

Огляд

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-03>

УДК 577.32+615.28+543.51

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ. 2. Противомикробные и противомаларийные препараты (Обзор)

В.А. Пашинская, М.В. Косевич

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

e-mail: mykosevich@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 5 октября 2018

Принята 8 декабря 2018 г.

Актуальность. Получение сведений о молекулярных механизмах действия биологически активных соединений является необходимым шагом для разработки новых лекарственных препаратов. Для установления механизмов взаимодействия химиотерапевтических препаратов, воздействующих на возбудителей инфекционных заболеваний, с их потенциальными молекулярными мишенями в биообъектах необходимы разработка и применение молекулярно-биофизических экспериментальных и теоретических методов исследования.

Цель работы. Целью данного обзора явилось обобщение многолетнего опыта изучения молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов в биофизических отделах Физико-технического института низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины (ФТИНТ). Во второй части обзора представлены данные о предлагаемых механизмах действия ряда противомикробных и противомаларийных агентов.

Материалы и методы. В комплексных исследованиях были использованы экспериментальные методики мягкоионизационной масс-спектрометрии в сочетании с компьютерным моделированием методами квантовой химии.

Результаты. Были исследованы модельные системы, состоящие из химиотерапевтического препарата и его молекулярных мишеней: противомикробных препаратов и компонентов биомембран; противомаларийных препаратов и гема. На молекулярном уровне установлены механизмы действия этих химиотерапевтических агентов, состоящие в невалентных взаимодействиях молекул или ионов препаратов с молекулами-мишенями с образованием стабильных супрамолекулярных комплексов. Методы мягкоионизационной масс-спектрометрии позволили зарегистрировать невалентные комплексы лекарственных препаратов с биомолекулами. Структурные, электронные и энергетические параметры этих комплексов установлены квантово-химическими расчетами.

Выводы. Результаты исследований, проводившихся в течение нескольких десятилетий во ФТИНТ, продемонстрировали эффективность применения молекулярно-биофизических подходов к установлению молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов. Полученные результаты имеют практическое значение для дальнейшей разработки лекарственных средств и способов их применения. Ряд результатов включен в международные базы данных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: межмолекулярные взаимодействия; химиотерапевтические препараты; масс-спектрометрия; квантовая химия; бисчетвертичные аммониевые соединения; производные артемизинина; фосфолипиды.

БІОФІЗИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ.

2. Протимікробні та протималарійні препарати (Огляд)

В.А. Пашинська, М.В. Косевич

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

Актуальність. Отримання відомостей стосовно молекулярних механізмів дії біологічно активних сполук є необхідним кроком для розробки нових лікарських препаратів. Для встановлення механізмів взаємодії хіміотерапевтичних препаратів, які впливають на збудників інфекційних захворювань, з їх потенційними молекулярними мішенями у біооб'єктах необхідні розробка та застосування молекулярно-біофізичних експериментальних та теоретичних методів дослідження.

Мета роботи. Метою огляду є узагальнення багаторічного досвіду вивчення молекулярних механізмів дії хіміотерапевтичних препаратів у біофізичних відділах Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України (ФТІНТ). У другій частині огляду представлено дані стосовно запропонованих механізмів дії низки протимікробних і протималарійних агентів.

Матеріали та методи. У комплексних дослідженнях було використано експериментальні методики м'якоіонізаційної мас-спектрометрії в поєднанні з комп'ютерним моделюванням методами квантової хімії.

Результати. Було досліджено модельні системи, які склалися з хіміотерапевтичного препарату та його молекулярних мішеней: протимікробних препаратів та компонентів біомембран, протималарійних препаратів та гема. На молекулярному рівні встановлено механізми дії цих хіміотерапевтичних агентів, які полягають у невалентних взаємодіях молекул або іонів препаратів з молекулами-мішенями з утворенням стабільних супрамолекулярних комплексів. Методи м'якоіонізаційної мас-спектрометрії дозволили зареєструвати невалентні комплекси лікарських препаратів з біомолекулами. Структурні, електронні та енергетичні характеристики цих комплексів встановлено квантово-хімічними розрахунками.

Висновки. Результати досліджень, які проводилися протягом кількох десятиріч у ФТІНТ, продемонстрували ефективність застосування молекулярно-біофізичних підходів до встановлення молекулярних механізмів дії хіміотерапевтичних препаратів. Отримані результати мають практичне значення для подальшої розробки лікарських засобів та способів їх застосування. Низку результатів включено до міжнародних баз даних.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: міжмолекулярні взаємодії; хіміотерапевтичні препарати; мас-спектрометрія; квантова хімія; бісчетвертинні амонієві сполуки; похідні артемізініну; фосфоліпіди.

BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS OF MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS.

2. Antimicrobial and antimalarial agents (Review)

V.A. Pashynska, M.V. Kosevich

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky Avenue, Kharkiv, Ukraine, 61103

Background: Getting information on molecular mechanisms of action of biologically active compounds is a necessary step in the elaboration of new medicines. The development and application of molecular-biophysical experimental and theoretical techniques are required to establish the mechanisms of interaction of chemotherapeutic drugs, which affect infectious agents, with their potential molecular targets in biological objects.

Objectives: The aim of this review is a generalization of the results of long-term investigations on molecular mechanisms of action of chemotherapeutic agents performed in the biophysical departments of B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering (ILTPE) of the NAS of Ukraine. In the second part of the review the data on the assumed mechanisms of action of some antimicrobial and antimalarial agents are presented.

Materials and methods: Experimental methods of soft ionization mass spectrometry and computer simulations by means of quantum chemistry were used in the combined investigations.

Results: Model systems composed of chemotherapeutic drugs and their molecular targets were studied, such as antimicrobial drugs and biomembranes components, antimalarial drugs and heme. The mechanisms of action of these chemotherapeutic agents were revealed at the molecular level, which consisted in the noncovalent interactions of the drugs' molecules or ions with molecular targets resulting in the supramolecular complexes formation. Methods of soft ionization mass spectrometry allowed us to detect such noncovalent complexes of the medicines with biomolecules. Structural, electronic and energetic characteristics of these complexes were established by quantum chemical calculations.

Conclusions: The results of investigations conducted during several decades at the ILTPE have demonstrated the efficiency of the application of the methods and approaches of molecular biophysics to determination of molecular mechanisms of chemotherapeutic drugs action. The results obtained are of practical importance for further development of medicines and schemes of their application. A number of the results obtained were included into international data bases.

KEY WORDS: intermolecular interactions; chemotherapeutic agents; mass spectrometry; quantum chemistry; bisquaternary ammonium compounds; artemisinin derivatives; phospholipids.

Сведения о молекулярных механизмах действия биологически активных соединений необходимы для целенаправленного поиска и разработки новых

эффективных лекарственных препаратов и схем их применения в медицинской практике. При классификации фармакологических препаратов в отдельную группу выделяют химиотерапевтические препараты, объектами воздействия которых являются возбудители заболеваний – бактерии, вирусы, грибы, а также клетки злокачественных новообразований [1]. Механизмы действия многих химиотерапевтических препаратов связаны с их невалентными межмолекулярными взаимодействиями с биомолекулами-мишенями в клетках патогенов. Изучение таких механизмов попадает в сферу задач, решаемых молекулярной биофизикой.

Целью данного обзора явилось обобщение результатов изучения молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов в биофизических отделах Физико-технического института низких температур (ФТИНТ) им. Б.И. Веркина НАН Украины [2]. В первой части обзора [3] были рассмотрены работы исследователей ФТИНТ, посвященные механизмам действия противоопухолевых и противовирусных агентов, мишенью которых являются нуклеиновые кислоты. Во второй части обзора основное внимание уделяется установлению механизмов действия ряда противомикробных и противомаларийных препаратов. А именно, проанализированы результаты работ по изучению взаимодействия противомикробных препаратов на основе солей бисчетвертичных аммониевых соединений (БЧАС) с фосфолипидами и белками мембран микробных клеток и возможных путей взаимодействия противомаларийных препаратов – производных артемизинина с гемом гемоглобина эритроцитов крови.

