

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

На правах рукопису

САДЧЕНКО АЛІНА ОЛЕГІВНА

УДК 577.352.2

**ФІЗИЧНІ МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ
СУБСТАНЦІЙ НА ФАЗОВИЙ СТАН МОДЕЛЬНИХ ФОСФОЛІПІДНИХ
МЕМБРАН**

03.00.02 – біофізика

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Науковий керівник:

Лисецький

Лонгін Миколайович,

доктор фізико-математичних
наук, професор

Харків-2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ВЗАЄМОДІЯ РЕЧОВИН РІЗНИХ ХІМІЧНИХ І ФАРМАЦЕВТИЧНИХ КЛАСІВ З ЛІПІДНИМИ МЕМБРАНАМИ.....	14
1.1. Взаємодія мембрани з фармпрепаратом.....	14
1.2. Клітинні мембрани.....	15
1.3. Типи модельних ліпідних мембран.....	17
1.4. Мезоморфізм ліпідних структур. Фазові переходи в модельних мембранах.....	20
1.5. Вплив мембранотропних речовин на фазові переходи фосфоліпідних мембран.....	25
1.6. Біофізичні методи досліджень модельних мембран	28
1.7. Висновки до розділу 1	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	34
2.1. Матеріали.....	34
2.2. Методика отримання модельних ліпідних мембран на основі гідратованих фосфоліпідів.....	35
2.3. ДСК вимірювання	36
2.4. ІЧ вимірювання	39
2.5. Оптична мікроскопія дослідження гемолізу еритроцитів	40
2.6. Метод малокутового розсіювання рентгенівських променів.....	40

2.7. Дослідження коефіцієнтів проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для молекул води.....	41
2.8. Квантово-хімічні розрахунки	41
2.9. Методи комп'ютерного моделювання та обробки даних	42
2.10. Висновки до розділу 2	43
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ	
МЕМБРАНОТРОПНОЇ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СУБСТАНЦІЙ	44
3.1. Індивідуальна мембранотропна дія лікарських субстанцій	48
3.1.1. Мірамістин	48
3.1.2. Азітроміцин	49
3.1.3. Доксорубіцин та ландоміцин Е	50
3.1.4. Сукцинілхолін	52
3.1.5. Транквілар	53
3.1.6. Нітрат срібла	54
3.1.7. Фенібут	56
3.2. Зміна проникності клітин для води в присутності лікарських речовин.....	58
3.3. Індивідуальна мембранотропна дія кріопротекторів на основі похідних гліцерину	60
3.3.1. Термодинамічні властивості модельної ліпідної мембрани на водно-гліцериновій субфазі.....	60
3.3.2. Дослідження ІЧ спектрів модельної ліпідної мембрани на водно-гліцериновій субфазі.....	64
3.3.3 Термодинамічні властивості ліпідних мембран на субфазі вода-ОЕГ _n	66
3.4. Визначення структурних параметрів модельних ліпідних мембран методом малокутового рентгенівського розсіювання.	73

3.5. Висновки до розділу 3	78
РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ СУКУПНОЇ МЕМБРАНОТРОПНОЇ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СУБСТАНЦІЙ	79
4.1. Дослідження сукупної мембранотропної дії двох БАС у квазібінарних системах.	79
4.1.1. Ефекти сукупної дії антимікробних препаратів на основі бісчетвертинних амонієвих сполук з ацетилсаліциловою кислотою.	81
4.1.2. Дослідження індивідуальної та сумісної дії декаметоксину та ацетилсаліцилової кислоти на еритроцитах людини.....	87
4.1.3. Ефекти сукупної дії декаметоксину та уроканової кислоти.	89
4.1.4. Ефекти сукупної дії термотропних мезогенів у модельній ліпідній мембрані	90
4.1.5. Виявлення ефектів конкуренції нітратів у модельних ліпідних мембранах	93
4.2. Дослідження сукупної мембранотропної дії основної діючої речовини фармпрепарату з допоміжними речовинами	99
4.2.1. Препарати срібла	100
4.2.2. Аспірин	101
4.2.3. Аміксин.....	102
4.2.4. Фенспірид.....	103
4.2.5. Фенібут	105
4.3. Гідратаційні властивості БАС за даними Фур'є-ІЧ спектроскопії.....	107
4.4. Порівняльні дослідження мембранотропної дії фармацевтичних аналогів.....	114
4.4.1. Препарати-аналоги метронідазолу	114
4.4.2. Препарати-аналоги азітроміцину.....	116

4.5. Аналіз ролі допоміжних речовин у мембранотропній дії фармпрепаратів	119
4.5.1. Аналіз мембранотропної дії ДР у фармпрепаратів-аналогів, що містять азітроміцин	119
4.5.2. Фізико-хімічний механізм сукупної мембранотропної дії для гідрофобної та гідрофільної	121
4.6. Висновки до розділу 4	126
РОЗДІЛ 5. ТЕОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ КОРЕЛЯЦІЙ МІЖ МОЛЕКУЛЯРНИМИ ПАРАМЕТРАМИ БАС ТА ЇХ МЕМБРАНОТРОПНОЮ АКТИВНІСТЮ	127
Висновки до розділу 5	137
ВИСНОВКИ	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	140
ДОДАТОК	164

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

БАС – біологічно активна субстанція

ДПФХ – 1- α -дипальмітоилфосфатидилхолін

ДСК – диференціальна скануюча калориметрія

T_m – температура основного фазового переходу ліпідної мембрани

T_p – температура передпереходу ліпідної мембрани

ΔT_m – зсув температури основного фазового переходу мембрани

ΔH_m – ентальпія основного фазового переходу

ΔH_p – ентальпія передпереходу ліпідної мембрани

h – гістерезис основного фазового переходу

$\Delta T_{1/2}$ – напівширина піку фазового переходу модельної ліпідної мембрани

L_α – рідкокристалічна фаза ліпідної мембрани

$L_{\beta'}$ – фаза гелю

$P_{\beta'}$ – проміжна фаза

$L_{\beta I}$ – інтердігітована фаза

a – мембранотропна активність

ОЕГ_{n=5} – оксиетильований гліцерин зі ступенем полімеризації 5

ОЕГ_{n=25} – оксиетильований гліцерин зі ступенем полімеризації 25

ОЕГ_{n=30} – оксиетильований гліцерин зі ступенем полімеризації 30

БЧАС – бісчетвертинна амонійова сполука

ДЕК – декаметоксин

АСК – ацетилсаліцилова кислота

УК – уроканова кислота

ІЧ – інфрачервоний

$\nu_{C=O}$ – ІЧ смуга валентних коливань карбонільної групи

РК – рідкий кристал, рідкокристалічний

5CB – нематичний рідкий кристал 4-аміл-4'-ціанобіфеніл

ХОК – холестерилолеїлкарбонат

ФП - фармпрепарат

ДР– допоміжна речовина.

ОДР – основна діюча речовина.

(SAXS) – малокутове розсіювання X-променів

ВСТУП

Актуальність теми. Однією з найважливіших задач сучасної біофізики є з'ясування механізмів впливу різних хімічних речовин на фазовий стан фосфоліпідних мембран. Ця задача є складовою загальної проблеми, яку в літературі називають “drug-membrane interactions” – взаємодія фармпрепаратів з клітинними мембранами. Оскільки нативні клітинні мембрани мають складну структуру і не завжди визначений склад, для біофізичних досліджень звичайно використовують модельні фосфоліпідні мембрани (найпростішим класичним прикладом є мультіламелярні структури гідратованого дипальмітоїлфосфатидилхоліну (ДПФХ) та інших фосфоліпідів. Аналіз літератури дозволяє вказати три аспекти досліджень у цьому напрямку. По-перше, зв'язок між мембранотропною дією і терапевтичною активністю встановлений для низки фармпрепаратів: локальних анестетиків, деяких антибіотиків тощо. Далі, мембранотропна дія фармпрепарату тісно пов'язана з проникністю мембрани для нього, і визначення взаємодії препарату з модельними мембранами може бути важливим для визначення характеристик їхньої проникності. Нарешті, оскільки модельні фосфоліпідні мембрани є прикладами ліотропних рідкокристалічних фаз, дослідження впливу біологічно активних субстанцій (БАС) на фазові стани модельних мембран дає важливу інформацію для рішення загальних питань фізики складних рідин. Як правило, внесення БАС призводить до зниження температур фазових переходів у ланцюгу «гель – ріпл- фаза – рідкий кристал» ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$), але в багатьох випадках картина істотно ускладнюється. Наявні дані охоплюють лише обмежене коло БАС, і не існує загальноприйнятих уявлень про зв'язок між молекулярною будовою БАС та їх поведінкою в фосфоліпідній мембрані. Зокрема, практично не досліджені ефекти сукупної дії різнорідних речовин, коли, окрім взаємодії

БАС – ліпід, можливий вплив взаємодії БАС між собою в упорядкованому середовищі мембрани.

