

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ

Н.Т. Картель¹, Е.П. Безуглая², Л.В. Иванов¹, А.Н. Ляпунов²,
О.А. Нардид³, И.А. Кирилюк⁴, Я.О. Черкашина³

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины,
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, e-mail: nikar@kartel.kiev.ua;

²Институт монокристаллов НАН Украины, г. Харьков;

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

⁴Институт органической химии СО РАН, Новосибирск

Получены новые данные о влиянии ряда осмотически активных вспомогательных веществ различной структуры, молекулярной массы и разной концентрации на микровязкость и проницаемость мембран эритроцитов. Обнаружено, что под действием этих веществ в мембране эритроцитов происходят одновременно два разнонаправленных процесса - дегидратация клетки с увеличением микровязкости мембран и взаимодействие растворителя с липидами, сопровождающееся уменьшением микровязкости мембран, нарушением их жидкокристаллической структуры и упорядоченности фосфолипидов. Во многих случаях это приводит к двойственному характеру изменения вязкости мембран эритроцитов во времени, так как оба процесса действуют не синхронно.

По влиянию изученных вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов с учетом разных применяемых концентраций, их можно расположить в следующий ряд: пропиленгликоль (ПГ) < полиэтиленгликоль-300 (ПЭГ-300) < ПЭГ-400 < ПЭГ-1500 < ПЭГ-6000 < ПЭГ-4000 < полоксамер 237 < полоксамер 188 < гексиленгликоль (ГГ) < полоксамер 338 < N-метилпирролидон (N-МП) < полоксамер 407.

Введение

В лекарственных формах, кроме фармакологически активных веществ, имеются различные вспомогательные вещества (ВВ), обеспечивающие необходимую консистенцию и стабильность форм, а также их физико-химические, пластические и другие свойства. Ранее [1–4] Л.В. Ивановым с соавторами были изучены мембранотропные свойства ряда ВВ, процессы дегидратации и набухания клеток эритроцитов под действием осмотически активных ВВ, проведена оценка возможного влияния ряда ВВ на биодоступность различных лекарственных веществ. Для этого использовали метод спиновых зондов, широко применяющийся в молекулярной биологии и биофизике для оценки конформационных изменений в белках и мембранах клеток под влиянием различных физико-химических факторов, оценки микровязкости мембран клеток и вязкости внутриклеточной жидкости, проницаемости и целостности мембран клеток и т.д. [5, 6].

Показано, что различные фармацевтические растворители и полимеры имеют сродство к мембранам модельных и интактных клеток. Введение осмотически активных низкомолекулярных растворителей во взвесь эритроцитов на первом этапе сопровождается быстрым увеличением вязкости внутриклеточной жидкости эритроцитов (дегидратацией), а затем снижением вязкости внутриклеточной жидкости (цитозоля) – набуханием клеток вследствие проникновения растворителей внутрь клеток через цитоплазматическую мембрану и выравнивания осмотического давления снаружи и внутри клеток. Для высокомолекулярных полимеров, не проникающих через

мембрану, дегидратация клеток сопровождалась увеличением вязкости цитозоля эритроцитов в течение часа и далее не менялась [4, 7, 8].

В то же время данных об исследовании непосредственно взаимодействия и влияния на структуру мембран клеток фармацевтических ВВ крайне мало. В настоящее время остается актуальным вопрос о влиянии различных ВВ для фармации на микровязкость мембран различных клеток и клеток тканей, так как возможные необратимые изменения микровязкости мембран клеток могут определять цитотоксичность ВВ и существенно влиять на биодоступность лекарственных препаратов.

Целью настоящей работы является получение данных о влиянии ряда осмотически активных ВВ – фармацевтических растворителей и полимеров – на микровязкость мембран эритроцитов крови крыс методом спиновых зондов. Полученные результаты помогут расширить знания о механизме цитотоксичности растворителей и полимеров, используемых в медицинской практике.

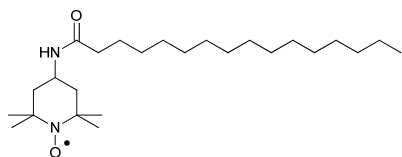
Материалы и методы исследований

В работе использован метод спиновых зондов, согласно которому по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) стабильных нитроксильных радикалов с липофильным органическим заместителем (что позволяет им внедриться в липидный слой мембран эритроцитов) оценивали время корреляции броуновской вращательной диффузии зондов в мембранах клеток.

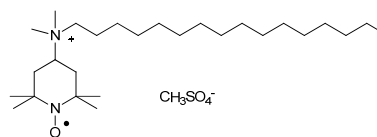
Были выбраны два спиновых зонда на основе пальмитиновой кислоты, синтезированные согласно [9]:

зонд **1** – нитроксильный радикал 4-пальмитоиламидо-ТЕМПО;

зонд **2** – нитроксильный радикал 4-(N,N-диметил-N-гексадециламмонийо)-ТЕМПО, содержащий в своём составе четвертичный аммониевый фрагмент:



зонд **1**



зонд **2**

Введение зондов **1** или **2** 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%. Регистрацию спектров ЭПР осуществляли на радиоспектрометре «ESR Spectrometer CMS 8400».