Также определен вклад работ ФТИНТ в интернациональные исследования фармакологических препаратов и механизмов их действия, отмечено цитирование оригинальных публикаций в международных базах научных данных, намечены перспективы и направления дальнейших исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

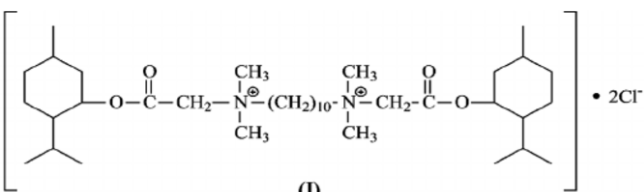
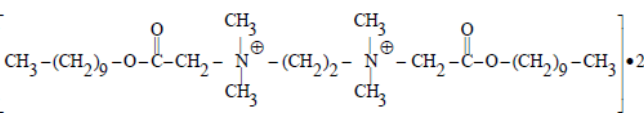
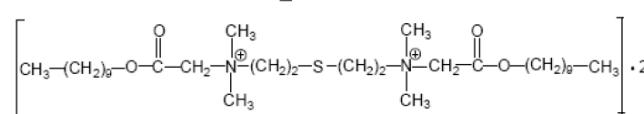
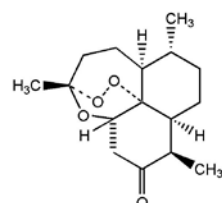
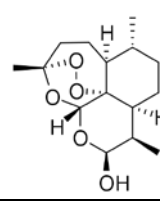
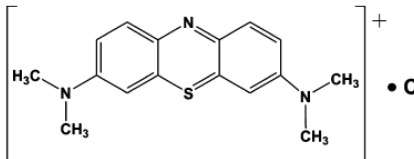
Для изучения межмолекулярных взаимодействий биомолекул и химиотерапевтических препаратов применялся комплекс экспериментальных и теоретических методов биофизических исследований, которые развивались и совершенствовались сотрудниками биофизических отделов ФТИНТ. В первой части данного обзора [3] была дана оценка вклада ученых ФТИНТ в усовершенствование масс-спектрометрических методик [2, 4, 5]. В рамках единого масс-спектрометрического подхода разносторонняя информация об объектах исследования была получена с применением различных способов воздействия на вещество: ионизации электронами (ИЭ), (Electron Ionization, EI), полевой ионизации (ПИ), (Field Ionization, FI) [4, 6], полевой десорбции (ПД), (Field Desorption, FD) [7, 8], бомбардировки быстрыми атомами (ББА), (Fast Atom Bombardment, FAB) и вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС), (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS), включая жидкостную ВИМС (жВИМС) [9, 10].

Актуальность проблемы выявления молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов обеспечила возможность проведения ряда исследований в рамках международных научных проектов. В сотрудничестве с Институтом органической химии Исследовательского центра естественных наук Венгерской академии наук (ИОХ ИЦЕН ВАН, г. Будапешт, Венгрия) и Антверпенским университетом (г. Антверпен, Бельгия) мы проводили масс-спектрометрические эксперименты с ионизацией электро-распылением (ИЭР) растворов, (Electrospray Ionization, ESI). Ресурсы, предоставлявшиеся Центром коллективного пользования НАН Украины при Институте химии поверхности (ИХП) НАН Украины (г. Киев) [5], были использованы для проведения экспериментов методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ), (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI).

Исследования механизмов действия противомикробных препаратов на уровне модельных мембран проводились в рамках многолетнего сотрудничества с Институтом скинтилляционных материалов НАН Украины (г. Харьков), с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Для решения ряда задач применяли методы молекулярной спектроскопии. Компьютерное моделирование выполняли методами квантовой химии в сотрудничестве с Аризонским университетом (США).

Объектами исследования служили модельные системы, состоящие из химиотерапевтических противомикробных и противомаларийных препаратов и их биомолекулярных мишеней в клетках патогенов (табл. 1).

Таблица 1. Структурные формулы и названия исследовавшихся химиотерапевтических препаратов

Структурные формулы молекул препаратов	Название, ссылка в базе данных PubChem
 <p style="text-align: center;">(I)</p>	Декаметоксин, Decamethoxine, Decamethoxinum https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/162291
	Этоний, Ethonium https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/30869
	Тионий Thiomium https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156859
	Артемизинин, Artemisinin https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827
	Дигидроартемизинин Dihydroartemisinin https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/456410
	Метиленовый синий, Methylene Blue https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6099

В табл. 1 представлены структурные формулы ряда химиотерапевтических препаратов, исследовавшихся в работах, цитируемых в данном обзоре. Названия, структурные формулы, физико-химические и фармакологические свойства препаратов,

а также ссылки на наиболее информативные литературные источники можно найти в базе данных PubChem [11].

Отметим, что антимикробные препараты декаметоксин, этоний и тионий относятся к классу солей бисчетвертичных аммониевых соединений (БЧАС), т. е. являются органическими солями. Они также являются поверхностно-активными веществами (ПАВ). К исследовавшимся производным артемизинина, наряду с дигидроартемизинином (ДГА) относятся артеметер и артеестер; также, для сравнения, использовали известный противомаларийный агент хинин.

В исследованиях комбинированного действия нескольких препаратов использовали ацетилсалициловую кислоту (АСК) – аспирин, 2,5-дигидробензойную кислоту (2,5-dihydrobenzoic acid, DHB), тетраметиламмоний и додецилсульфат натрия (sodium dodecylsulfate, SDS). В качестве основного компонента модельных биомембран использовали фосфолипид дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ).

Были исследованы следующие модельные системы, состоящие из химиотерапевтического препарата и его предполагаемых молекулярных мишеней:

- препараты противомикробного действия на основе солей БЧАС - этоний, тионий, декаметоксин (также с фунгицидной активностью) - и фосфолипиды или белки клеточных мембран;

- противомаларийные препараты артемизининового ряда и гем.

Также исследовали системы, включающие препарат широкого спектра действия – краситель метиленовый синий, монослой ПАВ и наноматериалы.

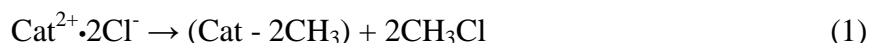
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Масс-спектрометрическое изучение химиотерапевтических препаратов на основе бисчетвертичных аммониевых соединений

Особым классом лабильных органических соединений, масс-спектрометрическое исследование которых было невозможно до изобретения мягкоионизационных десорбционных методов, являются органические соли. К таковым относятся соли четвертичных и бисчетвертичных аммониевых соединений, обладающие противомикробной активностью. Основной проблемой для получения информативных масс-спектров таких соединений является их термическая нестабильность и низкая летучесть. Сложность перевода БЧАС в газовую фазу без термического разложения препятствовала их исследованию с использованием таких традиционных методик, существовавших на ранних этапах становления масс-спектрометрии, как электронный удар и химическая ионизация.

С использованием набора разнообразных масс-спектрометрических методов ионизации и десорбции, включая мягкоионизационные методы (ИЭ, ПИ, ПД, БА, ВИМС, МАЛДИ, ИЭР), в наших работах были охарактеризованы БЧАС декаметоксин – противомикробный препарат украинской разработки, этоний и тионий [12-17]. Сравнение результатов, полученных разными методиками, и использование дополнительных приемов воздействия на образцы, реализуемые в условиях масс-спектрометрических экспериментов, дало возможность получить разностороннюю информацию о стабильности, структурных особенностях и некоторых физико-химических характеристиках молекул (ионов) препаратов.

Известно, что основной путь термического разложения солей БЧАС, общую формулу которых можно представить как совокупность органического дикатиона Cat^{2+} и двух неорганических анионов, обычно галогенов (в нашем случае Cl^- , $\text{Cat}^{2+} \cdot 2\text{Cl}^-$), состоит в так называемой декватернизации, т.е. превращении четвертичного азота в третичный путем отрыва галогеналкилов, например:



Образовавшиеся в результате реакции (1) нейтральные соединения с третичным азотом являются летучими. Было показано, что масс-спектры БЧАС декаметоксина [12] и этония [13], полученные в режимах ИЭ и ПИ, требующих термического испарения твердого образца, соответствуют нейтральным продуктам термодеструкции БЧАС, т.е., фактически, другим индивидуальным соединениям вида (Cat - 2CH₃). Только с появлением мягкоионизационного десорбционного метода ПД впервые удалось зарегистрировать интактные дикатионы Cat²⁺, необходимые для однозначной идентификации этих соединений. Далее, с использованием растворов препаратов в жидкой матрице в методах ББА и жВИМС были зарегистрированы комплексы дикатиона с противоионом хлора Cat²⁺·Cl⁻ с соответствующей фрагментацией. Метод жВИМС был использован для изучения стабильности препарата декаметоксина и его разложения со временем [14]. После появления ИЭР и МАЛДИ, эти методы также были применены нами для изучения БЧАС [15-17].

Наряду с традиционным аналитическим приложением масс-спектрометрии как метода получения своего рода «отпечатков пальцев» для идентификации веществ, на базе современных экспериментальных установок реализуются уникальные методики для получения разнообразных физико-химических характеристик вещества на уровне отдельных молекул. Так, для масс-спектрометрических приборов с двойной фокусировкой был разработан метод оценки кинетической энергии, выделяемой при распаде метастабильных ионов на два фрагмента. Этот метод, внедренный венгерскими коллоработорами в ИОХ ИЦЕН ВАН, был применен нами для сравнения энергий распада дикатионов декаметоксина и этония за счет кулоновского отталкивания между двумя положительно заряженными частями дикатионов [18]. В результате был сделан вывод о том, что органические дикатионы в газовой фазе являются более стабильными, чем считалось ранее. Объяснение этому эффекту было дано с помощью квантово-химических расчетов распределения плотности зарядов в дикатионах [19-21], показавших, что положительный заряд в группе четвертичного азота не локализован, как считалось ранее, на атоме азота, а делокализован по атомам водорода ближайших алкильных заместителей. В результате энергия отталкивания между пространственно делокализованными зарядами становится меньшей, чем энергия, оцененная в приближении локализованных точечных единичных зарядов [18, 19]. Квантово-химические расчеты были применены нами также для установления зависимости электронных параметров БЧАС от такого их структурного параметра, как расстояние между четвертичными атомами азота [19, 20]. Эта информация имеет важное практическое значение для моделирования взаимодействия БЧАС с биологическими молекулами-мишенями и установления зависимости «структура-активность» для биологически активных БЧАС [20].

