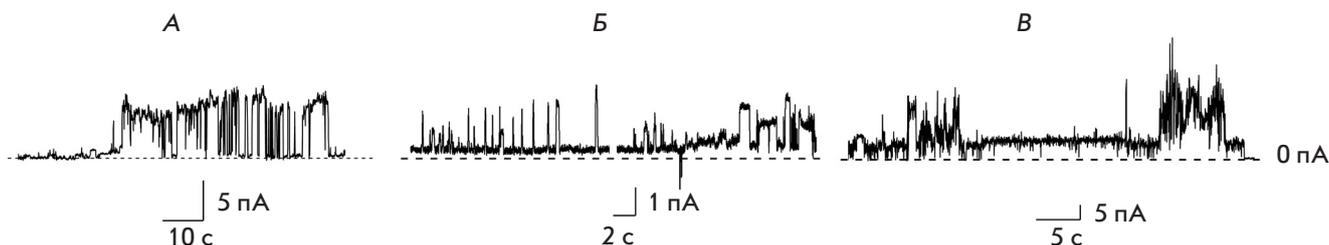


Рис. 2. Записи флуктуаций трансмембранных токов, соответствующие открыванию/закрыванию индуцированных ЛХТА-2701 одиночных пор, при концентрации вещества 10 (А), 70 (Б) и 100 (В) мкМ. Мембраны сформированы из ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%) (А), ДФФХ (Б) и ПОФХ (В) и оmyваются 0.1 М КСl, 5 мм НЕРЕС, рН 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 100 мВ

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе изучена мембранная активность синтетических гомологов турбомицина А, ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701. В табл. 1 представлены характеристические параметры действия тестируемых агентов на липидные бислои. Добавка ЛХТА-1975 до концентрации 15 мкМ к мембранам из эквимолярной смеси ДОФС и ДОФЭ не вызывает появления видимых флуктуаций трансмембранного тока. Повышение концентрации агента вызывает нарушение стабильности бислоя и последующее его разрушение. Добавка ЛХТА-2701 до концентрации 8 мкМ не влияет на ионную проницаемость отрицательно заряженных мембран. Введение ЛХТА-2701 до концентрации 8–25 мкМ в раствор *цис*-отделения камеры вызывает рост проводимости мембраны, обусловленной образованием ион-проницаемых пор. На рис. 2А приведены примеры записей ступенеобразных флуктуаций тока, протекающего через ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)–мембраны в присутствии ЛХТА-2701. Из рис. 2А видно, что поры характеризуются различной проводимостью. Проводимость пор варьирует от 5 до 100 пСм, а их время жизни – от 0.1 до 5 с. Дальнейшее повышение концентрации ЛХТА-2701 приводит к дезинтеграции липидного бислоя.

Отличие от отрицательно заряженных мембран, включающих ДОФС, тестируемые вещества проявляют детергентное действие в отношении бис-

лоев из нейтральных липидов, ДФФХ или ПОФХ, при на порядок более высоких концентрациях (табл. 1). Повышение концентрации ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701 до 200 и 130 мкМ соответственно приводит к нарушению стабильности незаряженных мембран и их разрушению. ЛХТА-2701 в концентрации 30–130 мкМ также характеризуется прообразующей способностью. Записи флуктуаций тока, соответствующих открыванию и закрыванию индуцированных этим веществом трансмембранных пор в ДФФХ- или ПОФХ-бислоях, представлены на рис. 2Б,В.

Полученные результаты позволяют заключить, что тестируемые вещества по-разному действуют на модельные липидные мембраны: оба агента обладают детергентной активностью, в то время как ЛХТА-2701 также способен индуцировать трансмембранные поры. Следует отметить, что тип мембранной активности этих веществ не зависит от состава мембраны. Пороговая концентрация, при которой проявляется разрушительное действие тестируемых агентов, определяется поверхностным зарядом бислоя. Возможной причиной этого может быть положительный заряд тестируемых соединений, что способствует их сорбции на отрицательно заряженных мембранах из ДОФС и ДОФЭ. Кроме того, мембранная активность тестируемых производных практически не зависит от формы мембра-

нообразующих липидов. Активность тестируемых веществ в отношении мембран из конусообразных молекул ДФФХ и цилиндрических молекул ПОФХ [10, 11] проявляется при близких концентрациях. Пороговая концентрация, вызывающая увеличение ионной проницаемости липидного бислоя, зависит также от вида агента. ЛХТА-2701 более эффективно, чем ЛХТА-1975, действует как на отрицательно заряженные, так и на нейтральные мембраны.