Оценка параметров броуновской вращательной диффузии зондов и микровязкости мембран эритроцитов проводилась на основе обработки интенсивности и ширины линий триплета ЭПР-спектров нитроксильных радикалов – спиновых зондов **1** и **2**, находящихся в липидном бислое мембран эритроцитов [5–8]. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (τ) используются такие характеристики спектров: ширина центральной компоненты (ΔH_0), интенсивности компонентов спектра ЭПР (h_0, h_{+1}, h_{-1}) с магнитным квантовым числом ядра ^{14}N ($M = 0, +1, -1$), изотропная константа сверхтонкого взаимодействия ($A_{\text{изо}}$). Базовым уравнением для оценки вязкости любых сред является уравнение Стокса–Эйнштейна

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

где: η – вязкость среды, a – эффективный радиус спинового зонда, определяемый по спектрам ЭПР [7, 8].

Время корреляции (в c) рассчитывается из соотношений

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

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

Для идентификации места нахождения нитроксильной головки спиновых зондов **1** и **2** в мембране оценивали полярность микроокружения нитроксильного фрагмента спиновых зондов в мембране в норме и в присутствии растворителей, измеряя параметр $A_{изо}$ – расстояние (в гауссах) между низкополевой (h_{+1}) и центральной (h_0) компонентами спектров ЭПР [5, 6]. При нахождении нитроксильной головки зонда в водном окружении $A_{изо}$ составляет 17,2 Гс, а в липофильном окружении мембраны 14,0 Гс.

Вследствие вытянутой структуры зондов **1** и **2**, а также анизотропного вращения их вокруг длинной оси молекулы при анализе результатов в первую очередь учитывали время корреляции $\tau_{c(+1/-1)}$, которое отражает анизотропию спектров ЭПР и анизотропное вращение зондов в мембране [5, 6].

Эритроциты крови крыс получали согласно [9]. Изучаемые ВВ можно разделить на фармацевтические растворители с молекулярной массой до 600 Да включительно и водорастворимые полимеры с молекулярной массой более 1000 Да. Изучали фармацевтические растворители: пропиленгликоль (ПГ), полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 и 400 Да (ПЭГ-300 и ПЭГ-400), гексиленгликоль (ГГ) и N-метилпирролидон (N-МР), а также полимеры ПЭГ-1500, ПЭГ-4000 ПЭГ-6000, блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида – полоксамеры марки 188, 237, 338 и 407 (табл. 1). ВВ вводили во взвесь эритроцитов путем добавления во взвесь по каплям 30% или 15% водных растворов.

Полоксамеры являются синтетическими блок-сополимерами этиленоксида и пропиленоксида; они могут быть представлены следующей общей формулой (по *European Pharmacopoeia* 7.0):

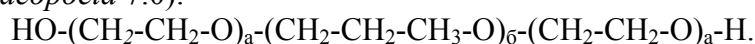


Таблица 1. Характеристики полоксамеров

Тип полоксамера	Звенья этиленоксида (а)	Звенья пропиленоксида (б)	Содержание оксиэтилена (в %)	Средняя молекулярная масса
188	75-85	25-30	79,9-83,7	7680-9510
237	60-68	35-40	70,5-74,3	6840-8830
338	137-146	42-47	81,4-84,9	12700-17400
407	95-105	54-60	71,5-74,9	9840-14600

Результаты и их обсуждение

Используемые липофильные спиновые зонды могут по-разному встраиваться в липидный бислой мембран. Зонд **2** с положительным зарядом, по-видимому, встраивается в мембрану подобно фосфатидилхолину, имеющему положительно заряженную холиновую «головку» и два алкильных «хвоста». Нами показано, что нитроксильный фрагмент зонда **2** с неспаренным электроном находится на поверхности мембраны в липидном окружении мембран, так как его константа $A_{изо}$ равна 14,6 Гс и соответствует нахождению нитроксильного фрагмента в неполярном окружении. Нитроксильный фрагмент зонда **2** «зажат» между фосфолипидными головками в

мембране, поэтому его вращательная подвижность может быть весьма чувствительна к изменению плотности упаковки фосфолипидов мембран клеток, т.е. к микровязкости поверхности мембран. Связывание растворителей с мембраной эритроцитов и внедрение молекул растворителя между молекулами фосфолипидов мембран может менять плотность упаковки фосфолипидов в мембране (микровязкость), а также параметр $A_{\text{изо}}$ зондов **1** и **2**.

Нейтральный зонд **1** не так жестко структурирован (ориентирован) в липидном бислое мембран эритроцитов. Поэтому вращательная подвижность зонда **1** в мембране эритроцитов несколько выше, чем для зонда **2**, что отражается на соответствующих спектрах ЭПР (рис. 1 и 2).

