
СПІВЗАСНОВНИКИ

Національна академія медичних наук України •
Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України» •
Державне підприємство «Державний експертний центр
Міністерства охорони здоров'я України» •
Всеукраїнська громадська організація «Асоціація фармакологів України»

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ЛІКАРСЬКА ТОКСИКОЛОГІЯ PHARMACOLOGY AND DRUG TOXICOLOGY

Науково-практичне видання

Журнал заснований у серпні 2007 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 1 (47)/2016

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

- Лук'янчук В. Д., Сейфулліна І. Й., Літвиненко Д. Ф., Марцинко О. Е.*
Фармакологічні властивості органічних і координаційних сполук германію –
сучасні уявлення 3
- Чекман І. С.* Науково-методичні основи викладання нанофармакології..... 14

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

- Горбачева С. В., Беленичев І. Ф., Кучеренко Л. І.* Механізми ендогенної
нейропротекції при використанні модуляторів тиол-дисульфідної системи
в умовах експериментального порушення мозгового кровообігу..... 24
- Носач С. Г., Беленичев І. Ф., Александрова Е. В., Левич С. В., Рыженко В. П.*
Антиоксидантний механізм нейропротективного дії производного
3-метилксантину (сполучення С-3) в умовах внутримозгового кровоизливу..... 31
- Холодняк С. В., Бухтіярова Н. В., Шабельник К. П., Берест Г. Г.,
Беленичев І. Ф., Коваленко С. І.* Спрямований пошук протисудомних агентів
серед спіропохідних з 2-арил-5,6-дигідро-[1,2,4]тріазоло-[1,5-с]хіназоліновим
фрагментом 39

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

- Білай І. М., Михайлюк Є. О., Цис О. В., Шабельник К. П., Коваленко С. І.,
Остапенко А. О.* Анальгетична активність похідних 1,2,4-тріазолу на етапі
первинного фармакологічного скринінгу 48
- Головенко М. Я., Валіводзь І. П., Ларіонов В. Б.* Участь фенобарбітал-індукованих
ізоформ CYP450 у О-дезалкоксилюванні ¹⁴С-етоксазепаму 53
- Dronova M. L.* The therapeutic efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethyl butyl)
phenoxy]-3-(n-benzyl hexametylenimino)-2-propanol chloride under *in vivo* models 60
- Добреля Н. В., Карацуба Т. А., Гула Н. С., Дуняк Ю. О., Бойцова Л. В.,
Данова І. В., Тишкін С. М., Хромов О. С.* Корекція порушень гемостазу 66
-

<i>Иванов Л. В., Ляпунов А. Н., Картель Н. Т., Нардид О. А., Черкашина Я. О., Деримедведь Л. В.</i> Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов	72
<i>Калько К. О., Дроговоз С. М., Захарко Н. В., Юдкевич Т. К.</i> Вплив токсичних доз парацетамолу на циркадіанний ритм прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу.....	81
<i>Мєшкова Н. О., Міщенко О. В., Олійник В. Л., Олійник Г. М., Шарикіна Н. І.</i> Дослідження цитостатичної дії похідних хіназоліну	87
<i>Мохорт М. А., Кутовий Ю. М.</i> Дослідження захисних ефектів фармакологічного прекодиціювання похідними імідазо[1,2-а]азепінію на функціонування серця щурів <i>in vivo</i> за умов регіональної ішемії	91
<i>Попов О. С., Шебеко С. К., Зупанець І. А., Шаламай А. С.</i> Дослідження впливу препарату «Диклокор» на спонтанну больову реакцію в експерименті	97

ПИТАННЯ ФАРМАЦЕВТИКИ, ФАРМАЦЕВТИЧНОГО РИНКУ, ФАРМАКОЕКОНОМІКИ

<i>Делян Є. П.</i> Амінокислотний склад надземних органів рослин роду <i>Sonchus</i>	102
--	-----

СОДЕРЖАНИЕ	107
-------------------------	-----

CONTENT	108
----------------------	-----

Л. В. Иванов¹, А. Н. Ляпунов², Н. Т. Картель¹, О. А. Нардид³,
Я. О. Черкашина³, Л. В. Деримедведь⁴

Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов

¹Институт химии поверхности имени А. А. Чуйка НАН Украины, г. Киев

²Институт монокристаллов НАН Украины, г. Харьков

³Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

⁴Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

*Ключевые слова: фармацевтические
вспомогательные вещества,
микровязкость, мембраны эритроцитов,
метод спиновых зондов*

В настоящее время при создании различных лекарственных форм кроме фармакологически активных, действующих веществ используют вспомогательные вещества (ВВ), в том числе низкомолекулярные растворители и высокомолекулярные полимеры (молекулярная масса выше 600) различной химической структуры с различными физико-химическими свойствами, обеспечивающими необходимую консистенцию, стабильность, хранение и эффективность лекарственных форм. Ранее с помощью метода спиновых зондов было показано, что фармацевтические растворители и полимеры эффективно взаимодействуют с мембранами модельных клеток липосом и мембранами интактных клеток, вытесняя по конкурентному механизму из мембран лекарственные вещества (ЛВ), влияют на проницаемость и целостность мембран клеток, текучесть липидов мембран липосом [1–6].