Наибольшей электростабильностью в отсутствие каких-либо модификаторов обладают плоские липидные бислои из ДФФХ. Пороговое значение трансмембранного напряжения ( $V_{bd}$ ), которое вызывает разрушение ДФФХ мембран, составляет  $450 \pm 30$  мВ. Введение ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 до концентрации 100 мкМ приводит к падению  $V_{bd}$  до  $310 \pm 30$  мВ и  $370 \pm 30$  мВ. Это свидетельствует о снижении электрической стабильности мембраны в присутствии этих веществ. Полученные результаты указывают на разупорядочивающее действие тестируемых агентов на липиды в бислое.

Выдвинутое предположение независимо подтверждают результаты изучения влияния алкалоидов на мембранную активность ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701. Комплексные исследования с применением методов дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, рентгеновской дифракции, флуоресцентной зондовой спектроскопии и ЯМР показали значительное влияние капсаицина – алкалоида перца чили, на фазовые превращения мембранных липидов [12, 13]. Капсаицин существенно снижает температуру и кооперативность плавления димиристоилфосфохолина [14] и дипальмитоилфосфохолина [12]. При относительно высоких концентрациях алкалоида на термограмме наблюдается выраженная деконволюция пика, соответствующего главному фазовому переходу, что говорит о существовании нескольких смешанных алкалоид-липидных фаз. Более того, капсаицин усиливает способность фосфоэтаноламина формировать неламеллярные инвертированные гексагональные фазы. Предполагается, что адсорбция капсаицина увеличивает отрицательную спонтанную кривизну липидных монослоев [12, 15]. В мембранах из пальмитоолеилфосфохолина капсаицин локализуется между липид-водной интерфазой и плоскостью, соответствующей положению двойной связи в ненасыщенной ацильной цепи липида [13]. Обнаружено, что снижение жесткости мембраны в присутствии капсаицина ответственно за модулирование ионных токов, индуцированных антибиотиком грамицидином А [16, 17]. На основании приведенных данных о разупорядочивающем действии капсаицина можно было ожидать увеличения детергентного действия тестируемых производных

в его присутствии. Действительно, введение 0.4 мМ капсаицина в растворы, омывающие ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)–мембраны, модифицированные ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701, приводит к 20–30% снижению концентрации веществ, вызывающей дестабилизацию бислоя.

Взаимодействие другого растительного алкалоида, кофеина, с молекулами воды, связанными с соседними липидами, приводит к локальному увеличению гидратации, росту толщины мембраны и уменьшению ее текучести [18]. Эти результаты согласуются с данными калориметрии и молекулярной динамики, согласно которым кофеин значительно компенсирует разобщающий эффект местного анестетика тетракаина [19]. Аналогичный эффект отсутствует в случае ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701. Неспецифическое взаимодействие кофеина с ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)–бислоями практически не влияет на мембранную активность тестируемых веществ. Невозможность компенсации кофеином разобщающего действия ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 может указывать на существенное различие в локализации этих веществ и кофеина в мембране. По данным [18, 20] молекулы ксантина располагаются на границе между областями, занимаемыми липидными «головками» и «хвостами». По всей вероятности, благодаря алкильным заместителям молекулы ЛХТА способны погружаться в гидрофобную область мембраны, что приводит к росту латерального давления в этом регионе и его экспансии. Близость расположения в мембране тестируемых антибактериальных агентов и капсаицина может объяснить синергизм их разупорядочивающего действия.

На *рис. 3* представлены термограммы липосом из ДПФХ в отсутствие (контроль, *черные линии*) и в присутствии ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 в суспензии при молярном соотношении липид : агент = 10 : 1 (*красные линии*) и 5 : 1 (*синие линии*). В отсутствие производных ЛХТА температура предперехода,  $T_p$ , составляет 32.6°C, температура главного фазового перехода,  $T_m$ , равна 41.2°C, ширина пика на полувысоте, характеризующая кооперативность перехода ДПФХ из геля в жидкое состояние,  $T_{1/2}$ , составляет не более 0.6°C. Оба тестируемых агента существенно влияют на процесс плавления ДПФХ. В обоих случаях элиминируется предпереход. В *табл. 2* приведены величины  $T_m$  и  $T_{1/2}$  при используемых соотношениях липид : агент. Следует отметить деконволюцию пика, соответствующего главному фазовому переходу ДПФХ, выраженность которой зависит от соотношения липид : агент (*рис. 3*). На *рис. 4* представлен результат разложения пика, соответствующего главному фазовому переходу ДПФХ в присутствии тестируемых агентов, на от-