Для получения информации о структуре стабильных молекулярных ионов в современной масс-спектрометрии используются приемы их разбиения путем столкновения с молекулами газа-реагента – диссоциация, индуцируемая столкновениями (ДИС), которая реализуется в тандемных масс-спектрометрах, в которых последовательно («в тандеме») соединены несколько масс-анализаторов. В таких приборах, независимо от типа источника ионов, ДИС осуществляется в ячейке столкновений, располагаемой между двумя масс-анализаторами. В приборах, использующих метод ИЭР, фрагментация путем ДИС возможна в пространстве между определенными электродами в источнике ионов, причем энергией столкновений можно управлять, изменяя потенциал между этими электродами (для этого потенциала в англоязычной литературе принято название «cone voltage», CV). Оба эти метода впервые были применены нами к изуче-

нию БЧАС декаметоксина [15, 18] и этония [10], что позволило составить детальные схемы фрагментации их дикатионов в условиях ВИМС [18] и ИЭР [15, 16]. На основе анализа этих схем было сделано интересное наблюдение: масс-спектры БЧАС являются сложной суперпозицией спектров нескольких ионов-прекурсоров, т. е. ряд первичных фрагментов претерпевают вторичную фрагментацию. Это наблюдение имеет практическое значение для правильной интерпретации масс-спектров БЧАС, полученных методом ИЭР, поскольку было обнаружено, что спектры, зарегистрированные при самом низком и самом высоком из доступных значений CV , выглядят как масс-спектры совершенно разных соединений и содержат разные наборы ионов (рис. 1).

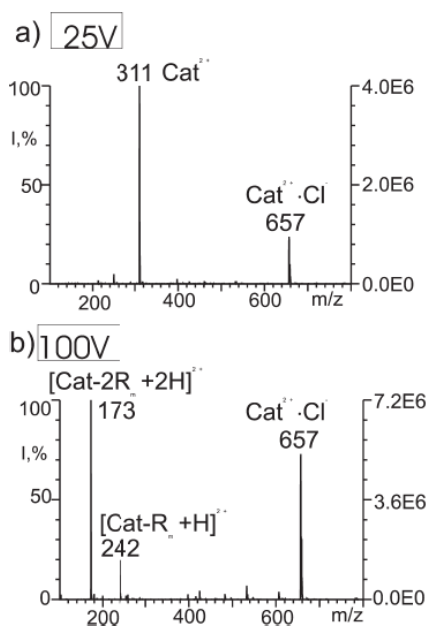


Рис. 1. Масс-спектры ИЭР органической соли декаметоксина ($Cat^{2+} \cdot 2Cl^-$), полученные при двух различных значениях параметра CV . Масс-спектры содержат разные наборы ионов и воспринимаются как спектры различных веществ. (Воспроизведено по данным работы [15] по лицензии издательства Wiley and Sons).

Поскольку для получения структурной информации в рамках метода ИЭР обычно используются средние или высокие значения CV , а при исследовании взаимодействий БЧАС с молекулами-мишенями для стабилизации ожидаемых ассоциатов в газовой фазе используются самые низкие значения CV , знание об особенностях спектров БЧАС при разных CV приобретает особую практическую и методическую значимость.

Отдельный вопрос вторично-эмиссионной масс-спектрометрии касается особенностей получения масс-спектров ПАВ, к которым относятся БЧАС декаметоксин и этоний. С одной стороны, повышение концентрации ПАВ на поверхности жидкой матрицы является положительным фактором, способствующим получению интенсивных сигналов ПАВ в условиях ББА и жВИМС. С другой стороны, этот же фактор осложняет получение адекватных масс-спектров смесей, содержащих ПАВ, что проявляется в так называемом «эффекте подавления» - существенном снижении интенсивностей сигналов всех компонентов образца, отличных от ПАВ, включая жидкую матрицу.

При анализе масс-спектрометрической информации, накопленной для катионных ПАВ декаметоксина и этония, а также анионного ПАВ додецилсульфата натрия (SDS), было предложено одно из возможных объяснений этого эффекта, основанное на образовании на поверхности жидкой матрицы двойного электрического слоя из органической части ПАВ и комплексов неорганической части с молекулами матрицы [22]. Эти типы частиц распыляются из поверхностного слоя в условиях ББА/жВИМС, причем в режиме положительных ионов в масс-спектрах регистрируются органические катионы, а стабильные отрицательно заряженные комплексы молекул матрицы с

анионом отсутствуют. Данный результат вносит вклад в развитие фундаментальных основ масс-спектрометрии, а предложенная модель была использована далее для интерпретации масс-спектров смесей ПАВ и биологически активных красителей [23].

С появлением метода МАЛДИ его возможности также были использованы нами для изучения БЧАС. МАЛДИ спектры получали с использованием в качестве матричного вещества дигидроксibenзойной кислоты (2,5-dihydroxybenzoic acid, ДНВ) [17]. Структура МАЛДИ масс-спектра декаметоксина качественно была подобна таковой, наблюдавшейся в условиях жВИМС и ИЭР, однако наблюдались количественные различия, обусловленные разным количеством энергии, передаваемой молекулам образца разными ионизирующими агентами. Интересной отличительной особенностью МАЛДИ масс-спектров было наблюдение ассоциатов бисчетвертичного дикатиона, обладающего основными свойствами, с органическим анионом ДНВ, фактически замещавшим неорганический анион хлора исходной соли БЧАС. Из этого наблюдения следовали два важных вывода прикладного [24] и фундаментального [25] характера, инициировавшие цепочку дальнейших исследований. В плане исследований взаимодействий «лекарство-мишень» было высказано предположение, что анион ДНВ может моделировать два сайта белков, по которым может проходить узнавание и связывание БЧАС: анионные карбоксильные боковые радикалы аминокислот и гетероциклические боковые радикалы, с которыми возможно так называемое катион-пи взаимодействие. Для проверки и подтверждения этого предположения нами были выполнены квантово-химические расчеты комплексов аниона ДНВ с тетраметиламмонием как моделью активной функциональной группы БЧАС [24].

Основываясь на результатах этих исследований, в дальнейшем нами были предложены подходы к изучению межмолекулярных взаимодействий БЧАС с другими лекарственными препаратами, относящимися к классу органических кислот, в частности, с аспирином, которые модулируют активность БЧАС (см. раздел 2 этого обзора). В плане развития фундаментальных основ масс-спектрометрии МАЛДИ была предложена модель, объясняющая существенное подавление сигналов протонированных молекул кислотной матрицы при наличии в ней четвертичных аммониевых солей образованием новой соли с замещением неорганического аниона ЧАС на органический анион матрицы [25].

Накопленные данные об основных закономерностях формирования масс-спектров БЧАС нашли практическое применение в работах других исследователей при интерпретации масс-спектрометрических данных для новых биологически активных веществ [26, 27] этого класса. Кроме того, данные нашей работы [18] рекомендованы в международной базе PubChem для описания свойств декаметоксина [28].

Масс-спектрометрические характеристики ряда других препаратов, использовавшихся в обсуждающихся ниже работах, были получены ранее другими авторами на этапе разработки и синтеза этих веществ.

2. Молекулярные механизмы действия противомикробных препаратов на основе солей бисчетвертичных аммониевых соединений

Молекулярные механизмы действия противомикробных лекарственных препаратов декаметоксина, этония и тиония на основе солей БЧАС изучались в отделе молекулярной биофизики ФТИНТ в течение двадцати лет с использованием всего арсенала методов мягкоионизационной масс-спектрометрии, а также другими биофизическими методами, включая спектроскопию, микроскопию и ДСК в рамках сотрудничества с Институтом сцинтилляционных материалов НАН Украины, Харьковским национальным университетом им. В.Н. Каразина, а также с ИОХ ИЦЕН ВАН (Венгрия) и

Антверпенским университетом (Бельгия) [29-35]. Результаты экспериментальных исследований были существенно дополнены структурно-энергетическими данными, полученными благодаря применению к изученным модельным системам «лекарство – молекула-мишень» современных методов квантово-химических расчетов, выполненных с привлечением компьютерных мощностей Аризонского университета (США) [20, 25].

Одним из основных механизмов действия противомикробных препаратов, обладающих свойствами ПАВ, считается нарушение нормального функционирования мембран клеток микроорганизмов, вызванное взаимодействием этих ПАВ с компонентами мембран (мембранотропное действие). Однако до последнего времени молекулярные механизмы взаимодействия мембранотропных ПАВ на основе БЧАС с компонентами биомембран и биофизические последствия таких взаимодействий были изучены недостаточно.