Анализ влияния изучаемых растворителей и полимеров на микровязкость мембран эритроцитов свидетельствует, что эти вещества одновременно вызывают разнонаправленное действие на микровязкость мембран в результате дегидратации и набухания клеток, деструкции жидкокристаллической структуры мембран, изменения упорядоченности фосфолипидов мембран, а также нарушения белок-липидных взаимодействий в мембранах клеток.

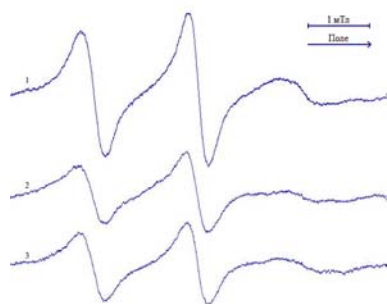


Рис. 1. Спектры ЭПР зонда **1** в эритроцитах при 25 °С: **1** – контроль; **2** – через 5 мин после введения ПЭГ-300 (15%) во взвесь эритроцитов, **3** – через 30 мин после введения ПЭГ-300 (15%) во взвесь эритроцитов.

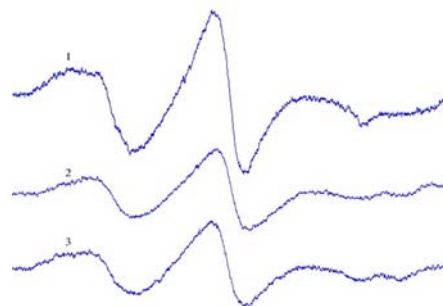


Рис. 2. Спектры ЭПР зонда **2** в эритроцитах при 25 °С: **1** – контроль; **2** – через 30 мин после введения ПЭГ-1500 (15%) во взвесь эритроцитов, **3** – через 5 мин после введения ПЭГ-4000 (15%) во взвесь эритроцитов.

Регистрацию спектров ЭПР проводили через 5, 30 и 60 мин после введения ВВ во взвесь эритроцитов, что позволило оценить во времени изменение конформационной подвижности липидов мембран под действием ВВ и следить за последствием диффузии ВВ внутрь мембраны. Некоторые спектры ЭПР для зондов **1** и **2** в эритроцитах в присутствии ряда растворителей и полимеров представлены на рис. 1–3, а в табл. 1, 2 и 4 представлены значения времени корреляции τ_c этих зондов в мембране (пропорциональных вязкости η) для каждого конкретного ВВ в суспензии клеток.

ВВ вводили во взвесь эритроцитов в небольших концентрациях (табл. 4), когда соблюдалась целостность мембран клеток, и в более высоких концентрациях (табл. 2 и 3), близких к критическим, для более чёткого определения тенденций изменения структуры мембран под действием растворителей.

Анализ вращательной подвижности зонда **2** в мембранах эритроцитов (табл. 2) при добавлении достаточно высоких концентраций ВВ к эритроцитам показывает, что для 15% ПГ наблюдается двухфазный характер изменений в мембране со временем: вначале наблюдается увеличение микровязкости мембран, а затем снижение микровязкости, что, по-видимому, связано с начальной быстрой дегидратацией клеток эритроцитов и последующим набуханием клеток при диффузии ПГ внутрь клеток.

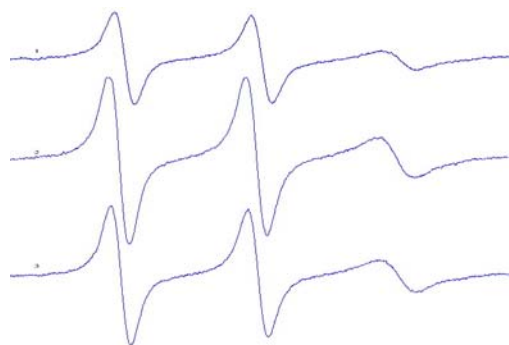


Рис. 3. Спектры ЭПР зонда **1** в эритроцитах при 25 °С:
1 – через 5 мин после введения полоксамера 338 (10%);
2 – через 30 мин после введения полоксамера 338 (10%) во взвесь эритроцитов,
3 – через 60 мин после введения полоксамера 338 (10%) во взвесь эритроцитов.

Таблица 2. Времена корреляции τ зонда **2** в мембранах эритроцитов в присутствии растворителей и полимеров при температуре 25 °С