Изучение за рубежом проницаемости глицерина через мембрану эритроцитов крови восьми млекопитающих показало, что только эритроциты крови крыс и человека имеют достаточно высокую проницаемость для глицерина, сравнимую между собой. Проницаемость для глицерина эритроцитов крови других млекопитающих заметно ниже и не может быть объяснена различием фос-

фолипидного состава мембран исследованных эритроцитов [7].

Вопрос о влиянии современных фармацевтических растворителей и полимеров на конформационную подвижность липидов мембран клеток (микровязкость мембран) является актуальным, так как биодоступность ЛВ является многократной трансдиффузией молекул ЛВ в мембранах клеток и напрямую зависит от их микровязкости. Создание лекарственных препаратов с регулируемым всасыванием (заданной биодоступностью) для медицины и ветеринарии требует использования ВВ, способных замедлять или ускорять процессы трансмембранной диффузии ЛВ, а это, в свою очередь, требует конкретных данных об особенностях влияния определенных ВВ на микровязкость мембран клеток человека и животных, либо об универсальности действия определенных ВВ на биодоступность для человека и различных видов животных.

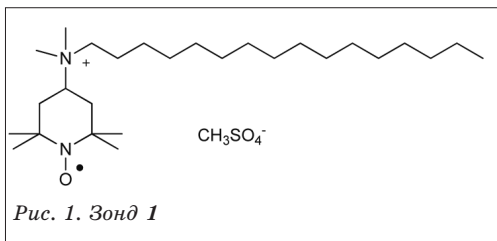
Недавно нами было опубликовано исследование, посвященное изучению механизмов цитотоксичности ряда гидрофильных полочксамеров, в котором показано значительное снижение микровязкости мембран эритроцитов человека и крыс под действием ряда полочксамеров [15]. Эксперименты показали, что разжижающее действие гидрофильных полочксамеров на мембраны эритроцитов крыс меньше, чем человека, что обусловило продолжение такого сравнительного исследования микровязкости эритроцитов человека и крыс в присутствии ряда других фар-

мацевтических вспомогательных веществ.

Цель исследования – сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ (растворителей и высокомолекулярных полимеров) на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов. Полученные результаты могут дать новую информацию о механизмах цитотоксичности фармацевтических вспомогательных веществ, а также могут быть использованы при создании лекарственных препаратов с регулируемым всасыванием и оптимальной биодоступностью.

Материалы и методы. В работе использован метод спиновых зондов, в котором по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) стабильных нитроксильных радикалов с липофильным органическим заместителем (что позволяет им внедриться в липофильный слой мембран эритроцитов) оценивали время корреляции броуновской вращательной диффузии зондов в липидах мембран клеток.

Для изучения микровязкости мембран эритроцитов в присутствии растворителей и полимеров был выбран спиновый зонд **1** (рис. 1) на основе пальмитиновой кислоты – нитроксильный радикал 4-(N,N-диметил-N-гексадециламмоний)-ГЕМПО, содержащий в своем составе четвертичный аммониевый фрагмент и синтезированный по схемам [8, 9]:



Введение зонда **1** в водную взвесь эритроцитов осуществляли добавлением концентрированного раствора зонда в ДМСО таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО во взвеси эритроцитов была в пределах 0,5–1,0 %. Регистрацию спектров ЭПР осуществляли на радиоспектрометре «ESR Spectrometer CMS8400».

Оценку микровязкости мембран эритроцитов проводили на основе обработки интенсивности и ширины линий триплета ЭПР-спектров нитроксильных радикалов – спинового зонда **1**, находящегося в липидном бислое мембран эритроцитов [10, 11]. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (τ) использовали такие характеристики спектров: ширина центральной компоненты (ΔH_0), интенсивность компонентов спектра ЭПР (h_0, h_{+1}, h_{-1}) с магнитным квантовым числом ядра ¹⁴N ($M = 0, +1, -1$), изотропная константа сверхтонкой структуры $A_{\text{изо}}$ (рис. 2) [10]. Базовым уравнением для оценки вязкости любых сред является уравнение Стокса-Эйнштейна:

$$\tau = 4\pi a^3 \cdot \eta / 3kT, \quad (1)$$

где

τ – время, за которое спиновый зонд поворачивается на 1 радиан (57°) в 1 с, η – вязкость среды, a – эффективный радиус спинового зонда, определяемый по спектрам ЭПР [10, 11].