На начальном этапе наших исследований методом жВИМС изучались межмолекулярные взаимодействия декаметоксина и этония с дипальмитоилфосфатидилхолином (ДПФХ), который является наиболее распространенным фосфолипидным компонентом биологических мембран [29, 31, 32]. В полученных масс-спектрах были зарегистрированы стабильные супрамолекулярные нековалентные комплексы органических дикатионов декаметоксина и этония с молекулой ДПФХ, что явилось прямым доказательством активного связывания этих препаратов с ДПФХ, а также исследована стабильность таких комплексов в зависимости от структурных особенностей дикатионов БЧАС. Методом тандемной масс-спектрометрии были получены данные о процессах распада двухзарядных супрамолекулярных комплексов дикатион БЧАС-ДПФХ, что позволило определить структурно-энергетические параметры этих комплексов в газовой фазе [31, 32].

Масс-спектрометрические данные, полученные на уровне отдельных молекул, были подкреплены результатами партнерских исследований методом ДСК на уровне модельных мембран, построенных из гидратированного ДПФХ [29-32]. Установлено, что лекарственные препараты на основе БЧАС существенно влияют на жидкокристаллическое состояние модельных мембран, изменяя температуру фазового перехода последних, и, следовательно, могут существенно нарушать функциональную активность мембран клеток бактерий, оказывая противомикробное действие. Причем характер влияния солей БЧАС на физико-химические свойства модельных фосфолипидных мембран зависит от структурных характеристик дикатионов БЧАС, а именно, от расстояния между атомами четвертичного азота. Так, введение в систему, содержащую модельные фосфолипидные мембраны, декаметоксина, в дикатионе которого расстояние между положительно заряженными группами четвертичного азота составляет порядка 14 Å, приводило к значительному (около 4 °С) снижению температуры фазового перехода мембраны в сравнении с системой без лекарственного препарата. В то же время, введение в аналогичную модельную систему этония, в дикатионе которого расстояние между атомами четвертичного азота составляет порядка 4 Å, приводило, наоборот, к увеличению температуры фазового перехода модельных фосфолипидных мембран [30-33]. Таким образом, было обнаружено, что структурные особенности дикатионов изученных БЧАС определяют характер их взаимодействия с мембранными структурами, на основании чего была предложена следующая модель (рис. 2). Дикатион декаметоксина, характеризующийся сравнительно большим расстоянием между положительно заряженными группами, взаимодействует с полярными головками фосфолипидов, и основной вклад в это взаимодействие вносят электростатические силы, в то время как дикатион этония своей полярной частью взаимодействует с

полярными головками ДПФХ, а алифатические хвосты этого дикатиона БЧАС вступают в гидрофобные взаимодействия с гидрофобными хвостами фосфолипидов, т.е. встраиваются в мембрану [29-33].

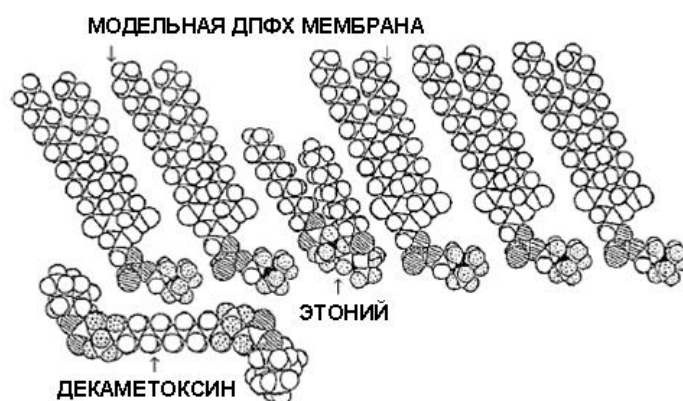


Рис. 2. Схематическое представление наиболее вероятных способов взаимодействия дикатионов декаметоксина и этония с фосфолипидными мембранами, предложенное на основе данных ДСК, масс-спектрометрии и квантово-химических расчетов.

Адаптировано по данным работ [31] и [32] по лицензии издательства Wiley and Sons.

Анализ полученных результатов масс-спектрометрических и ДСК экспериментов позволил предложить молекулярный механизм действия противомикробных препаратов на основе БЧАС, который состоит в нековалентных взаимодействиях дикатионов этих мембранотропных препаратов с фосфолипидными компонентами мембран, что вызывает изменение структурно-функционального состояния последних и, в свою очередь, может оказывать бактерицидный или бактериостатический эффект [29-33].

С появлением масс-спектрометрического метода ИЭР стало возможным изучение ассоциации биомолекул в растворах, что явилось шагом в приближении используемых модельных систем к реальным биологическим. В связи с этим, на следующем этапе исследований модельной системы «БЧАС+ДПФХ» нами был применен метод ИЭР с использованием опций ДИС с фрагментацией в ячейке столкновений или источнике ионов [34-36]. В результате установления зависимости вида масс-спектров ИЭР для систем «БЧАС+ДПФХ» от такого экспериментального параметра источника ионов, как CV, определяющего энергетические параметры процесса электрораспыления, были определены оптимальные условия для регистрации супрамолекулярных комплексов препаратов с фосфолипидами.

В масс-спектрах ИЭР систем «БЧАС+ДПФХ» были зарегистрированы стабильные двухзарядные нековалентные комплексы дикатионов декаметоксина, этония и тиония Cat^{2+} с молекулами ДПФХ (М) с общей формулой $n\text{M}\cdot\text{Cat}^{2+}$, включающие до девяти молекул ДПФХ в комплексах с декаметоксином [34] и до четырех – в комплексах с этонием [35] и тионием [36] (рис. 3). Такие кластеры моделируют ассоциаты лекарственных препаратов с фосфолипидными локусами клеточных мембран в реальных биосистемах.

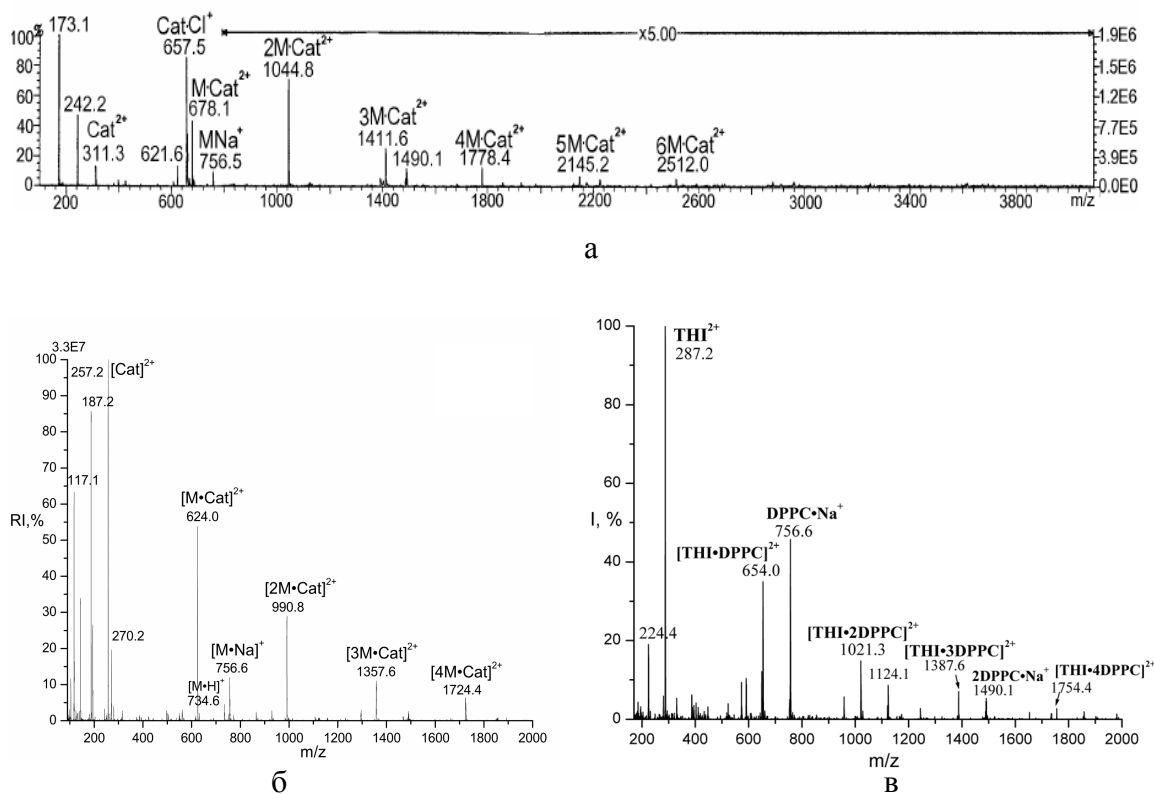


Рис. 3. Масс-спектры с ИЭР для систем, состоящих из ДПФХ и БЧАС:
 а) (ДПФХ+декаметоксин) [34]; б) (ДПФХ+этоний) [35]; в) (ДПФХ+тионий) [36].
 Обозначения: М – молекула ДПФХ (DPPC), Cat²⁺ – органический дикатион БЧАС.
 Рисунки воспроизведены с разрешения издательств журналов [34-36].