Фармацевтические растворители	$\tau_{+1} \cdot 10^9$, с	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^9$, с
Контроль	8,2	5,2
ПЭГ-6000 15 % 5 мин	7,9	4,9
ПЭГ-6000 15 % 30 мин	9,7	5,9
ПЭГ-6000 15 % 60 мин	9,0	4,7
ПЭГ-4000 15 % 5 мин	9,7	5,6
ПЭГ-4000 15 % 30 мин	6,9	4,5
ПЭГ-4000 15 % 60 мин	8,9	5
ПЭГ-1500 15 % 5 мин	7,1	3,5
ПЭГ-1500 15 % 30 мин	8,7	6,4
ПЭГ-1500 15 % 60 мин	7,9	5,1
ПЭГ-400 15 % 5 мин	7,7	4,1
ПЭГ-400 15 % 30 мин	7,5	4,7
ПЭГ-400 15 % 60 мин	9,2	5,5
ПЭГ-300 15 % 5 мин	6,8	3,9
ПЭГ-300 15 % 30 мин	12,5	4,4
ПЭГ-300 15 % 60 мин	7,2	5,4
ПГ 15 % 5 мин	8,4	5,4
ПГ 15 % 30 мин	9,8	4,3
ПГ 15 % 60 мин	7,8	4,6
ГГ 15 % 5 мин	7,4	4,6
ГГ 15 % 30 мин	5,7	3,8
*ГГ 15 % 60 мин	6,2	2,4
Полоксамер 407 10 % 5 мин	4,3	1,6
Полоксамер 407 10 % 30 мин	3,8	1,6
Полоксамер 407 10 % 60 мин	4,1	1,7
Полоксамер 338 10 % 5 мин	3,4	2,2
Полоксамер 338 10 % 30 мин	3,2	2,0
Полоксамер 338 10 % 60 мин	3,8	2,1
Полоксамер 237 10 % 5 мин	6,2	3,7
Полоксамер 237 10 % 30 мин	7,8	4,5
Полоксамер 237 10 % 60 мин	9,1	5,7
Полоксамер 188 10 % 60 мин	7,4	6,1
N-MP 7,5 % 5 мин	7,1	3,4
*N-MP 7,5 % 60 мин	5,7	4,6

* Обозначено разрушение мембран эритроцитов.

Для зонда **1** (табл. 3) параметр τ_{+1} также свидетельствует о двухфазном характере влияния ПГ на мембраны эритроцитов, а параметр $\tau_{+1/-1}$ фиксирует разрыхление мембран вследствие набухания клеток.

Введение 15% ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 во взвесь эритроцитов приводило к двухфазному изменению микровязкости мембран эритроцитов во времени: вначале микровязкость мембран заметно снижалась (зонд **2**, табл. 2), а затем в течение часа повышалась до нормы и выше.

При таких концентрациях ПЭГ процесс нарушения жидкокристаллической структуры мембран и нарушение белок-липидных взаимодействий в мембране превалировало над процессом дегидратации клеток эритроцитов в начальный период времени. В работах криобиологов, где ПЭГ-1500 используют как криопротектор, показано, что при добавлении ПЭГ-1500 к взвеси эритроцитов образуется его прочный комплекс с мембраной, который при отмывании ПЭГ-1500 вызывает разрыв клеток (гемолиз) [10, 11]. Данные вращательной подвижности зонда **1** (табл. 3), находящегося на поверхности раздела мембрана–вода ($A_{изо} = 16,8$ Гс), показывают, что введение ПЭГ-1500 в эритроциты приводит к увеличению микровязкости мембран на всем протяжении времени. Действительно, ПЭГ-1500 не проходит внутрь клеток, а локализуется на поверхности мембран, вызывая иммобилизацию поверхности мембран и торможение вращательной подвижности зонда **1** (рис. 2).

Таблица 3. Времена корреляции τ зонда **1** в мембранах эритроцитов в присутствии растворителей и полимеров при температуре 25 °С

Фармацевтические растворители	$\tau_{+1} \cdot 10^9$, с	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^9$, с
Контроль	1,6	3,6
ПЭГ-1500 15 % 5 мин	2,2	3,8
ПЭГ-1500 15 % 30 мин	2,2	3,7
ПЭГ-1500 15 % 60 мин	2,2	3,6
ПЭГ-400 15 % 5 мин	3,1	3,0
ПЭГ-400 15 % 30 мин	2,0	3,1
ПЭГ-400 15 % 60 мин	1,4	3,5
ПЭГ-300 15 % 5 мин	2,9	4,0
ПЭГ-300 15 % 30 мин	1,3	3,3
ПЭГ-300 15 % 60 мин	1,7	3,3
ПГ 15 % 5 мин	2,0	2,9
ПГ 15 % 30 мин	1,5	2,9
ПГ 15 % 60 мин	1,7	2,7
ГГ 15 % 5 мин	2,0	3,1
ГГ 15 % 30 мин	1,1	2,8
ГГ 15 % 60 мин	1,6	3,0
Полоксамер 338 10 % 5 мин	1,5	1,8
Полоксамер 338 10 % 30 мин	1,3	1,6
Полоксамер 338 10 % 60 мин	1,6	1,5
Полоксамер 237 10 % 5 мин	1,1	1,8
Полоксамер 237 10 % 30 мин	1,4	2,3
Полоксамер 237 10 % 60 мин	1,4	2,3
Полоксамер 188 10 % 5 мин	1,7	3,3
Полоксамер 188 10 % 30 мин	1,8	2,8
Полоксамер 188 10 % 60 мин	1,5	3,5