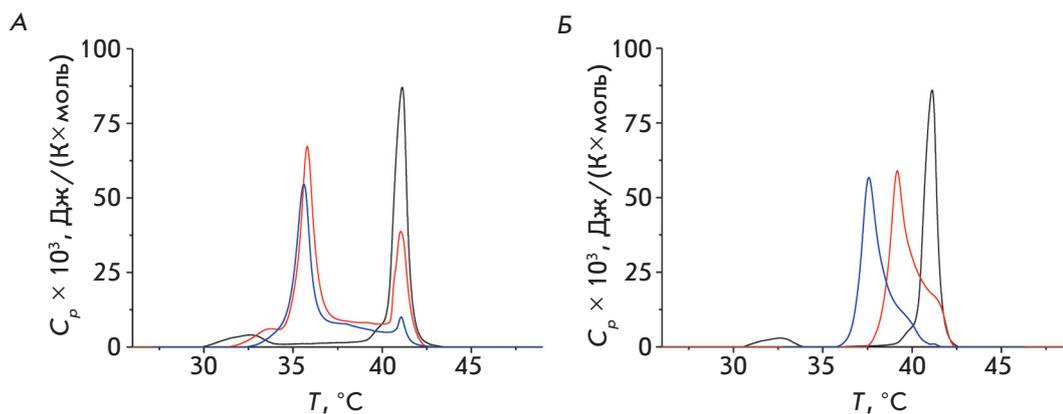


Рис. 3. Термограммы плавления ДПФХ в отсутствие (контроль, черная линия) и в присутствии ЛХТА-1975 (А) и ЛХТА-2701 (Б). Соотношение липид : вещество составляет 10 : 1 (красные линии) и 5 : 1 (синие линии)

дельные составляющие. Присутствие нескольких пиков свидетельствует о сосуществовании различных фаз. Пик под номером 1 на термограммах (рис. 4А–Г) может быть ассоциирован с плавлением чистого ДПФХ, а два других – с наличием различных фаз, включающих как ДПФХ, так и ЛХТА (пик 2 и(или) 3 на рис. 4А–Г). Падение температуры и кооперативности перехода ДПФХ в присутствии тестируемых веществ может быть связано с их погружением в гидрофобную область бислоя, что приводит к увеличению площади, приходящейся на одну липидную молекулу, а следовательно, к относительному росту подвижности ацильных хвостов липидов. Полученные результаты также показывают, что с увеличением концентрации ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701 происходит уменьшение изменения энтальпии главного фазового перехода ( $\Delta H$ ): при увеличении концентрации в 2 раза  $\Delta H$  падает примерно на 10%. Уменьшение  $\Delta H$  может быть связано с переходом части липида в немеллярную фазу [21–23]. В частности, появление выраженного пика при 34°C после введения ЛХТА-1975 во всех используемых концентрациях может свидетельствовать о существенном изменении распределения латерального давления в мембране и формировании в присутствии этого агента небислойных липидных образований (пик 4 на рис. 4А,Б).

Изучено также действие антибактериальных веществ на граничный потенциал плоских липидных бислоев из ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%). ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 не влияют на стационарный трансмембранный ток, индуцированный комплексом ионофора нонактина с ионом калия ( $\Delta\varphi_d = 1 \pm 1$  мВ). Это указывает на неизменность распределения электрического потенциала на границе раздела мембрана / водный раствор при адсорбции тестируемых соединений.

С использованием конфокальной микроскопии изучены везикулы из ПОФХ до и после введения в суспензию производных ЛХТА. Добавка к ПОФХ-липосомам ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 в моляр-

Таблица 2. Характеристические параметры термограмм плавления ДПФХ в отсутствие и в присутствии производных трииндолилметана

Экспериментальная система	Соотношение липид:агент	№ пика	$T_m^*$ , °C	$T_{1/2}^*$ , °C	$\Delta H$ , ккал/мол
Контроль	–	1	41.2	0.6	13.3
ЛХТА-1975	10 : 1	1	41.0	0.9	12.3
		2	38.7		
		3	35.8		
		4	33.7		
	5 : 1	1	41.0	0.9	11.2
		2	37.8		
		3	35.5		
		4	34.4		
ЛХТА-2701	10 : 1	1	41.1	2.4	10.6
		2	39.1		
	5 : 1	1	41.2	1.8	9.6
		2	39.1		
		3	37.6		
		4	34.4		

Примечание.  $T_m$  – температура локального максимума удельной теплоемкости;  $T_{1/2}$  – полуширина основного пика;  $\Delta H$  – изменение энтальпии при фазовом переходе.