Эксперименты ИЭР с использованием тандемной масс-спектрометрии и опции ДИС позволили определить, что наибольшей относительной энергетической стабильностью среди зарегистрированных ионов $nM \cdot \text{Cat}^{2+}$ ($n=1 \div 9$) характеризуется комплекс дикатиона декаметоксина с двумя молекулами ДПФХ [34]. На основе проведенных экспериментов мы рекомендовали описанный масс-спектрометрический подход для регистрации комплексов БЧАС с крупными ассоциатами фосфолипидных молекул как эффективный метод экспресс-оценки мембрантропной активности бисчетвертичных аммониевых соединений с потенциальными антимикробными свойствами [34, 35].

Результаты, полученные в ходе проведенных экспериментов по изучению взаимодействия БЧАС с потенциальными молекулами-мишенями в клетке и суммированные в работе [31], были дополнены данными модельных расчетов методами квантовой химии [20, 25, 37]. Наши теоретические исследования связаны с анализом еще одного возможного молекулярного механизма противомикробного действия БЧАС, который состоит во взаимодействии дикатионов лекарственных препаратов этого класса с локусами мембран клеток бактерий, в которых расположены цепи переноса отрицательных зарядов, в частности, дыхательные цепи микроорганизмов. Перенос электрона с активных центров ферментов дыхательной цепи бактерий (например, с гема цитохромоксидазы) на дикатионы БЧАС вызовет прерывание транспорта электрона по дыхательной цепи, что может привести к подавлению активности или гибели микроорганизма. Расчет электронных параметров (потенциала ионизации и сродства к электрону) дикатионов декаметоксина, этония, тиония и

порфирина гема методом АМ1 и сравнение окислительно-восстановительных свойств этих соединений показали, что для всех исследуемых дикатионов сумма потенциала ионизации и сродства к электрону более чем на 50% превосходит такую сумму для порфирина [20]. Это позволило сделать вывод о возможности переноса электрона с гема цитохромоксидазы на данные катионные ПАВ, и такое прерывание передачи электрона по дыхательной цепи может также вносить вклад в бактериостатическое или бактерицидное действие лекарственных препаратов на основе БЧАС. Кроме того, было показано, что взаимодействие катиона тетраметиламмония с группами, моделирующими боковые радикалы аминокислот мембранных ферментов клеток бактерий, происходит в конкуренции с противоионом хлора, входящим в состав БЧАС. При этом биологически значащие взаимодействия заряженных четвертичных групп аммония с отрицательно заряженными группами боковых радикалов аминокислотных остатков молекул-мишеней могут быть энергетически более выгодным процессом [25, 37].

Еще одним важным вопросом современной молекулярной медицины и молекулярной биофизики является установление взаимного влияния нескольких различных препаратов при комплексной фармако- или химиотерапии. Мотивацией для наших исследований в этой области [36, 38-41] послужили два разноплановых факта. Первый из них непосредственно связан с выработкой правил применения исследуемых противомикробных лекарственных средств, поскольку при лечении простудных заболеваний препараты на основе БЧАС могут использоваться совместно с аспирином (ацетилсалициловой кислотой, АСК), который является распространенным противовоспалительным и кроверазжижающим средством. Второй факт связан с результатами наших масс-спектрометрических экспериментов [17], описанных выше, в которых было обнаружено, что органические анионы могут конкурировать с неорганическим противоионом хлора за связывание с четвертичными аммониевыми группами.

Двух- и трехкомпонентные системы, содержащие БЧАС декаметоксин, этоний или тионий, обладающие основными свойствами, и аспирин, являющийся органической кислотой, а также ДПФХ, мы исследовали методом масс-спектрометрии с ИЭР [36, 40]. Было установлено формирование стабильных ассоциатов дикатионов БЧАС с анионом аспирина, что является одним из возможных путей дезактивации ионных форм препаратов при совместном применении. Образование стабильных комплексов БЧАС с ДПФХ и аспирина с ДПФХ в двухкомпонентных системах, а также распределение комплексов в трехкомпонентных системах БЧАС-АСК-ДПФХ, указывают на существование конкурентного комплексообразования в модельных молекулярных системах, содержащих БЧАС, АСК и мембранные фосфолипиды и возможность такого комплексообразования в биосистемах [40, 41].

Далее, совместно с нашими партнерами, мы продолжили исследование взаимодействия между декаметоксином и аспирином в фосфолипид-содержащих системах различного уровня сложности: растворах [36, 40, 41], модельных фосфолипидных мембранах [36, 38, 39, 41] и образцах эритроцитов [41] человека. В каждой системе соответствующими экспериментальными методами были зарегистрированы специфические эффекты, обусловленные взаимодействием декаметоксина и аспирина: а) методом масс-спектрометрии с ИЭР подтверждено образование нековалентных комплексов декаметоксина и аспирина в органическом растворителе, содержащем ДПФХ; б) в модельных мембранах из ДПФХ методом ДСК было показано, что совместное действие декаметоксина и аспирина приводит к повышению температуры плавления мембраны T_m , тогда как индивидуальное действие каждого препарата приводит к снижению T_m (рис. 4); в) с помощью оптической

микроскопии показано замедление индуцированного декаметоксином гемолиза эритроцитов при совместном введении декаметоксина и аспирина [41].

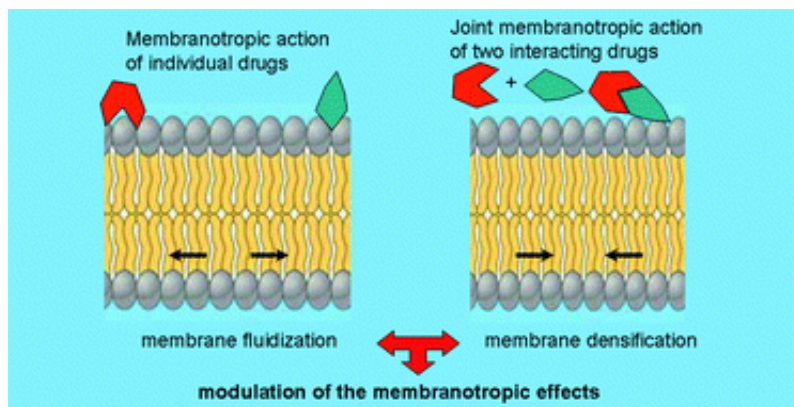


Рис. 4. Графическая аннотация к работе [36], иллюстрирующая молекулярные механизмы воздействия на фосфолипидные мембраны БЧАС и аспирина при индивидуальном и совместном применении препаратов. Воспроизведено из [36] с разрешения The Royal Society of Chemistry.

Полученные результаты указывают на возможность модуляции активности бисчетвертичных аммониевых противомикробных агентов и аспирина при совместном применении препаратов вследствие конкуренции между лекарствами за связывание с мембранными фосфолипидами, а также благодаря формированию нековалентных комплексов между БЧАС и АСК.

Работы [18, 32, 36] включены в международную базу PubChem [28, 42] в списки основополагающих работ, описывающих физико-химические и фармакологические свойства препаратов декаметоксина и этония.

3. Молекулярные основы биологической активности противомаларийных препаратов артемизининового ряда

Одной из актуальнейших социо-медицинских проблем современного мира остается проблема борьбы с опасными инфекционными заболеваниями, к которым относится и малярия. По данным ВОЗ одними из наиболее эффективных противомаларийных лекарственных препаратов являются артемизинин и ряд его синтетических производных, молекулярные механизмы действия которых изучались в отделе молекулярной биофизики ФТИНТ в сотрудничестве с коллегами из масс-спектрометрической лаборатории Антверпенского университета (Бельгия) и химического факультета Аризонского университета (США).

Основные сложности в создании новых эффективных противомаларийных препаратов обусловлены сложным циклом развития возбудителя малярии - малярийного плазмодия, проходящего определенные стадии развития в разных органах тела инфицированного человека. Предполагается, что одним из возможных способов повреждающего воздействия на плазмодий на эритроцитарной стадии его развития может служить блокировка полимеризации гема (освобождающегося из гемоглобина, которым питаются мерозоиты малярийного плазмодия), который в мономерной форме токсичен для возбудителя заболевания.

Методом масс-спектрометрии с ИЭР было установлено формирование стабильных нековалентных комплексов между Fe(III)-гемом и молекулами противомаларийных препаратов хинина, артемизинина, дигидроартемизинина, артемтера и артеестера [43]. Образование невалентных комплексов препаратов с отдельными молекулами гема

должно препятствовать химической полимеризации гема и его последующей детоксикации. Неполимеризованный гем в мономерной форме, после распада нековалентных комплексов с противомалярийными препаратами, остается токсичным для плазмодия при взаимодействии с его структурами и может вызвать гибель патогенна. Таким образом, выявленный процесс невалентного комплексообразования предлагается как возможный молекулярный механизм противомалярийной активности хинина и препаратов артемизининового ряда.

Далее методом ДИС в условиях тандемной масс-спектрометрии нами были изучены сравнительные характеристики стабильности зарегистрированных комплексов гем-лекарственный препарат. Установлено, что наибольшей относительной стабильностью обладает комплекс гема с хинином. Из препаратов артемизининового ряда наиболее стабильным и сравнимым по энергетическим характеристикам с гем-хинин комплексом, является кластер гема с дигидроартемизинином, который считается активным метаболитом препаратов артемизининового ряда в организме человека. Полученные результаты показывают возможность комплексообразования с гемом и блокировки его полимеризации артемизинином и его производными в биосистемах, причем эффективность этого процесса сравнима с таковой для традиционного противомалярийного препарата хинина. Проведенное исследование также показало эффективность подхода с использованием масс-спектрометрии с ИЭР для поиска новых противомалярийных средств, механизм действия которых связан с взаимодействием с гемом [43].