Зв'язок теми з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках наукових тем Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України в рамках НДР, а саме, «Розробка нових наноматеріалів на основі гетероструктурованих рідких кристалів і ліотропних фаз гідратованих фосфоліпідів для застосування в медико-біологічних і біофізичних дослідженнях» (шифр «Гетерофаза-2», № держреєстрації 0113U001842); за темою відомчого держзамовлення ВФТПМ НАН України «Механізми надмолекулярного впорядкування та утворення нанорозмірних гетероструктур в багатокомпонентних рідкокристалічних системах і створення нових функціональних матеріалів на їх основі» (шифр «Наноспіраль-2» № держреєстрації 0112U001903); пошуковими темами «Зміни структурно-функціональних властивостей модельних біомембран за індивідуальної та сукупної дії лікарських субстанцій» (шифр «Модуль» № держреєстрації 0113U001836); «Вивчення мембранотропної дії лікарських субстанцій» (шифр «Мелодія» № держреєстрації 0114U001505); «Зміни фазового стану ліпідного бішару як один з чинників дії біологічно активних субстанцій» (№ держреєстрації 0113U006037); «Специфіка відгуку ліпідного наноматеріалу на присутність люмінесцентних зондів та біологічно активних субстанцій» (шифр «Оркестр» № держреєстрації 0115U003433).

Мета і задачі дослідження. Метою цієї роботи є визначення механізмів індивідуальної і сукупної дії біологічно активних субстанцій (БАС) на термодинамічні та структурні параметри модельних ліпідних мембран. Для досягнення цієї мети було необхідно вирішення таких основних задач:

- Визначення індивідуальної дії БАС (антимікробних препаратів; антибіотиків; кріопротекторів; психотропних препаратів тощо) на фазовий стан модельних ліпідних мембран.

- Встановлення ефектів сукупної мембранотропної дії БАС у квазібінарних системах на основі модельних ліпідних мембран, що містять: антимікробні препарати, термотропні мезогенні речовини, біологічно важливі іони.
- Порівняння мембранотропної дії індивідуальної діючої речовини та фармпрепарата на його основі, виявлення внеску допоміжних речовин у мембранотропну дію фармпрепаратів та порівняння фармпрепаратів-аналогів.
- Проведення теоретичного аналізу кореляцій між молекулярними параметрами БАС та їх мембранотропною активністю.

Об'єкт досліджень – прояви мембранотропної дії БАС в модельних ліпідних мембранах.

Предмет досліджень – термодинамічні та структурні параметри модельних ліпідних мембран, що містять біологічно активні субстанції

Методи дослідження: Диференціальна скануюча калориметрія (ДСК), малокутове рентгенівське розсіювання, Фур'є-ІЧ-спектроскопія, оптична мікроскопія

Наукова новизна результатів роботи:

1. Вперше визначено вплив кріопротекторів групи оксиетильованих похідних гліцерину, внесених до модельної мембрани на основі ДПФХ, на її структурні параметри і термодинамічні характеристики фазових переходів. При цьому ламелярна рідкокристалічна фаза зберігається до повної заміни води кріопротектором, а період повторюваності ламелярної структури змінюється із зростанням температури в L_{α} -фазі аналогічно його зміні при внесенні кріопротекторів до модельної мембрани.
2. Вперше встановлена неадитивність зміни термодинамічних параметрів фазових переходів мембрани при сукупній дії низки пар речовин (БЧАС

- + аспірин, ціанобіфеніл + азоксібензол, нітратів срібла і лужних металів) з можливістю зміни знаку мембранотропної активності.
3. Вперше відзначено ущільнювальний вплив іонів срібла на ліпідну мембрану, який призводить до появи, при температурах на 6-7° вище переходу в L_{α} -фазі, ознак фазового розділення та утворення додаткової ущільненої фази, частка котрої збільшується із зростанням концентрації іонів срібла.
 4. Вперше методом диференціальної скануючої калориметрії показана можливість визначення відмінностей між фармпрепаратами-аналогами за їх різним впливом на параметри фазових переходів модельної мембрани ДПФХ.

Практичне значення одержаних результатів. Показано можливість реєстрації відмінностей мембранотропної дії фармпрепаратів-аналогів, а також ефектів сукупної мембранотропної дії компонентів фармпрепаратів, що може бути використано в доклінічних тестуваннях розроблюваних лікарських засобів.

Особистий внесок здобувача. В опублікованих із співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає: у роботах [1, 3, 8, 10-12] – пошук літератури, проведення контрольних експериментів, участь у написанні статей та тез доповідей; у роботі [2] – участь у приготуванні зразків, участь у проведенні експериментів, підготування тексту рукопису статі; у роботах [4, 6, 17] приготування зразків для малокутового рентгенівського розсіювання, проведення калориметричних вимірювань, обговорення результатів, участь у написанні статей та тез; у роботах [5, 7, 14-16, 18, 20, 21] – отримання та обробка калориметричних даних, написання тез; у роботах [9, 22] – отримання та обробка калориметричних даних, обчислення молекулярних параметрів БАС, проведення кореляційного аналізу; у роботах [13, 19] приготування зразків для ІЧ-спектроскопії, проведення калориметричних вимірювань, обговорення результатів, написання тез.

Постановка задачі та інтерпретація отриманих даних здійснювалися спільно з науковим керівником та співавторами наукових публікацій.

Апробація роботи. Основні результати досліджень були представлені та обговорені на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях: міжнародная междисциплинарная научная конференция «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Новый Свет, Украина 27 мая – 1 июня 2013; 3rd European Lipidomic Meeting (ELM 2013), Pardubice, Czech Republic 2 - 4 July, 2013; XXI та XXII International School-Seminar –Spectroscopy of molecules and crystals” Beregove, Crimea, Ukraine, 22-29 September 2013 and Zakarpattia, Ukraine 27 September - 4 October 2015; 3th and 4th International Conference –Nanobiophysics: fundamental and applied aspects”, Kharkiv 7-10 October 2013 and Kyiv 1-4 October 2015; конференція молодих вчених «Проблеми теоретичної фізики» Київ 24 – 27 грудня 2013; XIV Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics, Kharkiv 14 – 17 October 2014; 39-я ежегодная конференция молодых ученых, посвященная 70-летию ЮНЕСКО «Холод в биологии и медицине» Харьков– 20-21 мая 2015; VI з’їзд українського біофізичного товариства, Луцьк - Світязь, Україна 27-29 травня 2015 р; X Міжнародної конференції молодих науковців "Біологія: від молекули до біосфери", Харків, 2 – 4 грудня 2015; 7th International conference physics of liquid matter: Modern problems, Kyiv, Ukraine 27-30 May 2016 та були опубліковані в тезах доповідей цих конференцій.

Публікації. Основні результати дисертаційної роботи опубліковано в 23 –наукових працях, з них 9 статей в фахових вітчизняних та закордонних журналах [1–9] та розділ у колективній монографії [10] і 12 тез доповідей міжнародних і національних наукових конференцій [11–23].

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, п’яти основних розділів, висновків, списку використаних джерел та додатку. Загальний обсяг дисертації складає 168 сторінок. Дисертація містить 75

рисунків, 13 таблиць. Список використаних джерел (192 найменувань) займає 24 сторінки. Додаток займає 5 сторінок.

РОЗДІЛ 1

ВЗАЄМОДІЯ РЕЧОВИН РІЗНИХ ХІМІЧНИХ І ФАРМАЦЕВТИЧНИХ КЛАСІВ З ЛІПІДНИМИ МЕМБРАНАМИ

1.1. Взаємодія мембрани з фармпрепаратом

Дослідження взаємодій мембрани з фармпрепаратами (ФП) має важливе значення з точки зору біофізичних аспектів сучасної фармакології, оскільки ця взаємодія безпосередньо або опосередковано пов'язана з механізмами дії препаратів [23-26]. Багато фармпрепаратів та їх активних субстанцій (далі використовуємо більш загальну назву – біологічно активні субстанції (БАС)), з різними терапевтичними застосуваннями (антибіотики, протигрибкові засоби, антидепресанти, антигістамінні засоби, місцеві анестезуючі засоби, протипухлинні препарати і т.д.) та іншими можливими діями на біологічні тканини (наприклад, неорганічні іони, кріопротектори тощо) можуть тим чи іншим чином зв'язуватися з клітинними мембранами (наприклад, адсорбуватися на поверхні або абсорбуватися ліпідним бішаром), змінюючи фізичні властивості мембрани [26].