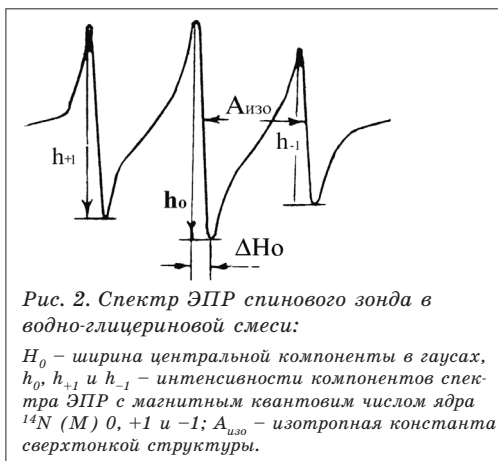
$$1/\tau_{c(+1)} = 2 \cdot 10^8 / [(h_0/h_{+1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 c^{-1} \quad 2(a)$$

$$1/\tau_{c(-1)} = 3,6 \cdot 10^9 / [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 c^{-1} \quad 2(б)$$

$$\tau_{c(+1/-1)} = 6,65 \cdot 10^{-10} / [(h_{+1}/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_{+1} c^{-1} \quad 2(в)$$

Учитывая структуру спинового зонда **1**, а также анизотропное вращение его вокруг длинной оси молекулы, при анализе результатов, в первую очередь, обращали внимание на время корреляции $\tau_{c(+1/-1)}$, которое учитывает анизотропию спектров ЭПР и анизотропное вращение зонда в мембране клеток [10, 11].

Эритроциты крыс для исследований получали из крови крыс самцов согласно [9]. Эритроциты человека получали из свежесконсервированной донорской крови, заготовленной на глюцицировом консерванте. Кровь получали на Харьковской областной станции переливания крови. С целью унификации объекта в работе использовали кровь II группы. После удаления плазмы эритромасту трижды отмывали путем центрифугирования при 1500 g в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л хлорид натрия, 0,01 моль/л трис-буфер, pH 7,4).



Изучали следующие фармацевтические растворители и полимеры: пропиленгликоль (ПГ), полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 (ПЭГ-300), ПЭГ-400, гексиленгликоль (ГГ) и N-метилпирролидон (N-МР), а также высокомолекулярный полимер ПЭГ-1500.

Растворители и водные растворы полимеров вводили во взвесь эритроцитов путем добавления по каплям разбавленных водных растворов растворителей (полимеров) в различных соотношениях таким образом, чтобы конечная их концентрация во взвеси эритроцитов составляла необходимые 10 или 5 % (табл. 1 и 2).

Исследования проводили в светлое время суток на беспородных белых крысах-самцах массой 180–210 г. Кровь отбирали у каждого из шести животных ($n = 6$), а также использовали кровь шести доноров ($n = 6$). Все опыты на животных проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (г. Страсбург, 1986 г.), и «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Украина, 2001 г.).

Таблица 1

Значения величин времени корреляции τ , рассчитанные из спектров ЭПР зонда 1 в мембранах эритроцитов человека в присутствии фармацевтических вспомогательных веществ при температуре 25 °С

Вспомогательное вещество	$\tau_{-1} \cdot 10^{10}$, с	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^{10}$, с
Контроль	17,90 ± 0,89	70,30 ± 4,20
ПЭГ 1500 10 % 10 мин	17,70 ± 0,88	68,50 ± 4,10
ПЭГ 1500 10 % 30 мин	15,60 ± 0,70*	67,00 ± 4,01
ПЭГ 1500 10 % 60 мин	15,00 ± 0,85	60,10 ± 3,65*
ПЭГ 400 10 % 10 мин	18,50 ± 0,98	71,00 ± 4,28
ПЭГ 400 10 % 30 мин	19,50 ± 0,99	81,00 ± 4,85*
ПЭГ 400 10 % 60 мин	18,30 ± 0,96	75,00 ± 4,70
ПЭГ 300 10 % 10 мин	19,80 ± 1,01*	86,90 ± 5,23*
ПЭГ 300 10 % 30 мин	21,70 ± 1,10*	87,30 ± 5,26*
ПЭГ 300 10 % 60 мин	18,10 ± 0,92	75,10 ± 4,55
ПГ 10 % 10 мин	19,60 ± 0,98	71,90 ± 4,35
ПГ 10 % 30 мин	19,00 ± 0,95	90,60 ± 5,43*
ПГ 10 % 60 мин	20,10 ± 1,05*	70,50 ± 4,30
ГГ 10 % 10 мин	14,70 ± 0,78*	65,00 ± 3,95
ГГ 10 % 30 мин	13,60 ± 0,72*	52,60 ± 3,25*
ГГ 10 % 60 мин	10,10 ± 0,56*	24,90 ± 1,58*
N-МР 5 % 10 мин	19,60 ± 1,05	73,00 ± 4,42
N-МР 5 % 30 мин	18,10 ± 1,01	69,70 ± 4,25
N-МР 5 % 60 мин	17,00 ± 0,93	69,50 ± 4,22