ном соотношении липид : агент = 10 : 1 не приводит к изменению сферической формы липидных везикул. Неизменность среднего диаметра липосом до ( $15 \pm 6$  мкм) и после введения ( $15 \pm 7$  мкм) показывает, что тестируемые агенты не вызывают заметно го слияния или деления липидных везикул.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что механизмы действия тестируемых соединений на модельные липидные мембраны различны: ЛХТА-1975 обладает детергентными свойствами, а ЛХТА-2701 характеризуется

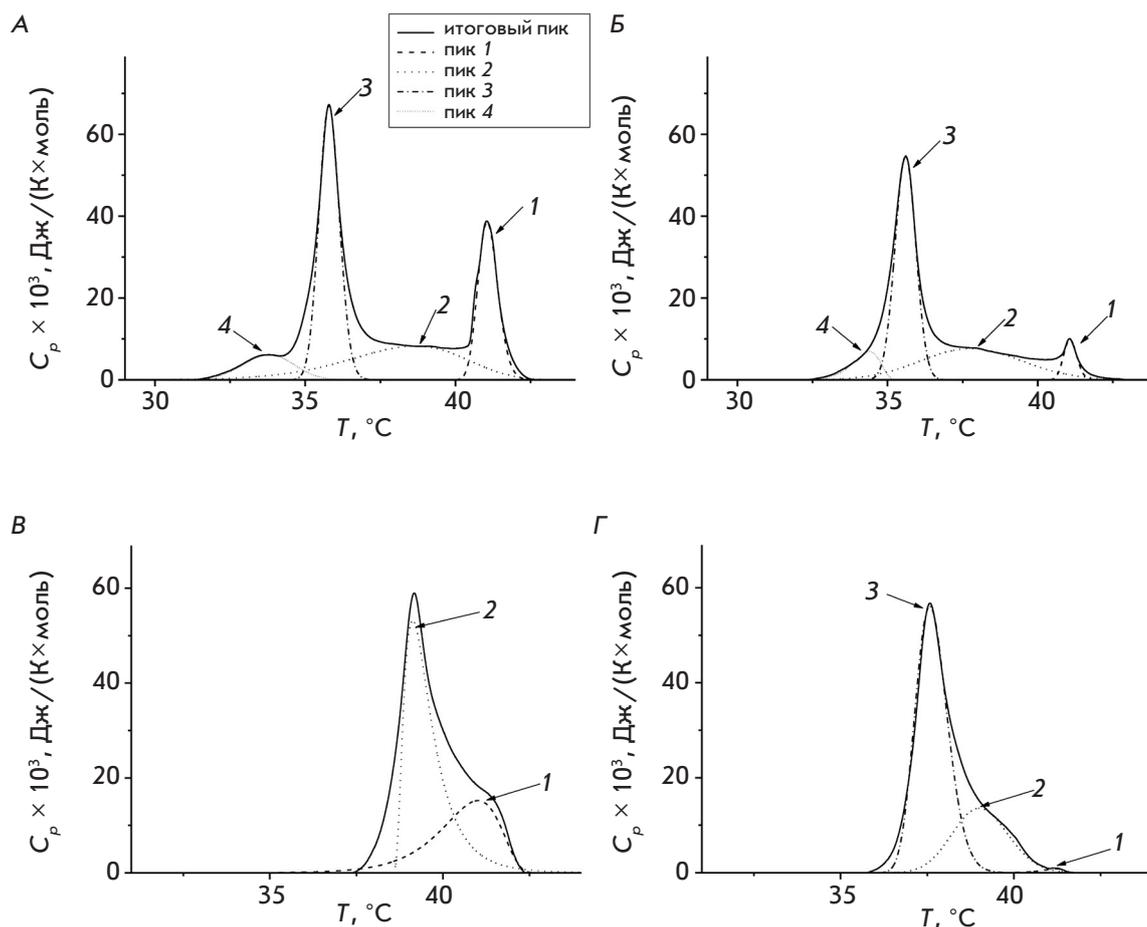


Рис. 4. Разложение пиков, соответствующих главному фазовому переходу ДПФХ, на отдельные составляющие в присутствии ЛХТА-1975 (А, Б) и ЛХТА-2701 (В, Г). Соотношение липид : вещество составляет 10 : 1 (А, В) и 5 : 1 (Б, Г). Параметры пиков представлены в табл. 2

не только также детергентной активностью, но способен индуцировать поры в фосфолипидных мембранах. Различие механизмов действия определяется особенностями их строения: в молекуле ЛХТА-1975 все три заместителя при атомах азота индольных циклов одинаковы и представляют собой *n*-алкильные группы (пентильные), а ЛХТА-2701 содержит наряду с двумя алкильными заместителями (*n*-пропильными) малеинимидный цикл. Полученные результаты помогают понять механизм действия новых антибактериальных агентов, проясняют различия в селективности действия веществ на микроорганизмы и цитотоксичности для клеток человека,