Функції клітинних мембран у нормальних і патологічних станах, як правило, пов'язані з активністю специфічних білків (канали, рецептори, ферменти) і нуклеїнових кислот [27]. Фармпрепарати можуть діяти на мембранні білки або (після проходження через мембрану за достатньої проникності) на внутрішньоклітинні мішені (наприклад, ДНК);

Така стратегія фармакотерапії обумовлена загальноприйнятою на сьогоднішній день протеїноцентричною моделлю, згідно з якою ключові функції в життєдіяльності клітини належать білкам і пептидам [28]. Проте, взаємодія лікарських речовин з ліпідним бішаром біомембран (з проникненням через мембрану чи без) є необхідною стадією при визначенні механізму дії фармпрепарату [29], оскільки місце введення ФП та їх

молекулярні мішені, як правило, рознесені і розділені клітинними мембранами [30].

Відомо, що проникнення більшості ФП у клітину здійснюється шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар [31]. Взаємодія ФП з ліпідною мембраною (майже загальновизнаним терміном у світовій літературі є “drug-membrane interactions” [24, 29, 32, 33] - двосторонній процес: з одного боку, ця взаємодія впливає на фармакокінетичні властивості ФП, а з іншого боку, під дією ФП та інших БАС можуть змінюватися структурно-функціональні властивості мембрани (мембранотропна дія БАС). Зв'язок між мембранотропною дією і терапевтичною активністю встановлена для багатьох ФП: локальних анестетиків [34-38], антибіотиків [30, 39], катіонних сурфактантів [30, 40-42] та інших [43-49]. Останнім часом для вивчення взаємодії ФП з клітинними мембранами широко використовуються модельні ліпідні мембрани, що дають цінну інформацію про всмоктування, токсичні властивості, можливості оптимізації доставки ФП тощо [30, 43, 48, 50-52].

1.2. Клітинні мембрани

Клітинна мембрана, або біомембрана відіграє значну роль у функціонуванні клітини. Вона має складну надомлекулярну організацію. Структурною основою мембрани є ліпідний бішар, в який занурені білки, глікопротеїни та інші молекули. У ліпідному бішарі молекули ліпідів обернені один до одного своїми гідрофобними частинами, а їх полярні голівки спрямовані назовні. Така організація мембрани є універсальною та притаманною усім клітинам, різниця полягає лише в молекулярному складі ліпідів і білків [53].

Раніше вважали, що функціональна діяльність мембрани цілком визначається її білковими та вуглеводними компонентами, тоді як ліпідному бішару традиційно приділялася мінорна роль. Однак, за останні півсторіччя уявлення щодо ролі ліпідного бішару у функціонуванні живої клітини суттєво

еволюціонували. Так, зараз вже загальновідомими є уявлення про життєву необхідність підтримання ліпідного бішару в особливому рідкокристалічному фазовому стані (L_α -фазі), яка забезпечує належне функціонування занурених у бішар мембранних білків [54-56]. Новітні дані свідчать про зв'язок фазового стану ліпідного бішару з різноманітними важливими біологічними процесами, такими як сон, анестезія, сталість температури тіла тощо [34]. Є підстави вважати, що нам відомі далеко не всі аспекти біологічної ролі ліпідного бішару, тому цілком природньо, що інтерес до нього з боку сучасної науки не слабшає.

В літературі накопичено значний обсяг досліджень клітинних мембран методами диференціальної скануючої калориметрії (ДСК), електронної мікроскопії, інфрачервоної і Раман-спектроскопії тощо [57], проте автори настановлюються на складності інтерпретації даних через складність досліджуваних об'єктів.

Оскільки біофізичні дослідження безпосередньо нативних клітинних мембран настановлюються на низку експериментальних труднощів, у світовій літературі загальноприйнятим є використання модельних систем, що являють собою мультіламеллярні чи везикулярні ліпідні структури чітко визначеного хімічного складу [25]. Важливо підкреслити, що таке спрощення (моделювання) мембран і, таким чином, можливість контролю структури і фазового стану таких складних структур має вирішальне значення для розуміння взаємодій БАС з мембраною на молекулярному рівні і побудови відповідних фізичних моделей.

Загальноприйнятою модельною системою є ламелярні мультібішарові ліпідні структури, в яких ліпідні бішари розділені прошарками води, рис.1.1. Такі структури можуть самочинно (спонтанно) утворюватися деякими ліпідами в присутності води [54, 55].

Одним із найбільш розповсюджених фосфоліпідів, що застосовується для отримання модельних ліпідних мембран є L_α -

діпальмітоїлфосфатидилхолін (ДПФХ), [54, 55]. Популярність ДПФХ як модельного об'єкту зумовлена декількома факторами:

- він є дуже поширеним – присутній майже у всіх біомембранах у значній кількості;
- самочинно формує ламелярні фази в широкому концентраційному інтервалі вмісту води;
- фазові переходи в ньому відбуваються в області температур функціонування живих клітин.

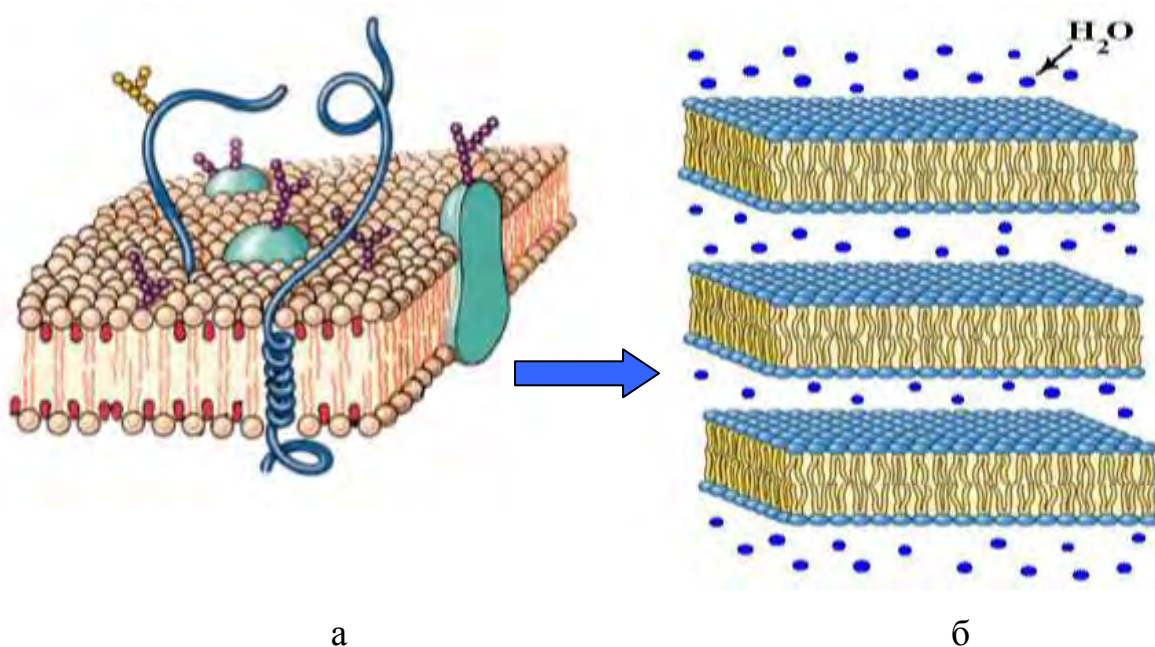


Рисунок 1.1. Клітинна мембрана (а) та модельна ліпідна мембрана (б), що представляє собою ліпідні бішари розділені прошарками води

1.3. Типи модельних ліпідних мембран

Уточнення будови біомембрани і вивчення її властивостей звичайно здійснюється з використанням фізико-хімічних моделей мембран (рис. 1.2.) Найбільшого поширення набули такі моделі:

Моношари фосfolіпідів на границі розділу вода-повітря або вода - масло, де гідрофільні головки знаходяться у воді, а гідрофобні хвости - в

повітрі або маслі. Якщо поступово зменшувати площу, яку займає моношар, то в результаті вдасться отримати моношар, в якому молекули розташовані так само щільно, як і в одному з моношарів мембрани. Так вивчають рухливість і типи упаковки молекулярних компонентів у мембранах, міжмолекулярні взаємодії в мембранах, механічні властивості мембран [54, 58]. Також досліджують кінетику і механізми ферментативних процесів, що протікають на межі розділу фаз; вивчають процеси переносу іонів та електронів через границю розділу фаз. Однак, цей метод має низку обмежень, в значній мірі обумовлені тим, що моношар - це лише половина ліпідного бішару мембран.

Ліпосоми та фосфоліпідні везикули отримують при набуханні сухих фосфоліпідів у воді або при вприскуванні розчину ліпідів у воду, при обробці суміші води і фосфоліпідів ультразвуком тощо. При цьому відбувається упорядкування ліпідної мембрани. Мінімуму енергії Гіббса відповідає замкнута сферична моноламелярна форма мембрани. При цьому всі неполярні гідрофобні хвости знаходяться всередині мембрани, і жоден з них не контактує з полярними молекулами води.