Примечание. Здесь и в табл. 2: * $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Значения величин времени корреляции τ , рассчитанные из спектров ЭПР зонда 1 в мембранах эритроцитов крыс в присутствии фармацевтических вспомогательных веществ при температуре 25 °С

Вспомогательное вещество	$\tau_{-1} \cdot 10^{10}, \text{с}$	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^{10}, \text{с}$
Контроль	15,20 ± 0,78	66,30 ± 3,37
ПЭГ 1500 10 % 5 мин	16,20 ± 0,84	55,40 ± 2,99*
ПЭГ 1500 10 % 30 мин	14,00 ± 0,75	64,40 ± 3,32
ПЭГ 1500 10 % 60 мин	16,00 ± 0,86	67,10 ± 3,46
ПЭГ 400 10 % 5 мин	15,10 ± 0,81	66,20 ± 3,39
ПЭГ 400 10 % 30 мин	17,20 ± 0,87*	69,30 ± 3,49
ПЭГ 400 10 % 60 мин	19,30 ± 0,99*	85,40 ± 4,46*
ПГ 10 % 5 мин	16,20 ± 0,83	82,20 ± 4,93*
ПГ 10 % 30 мин	16,00 ± 0,84	69,00 ± 3,55
ПГ 10 % 60 мин	15,20 ± 0,80	78,10 ± 4,20*
ГГ 10 % 5 мин	14,10 ± 0,75	56,20 ± 3,16*
ГГ 10 % 30 мин	16,00 ± 0,88	61,00 ± 3,35
ГГ 10 % 60 мин	13,20 ± 0,69*	45,10 ± 2,76*
N-MP 5 % 5 мин	15,50 ± 0,81	64,00 ± 3,35
N-MP 5 % 30 мин	15,10 ± 0,83	61,00 ± 3,26

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методами вариационной статистики с помощью стандартных пакетов программ Statistica 7 for Windows, Microsoft Excel XP. При сравнении результатов между группами использовали модифицированный параметрический t-критерий Стьюдента для выборок с неравными дисперсиями. Проводили расчет средних величин, стандартного отклонения (табл. 1, табл. 2) [16]. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Спиновый зонд 1, имеющий положительный заряд, по-видимому, встраивается в мембрану подобно фосфатидилхолину, имеющему положительно заряженную холинную «головку» и два алкильных «хвоста». Показано, что нитроксильный фрагмент зонда 1 с неспаренным электроном находится в липидном окружении мембран, так как его константа $A_{\text{изо}}$ равна 14,6 гс и соответствует нахождению нитроксильного фрагмента в неполярном окружении. В полярном окружении нитроксильного фрагмента спинового зонда $A_{\text{изо}}$ составляет около 17,2 гс [10, 11]. Наибольшую плотность и наи-

меньшую подвижность липидный бислой мембран клеток имеет на поверхности мембран на уровне фосфолипидных «головок», а конформационная подвижность алкильных хвостов фосфолипидов возрастает при удалении от поверхности мембраны вглубь (вязкость падает) [12]. Нитроксильный фрагмент зонда 1 «зажат» между фосфолипидными головками в мембране, поэтому величина τ_c вращательной подвижности зонда 1 может быть весьма чувствительна к изменению плотности упаковки фосфолипидов мембран клеток (микровязкости) под действием ВВ. Внедрение молекул ВВ между молекулами фосфолипидов мембран может менять плотность упаковки фосфолипидов в мембране (микровязкость), нарушать жидкокристаллическую структуру мембран, а также параметр $A_{\text{изо}}$ зонда 1 – полярность микроокружения нитроксильного фрагмента. Исследования, проведенные ранее, показали, что $\tau_{+1/-1}$ зонда 1 в мембране эритроцитов более чувствительно к изменению микровязкости мембран, чем τ_{+1} или τ_{-1} , так как более адекватно отображает анизотропию вращательной подвижности зонда 1 вокруг длинной оси молекулы.

Анализ влияния изучаемых фармацевтических растворителей и полимеров на микровязкость мембран эритроцитов должен учитывать, что осмотически активные растворители одновременно вызывают разнонаправленные эффекты изменения микровязкости в мембране клеток: дегидратацию и сжатие клеток, набухание клеток вследствие диффузии низкомолекулярных растворителей внутрь клеток, нарушение жидкокристаллической структуры мембран клеток, нарушение белок-липидных взаимодействий в мембране клеток [1–6].