Для оценки целостности клеток эритроцитов в присутствии ВВ использовали разработанный Л.В. Ивановым способ [12] с использованием водорастворимого спинового зонда ТЕМПОЛ. При введении в эритроциты ПЭГ-4000 и ПЭГ-6000 наблюдался частичный гемолиз и частичное слипание (коагуляция) клеток эритроцитов, однако опыты с ТЕМПОЛ показали наличие во взвеси эритроцитов 85–90% целых клеток. По-видимому, 15% концентрация этих полимеров во взвеси эритроцитов является граничной. Реакция эритроцитов на введение ПЭГ-4000 и ПЭГ-6000 во взвесь несколько отличалась – дегидратация и частичное слипание клеток, приводящее к иммобилизации мембран для ПЭГ-4000, наступало сразу после введения, а для ПЭГ-6000 – через 30 мин.

Введение полоксамера 407 в эритроциты приводит с первых минут к сильному уменьшению микровязкости мембран: для зонда **2** по параметру $\tau_{+/-1}$ на 70%, по параметру спектра τ_{+1} на 50%; действие продолжалось в течение часа и по эффекту снижения микровязкости мембран стоит на первом месте среди полоксамеров (табл. 2). Для полоксамера 338 с первых минут его введения в эритроциты микровязкость мембран снижается более, чем в 1,5 раза и это снижение продолжается около часа. При этом $A_{\text{изо}}$ спектров ЭПР повышается с 14,6 (контроль) до 16,1 Гс, что указывает на заметное повышение полярности микроокружения нитроксильного фрагмента зонда **2** в мембране, который в норме находился в липидном окружении. Это свидетельствует о значительном разрыхлении мембран – уменьшении плотности упаковки их фосфолипидов под действием полоксамера 338. Для полоксамера 237 на начальном этапе взаимодействия его с мембраной эритроцитов преобладает процесс нарушения жидкокристаллической структуры мембран и микровязкость мембран снижается на 25% по данным вращательной подвижности зонда **2** (табл. 2) и на 40% по данным для зонда **1** (табл. 3). Затем микровязкость мембран повышается до нормы и даже несколько выше.

Как и в случае с высокомолекулярными ПЭГ, введение полоксамеров 407, 338 и 237 сопровождалось частичной коагуляцией клеток эритроцитов. Изучаемая концентрация полоксамеров (10%) является, по-видимому, граничной, и снижение микровязкости в 1,5 раза для мембран эритроцитов также является критическим. Опыты с зондом ТЕМПОЛ показали, что около 80% клеток эритроцитов при введении полоксамеров остаются целыми. Изменение параметров вращательной диффузии зондов в мембране эритроцитов в присутствии полоксамера 188 не имеют четко выраженной направленности, так как его структурные параметры являются промежуточными между полоксамерами 237 и 338.

Введение 15% ГГ во взвесь эритроцитов сопровождалось заметным снижением микровязкости мембран: через 30 мин после введения растворителя она снизилась на 30%, а через 60 мин после введения ГГ целостность мембраны была нарушена – сигнал ЭПР от зонда ТЕМПОЛ в цитозоле эритроцитов не наблюдался.

При этом $\tau_{+/-1}$ зонда **2** (табл. 2) резко падает, параметр анизотропии спектров ЭПР ε (формула (3)), связанный с анизотропией вращательной диффузии зонда **2** вокруг длинной оси молекулы зонда, резко возрастает с 0,3 до 0,49 (эффект 60%), что свидетельствует о заметном повышении хаотичности движения алкильных «хвостов» фосфолипидов в мембране под действием ГГ:

$$\varepsilon = [(h_0 / h_{+1}) - 1] / [(h_0 / h_{-1}) - 1] . \quad (3)$$

В то же время параметр τ_{+1} зонда **1** и **2** в мембране (см. табл. 2 и 3) снижается немного, что говорит о его слабой чувствительности к процессу нарушения целостности мембран эритроцитов.

Производное пирролидона N-MP оказалось более цитотоксичным, чем ГГ – его действие на эритроциты, в концентрации в 2 раза меньшей (7,5 %), также сопровождалось частичным гемолизом (количество целых клеток около 60%) и значительным снижением микровязкости мембран эритроцитов (табл. 2 и 3). Введение N-MP во взвесь эритроцитов сразу приводит к сильному снижению вязкости цитозоля клеток (эффект составлял около 30%), а через 30 мин и далее сигнал ЭПР зонда ТЕМПОЛ в цитозоле эритроцитов не наблюдался – клетки разрушались.

В табл. 4 представлены данные о влиянии меньших концентраций изучаемых ВВ на мембрану эритроцитов, что необходимо для понимания динамики развития изменений в мембране с увеличением концентрации. Этот параметр свидетельствует (табл. 4), что введение 10% ПЭГ-1500 в эритроциты, также как и введение 15% (табл. 2), вначале приводит к разрыхлению мембраны, а затем со временем к иммобилизации мембраны вследствие образования устойчивого комплекса с мембраной эритроцитов. Другие параметры указывают на существенную иммобилизацию мембраны вследствие дегидратации клеток. Для ПЭГ-1500 преобладающим в его влиянии на мембраны является дегидратация эритроцитов.