Лечение малярии, которая сопровождается тяжелыми формами проявления лихорадки, осуществляется, как правило, с применением мультилекарственных терапевтических схем, поэтому актуальным является также изучение возможной модуляции действия противомалярийных и противовоспалительных препаратов при их совместном применении. Этому вопросу было посвящено комплексное модельное исследование (с применением метода масс-спектрометрии с ИЭР и метода квантово-химических расчетов DFT B3LYP/aug-cc-pVDZ) межмолекулярных взаимодействий противомалярийных препаратов артемизининового ряда (дигидроартемизинин, артемизинин и артеестер) и аспирина (который является распространенным противовоспалительным и жаропонижающим средством) с мембранными фосфолипидами [44]. Исследование модельных трехкомпонентных систем, содержащих препарат артемизининового ряда, аспирин и ДПФХ, методом масс-спектрометрии выявило существование процесса конкуренции между молекулами противомалярийных агентов и аспирина за нековалентное связывание с ДПФХ. Кроме того, в масс-спектрах зарегистрированы также стабильные супрамолекулярные комплексы противомалярийных агентов с самим аспирином [44]. Для оценки структурно-энергетических характеристик комплексов, зарегистрированных в ходе масс-спектрометрического эксперимента, проведены квантово-химические расчеты комплексов дигидроартемизинин-аспирин и комплексов каждого из препаратов с полярной головкой ДПФХ – фосфатидилхолином (ФХ) [44]. Определены наиболее энергетически выгодные геометрии модельных комплексов (рис. 5). Сравнение величин энергии связи (IE) в этих комплексах показало, что наиболее стабильным является нековалентный комплекс аспирина с ФХ, а энергии стабилизации кластеров дигидроартемизинина с ФХ и аспирина с дигидроартемизинином меньше по абсолютной величине и близки по значению, что еще раз подтверждает вывод, что аспирин и антималярийный агент конкурируют за связывание с фосфолипидами мембран в трехкомпонентных модельных системах [44]. Полученные результаты показывают, что мембранотропная активность артемизининовых агентов и аспирина может модулироваться при совместном применении препаратов.

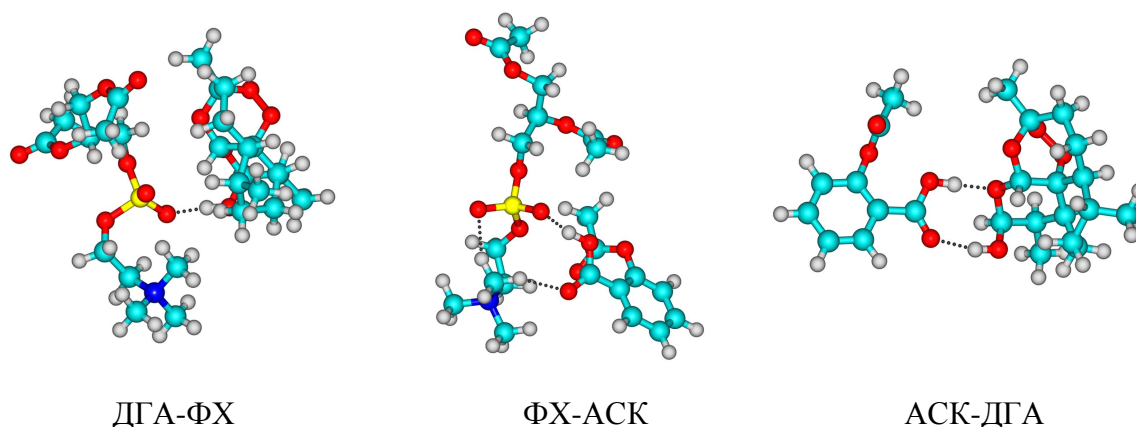


Рис. 5. Структуры наиболее энергетически стабильных нековалентных парных комплексов дигидроартемизинина (ДГА), ацетилсалициловой кислоты (АСК) и фосфатидилхолина (ФХ), полученных в результате расчетов методом B3LYP/aug-cc-pVDZ level в вакууме.

Адаптировано по материалам статьи [44] в разрешения издательства Elsevier.

Возможности применения препаратов артемизининового ряда в медицинской практике не ограничиваются борьбой с малярией. Недавно в литературе появилась информация о противораковой активности этих препаратов [45], однако молекулярный механизм такого действия остается мало исследованным. Установлению возможного механизма противораковой активности артемизинина и его производных было посвящено масс-спектрометрическое исследование межмолекулярных взаимодействий артемизинина и дигидроартемизинина с пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями – компонентами нуклеиновых кислот, которые рассматриваются как потенциальные молекулы-мишени действия многих противоопухолевых препаратов [46]. В масс-спектрах ИЭР были зарегистрированы стабильные супрамолекулярные комплексы «артемизининовый агент - азотистое основание» для всех исследованных оснований (Ade, Cyt, mThy) и проведен сравнительный анализ стабильности комплексов препаратов с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями.

Анализ полученных экспериментальных результатов позволил предположить, что комплексы стабилизируются Ван-дер-Вальсовыми и водородными связями между функциональными группами противомалярийных препаратов и азотистых оснований. Формирование супрамолекулярных комплексов препаратов артемизининового ряда с азотистыми основаниями ДНК и РНК рассматривается в качестве возможного молекулярного механизма противоопухолевого действия препаратов [46].

4. Действие многофункционального красителя метиленового синего

Среди многообразия химиотерапевтических препаратов особо хочется выделить катионный редокс-активный краситель метиленовый синий (Methylene Blue, MB) (см. табл. 1), спектр применения которого распространяется практически на все мишени, рассмотренные в данном обзоре: MB используется в качестве антисептического, противомикробного, противомалярийного, интеркалирующего и фотосенсибилизирующего противоопухолевого средства, а также как молекулярный компонент наноразмерных устройств [47]. Соответственно, механизмы его взаимодействия с разнообразными мишенями активно изучались и продолжают изучаться. Нами были выбраны несколько недостаточно изученных механизмов, помочь в прояснении которых способна современная масс-спектрометрия.

В рамках проблемы применения MB в фотодинамической терапии в литературе [47] обсуждается зависимость механизмов действия препарата от концентрации,

определяющей степень агрегации катионов этой органической соли $\text{Cat}^+\cdot\text{Cl}^-$ в растворе или на границе раздела фаз. Используя метод оценки редокс-активности красителей на основе характерных изменений в масс-спектрах, разработанный нами ранее [49-50] и описанный в первой части этого обзора [3], были выявлены различия в редокс-активности MB, адсорбированного на модельных отрицательно заряженных монослоях SDS, моделирующих отрицательно заряженные биомембраны (рис. 6) [23].

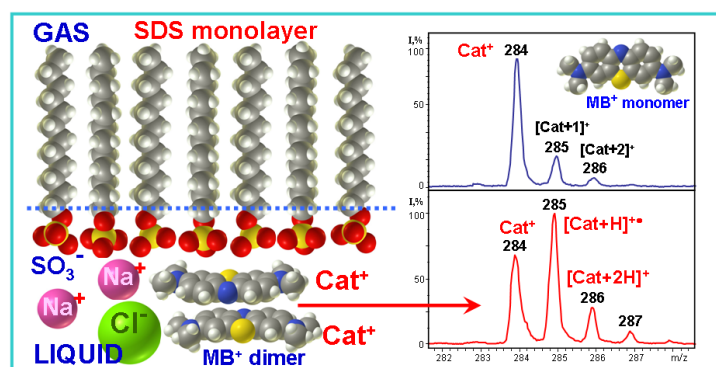


Рис. 6. Графическая аннотация к работе [23]. Слева: отрицательно заряженный монослой ПАВ SDS на поверхности раздела жидкость-газ с адсорбированным на нем димером катиона (Cat^+) метиленового синего. Справа: различие в распределении пиков в масс-спектрах систем, содержащих MB в мономерной (верх) и димерной (низ) формах. Воспроизведено из статьи [23] с разрешения The Royal Society of Chemistry.

Обнаруженное отсутствие или наличие продуктов восстановления MB во вторично-эмиссионных масс-спектрах систем с мономерной и димерной формами адсорбции MB на монослое, соответственно, показало, что редокс-процессы осуществляются в системах с концентрацией MB, достаточной для его агрегации [23]. Аналогичный масс-спектрометрический подход был применен для установления формы адсорбции MB на поверхности углеродных нанотрубок, которая оказалась мономерной [51].

Разработанная масс-спектрометрическая методика слежения за редокс-активностью MB была использована в поисковых исследованиях возможных механизмов вмешательства MB в процессы, связанные с нейродегенеративной патологией – болезнью Альцгеймера [52]. Было показано, что MB, восстанавливаясь, способен окислять аминокислотный остаток цистеина в белках, способствуя образованию дисульфидных мостиков [52], препятствуя, тем самым, формированию патологических нейрофибриллярных клубков.