Анализ τ_c (пропорционального микровязкости мембран, формула 1) зонда 1 в мембране эритроцитов крови человека (табл. 1) показал, что введение ПГ в эритроциты человека сопровождалось слабым, но достоверным повышением микровязкости мембран эритроцитов в течение 1 ч для параметра τ_{-1} и заметным повышением микровязкости мембран в течение получаса для чувствительного параметра $\tau_{+1/-1}$ (дегидратация клеток) с последующим снижением микровязкости в течение 1 ч до нормы – набухание клеток вследствие диффузии низкомолекулярных растворителей внутрь клеток и выравнивание осмотического давления внутри и снаружи. Аналогичные тенденции наблюдаются и для эритроцитов крыс при введении ПГ, однако, начальное заметное повышение микровязкости мембран согласно чувствительному параметру $\tau_{+1/-1}$ (табл. 2) не сопрово-

ждается последующим снижением микровязкости мембран до нормы вследствие набухания клеток. По параметру τ_{-1} микровязкость мембран эритроцитов крыс в течение часа колеблется в пределах ошибки, обозначая по средним значениям τ_{-1} лишь тенденции процессов дегидратации и набухания клеток.

Введение ПЭГ-300 во взвесь эритроцитов крови человека приводит к заметному и стабильному увеличению микровязкости мембран клеток вследствие дегидратации в первый период времени, исходя из параметров $\tau_{+1/-1}$ и τ_{-1} . Через 1 ч микровязкость мембран восстанавливается практически до нормы вследствие диффузии ПЭГ-300 внутрь эритроцитов и набухания клеток (табл. 1). На рисунках 3–4 представлены спектры ЭПР спинового зонда 1 в мембранах эритроцитов человека в присутствии некоторых ВВ, из которых видно, что параметры спектров ЭПР, например, h_0/h_{-1} , связанные в вращательной подвижностью зонда 1 в мембране, при введении ВВ в эритроциты, отличаются от таковых в контроле.

При введении ПЭГ-400 в эритроциты человека чувствительный параметр $\tau_{+1/-1}$ вращательной диффузии зонда 1 в мембране демонстрирует небольшое увеличение микровязкости мембран через 30 мин вследствие дегидратации и падение микровязкости через 1 ч вследствие набухания клеток (табл. 1).

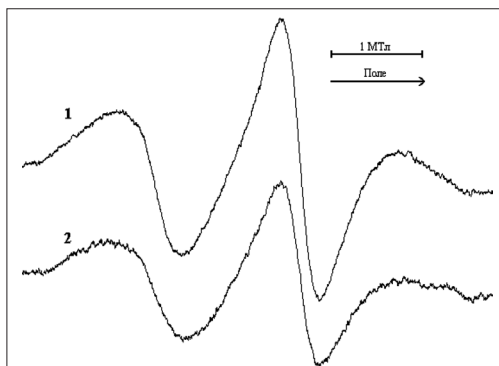


Рис. 3. Спектры ЭПР спинового зонда 1 в мембранах эритроцитов человека:

1 – контроль, 2 – в присутствии 10 % ПГ через 30 мин после введения в эритроциты (25 °С).

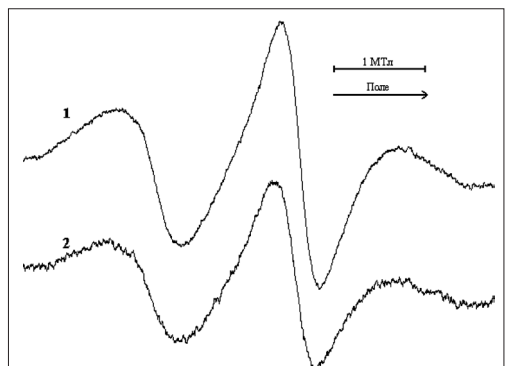


Рис. 4. Спектры ЭПР спинового зонда 1 в мембранах эритроцитов человека:

1 – контроль, 2 – в присутствии 10 % ПЭГ-400 через 30 мин после введения в эритроциты (25 °С).

При введении ПЭГ-400 в эритроциты крыс микровязкость мембран постепенно увеличивается в течение 1 ч инкубации по двум параметрам времени корреляции в разной степени (табл. 2), что можно объяснить насыщением поверхностных слоев мембран клеток более крупными молекулами ПЭГ-400 (большая вязкость растворителя), чем ПГ или ПЭГ-300, которые достаточно быстро диффундируют внутрь клеток эритроцитов. В противоположность этому действие очень вязкого растворителя полимера ПЭГ-1500 на мембраны эритроцитов человека заключается в небольшом достоверном снижении микровязкости мембран для всех параметров времени корреляции зонда 1 в мембране на протяжении 1 ч (табл. 1). Это можно объяснить образованием стабильного комплекса ПЭГ-1500 с компонентами липидного поверхностного слоя мембран, которое нарушает жидкокристаллическую структуру мембран эритроцитов и белок-липидные взаимодействия в мембране эритроцитов, что приводит к разжижению липидного бислоя мембран эритроцитов человека [13, 14].

В то же время введение ПЭГ-1500 во взвесь эритроцитов крыс приводит к начальному снижению микровязкости мембран и дальнейшему быстрому выходу значений микровязкости на уровень нормы в течение 30 и 60 мин. Несовпадение кинетики реагирования эритроцитов человека и крысы на введение осмотически активных фармацевтических ВВ отражает различие величины и длительности процессов дегидратации клеток эритроцитов человека и крысы и процессов набухания клеток вследствие трансмембранной диффузии низкомолекулярных ВВ внутрь клеток. А это, в свою очередь, определяется различием фосфолипидного состава мембран этих клеток у человека и крысы.