Таблица 4. Времена корреляции τ зонда 2 в мембранах эритроцитов в присутствии умеренных концентраций растворителей и полимеров при температуре 25 °С

Образец	$\tau_{+1} \cdot 10^9$ с	$\tau_{-1} \cdot 10^9$ с	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^9$ с
Контроль	5,8	1,5	6,6
ПЭГ-1500 10 % 5 мин	6,7	1,6	5,5
ПЭГ-1500 10 % 30 мин	7,4	1,40	6,4
ПЭГ-1500 10 % 60 мин	6,8	1,6	6,7
ПЭГ-400 10 % 5 мин	6,3	1,5	6,6
ПЭГ-400 10 % 30 мин	5,6	1,7	6,9
ПЭГ-400 10 % 60 мин	6,3	2,1	10,8
ПГ 10 % 5 мин	5,8	1,6	8,2
ПГ 10 % 30 мин	5,4	1,6	6,9
ПГ 10 % 60 мин	5,5	1,5	7,8
ГГ 10 % 5 мин	6,5	1,4	5,6
ГГ 10 % 30 мин	7	1,6	6,1
ГГ 10 % 60 мин	5,9	1,3	4,5
Полоксамер 407 5 % 5 мин	4,5	1,0	2,7
Полоксамер 407 5 % 30 мин	3,6	0,9	2,4
Полоксамер 407 5 % 60 мин	4,1	1,1	2,5
Полоксамер 338 5 % 5 мин	5,7	1,2	3,3
Полоксамер 338 5 % 30 мин	5,9	1,2	4,3
Полоксамер 338 5 % 60 мин	6,3	1,3	3,7
Полоксамер 237 5 % 5 мин	6,8	1,7	5,7
Полоксамер 237 5 % 30 мин	6,5	1,6	5,8
Полоксамер 237 5 % 60 мин	6,6	1,6	6,7
Полоксамер 188 5 % 5 мин	6,9	1,7	6,2
Полоксамер 188 5 % 30 мин	7,3	1,7	5,3
Полоксамер 188 5 % 60 мин	6,5	1,6	6,8
N-MP 5 % 5 мин	6,4	1,6	6,4
N-MP 5 % 30 мин	6,8	1,7	5,1

Использование небольших концентраций растворителей позволило для каждого растворителя выявить и разделить влияние на мембраны различных процессов. Так,

при относительно мягком воздействии на мембраны ПЭГ-400 (10%) преобладающим процессом, действующим на мембраны, является дегидратация клеток, приводящая к повышению микровязкости мембран в среднем на 35% (табл. 4). По-видимому, 10% концентрации ПЭГ-400 во взвеси эритроцитов не хватает для быстрого разрушения жидкокристаллической структуры мембран и понижения микровязкости мембран. При введении 10% ГГ в эритроциты (табл. 4) наблюдались в среднем значительно меньшие эффекты снижения микровязкости мембран, чем при введении 15% ГГ (табл. 2), т.е. цитотоксичность ГГ резко возрастает при приближении концентраций ГГ к 15% во взвеси клеток.

В полной степени это относится и к N-MP – снижение концентрации N-MP во взвеси клеток лишь на 2,5 % (5% N-MP во взвеси) резко снизило его цитотоксичность – все клетки оставались целыми и наблюдались небольшие противоречивые отклонения микровязкости мембран от нормы, оцениваемые по разным параметрам спектров ЭПР.

С другой стороны полксамер 407 даже при концентрации 5% во взвеси эритроцитов (табл. 4) демонстрирует сильное влияние на микровязкость мембран эритроцитов. Так, микровязкость мембран по разным параметрам времени корреляции снижается от 25% до 60%. Введение 5% полксамера 338 в эритроциты также вызывает заметное понижение микровязкости мембран, несмотря на небольшую концентрацию растворителя (табл. 4), однако величина эффекта снижения микровязкости мембран ниже, чем у полксамера 407. Известно, что полксамеры угнетают активность раковых клеток и способны снижать устойчивость раковых клеток к лекарствам (множественную лекарственную устойчивость), подавляя выброс лекарства из клетки и тем самым повышая эффективность химиотерапии [13]. Показано, что это связано с ингибированием ключевого мембранного белка раковых клеток P-gr – P-гликопротеина, активность которого очень чувствительна к состоянию ближайшего липидного окружения, а сам механизм ингибирования белка P-gr связан с взаимодействием полксамеров с липидами мембран раковых клеток и снижением микровязкости мембран [14]. Таким образом, полученные нами данные о сильном снижении микровязкости мембран эритроцитов крысы в присутствии полксамеров с использованием метода спиновых зондов подтверждают предложенный ранее механизм цитотоксического и угнетающего действия полксамеров на раковые клетки [13, 15]. По-видимому, такое действие полксамеров на мембраны клеток носит универсальный характер.