Ліпосоми застосовуються в медицині, наприклад, як фосфоліпідні мікрокапсули, всередину яких внесено лікарський препарат. У процесі приготування ліпосом в їх внутрішній водний об'єм включаються ті речовини, які містяться в вивідному водному розчині [59]. При цьому неполярні молекули включаються всередину ліпідного бішару. Ліпосоми не токсичні, повністю засвоюються організмом, здатні долати деякі біологічні бар'єри.

Ліпідний бішар - подвійний молекулярний шар (ламела), що формується полярними ліпідами у водному середовищі, - термодинамічно вигідна форма асоціації багатьох полярних ліпідів у водному середовищі, при якій молекули ліпідів орієнтовані таким чином, що їх полярні головки звернені в бік водної фази і формують дві гідрофільні поверхні, а

вуглеводневі ланцюги розташовані приблизно під прямим кутом до цих поверхонь і утворюють між ними гідрофобну область (рис. 1.2.) [60].

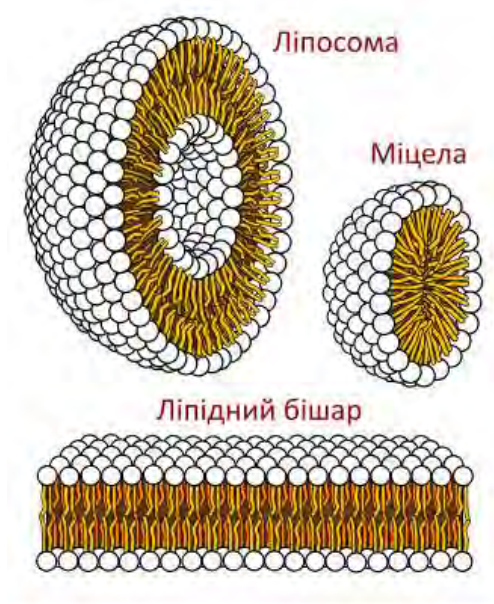


Рисунок 1.2. Структури, які утворюють фосфоліпіди при змішуванні з водою

Такі бішари легко формуються ліпідами, в яких невеликі відмінності між площею поперечного перерізу головки і вуглеводневих ланцюгів [55]. Це властиво більшості фосфоліпідів. Товщина ліпідного бішару визначається насамперед довжиною вуглеводневих ланцюгів і зазвичай знаходиться в межах 4-5 нм. Присутність у ланцюгах *цис*-подвійних зв'язків, бічних метильних груп та інших замісників порушує щільність упаковки молекул і призводить до зменшення товщини бішару.

В модельних мультибішарових фосфоліпідних структурах стовпці бішарів розділені водними прошарками такої товщини, що бішари можна вважати практично незалежними один від одного [54]. Плaskі (планарні) ліпідні мембрани, поряд з ліпосомами, широко використовуються в якості моделей для вивчення електричних властивостей мембран та їх проникності [61]. За допомогою модельних мембран вивчають їх бар'єрну функцію або моделюють транспорт речовин.

Такі мультибішарові структури дуже корисні при калориметричних дослідженнях, оскільки усі термодинамічні ефекти, що відбуваються для одного бішару, мультиплікуються за кількістю бішарів у досліджуваному зразку (кілька тисяч), даючи можливість досить точної реєстрації калориметричного сигналу. При цьому, зважаючи на незалежність бішарів у системі, усі отримані результати можуть бути застосовані безпосередньо до індивідуального бішару.

1.4. Мезоморфізм ліпідних структур. Фазові переходи в модельних мембранах

З точки зору надмолекулярної будови та фазового стану, основою структури клітинних мембран є утворений амфіфільними молекулами фосфоліпідів бішар, який можна описувати в термінах ліотропної рідкокристалічної фази. Це – один із багатьох прикладів реалізації рідкокристалічного фазового стану в біологічних системах [62], що дає можливість застосовувати поняття і методи фізики та фізичної хімії рідких кристалів до вирішення біофізичних та біо-фізико-хімічних задач.

Ліпіди є амфіфільними молекулами, що мають гідрофільну та гідрофобну частину (відповідно, полярні головки та вуглеводневі «хвости»). Для молекул звичайних (термотропних) рідких кристалів (РК) аналогією будови є жорстке анізотричне ядро та конформаційно рухливі вуглеводневі «хвости». Якщо для термотропних рідких кристалів основними силами міжмолекулярної взаємодії є ван-дер-ваальсові (дисперсійне притягування та стеричне відштовхування), для ліотропних фаз, зокрема, і фосфоліпідів, значну роль відіграють електростатичні взаємодії. Як і термотропні РК, гідратовані фосфоліпіди можуть утворювати різноманітні РК-фази, що відрізняються характером орієнтаційного і трансляційного впорядкування анізотричних молекул (ламельні, прямі та обернені гексагональні, кубічні фази тощо [63].

Ліпіди біомембран виявляють як ліотропний, так і термотропний мезоморфізм, і в гідратованому стані можуть утворювати велику кількість різноманітних ліотропних фаз [63, 64]. Для прикладу на рис. 1.3 показано фазову діаграму системи яєчний лецитін – вода. Як видно із діаграми, для лецитинів переважною є рідкокристалічна ламелярна фаза L_α . Перехід з більш впорядкованої L_β -фази в L_α -фазу, який може відбуватися через проміжну складчасту P_β -фази, часто не вповні коректно називають плавленням бішару (або переходом гель-рідкий кристалл) [55]. Таким чином, у фізіологічно важливому інтервалі температур і широкому інтервалі концентрацій води лецитін формує чітко виражені впорядковані ламелярні структури – L_α та L_β .

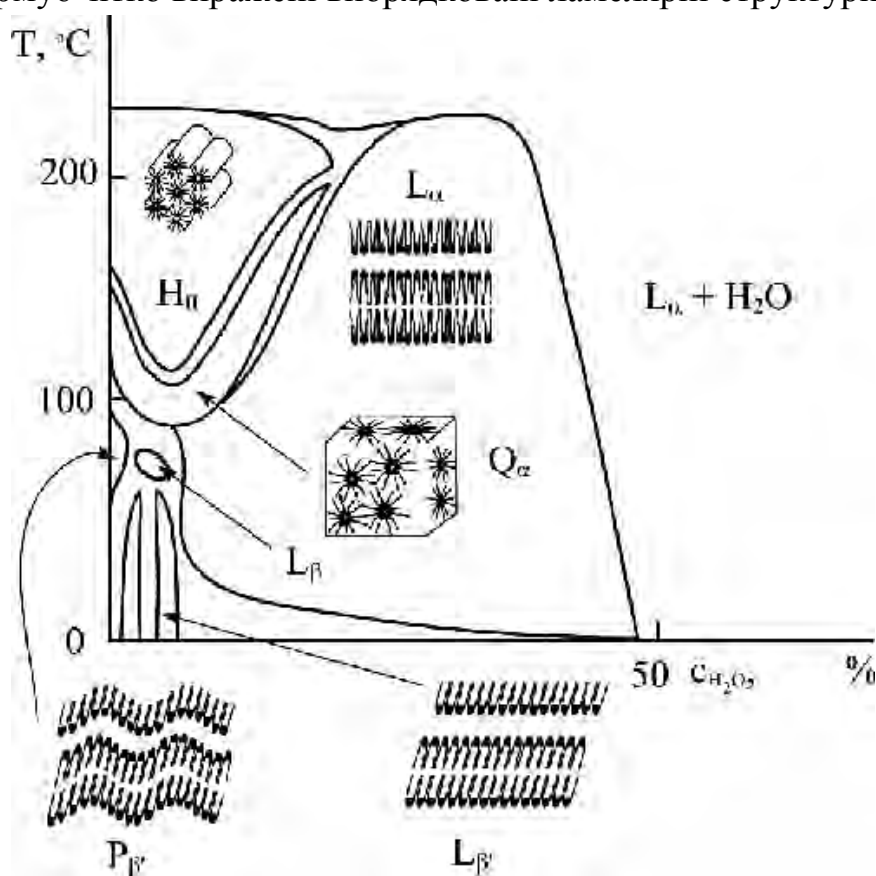


Рисунок 1.3. Фазова діаграма системи яєчний лецитін – вода [65]

Будова ліпідних структур може включати елементи певного трансляційного (просторового) впорядкування, подібного до кристалічних ґраток. Аналогічно параметрам ґраток, можна розглядати певні періоди повторюваності (зокрема, в мультибішарових структурах). Значення періоду

повторюваності D можна визначити, наприклад, методом малокутового розсіювання Х-променів (SAXS) з положення дифракційних піків.