Значительные изменения в мембране эритроцитов человека происходят при введении в эритроциты низкомолекулярного растворителя ГГ, который считается активатором всасывания лекарственных веществ: наблюдается постепенное сильное снижение микровязкости мембран в течение 1 ч, которое

быстро развивается во времени. Такой эффект сильного разжижения мембран эритроцитов похож на действие полоксамеров на мембраны эритроцитов человека и крысы, обнаруженного и описанного нами ранее [15].

Величина максимального эффекта для ГГ по разным параметрам времени корреляции составляет 40–60 % (табл. 1). По-видимому, присутствие в молекуле ГГ трех гидрофобных метильных и одной метиленовой группы с одной стороны, а также двух гидроксильных групп с другой стороны позволяет молекулам ГГ осуществлять многоточечное связывание с поверхностными полярными и гидрофобными внутренними участками мембран эритроцитов, нарушая как жидкокристаллическую структуру мембран, так и белок-липидное взаимодействие.

Взаимодействие ГГ с мембранами эритроцитов крыс не вызывает такого сильного понижения микровязкости мембран, как в случае с эритроцитами человека: наблюдаемые эффекты заметно меньше и даже для чувствительного параметра $\tau_{+1/-1}$ составляют около 30 % (табл. 2). И в этом случае мембрана эритроцитов крыс оказывается более устойчива к цитотоксическому растворителю ГГ, чем мембрана эритроцитов человека. При введении в эритроциты человека низкомолекулярного растворителя метилпирролидона (N-MP) микровязкость мембраны эритроцитов человека и крысы в течение 1 ч достоверно не менялась.

Выводы

Действие на мембраны эритроцитов относительно нетоксичных, водорастворимых, низкомолекулярных фармацевтических растворителей пропиленгликоля ПЭГ-300 или ПЭГ-400 не приводит к существенному изменению микровязкости мембран эритроцитов человека или крысы. Различие в устойчивости (резистентности) мембран эритроцитов человека и крысы к действию ВВ появляются при взаимодействии с мембраной клеток цитотоксически активных ВВ (растворителей и полимеров), имеющих в молекулах достаточное количество метильных и метилено-

вых гидрофобных групп – полоксамеров, гексиленгликоля, высокомолекулярных ПЭГ. Увеличение молекулярной массы ВВ полимеров приводит к увеличению многоточечного связывания макромолекулы полимера с различными компонентами липидного бислоя мембран, которое в сумме приводит к значительному падению микровязкости мембран вследствие нарушения жидкокристаллической структуры мембран эритроцитов.

Заметное снижение микровязкости мембран эритроцитов в присутствии ГГ, по-видимому, объясняется наличием в молекуле ГГ трех гидрофобных метильных и одной метиленовой групп

с одной стороны, а также двух гидроксильных групп, позволяющих молекулам ГГ осуществлять многоточечное связывание с поверхностными полярными и гидрофобными внутренними участками мембран эритроцитов, нарушая как жидкокристаллическую структуру мембран, так и белок-липидное взаимодействие (с поверхностными белками мембраны). Резистентность мембран эритроцитов человека и крысы к ГГ заметно отличается вследствие различий фосфолипидного состава мембран, который определяет структуру, свойства и резистентность липидного бислоя и всей мембраны клетки в целом.