Таким образом, получены новые данные о влиянии ряда осмотически активных ВВ различной структуры, молекулярной массы и разной концентрации на микровязкость и проницаемость мембран эритроцитов во времени. Показано, что под действием ВВ в мембране эритроцитов происходят одновременно два разнонаправленных процесса – дегидратация клетки с увеличением микровязкости мембран и взаимодействие растворителя с липидами мембран, сопровождающееся уменьшением микровязкости мембран и приводящее к нарушению жидкокристаллической структуры мембран и упорядоченности фосфолипидов в мембране. Во многих случаях это приводит к двухфазному характеру изменения вязкости мембран эритроцитов во времени в присутствии растворителей и полимеров, так как оба процесса действуют не синхронно. Введение ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 во взвесь эритроцитов приводило в начальный момент времени к снижению микровязкости мембран, а затем к повышению микровязкости мембран клеток до нормы и выше. По-видимому, при больших концентрациях ПЭГ-300 и ПЭГ-400, проникающих через мембраны эритроцитов, процесс нарушения их жидкокристаллической структуры преобладает над процессом дегидратации клеток в

первые 30 мин. Введение полимеров ПЭГ-4000 (15%) и ПЭГ-6000 (15%) в эритроциты приводило к иммобилизации их мембран.

Показано, что введение в эритроциты полоксамеров 188, 237, 338 и 407, как правило, сопровождалось сильным снижением микровязкости мембран клеток. Причем для полоксамеров 338 и 407 микровязкость мембран эритроцитов снижалась в 1,5 и более раз, что, по-видимому, является критическим для мембран эритроцитов. Введение полоксамера 407 в эритроциты человека приводило с первых минут к сильному уменьшению микровязкости мембран более чем на 50%; действие продолжалось в течение часа и по эффекту занимает первое место среди изученных полоксамеров. Полученные данные о сильном снижении микровязкости мембран эритроцитов в присутствии полоксамеров с использованием метода спиновых зондов подтверждают предложенный ранее механизм эффективного воздействия полоксамеров на раковые клетки.

Низкомолекулярные растворители, такие как ГГ и N-MP при высоких концентрациях в эритроцитах, демонстрируют достаточно сильное влияние на мембраны, проявляющееся в критическом снижении микровязкости мембран до 50% и частичном нарушении целостности мембран клеток. При введении ГГ эффект снижения микровязкости мембран развивается во времени – через 5 мин составляет около 10%, через 30 мин – 25%, а через 1 ч – около 50%, что выше, чем у полоксамера 237 и немного ниже, чем у полоксамеров 338 и 407. Для растворителя N-MP снижение микровязкости мембран эритроцитов уже через 5 мин составляет около 30%, а через 30 мин целостность мембраны нарушается, что с учетом применяемой в опыте низкой концентрации N-MP (7,5%) выводит этот растворитель на первое место по влиянию на мембраны эритроцитов среди изученных растворителей.

Наибольшее влияние на микровязкость мембран эритроцитов в небольших и умеренных концентрациях оказывают полоксамеры 407 (средний эффект снижения микровязкости мембран около 45%) и 338 (35%). Снижение концентраций ГГ во взвеси эритроцитов с 15% до 10%, а N-MP с 7,5% до 5% не только резко снижает влияние этих цитотоксических растворителей на микровязкость мембран, но также снижает до нуля риск нарушения целостности мембран эритроцитов.

По влиянию изученных ВВ на микровязкость мембран эритроцитов (с учетом разницы в применяемых концентраций) их можно расположить в следующий ряд:

ПГ < ПЭГ-300 < ПЭГ-400 < ПЭГ-1500 < ПЭГ-6000 < ПЭГ-4000 < полоксамер 237 < полоксамер 188 < ГГ < полоксамер 338 < N-MP < полоксамер 407.

Литература

1. Иванов Л.В., Ляпунов Н.А., Цымбал Л.В. и др. Влияние состава двухкомпонентных растворителей на биологические мембраны // Хим.-фарм. журн. - 1986. - N 12. - С. 1437-1443.
2. Иванов Л.В., Орлова И.Н. Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойств и пути введения лекарственных препаратов // 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 // Фармаком. - 1999. - N 2. - С. 45-47.
4. Иванов Л.В. Изучение механизмов дегидратации клеток эритроцитов под действием гидрофильных неводных растворителей // Фармаком. - N 5. - 1998. - С. 43-47.

5. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. - М.: Наука, 1974. - С. 12-24.
6. Метод спиновых меток. Теория и применения / Под ред. Л. Берлинера. – Москва: Мир, 1979. – 639 с.
7. Иванов Л.В., Картель Н.Т. Оценка микровязкости клеточных мембран различной природы методом спиновых зондов // Доповіді НАН України, 2012. - №5. – С.139-145.
8. Иванов Л.В., Картель Н.Т. Характеризация реологических свойств поверхности нанобиообъектов методом спиновых зондов // Поверхность. - 2012. - Вып. 4(19). - С. 334–348.
9. Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Картель Н.Т. и др. Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови // Поверхность. -2014. - Вып. 6(21). - С. 292-304.
10. Межидов С.Х., Моисеев В.А., Нардид О.А. Дегидратация эритроцитов компонентами криоконсервирующих сред // Криобиология. – 1989. – № 2. – С. 13–16.
11. Нардид О.А., Цымбал Л.В., Гулевский А.К. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов // Физико-химические процессы в криобиологических системах: статьи. – Харьков, 1991. – С. 102–106.
12. Иванов Л.В., Моисеев В.А., Гаврилова и др. Способ определения степени деструкции клеток // А. с. СССР 1049808. Оpubл. 23.06.1983, Бюл. № 39.
13. Moghimi S.M., Hunter A.C. / Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine // Trends Biotechnol. - 2000. - V.18, № 10. - P. 412-420.
14. Rosenberg M.F., Callaghan R., Modok S. et al. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state // J. Biol. Chem. - 2005. - V. 280, № 4. - P. 2857-2862.
15. Будкина О.А. Структурно-функциональные закономерности воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки. - Дисс. соиск. уч. степ. канд. хим. н. - Москва. - МГУ-химфак. - 2015. - 135 с.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДОПОМІЖНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ РЕЧОВИН НА МІКРОВ'ЯЗКІСТЬ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ МЕТОДОМ СПІНОВИХ ЗОНДІВ

**М.Т. Картель¹, Є.П. Безугла², Л.В. Иванов², О.М. Ляпунов¹,
О.А. Нардід³, І.А. Кирилюк⁴, Я.О. Черкашина³**

¹*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна*

²*Інститут монокристалів НАН України, м. Харків;*

³*Інститут проблем криобіології та криомедицини НАН України, м. Харків;*

⁴*Інститут органічної хімії СБ РАН, м. Новосибірськ*

Отримані нові дані про вплив ряду осмотично активних допоміжних речовин різної структури, молекулярної маси і різної концентрації на микров'язкість і проникність мембран еритроцитів в залежності від часу експозиції. Показано, що під дією таких речовин в мембрані еритроцитів відбуваються одночасно два різноспрямовані процеси - дегідратація клітини із збільшенням микров'язкості мембран

і взаємодія розчинника з ліпідами мембран, що супроводжується зменшенням їх мікров'язкості і призводить до порушення їх рідкокристалічної структури і впорядкованості фосфоліпідів. У багатьох випадках це призводить до двофазного характеру зміни в'язкості мембран еритроцитів в залежності від часу експозиції, оскільки обидва процеси діють не синхронно.

По впливу вивчених допоміжних речовин на мікров'язкість мембран еритроцитів з урахуванням різниці використаних концентрацій можна розташувати в наступному ряді: пропіленгліколь (ПГ) < поліетиленгліколь-300 (ПЕГ- 300) < ПЕГ- 400 < ПЕГ- 1500 < ПЕГ- 6000 < ПЕГ- 4000 < полуксамер 237 < полуксамер 188 < гексиленгліколь (ГГ) < полуксамер 338 < N- метилпірролідон < полуксамер 407.

STUDY OF ASSISTING PHARMACEUTICAL SUBSTANCES INFLUENCE ON MICROVISCOSITY OF ERYTHROCYTE MEMBRANES BY SPIN PROBE METHOD

**M.T. Kartel¹, E.P. Bezugla², L.V. Ivanov², O.M. Lyapunov¹,
O.A. Nardid³, I.A. Kirilyuk⁴, Ya.O. Cherkashina³**

¹*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine,
17 General Naumov Str., 03164 Kyiv, Ukraine;*

³*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, Kharkiv;*

⁴*Institute of Organic Chemistry, SB RAS, Novosibirsk*

The new data on the impact of some osmotically active assisting substances (AS) of various structure, molecular weight and different concentrations on microviscosity and permeability of erythrocyte membranes over time were obtained. It has been shown that under the effect of AS in membrane of erythrocytes two differently directed processes occur simultaneously: dehydration of cells with an increased microviscosity of membranes and interaction of the solvent with membrane lipids, accompanying by a decrease in their microviscosity and leading to a disorder of liquid crystal structure and regularity of phospholipids. In many cases this leads to a biphasic changes in viscosity of erythrocyte membranes in time, since both two processes are not synchronized.

The effect of studied AS on microviscosity of erythrocyte membranes, taking into account the difference in the applied concentrations, can be arranged in the following order: propyleneglycol (PG) < polyetheleneglycol-300 (PEG-300) < PEG-400 < PEG-1500 < PEG-6000 < PEG-4000 < poloxamer 237 < poloxamer 188 < hexyleneglycol (HG) < poloxamer 338 < N-methylpyrrolidone < poloxamer 407.