Ламелярні фази відрізняються особливостями надмолекулярного пакування. Головні значення мають два типи впорядкування – в площині бішару та в напрямку нормалі до нього (рис. 1.4.).

Для ламелярних фаз виділяють окремі типи пакування молекул у площині бішару, а також їх нахил (рис.1.5), що було докладно досліджено для випадку мембран фосфоліпідів [49, 66, 67].

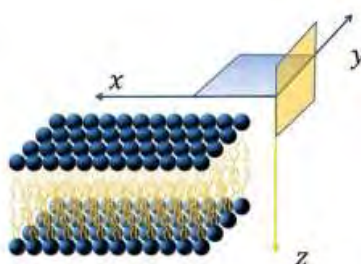


Рисунок 1.4. Ілюстрація двох типів упорядкування в ліпідній мембрані. Площина (x,y) – латеральне впорядкування. Напрямок z – ламелярне впорядкування

Зупинимося детально на фазових переходах модельної ліпідної мембрани на основі водної дисперсії ДПФХ. При зростанні температури така ліпідна мембрана переходить із низькотемпературної L_β фази (фаза гелю) до проміжної P_β фази, а потім – у високотемпературну (рідкокристалічну) фазу L_α [53-55, 68], рис. 1.6. Для першого з вказаних переходів часто вживають назву «передперехід» (pre-transition). При цьому змінюється пакування гідрофільних голівок фосфоліпиду, внаслідок чого фаза стає «скадчатою». Цю проміжну фазу (ріплл-фазу) пов'язують з утворенням певних доменів чи «хвиль» на поверхні з характерною довжиною ондуляції близько 140 Å [69]. Пошарова структура при цьому зберігається. Вуглеводневі хвости набувають деяку рухливість у просторі, при цьому зберігається гексагональне пакування полярних головок.

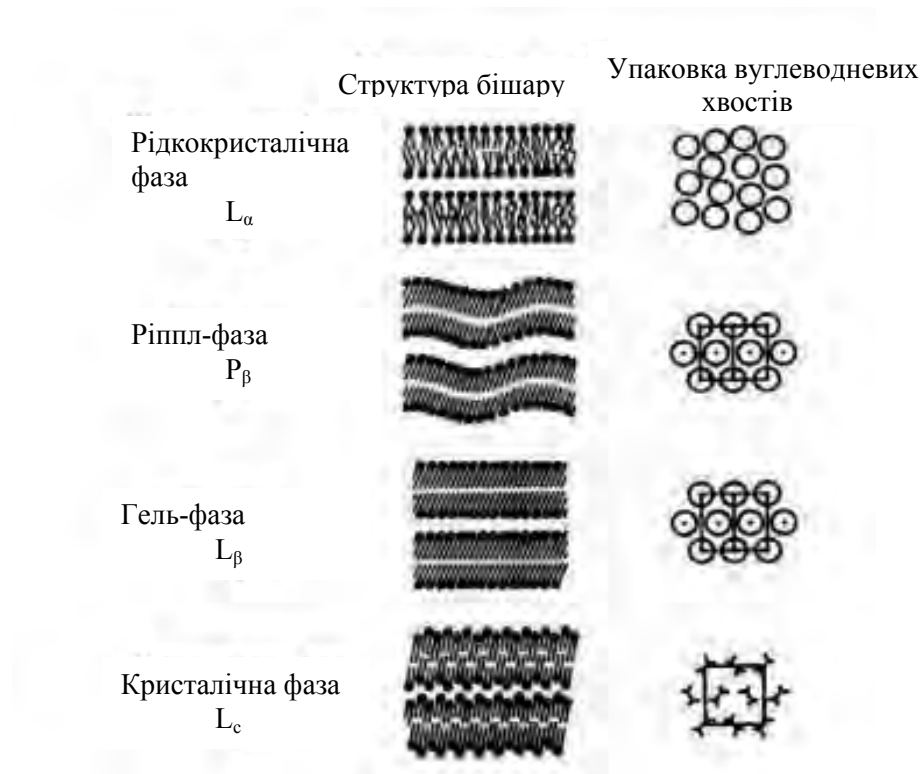


Рисунок 1.5. Типи ламелярних структур (ліотропних рідкокристалічних фаз) гідратованих фосфоліпідів [70]

Другий, більш високотемпературний, перехід в L_α фазу – це основний фазовий перехід, при якому змінюється конформація вуглеводневих ланцюгів фосфоліпиду. А саме, хвости стають рухливими (збуджуються конформаційні ступені свободи), значною мірою розупорядковуються. Кількісно, конформаційний стан ацильних ланцюгів ліпідних молекул виражається класичним параметром впорядкованості для рідких кристалів:

$$S_n = \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \vartheta_n \rangle - 1) \quad (1.1)$$

де ϑ_n – кут між n -им атомним зв'язком та нормаллю до поверхні мембрани. Для класичного кристалу $S_n \cong 1$; для ізотропної фази – $S_n = 0$, а для типових рідких кристалів $S_n \sim 0,7$. У пакуванні вуглеводневих хвостів відсутній далекий порядок. За літературними даними для ДПФХ, температура основного фазового переходу ліпідної мембрани (T_m) близька до 42°C , а температура передпереходу $T_p = 36\text{--}37^\circ\text{C}$ [54, 55]. У низькотемпературній фазі

усі ліпіди мають *транс*-конформацію ланцюгів, тоді як у високотемпературній на один вуглеводневий ланцюг у середньому приходить три *гаус*-конформації [43, 55].

В ліпідній мембрані можуть утворюватися різні ламеллярні субфази (фазове розшарування). При змішуванні двох ліпідів з істотно різною температурою основного фазового переходу утворюються «плотики» (рафти), що складаються з молекул того чи іншого виду з різною впорядкованістю. Додавання холестерину до таких мембран підсилює фазове розшарування [71]. Утворення рафтів дозволяє існувати границям розділу, що в свою чергу свідчить про можливу їх роль в утворенні пор, через які відбувається дифузія речовин через мембрану.

Фазові переходи відбуваються не тільки при варіації температури, та й при зміні тиску, що важливо для збереження біологічних функцій мембран тварин [72].

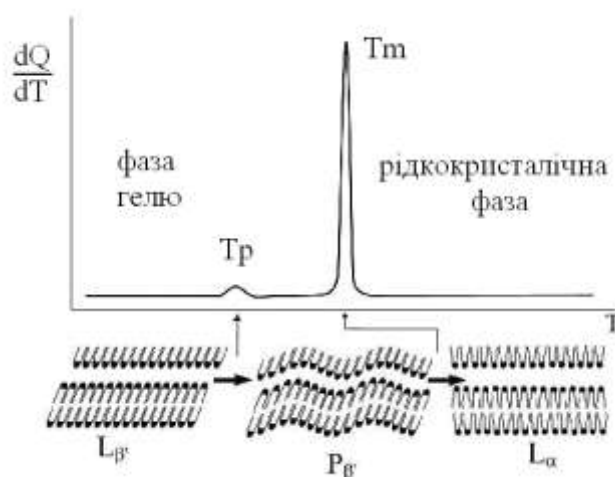


Рисунок 1.6. Типовий вигляд ДСК-термограми для гідратованого ДПФХ та структура утворюваних фаз: T_p – предперехід, T_m – основний перехід

Картина фазових переходів у мультибішарі гідратованого ДПФХ та структура утворюваних фаз згідно з найбільш сучасними уявленнями [23] більш детально показана на рис.1.7.

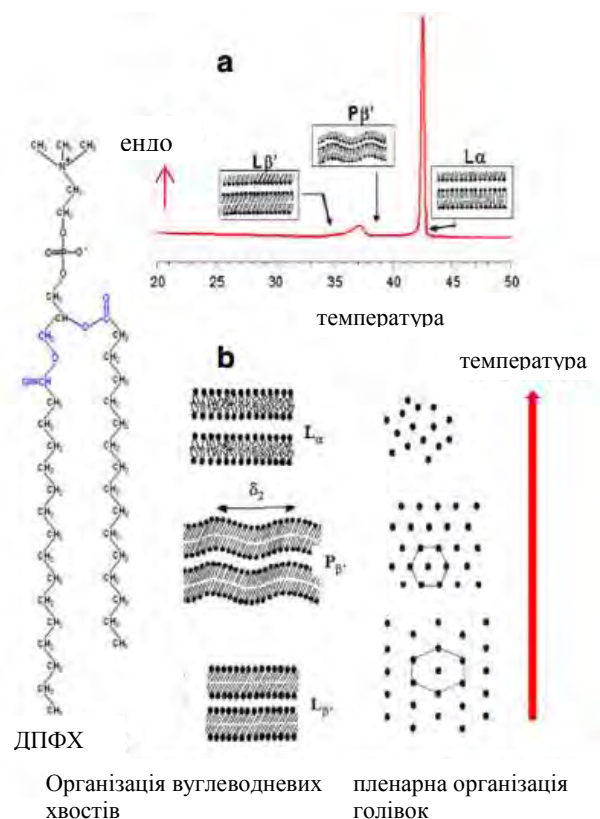


Рисунок 1.7. Схематичне представлення різних фаз, що реалізуються в гідратованому ДПФХ при зміні температури [23]