1. Влияние состава двухкомпонентных растворителей на биологические мембраны / Иванов Л. В., Ляпунов Н. А., Цымбал Л. В. [и др.] // Хим.-фармац. ж. – 1986. – № 12. – С. 1437–1443.
2. Иванов Л. В. Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойств и пути введения лекарственных препаратов / Иванов Л. В., Орлова И. Н. // В сб. «Технология и стандартизация лекарств». Т. 2. – Харьков, 2000. – С. 558–615.
3. Иванов Л. В. Изучение взаимодействия некоторых гидрофильных неводных растворителей с биомембранами различных клеток методами спиновых и флуоресцентных зондов / Иванов Л. В. // Фармаком. – 1999. – № 2. – С. 45–47.
4. Иванов Л. В. Изучение механизмов дегидратации клеток эритроцитов под действием гидрофильных неводных растворителей / Иванов Л. В. // Фармаком. – № 5. – 1998. – С. 43–47.
5. Иванов Л. В. Изучение механизмов влияния вспомогательных веществ на биодоступность / Иванов Л. В., Георгиевский В. П. // Материалы I Международной научно-практической конференции "Создание, производство, стандартизация, фармакоэкономика лекарственных средств и биологических добавок". – Тернополь, 2004. – С. 19.
6. Иванов Л. В. Мембранотропные свойства лекарственных и фармацевтических вспомогательных веществ. Проблемы поиска, скрининга и биодоступности лекарственных веществ / Иванов Л. В. // Материалы IV научно-практического семинара Координационного Совета Отделения химии НАН Украины по проблеме "Научные основы создания лекарственных средств". – Гурзуф, 2003. – С. 28–33.
7. Wessels J. M. C. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / J. M. C. Wessels, J. H. Veerkam'p // Biochimica et Biophysica Acta. – 1973. – V. 291. – P. 190–196.
8. Розанцев Э. Г. Свободные иминоксильные радикалы / Э. Г. Розанцев. – Москва : Химия, 1970. – 216 с.
9. Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови / Л. В. Иванов, А. Н. Ляпунов, Н. Т. Картель [и др.] // Поверхность. – 2014. – Вып. 6 (21). – С. 292–304.
10. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн. – Москва : Наука, 1974. – С. 12–24.
11. Метод спиновых меток. Теория и применения / Под ред. Л. Берлинера. – Москва : Мир, 1979. – 639 с.
12. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн. – Москва : Наука, 1974. – С. 205, 208.
13. Межидов С. Х. Дегидратация эритроцитов компонентами криоконсервирующих сред / С. Х. Межидов, В. А. Моисеев, О. А. Нардид // Криобиология. – 1989. – № 2. – С. 13–16.
14. Нардид О. А. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов / О. А. Нардид, Л. В. Цымбал, А. К. Гулевский // Физико-химические процессы в криобиологических системах. – Харьков, 1991. – С. 102–106.
15. Вивчення механізмів цитотоксичності низки гідрофільних полоксамерів методом спинових зондів / Л. В. Иванов, Н. Т. Картель, А. Н. Ляпунов [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 4–5 (45). – С. 46–58.
16. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.

**Л. В. Иванов, А. Н. Ляпунов, Н. Т. Картель, О. А. Нардид,
Я. О. Черкашина, Л. В. Деримедведь**

Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов

Изучено влияние ряда фармацевтических вспомогательных веществ (ВВ) на микровязкость мембран эритроцитов человека и крыс методом спиновых зондов. Действие на мембраны эритроцитов относительно нетоксичных, водорастворимых, низкомолекулярных фармацевтических растворителей типа пропиленгликоля (ПГ), ПЭГ-300 или ПЭГ-400 не приводит к существенному отличию изменений микровязкости мембран эритроцитов человека или крыс. Введение в эритроциты человека и крыс ПГ или ПЭГ-300 приводит к начальному повышению микровязкости мембран клеток вследствие дегидратации и последующему уменьшению микровязкости мембран до начального уровня вследствие диффузии этих ВВ внутрь клеток и выравнивания внеклеточного и внутриклеточного осмотического давления. Различие в резистентности мембран эритроцитов человека и крыс к действию ВВ появляются при взаимодействии клеток с цитотоксическими осмотически активными ВВ (растворителями и полимерами), имеющими в молекулах достаточное количество метильных и метиленовых гидрофобных групп – гексиленгликоля (ГГ) и высокомолекулярных ПЭГ. В этом случае мембраны эритроцитов крыс демонстрируют повышенную резистентность к действию ВВ – изменение микровязкости мембран эритроцитов крыс в присутствии таких ВВ меньше, чем в случае мембран эритроцитов человека.

Очевидно, что увеличение молекулярной массы ВВ полимеров приводит к увеличению много-точечного связывания макромолекулы полимера с различными компонентами липидного бислоя мембран, которое в сумме приводит к значительному падению микровязкости мембран вследствие разрушения жидкокристаллической структуры мембран эритроцитов. Снижение микровязкости мембран эритроцитов на 40–60 % в присутствии 10 % ГГ, по-видимому, объясняется наличием в его молекуле трех гидрофобных метильных и одной метиленовой группы с одной стороны, а также двух гидроксильных групп, позволяющих молекулам ГГ осуществлять многоточечное связывание с поверхностными полярными и гидрофобными внутренними участками мембран эритроцитов, нарушая как жидкокристаллическую структуру мембран, так и белок липидное взаимодействие с поверхностными белками мембраны.

Полученные результаты имеют практическую значимость для создания лекарственных препаратов с регулируемым всасыванием и заданной биодоступностью.