8. Перспективы исследований и нанотехнологии

В последнее время перспективы развития науки и техники связывают с нанотехнологиями. Не обошла эта тенденция и фармакологию, в рамках которой нанотехнологические приемы и методики применяются для создания новых лекарственных форм с большей биодоступностью и меньшей токсичностью, а также биосовместимых наноматериалов. Отдельное направление состоит в разработке форм для целенаправленной доставки лекарств к их мишеням в живом организме. Во ФТИНТ в рамках развиваемого под руководством члена-корреспондента НАН Украины Карачевцева В.А. направления нанобиофизики [53] ведутся исследования по созданию бионаноконструкций и бионаногибридов биомолекул с углеродными наноматериалами – углеродными нанотрубками (УНТ) и графеном. Результаты исследований, выполненных до 2016 года, обобщены в монографии "Nanobiophysics: Fundamentals and

Applications" [53]. Основным достижением этих работ является создание бионаногибридов УНТ с биополимерами – нуклеиновыми кислотами, установление их спектроскопических и структурных параметров.

Таким образом, перспективы дальнейших работ связаны с использованием разработанных биофизических подходов к исследованию молекулярных механизмов функционирования новых лекарственных форм, создаваемых с помощью нанотехнологий.

ВЫВОДЫ

Результаты исследований, проводившихся в течение нескольких десятилетий во ФТИНТ, подтвердили эффективность применения молекулярно-биофизических подходов и методов к установлению молекулярных механизмов биологического действия химиотерапевтических препаратов.

Показано, что в каждой из исследованных систем (химиотерапевтический препарат и предполагаемая молекулярная мишень) для ряда противомикробных БЧАС и противомаларийных агентов артемизининового ряда такие механизмы включают невалентные взаимодействия лекарственных агентов с биологическими молекулами-мишенями с последующим формированием стабильных супрамолекулярных комплексов, что может обуславливать химиотерапевтическую активность препарата. Методы мягкоионизационной масс-спектрометрии позволили зарегистрировать такие комплексы молекул или ионов лекарственных препаратов с молекулами-мишенями. Структурные, электронные и энергетические характеристики комплексов установлены в квантово-химических расчетах. Масс-спектрометрические результаты подкреплены результатами исследований совместно с нашими партнерами методами ДСК, которые показали, что нековалентные взаимодействия противомикробных БЧАС с фосфолипидами биомембран оказывают существенное влияние на жидкокристаллические свойства мембран и, следовательно, на их функциональную активность, что может быть молекулярной основой бактериостатического и бактерицидного действия изученных БЧАС.

Существенным результатом проведенных исследований можно считать установление молекулярных основ модуляции активности ряда противомикробных и противомаларийных препаратов аспирином при возможном совместном применении препаратов различных классов. Показано, что как изученные БЧАС, так и препараты артемизининового ряда могут конкурировать с аспирином за нековалентное связывание с биомолекулами-мишенями или образовывать супрамолекулярные комплексы лекарственных агентов различных классов.

Ряд оригинальных результатов, полученных сотрудниками ФТИНТ, и ссылки на соответствующие публикации включены в обзорные монографии и международные базы данных.

Перспективы дальнейших исследований связаны с нанотехнологическими подходами к разработке и изучению новых лекарственных форм, состоящих из биологически активных молекул и наночастиц/наноматериалов, предназначенных для целенаправленной доставки лекарств к их мишеням в живом организме или в патогене.

БЛАГОДАРНОСТИ

Этот обзор авторы посвящают памяти многолетнего руководителя отдела молекулярной биофизики ФТИНТ, одного из основателей Харьковской школы биофизики, видного украинского физика и биофизика профессора Благого Юрия Павловича. Его активная преподавательская деятельность на кафедре молекулярной и

прикладной биофизики Харьковского национального университета, внимательное научное руководство аспирантами и сотрудниками отдела, полученные весомые научные результаты внесли неоценимый вклад в развитие биофизической науки в Украине, включая исследования, которым посвящен данный обзор. Мы выражаем благодарность Юрию Павловичу за передачу бесценного научного опыта, начиная с лекций по биофизике, прослушанных в свое время, до наставничества и совместной творческой работы. Авторы обзора благодарны всем соавторам цитируемых работ за вдохновляющее творческое сотрудничество.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Authors' ORCID ID

V.A. Pashynska  <https://orcid.org/0000-0001-9786-6828>

M.V. Kosevich  <http://orcid.org/0000-0003-0257-4588>

REFERENCES

1. Mashkovskii, M. D. (2011) *Lekarstvennye sredstva: posobie dlia vrachei [Medicines: A Handbook for Physicians]*. Moskva: Novaia volna. (in Russian)
2. Gnatchenko, S. L. (Ed). (2010). *Fiziko-tehnicheskij institut nizkih temperatur im. B.I. Verkina NAN Ukrainy. 50 let [Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine. 50 years]*. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)
3. Kosevich, M. V., Ryazanova, O. A., Pashynska, V. A. (2019). Biophysical investigations of molecular mechanisms of chemotherapeutic agents action. 1. Chemotherapeutic and antiviral agents (Review). *Biophysical Bulletin*, (42), 8-27. (in Russian)
4. Verkin, B. I., Yanson, I. K., Sukhodub, L. F., Teplitsky, A. B. (1985). *Vsaimodejstviia biomolekul. Novye eksperimental'nye podhody i metody. [Interactions of biomolecules. New experimental approaches and methods]*. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)
5. Pokrovskiy V. A. (2012). Desorption mass spectrometry: physics, physical chemistry, surface chemistry. *Visnyk Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy [Visnyk of the National Academy of Sciences of Ukraine]*, (12), 28-43. (in Ukrainian)
6. Sukhodub, L. F. (1995). Soft-ionization mass spectrometry study of deoxynucleoside bioclusters and deoxynucleoside-antitumor medicinal preparation clusters // *Mass Spectrometry Reviews*, 14(4-5), 235-254. doi:10.1002/mas.1280140402
7. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S. (1993). A new type of graphite emitters for field ionization/field desorption mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 7(9), 805-811. doi 10.1002/rcm.1290070905
8. Kosevich, M. V., Pashinskaya, V. A., Shelkovsky, V. S. (1994). Direct identification of organic inclusions in graphite on the basis of field desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 29(9), 458-462. doi: 10.1002/oms.1210290903
9. Kosevich, M. V. (1998) Low temperature secondary emission mass spectrometry. Cryobiological applications. *European Mass Spectrometry*, 4(4), 251-264. doi: 10.1255/ejms.218
10. Blagoi, Yu. P., Sheina, G. G., Ivanov, A. Yu., Radchenko, E. D., Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A., Rubin, Yu. V. (1999). Low-temperature experimental studies in molecular biophysics: a review. *Low Temperature Physics*, 25(10), 747-760. doi:10.1063/1.593810
11. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (2018). PubChem Compound Database. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Shelkovskii, V. S., Volianskii, Iu. L. (1989). Mass-spectrometric analysis of an anti-microbial preparation decamethoxine. *Antibiotiki i khimioterapiia*, 34(11), 823-827
13. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Shelkovskii, V. S., Boriak, O. A., Volianskii, Iu. L., Moleva, V. I., Chumachenko, T. A. (1989). Identification of bis-quaternary ammonium compounds using mild ionization mass spectrometry. *Antibiotiki i khimioterapiia*, 35(2), 10-12. (in Russian)
14. Kosevich, M. V., Pashynska, V. A., Szilagyu, Z., Vekey, K., Shelkovsky, V. S., Blagoi, Yu. P. (1998). Stability of decamethoxin dication as revealed by secondary-ion mass spectrometry. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 422. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (2), 15-23

15. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Van den Heuvel, H., Claeys, M. (2006). The effect of cone voltage on electrospray mass spectra of the bisquaternary ammonium salt decamethoxinum. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(5), 755-763. doi: 10.1002/rcm.2371
16. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vekey, K., Claeys, M., Chagovets, V. V., Pokrovskiy, V. A. (2015). Variable electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra of the bisquaternary ammonium salt ethonium. *Mass Spectrometry & Purification Techniques*, 1(1), 103 (9p). doi: 10.4172/2469-9861.1000103
17. Pokrovsky, V. A., Kosevich, M. V., Osaulenko, V. L., Chagovets, V. V., Pashynska, V. A., Shelkovsky, V. S., Karachevtsev, V. A., Naumov, A. Yu. (2005). Matrix-assisted laser desorption-ionization study of bisquaternary ammonium antimicrobial agent decamethoxinum in 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Mass-spektrometriya*, 2(3), 183-192
18. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Szilagy, Z., Vekey, K., Stepanian, S. G. (2005). On the stability of the organic dication of the bisquaternary ammonium salt decamethoxinum under liquid secondary ion mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(6), 785-797. doi: 10.1002/rcm.1846
19. Kosevich, M. V., Pashinskaya, V. A., Stepanian, S. G., Shelkovsky, V. S., Orlov, V. V., Blagoy, Yu. P. (1999). Quantum chemical study of decamethoxinum and related dications. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 434. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (3), 31-38
20. Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Stepanian, S. G. (1999). Application of quantum chemical calculations data in study on molecular mechanisms of activity of drugs based on bisquaternary ammonium salts. *Visnyk Problem Biologii ta Medicyny*, (1), 118-125. (in Russian)
21. Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Stepanian, S. G. (2000). Quantum-mechanical study of structure of hydrated bisquaternary ammonium compound decamethoxinum. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu. Biofizychnyi Visnyk No 497 [Biophysical Bulletin]*, (7), 29-34. (in Russian)
22. Kosevich, M. V., Chagovets, V. V., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Gomory, A., Vegh, P. (2007). Is there a "matrix suppression effect" under fast atom bombardment liquid secondary ion mass spectrometry of ionic surfactants in glycerol? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(4), 466-478. doi: 10.1002/rcm.2859
23. Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Chagovets, V. V., Shmigol, I. V., Pokrovskiy, V. A. (2014). Monomer/dimer dependent modulation of reduction of the cationic dye methylene blue in negatively charged nanolayers as revealed by mass spectrometry. *RSC Advances*, 4(104), 60260-60269. doi: 10.1039/C4RA09592H
24. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Chagovets, V. V., Pashynska, V. A., Orlov, V. V., Stepanian, S. G., Shelkovsky, V. S. (2007). "Wet chemistry" and crystallochemistry reasons for acidic matrix suppression by quaternary ammonium salts under MALDI conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(11), 1813-1819. doi: 10.1002/rcm.3020
25. Pashynska, V., Kosevich, M., Stepanian, S., Adamowicz, L. (2007). Noncovalent 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. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 815(1-3), 55-62. doi: 10.1016/j.theochem.2007.03.019
26. Lysytsia, A. V. (2002). Fyzyko-khimichna kharakterystyka biolohichno aktyvnykh rehovyn za danymy chasoprolitnoi plazmovo-desorbtsiinoi mas-spektrometrii [Physico-chemical characterization of biologically active compounds by means of plasma desorption mass spectrometry]. (PhD dissertation). Retrieved from <http://www.dissers.com.ua/contents/42180.html> (in Ukrainian)
27. Babaev, V. M., Musin, R. Z., Korochkina, M. G. (2012). Investigation of diterpenoid isosteviol ammonium derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass-Spektrometriya*, 9(3), 175-180
28. National Center for Biotechnology Information (2018). PubChem Compound Database; Decamethoxine; CID=162291. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/162291>
29. Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vekey, K., Korzovskaya, O., Lisetskiy, L. N., Blagoy, Yu. P. (1999). Mass spectrometry investigation of noncovalent complexes of bisquaternary ammonium salts with phospholipids. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 450. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (4), 59-62. (in Russian)
30. Korzovskaya, O. V., Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Lisetski, L. N. (1999). Interaction of antimicrobial agents decamethoxinum and aethonium with model membranes. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 450. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (4), 35-39
31. Pashinskaya, V. A. (2000). Interactions of bisquaternary ammonium compounds with components of biological membranes. (PhD dissertation). Retrieved from <http://dissers.com.ua/content/13690.html> (in Russian)

32. Pashynskaya, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vashchenko, O. V., Lisetski, L. N. (2002). Mechanistic investigation of the interaction between bisquaternary antimicrobial agents and phospholipids by liquid secondary ion mass spectrometry and differential scanning calorimetry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(18), 1706–1713. doi: 10.1002/rcm.771
33. Vashchenko, O., Pashynska, V., Kosevich, M., Panikarska, V., Lisetski, L. (2011). Lyotropic mesophase of hydrated phospholipids as model medium for studies of antimicrobial agents activity. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 547(1), 155/[1845]–163[1853]. doi: 10.1080/15421406.2011.572038
34. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Van den Heuvel, H., Cuyckens, F., Claeys, M. (2004). 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. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 637. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (14), 123–130
35. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vekey, K. (2012). Investigations of the formation of noncovalent complexes between antimicrobial agent ethonium with membrane phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass-Spectrometria*, 9(2), 121–128
36. Kasian, N. A., Pashynska, V. A., Vashchenko, O. V., Krasnikova, A. O., Gomory, A., Kosevich, M. V., Lisetski, L. N. (2014). Probing of the combined effect of bisquaternary ammonium antimicrobial agents and acetylsalicylic acid on model phospholipid membranes: differential scanning calorimetry and mass spectrometry studies. *Molecular BioSystems*, 10(12), 3155–3162. doi: 10.1039/c4mb00420e
37. Pashynska, V., Boryak, O., Kosevich, M. V., Stepanian, S., Adamovicz, L. (2010). Competition between counterions and active protein sites to bind bisquaternary ammonium groups. A combined mass spectrometry and quantum chemistry model study. *European Physical Journal D*, 58(3), 287–296. doi: 10.1140/epjd/e2010-00125-5
38. Vashenko, O. V., Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Kasyan, N. A. (2010). Study of joint action of bisquaternary ammonium compounds and organic acids on model phospholipid membranes. *Biophysical Bulletin*, 25(2), 44–61. (in Russian)
39. Vashchenko, O. V., Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Panikarskaya, V. D., Lisetski, L. N. (2010). Modulation of bisquaternary ammonium agents affect on model biomembranes by complex formation with an organic anion. *Biopolymers and Cell*, 26(6), 472–477. (in Russian)
40. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vekey, K. (2013). Model mass spectrometric study of competitive interactions of antimicrobial bisquaternary ammonium drugs and aspirin with membrane phospholipids. *Biopolymers and Cell*, 29(2), 157–162. doi: 10.7124/bc.000814
41. Vashenko, O. V., Kasian, N. A., Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Sadchenko, A. O., Tishko, D. N., Tishko, T. V., Titov, V. P., Lisetski, L. N. (2015). Intermolecular interaction of decamethoxinum and acetylsalicylic acid in systems of various complexity levels. *Biophysical Bulletin*, 34(2), 5–15
42. National Center for Biotechnology Information (2018). PubChem Compound Database; Ethonium; CID=30869. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/30869>
43. Pashynska, V. A., Van den Heuvel, H., Claeys, M., Kosevich, M. V. (2004). Characterization of noncovalent complexes of antimalarial agents of the artemisinin-type and FE(III)-heme by electrospray mass spectrometry and collisional activation tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(8), 1181–1190. doi: 10.1016/j.jasms.2004.04.030
44. Pashynska, V., Stepanian, S., Gomory, A., Vekey, K., Adamowicz, L. (2015). Competing intermolecular interactions of artemisinin-type agents and aspirin with membrane phospholipids: Combined model mass spectrometry and quantum-chemical study. *Chemical Physics*, 455, 81–87
doi: 10.1016/j.chemphys.2015.04.014
45. Das, A. K. (2017). Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds. *Anticancer Research*, 37(11), 5995–6003
46. Pashynska, V. A. (2009). Mass spectrometric study of intermolecular interactions between the artemisin-type agents and nucleobases. *Biophysical Bulletin*, 22(1), 20–28
47. Shelkovsky, V.S. (2015). Utilization of redox and aggregation properties of methylene blue dye in nanobiophysical investigations. *Biophysical Bulletin*, 33(1), 5–29
48. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Shelkovsky, V. S., Chagovets, V. V., Stepanian, S. G., Karachevtsev, V. A., Adamowicz, L. (2006). Evaluation of the reduction of imidazophenazine dye derivatives under fast atom bombardment mass spectrometric conditions. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(1), 113–123. doi: 10.1002/jms.974
49. Kosevich, M. V., Chagovets, V. V., Shmigol, I. V., Snegir, S. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Shelkovsky, V. S., Pokrovskiy, V. A., Gomory, A. (2008). Sensitivity of redox reactions of dyes to variations of conditions created in mass spectrometric experiments. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(10), 1402–1412. doi: 10.1002/jms.1421

50. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Chagovets, V. V., Shelkovsky, V.S., Pokroveky, V. A. (2016). Chapter Seven: Interactions of biologically active redox-sensitive dyes with nanomaterials: mass spectrometric diagnostics. In V. A. Karachevtsev (Ed.), *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications* (pp. 193–233). Singapore: Pan Stanford Publishing
51. Chagovets, V. V., Kosevich, M. V., Stepanian, S. G., Boryak, O. A., Shelkovsky, V. S., Orlov, V. V., Leontiev, V. S., Pokrovskiy, V. A., Adamowicz, L., Karachevtsev, V. A. (2012). Noncovalent interaction of methylene blue with carbon nanotubes: theoretical and mass spectrometry characterization. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(38), 20579–20590. doi: 10.1021/jp306333c
52. Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Zobnina, V. G., Plokhotnichenko, A. M. Redox interactions of methylene blue with cysteine amino acid as a possible mechanism of biological action of the dye. *Biophysical Bulletin*, 1(37), 30–41. (in Russian) doi: 10.26565/2075-3810-2017-37-04
53. Karachevtsev, V. A. (Ed.). (2016). *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications*. Singapore: Pan Stanford Publishing