1.5. Вплив мембранотропних речовин на фазові переходи фосфоліпідних мембран

Вплив різноманітних БАС на фазові переходи в модельних фосфоліпідних мембранах є одним із актуальних напрямків сучасних біофізичних досліджень. Можна вказати на велику кількість відповідних публікацій, в яких обговорюється вплив біологічно важливих речовин з різною хімічною природою і структурою молекул на температури фазових переходів і вигляд відповідних ДСК-термограм (для прикладу, роботи лише однієї наукової групи і лише для модельних мембран на основі гідратованого діпальмітоїлфосфатидилхоліну [73-78]). Загальна теоретична інтерпретація таких даних у літературі практично відсутня – можна лише вказати на огляд [73] і опубліковану в 2013 р. монографію [74], де робиться спроба класифікації спостережуваних ефектів за принципом переважної взаємодії

молекули БАС є полярними голівками чи з гідрофобними алкільними ланцюгами молекул фосфоліпідів. В огляді [79] розглянуто зміни фазових переходів мембран *DL-α*-дипальмітоїл лецитину при введенні понад 90 речовин різних хімічних класів, де по змінам параметру напівширини основного фазового переходу побиться припущення про локалізацію БАС у ліпідному бішарі.

Для попередніх (доклінічних) досліджень *in vitro* розроблюваних фармпрепаратів, токсикологічних агентів та інших БАС зручним є використання модельних фосфоліпідних мембран, що мають чітко визначений хімічний склад, до яких вносять певну кількість біологічно активних субстанцій та визначення впливу тестованого БАС на властивості референтної модельної мембрани, перш за все, на характеристики мезоморфних фазових переходів. Останнім часом такий підхід викликає значний інтерес [23-27, 31, 33, 43, 80].

Рис. 1.8 ілюструє типовий характер зміни калориметричних піків фазових переходів мультибішарової структури ліотропної фази гідратованого фосфоліпиду ДПФХ на прикладі внесення (як БАС) холестерину та іншого стероїду – латостерину [81]. Для системи ДПФХ+вода присутні два фазових переходу: передперехід (з фази гелю $L_{\beta'}$ у проміжну фазу $P_{\beta'}$) та основний фазовий перехід (із проміжної фази в рідкокристалічну L_{α}); температура передпереходу $T_p = 36,5$ °C, а основного фазового переходу $T_m = 41,9$ °C, що узгоджується із літературними даними [54, 55, 82]. Треба відзначити, що температури цих переходів ($L_{\beta'}$ - $P_{\beta'}$ та $P_{\beta'}$ - L_{α}) для ДПФХ та його гомологів характеризуються дуже добрим відтворюванням їх значень у різних експериментах. Детальний аналіз характеристик фазових переходів для ДПФХ та його гомологів з різною довжиною вуглеводневих радикалів наведено, зокрема, в [82].

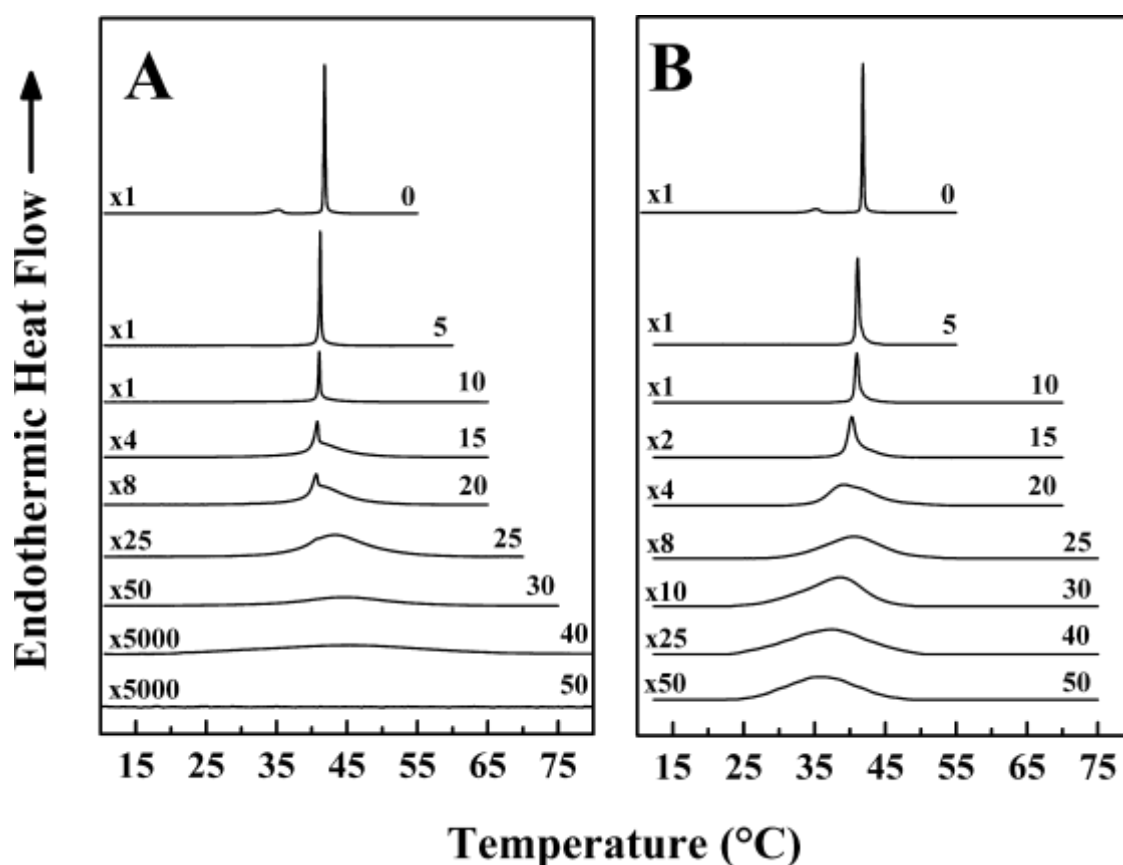


Рисунок 1.8. Калориметричні піки фазових переходів гідратованого ДПФХ при внесенні певної масової концентрації (%) холестерину (А) і латостерину (В). [81]

Внесення БАС призводить, як правило, до досить швидкого зникнення калориметричного піку передпереходу та до поступового зниження температури основного переходу з поступовим розмиванням цього піку при збільшенні концентрації БАС. Проте, при цьому поведінка кожного конкретного БАС дещо відрізняється – як якісною картиною спостережуваних змін форми піків, так і кількісними характеристиками – відносним зсувом температури основного переходу на певну кількість внесеного БАС. Також можливе визначення зміни ентальпії переходу (наприклад, аномальне збільшення може свідчити про так звану «інтердигітацію» [49, 73].

Розглядаючи механізми впливу БАС на властивості ліпідного бішару необхідно, насамперед, з'ясувати, в якій області мембрани вони розташовуються. Локалізація БАС залежить від їх структури та ліпофільності, а також від складу ліпідної мембрани. Оскільки високо гідрофобні сполуки асоціюють з ліпідним бішаром, вони швидко досягають цитоплазматичних компонентів клітини. Разом з особливостями хімічної структури БАС, на їх мембранну локалізацію значний вплив спричиняє ліпідний склад. Так, відомо, що в ліпосомах з аніонними ліпідами наявність електростатичного притягування приводить до зміщення місця розташування катіонних речовин ближче до поверхні мембрани в порівнянні з нейтральними мембранами [83].

Знання місця локалізації БАС у ліпідній мембрані має велике значення при оцінюванні їх впливу на молекулярну організацію бішару. Занурення гідрофобних сполук у неполярну область мембрани призводить до модифікації структури ліпідів, що може призводити до зміни в'язкості та проникності мембран для інших речовин [83].

Таким чином, підсумовуючи літературні відомості у цьому напрямку, можна сформулювати підхід до визначення мембранотропної дії біологічно активних речовин на модельні ліпідні мембрани на основі ліотропних фаз гідратованих фосфоліпідів для використання їх як тестових середовищ для дослідження фармпрепаратів та інших БАС з точки зору їх мембранотропної активності.

1.6. Біофізичні методи досліджень модельних мембран

Складність будови та динамічна поведінка нативних клітинних мембран значно утруднюють дослідження взаємодій фармпрепаратів з мембранами [23, 33]. Реальні мембрани мають невизначений ліпідний склад, можуть бути ліпідні домени, асиметрія розподілу ліпідів. До складу мембран входять також протеїни, вуглеводні, стероїди. Це значно утруднює інтерпретацію даних, отримуваних при дослідженні мембран фізичними методами.