Ключевые слова: фармацевтические вспомогательные вещества, микровязкость, мембраны эритроцитов, метод спиновых зондов

**Л. В. Иванов, О. М. Ляпунов, М. Т. Картель, О. А. Нардид,
Я. О. Черкашина, Л. В. Деримедведь**

Порівняльне дослідження впливу низки фармацевтичних допоміжних речовин на мікрів'язкість мембран еритроцитів крові людини та щурів методом спінових зондів

Вивчено вплив ряду фармацевтичних допоміжних речовин (ДР) на мікрів'язкість мембран еритроцитів людини і щурів методом спінових зондів. Дія на мембрани еритроцитів нетоксичних, водорозчинних, низькомолекулярних фармацевтичних розчинників пропиленгликолю (ПГ), поліетиленгликолів з молекулярною масою 300 (ПЕГ-300) та молекулярною масою 400 (ПЕГ-400) не призводить до суттєвої різниці в зміні мікрів'язкості мембран еритроцитів людини або щурів. Введення до еритроцитів людини або щурів ПГ або ПЕГ-300 призводить до початкового підвищення мікрів'язкості мембран клітин внаслідок дегідратації й подальшого зменшення мікрів'язкості мембран до початкового рівня внаслідок дифузії цих ДР всередину клітин і вирівнювання позаклітинного та внутрішньоклітинного осмотичного тиску.

Різниця в резистентності мембран еритроцитів людини та щурів до дії ДР з'являється при взаємодії клітин з цитотоксичними, осмотично активними ДР (розчинниками і полімерами), що мають у молекулах достатню кількість метильних і метиленових гідрофобних груп – гексиленгликолем (ГГ) і високомолекулярними ПЕГ. У цьому випадку мембрани еритроцитів щурів показують підвищену резистентність до дії ДР – зміна мікрів'язкості мембран еритроцитів щурів у присутності таких ДР менше, ніж мембран еритроцитів людини.

Вочевидь, збільшення молекулярної маси ДР полімерів призводить до збільшення багатоточкового зв'язування макромолекули полімеру з різними компонентами ліпідного бішару мембран, яке загалом призводить до значного падіння мікрів'язкості мембран внаслідок руйнування рідкокристалічної структури мембран еритроцитів. Зниження мікрів'язкості мембран еритроцитів на 40–60 % у присутності 10 % гексиленгликолю, мабуть, пояснюється наявністю в молекулі ГГ трьох гідрофобних метильних і однієї метиленової групи з одного боку, а також двох гідроксильних груп, що дозволяють молекулам ГГ здійснювати багаторівневе зв'язування з поверхневими полярними і

гідрофобними внутрішніми ділянками мембран еритроцитів, порушуючи як рідкокристалічну структуру мембран, так і білок ліпідну взаємодію з поверхневими білками мембрани. Отримані результати мають практичну значимість для створення лікарських препаратів з регульованим всмоктуванням і заданою біодоступністю.

Ключові слова: фармацевтичні допоміжні речовини, мікров'язкість, мембрани еритроцитів, метод спінових зондів

**L. V. Ivanov, A. N. Lyapunov, N. T. Kartel, O. A. Nardid, Ya. O. Cherkashina,
L. V. Derimedvid**

**Comparative study of the influence of some pharmaceutical excipients
on membrane microviscosity of human and rat blood erythrocytes
by spin probe method**

It was studied the influence of a number of pharmaceutical excipients (PE) on microviscosity of human and rat erythrocyte membranes by method of spin probes. Relatively non-toxic, water-soluble, low molecular weight solvents such as propylene glycol pharmaceutical, PEG-300 or PEG-400 did not lead to a significant changes of the erythrocyte membrane microviscosity both human and rat. Introduction to human or rat red blood cells PG or PEG-300 leads to an initial increase of cell membranes microviscosity as a result of dehydration and subsequent reduction microviscosity membrane to the initial level due to diffusion of PE into the cells and the extracellular and intracellular alignment osmotic pressure.

The difference in the resistance of human and rat erythrocyte's membranes appears under interaction with cytotoxic osmotically active PE (solvents, polymers) having a sufficient number of hydrophobic methyl and methylene groups in molecules – high molecular weight PEG and hexylene glycol. In this case rat erythrocyte's membranes exhibited enhanced resistance to the action of PE – changes of rat erythrocyte membranes microviscosity in the presence of such PE was smaller than in the case of human erythrocyte membranes.

Evidently, increasing the molecular weight of the polymers PE increases multipoint binding of macromolecule polymer with various components of the lipid bilayer membrane, which leads to a considerable drop in membrane microviscosity due to the destruction of liquid crystal structure erythrocyte membranes. Reduced erythrocyte membrane microviscosity by 40–60 % in the presence of 10 % hexylen glycol (HG), apparently is due to the presence in its molecule of three hydrophobic methyl and one methylene group, and two hydroxyl groups, allowing molecules HG to perform multipoint binding with surface polar and hydrophobic inner portions of erythrocyte membranes, disturbing as liquid crystal membrane structure and protein lipid interaction. The results obtained are of practical importance for the creation of drugs with adjustable absorption and defined bioavailability.

Key words: pharmaceutical excipients, microviscosity, membranes of erythrocytes, spin probe method

Надійшла: 11 листопада 2015 р.

Контактна особа: Ляпунов Олексій Миколайович, ДНУ «Науково-технологічний комплекс
«Інститут монокристалів НАН України», м. Харків. Тел.: + 38 0 57 341 01 09.
Електронна адреса: newmanpir@rambler.ru