а также позволяют использовать модельные мембраны в дальнейшем изучении направлений модификации и совершенствовании структуры новых антибактериальных средств. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-20047 (исследование воздействия на мембраны) и Российского научного фонда № 16-15-10300 (дизайн и синтез тестируемых веществ). С.С. Ефимова отмечена именной стипендией Президента РФ (СП-484.2018.4).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Palchaudhuri R., Nesterenko V., Hergenrother P.J. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 31. P. 10274–10281.
2. Budzikiwicz H., Eckau H., Ehrenberg M. // Tetrahedron Lett. 1972. V. 36. P. 3807.
3. Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E., Reznikova M.I., Stepanova E.V., Glazunova V.A., Volodina Y.L., Tatarsky V.V., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. № 18. P. 6905–6913.
4. Stepanova E.V., Shtil' A.A., Lavrenov S.N., Bukhman V.M., Inshakov A.N., Mirchink E.P., Trenin A.S., Preobrazhenskaya M.N. // Russ. Chem. Bull. 2010. V. 59. № 12. P. 2259–2267.
5. Исакова Е.Б., Трещалин И.Д., Бодягин Д.А., Лавренев С.Н., Преображенская М.Н., Переверзева Э.Р. // Рос. биотерапевт. журн. 2012. V. 11. № 2. P. 22.
6. Соломко Э.Ш., Лавренев С.Н., Иншаков А.Н., Абрамов М.Е., Преображенская М.Н., Степанова Е.В. // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2012. № 3. P. 48–53.
7. Лавренев С.Н., Симонов А.Ю., Панов А.А., Лакатош С.А., Исакова Е.Б., Цвигун Е.А., Бычкова О.П., Татарский

- В.В., Иванова Е.С., Мирчинк Е.П., Королев А.М., Тренин А.С. // Антибиотики и химиотерапия. 2018. V. 63. № 7–8. P. 3–9.
8. Montal M., Mueller P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 12. P. 3561–3566.
9. Efimova S.S., Ostroumova O.S. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 2. P. 67–74.
10. Bezrukov S.M. // Curr. Opin. Colloid. Interface Sci. 2000. V. 5. P. 237–243.
11. Sakuma Y., Taniguchi T., Imai M. // Biophys. J. 2010. V. 99. P. 472–479.
12. Aranda F.J., Villalaín J., Gómez-Fernández J.C. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1234. № 2. P. 225–234.
13. Torrecillas A., Schneider M., Fernández-Martínez A.M., Ausili A., de Godos A.M., Corbalán-García S., Gómez-Fernández J.C. // ACS Chem. Neurosci. 2015. V. 6. № 10. P. 1741–1750.
14. Swain J., Kumar Mishra A. // J. Phys. Chem. B. 2015. V. 119. № 36. P. 12086–12093.
15. Ingólfsson H.I., Andersen O.S. // Assay Drug Dev. Technol. 2010. V. 8. № 4. P. 427–436.
16. Lundbaek J.A., Birn P., Tape S.E., Toombes G.E., Søgaard R., Koeppe R.E., Gruner S.M., Hansen A.J., Andersen O.S. // Mol. Pharmacol. 2005. V. 68. № 3. P. 680–689.
17. Søgaard R., Werge T.M., Bertelsen C., Lundbye C., Madsen K.L., Nielsen C.H., Lundbaek J.A. // Biochem. 2006. V. 45. № 43. P. 13118–13129.
18. Khondker A., Dhaliwal A., Alsop R.J., Tang J., Backholm M., Shi A.C., Rheinstädter M.C. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2017. V. 19. № 10. P. 7101–7111.
19. Sierra-Valdez F.J., Forero-Quintero L.S., Zapata-Morin P.A., Costas M., Chavez-Reyes A., Ruiz-Suárez J.C. // PLoS One. 2013. V. 8. № 4. P. e59364.
20. Palonciová M., Berka K., Otyepka M. // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. № 8. P. 2403–2410.
21. Maruyama S., Hata T., Matsuki H., Kneshina S. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1325. P. 272–280.
22. Hata T., Matsuki H., Kaneshina S. // Biophys. Chem. 2000. V. 87. P. 25–36.
23. Takeda K., Okuno H., Hata T., Nishimoto M., Matsuki H., Kaneshina S. // Colloids Surf. B Biointerf. 2009. V. 72. P. 135–140.