Традиційним шляхом розвитку науки в таких ситуаціях є перехід до певних штучних моделей, які б зберігали основні риси та характеристики модельованих об'єктів. Одним з підходів до створення штучних мембран є спрямоване варіювання складу ліпідів та мембранних білків у так званих протеоліпосомах. Багато моделей запропоновано для з'ясування впливу хіміотерапевтичних агентів на властивості мембран. Для вивчення специфічних взаємодій між протипухлинними препаратами та мембранними ліпідами використовують ліпідні моношари та ліпосоми [26]. Особливу увагу привертають мультиламелярні та мультивезикулярні структури гідратованих фосфоліпідів, зокрема, ДПФХ.

Використання достатньо простих модельних мембран дало можливість застосування різноманітних методів фізичного та фізико-хімічного дослідження впливу фармпрепаратів на властивості мембрани, а також впливу мембрани на активність фармпрепаратів (рис.1.9). Певна річ, що жоден метод не може дати повної інформації про взаємодію фармпрепаратів з компонентами мембрани, і надійну інформацію можна отримати з сукупності різних експериментів [26]. У залежності від того, які властивості та характеристики мембрани нас цікавлять, можуть використовуватися різні модельні системи та специфічні біофізичні методи.

Наведемо короткий огляд біоміметичних моделей, найбільш вживаних при дослідженнях взаємодій «фармпрепарат-мембрана» [30, 84]. Ліпосоми дозволяють визначати велику кількість біофізичних параметрів і є найбільш вживаними моделями при дослідженні взаємодій фармпрепарат-мембрана. У залежності від розміру та ламелярності, серед них розрізняють гігантські моноламелярні везикули, мультиламелярні везикули, малі моноламелярні везикули та великі моноламелярні везикули. В останньому випадку кривизна буде найбільш близькою до клітинних мембран [85]. Вибір типу ліпосом залежить від використовуваних методів. Для таких методів, як дифрактометрія малокутового та ширококутового розсіювання X-променів,

диференціальна скануюча калориметрія, ядерний магнітний резонанс, позитивним є більший вміст матеріалу зразка, що притаманний мультиламелярним везикулам. Інші методи, зокрема, пов'язані з мікроскопією, які детектують структурні зміни, пов'язані з присутністю фармпрепарату, краще працюють з гігантськими моноламелярними везикулами, розмір яких вже практично наближається до розмірів клітини.

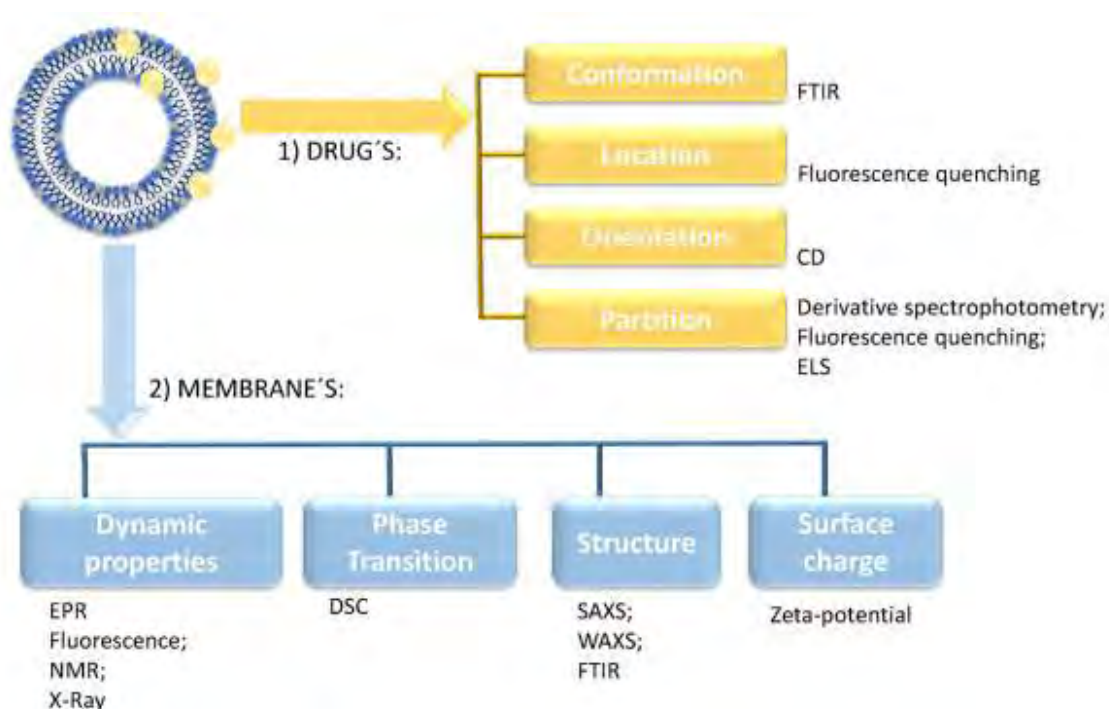


Рисунок 1.9. Фізико-хімічні параметри та пов'язані з ними експериментальні методи при дослідженнях взаємодій фармпрепаратів з ліпосомами [86]

Для вивчення взаємодій фармпрепаратів з мембранами, використовуючи ліпосоми як міметичні системи, запропоновано багато різних методів досліджень. Наприклад, коефіцієнт розподілу хіміотерапевтичних препаратів визначають за допомогою диференціальної спектрофотометрії [87], затухання флуоресценції [88] та електрофоретичного розсіяння світла [87]. Далі, розташування фармпрепарату в мембрані та його зв'язування визначається методом ядерного магнітного резонансу [90] та шляхом вимірювання інтенсивності флуоресценції [91]. Нарешті, визначення

конформації молекули препарату та виявлення змін конформації фосфоліпідів проводили, відповідно, за круговим дихроїзмом [92] та методом Фур'є-ІЧ спектроскопії [93].

Комбінація різних методів з ліпосомами може дати багато інформації щодо впливу фармпрепаратів на властивості мембрани, які пов'язані з фазовими перетвореннями в мембранах, структурою та поверхневим зарядом. Зміни температур фазових переходів та ступеню їх кооперативності внаслідок взаємодії хіміотерапевтичних агентів з мембранами вивчали методами ДСК [94], ЯМР [95] та динамічного розсіювання світла [96]. Зміни текучості мембран та їх організації реєстрували спектроскопією електронного парамагнітного резонансу [97]. Вплив фармпрепаратів на впорядковані домени в мембранах досліджували за допомогою фазоконтрастної мікроскопії [98] та вимірювань інтенсивності флуоресценції [99]. Нарешті, збурюючий ефект антинеопластичних сполук на структуру та динаміку бішару оцінювали за допомогою дифрактометрії X-променів [100].

Ліпідні моношари – добре визначені, стабільні, гомогенні двовимірні систем з пласкою геометрією. Говорячи про ліпідні моношари, треба зазначити метод їх отримання в «ленгмюрівській ванні» (що її використовують для отримання плівок Ленгмюра-Блоджетт), де можна задавати різні параметри, такі, як ліпідний склад, субфазу, температуру [58], і шляхом зміни цих параметрів імітувати біологічні умови. Цей метод дає інформацію про характеристики моношара на водній поверхні шляхом вимірювання змін поверхневого натягу при стискуванні моношара. Ліпідні моношари формуються на поверхні розділу повітря-вода в ленгмюрівській ванні і дають можливості використання методів детектування проникнення через мембрану [101] та вплив препарату на структурні властивості ліпідного моношару за допомогою мікроскопії кута Брюстера [102]. Більш детальну інформацію про застосування методів, пов'язаних з ленгмюрівськими моно

шарами, для досліджень взаємодій біомолекул з клітинними мембранами, можна дістати з оглядів [103-105].

1.7. Висновки до розділу 1

1. Визначення мембранотропної дії фармпрепаратів та інших біологічно активних субстанцій (БАС), тобто їх впливу на фазовий стан та фізико-хімічні властивості ліпідних мембран, є одним із актуальних напрямків сучасних біофізичних та медико-біологічних досліджень. У багатьох роботах використовують усталений термін “drug-membrane interactions” – взаємодія фармпрепаратів з мембранами. При цьому загальноприйнятим є використання модельних фосфоліпідних мембран чітко визначеного складу, зокрема, на основі мультиламелярних структур гідратованого дипальмітоїлфосфатидилхоліну (ДПФХ).

2. Основним методом визначення мембранотропної дії БАС є диференціальна скануюча калориметрія (ДСК). Поряд з цим, цінну інформацію отримують також методами ІЧ-спектроскопії, малокутового рентгенівського розсіювання, ядерного магнітного резонансу, а також методи з використанням люмінесцентних та парамагнітних міток.

3. У переважній більшості робіт різними методами досліджують окремі БАС або групи БАС подібної хімічної структури. Практично відсутні роботи, де б в однакових умовах експерименту проводили порівняльні дослідження широкого кола різнотипних БАС. Лише в деяких роботах є спроби певної систематизації та узагальнення.

4. Практично всі літературні дані стосуються індивідуальних речовин, зокрема, основних діючих речовин фармпрепаратів. Становило б значний інтерес дослідження сукупної дії БАС при їх спільному внесенні в мембрану, а також впливу допоміжних речовин на мембранотропну дію фармпрепаратів-аналогів.

Проведений аналіз сучасного стану проблеми дозволив нам сформулювати мету і задачі нашої роботи.

Для з'ясування механізмів індивідуальної і сукупної дії біологічно активних субстанцій (БАС) на термодинамічні та структурні параметри модельних ліпідних мембран ми зосередилися на таких основних задачах:

1. Визначення індивідуальної дії БАС (антимікробних препаратів; антибіотиків; кріопротекторів; психотропних препаратів та інших) на фазовий стан модельних ліпідних мембран.
2. Встановлення ефектів сукупної мембранотропної дії БАС у квазібінарних системах на основі модельних ліпідних мембран, що містять: антимікробні препарати, термотропні мезогенні речовини, біологічно важливі іони.
3. Порівняння мембранотропної дії індивідуальної діючої речовини та фармпрепарата на його основі, виявлення внеску допоміжних речовин у мембранотропну дію фармпрепаратів та порівняння фармпрепаратів-аналогів.
4. Проведення теоретичного аналізу кореляцій між молекулярними параметрами БАС та їх мембранотропною активністю.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали

В роботі було використано речовини класу фосфотидилхолінів *L*- α -діпальмітоїлфосфатиділхолін (ДПФХ) «Alexis Biochemicals» (Швейцарія) та його гомолог *L*- α -діміристоїлфосфатиділхолін (ДМФХ) «Sigma» (використаний тільки для модельних мембран, що містили пари нітратів, див. пункт 4.1.5), як основні структуроутворюючі компоненти модельних мембран, а також низку речовин, які додатково вносили до модельної ліпідної мембрани (табл. 1). Ці речовини належали до різних хімічних класів та відрізнялися своєю біологічною дією (фармпрепарати та їх компоненти, кріопротектори, неорганічні солі тощо). Всі вони в тексті дисертації позначені дещо умовною загальною назвою «біологічно активні субстанції» (БАС).

Було використано нітрати AgNO_3 , NaNO_3 , KNO_3 и $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ марки ОСЧ вітчизняного виробництва. Оксигетильований гліцерин зі ступенем полімеризації 5, 25 та 30 ($\text{OEG}_{n=5}$, $\text{OEG}_{n=25}$ та $\text{OEG}_{n=30}$) було надано Інститутом проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). В якості типових мезогених речовин використовували нематичний рідкий кристал 4-аміл-4'-ціанобіфеніл (5CB) виробництва Харківського заводу хімічних реактивів та нематичний рідкий кристал ЖК-440 (суміш на основі алкілціанобіфенілів), виробництва НІОПІК, Росія.

Також було використано низку фармпрепаратів (ФП) та їх основних діючих речовин (ОДР). ОДР аміксин, фенібут, фенспірид, транквілар були люб'язно надані для досліджень компанією «Інтерхім» (Одеса), ОДР метронідазол - компанією «Enamine» (Київ); ОДР аспірин, декаметоксин, етоній, тіоній та тетраметіламоній (ТМА) - Державним науковим центром лікарських засобів (Харків). Відповідними комерційними фармпрепаратами

були: аміксин - «Аміксин ІС» виробництва «Інтерхім» (Україна); аспірин - «Аспірин Комплекс» виробництва «Química Farmaceutica Bayer, S.A.» (Іспанія); метронідазол - «Метрогіл» виробництва «Юнік Фармасьютікал Лабораторіз» (Індія), «Метронідазол Юрія-Фарм» виробництва «Юрія-Фарм» (Україна), «Трікасайд» виробництва «Фармасайнс Інк.» (Канада); фенібут - «Нообут ІС» виробництва «Інтерхім» (Україна); фенспірид - «Ереспал» виробництва «Les Laboratoires Servier Industrie» (Франція) ; мірамістин - «Мірамістин» виробництва «Дарниця» (Україна). Використовували азітроміцин дігідрат виробництва «Biochemie, S.A.» (Іспанія). До групи азітроміцину належали «Хеоміцин» виробництва «Хемофарм» (Сербія), «Азітроміцин» виробництва «Alembic Pharmaceuticals Limited» (Індія) та «Азіцин» виробництва «Дарниця» (Україна). Нову протиракову субстанцію ландоміцин Е люб'язно надали проф. Р.С. Стойка та Р.Р. Панчук (Інститут біології клітини, НАН України, м. Львів). Доксорубіцин застосовували у вигляді фармпрепарату «Адрибластин швидкорозчинний» (Phizer, Італія).

2.2. Методика отримання модельних ліпідних мембран на основі гідратованих фосфоліпідів

Для отримання модельних зразків, а саме мультибішарових мембран гідратованого 1,2-діпальмітоїлфосфатиділхоліну (ДПФХ) з'єднували ДПФХ та бідистильовану воду (або розчин відповідного водорозчинного БАС) у співвідношенні 40:60 за масою. Формування мультибішарових ліпідних структур відбувалося при чергуванні термостатування зразків в атмосфері насиченої водної пари (20-40 годин), прогрівання вище температури основного фазового переходу ДПФХ (50° С, 20 мин) та перемішування. Після 3-5 таких циклів структура набувала візуальної однорідності, а її термодинамічні параметри – відтворюваності.

Таблетовані лікарські форми фармпрепаратів попередньо звільняли від зовнішньої оболонки, перетирали в ступці та відфільтровували нерозчинні

компоненти. Після цього розчини ФП додавали до безводного ДПФХ із розрахунку вмісту основної діючої речовини відносно зневодненої маси зразку. Препарати, що мали капсульовану форму, після вивільнення з капсул були готові для подальшого використання.

Водонерозчинні БАС розчиняли в етиловому спирті. Отриманий спиртовий розчин додавали до ДПФХ у кількостях, які забезпечували низку концентрацій від 1 до 30 мас. % від маси безводного ДПФХ. Далі об'єм розчинника доводили до 150 мкл. Видалення розчинника відбувалося за допомогою концентратора «Concentrator plus» (Німеччина) шляхом центрифугування протягом 4 год при 45° С та тиску 100 мбар зі швидкістю обертання 1400 об/мин (~240 g). Після випаровування розчинника, модельні ліпідні мембрани готували шляхом гідратації – так, як це описано вище.

2.3. ДСК вимірювання

Диференціальна скануюча калориметрія (ДСК) - це кількісний метод термічного аналізу, що визначає залежність між енергією, що виділяється або поглинається зразком при температурному скануванні, і температурою процесу.

До калориметру поміщають еталон (порожній тигель) та зразок в алюмінієвих тиглях. Тепловий потік реєструється приладом наступним чином.

$$H = Q_s - Q_r, \quad (2.1)$$

де Q_s – тепловий потік досліджуваного зразка, Q_r – тепловий потік референтного зразка. Q_r та Q_s визначають як:

$$Q_s = (T_c - T_s)/R_{th}, \quad Q_r = (T_c - T_r)/R_{th}, \quad (2.2)$$

де T_c – температура печі, T_s – температура досліджуваного зразка, T_r – температура референтного зразка, R_{th} – термічний опір зразків. Цей закон виконується при невеликих різницях температури, щоб зберігалася лінійність. Тоді:

$$H = -(T_s - T_r)/R_{th} = -\Delta U / (R_{th}S), \quad (2.3)$$

$$\Delta U = (T_s - T_r)S = \Delta TS, \quad (2.4)$$

ΔU – різниця потенціалів, яка вимірюється за допомогою термопар (термоЕРС), S – чутливість термопар (20 мкВ/К).

R_{th} та S – це функції температури

$$E = R_{th}S, \quad (2.5)$$

E – калориметрична чутливість. Її представляють у вигляді добутку двох компонент: залежної від температури E_{rel} і незалежної E_{in} :

$$E = E_{rel} E_{in}, \quad (2.6)$$

E_{in} визначається при калібруванні приладу за відомою теплою плавлення індію, E_{rel} представляється у вигляді розкладання в ступеневу функцію:

$$E_{rel} = A + BT + CT^2, \quad (2.7)$$

де константи А, В, С також визначаються при калібруванні приладу.

Термограмми досліджуваних зразків у координатах теплоємність (C_p) - температура (Т) можуть бути отримані на підставі співвідношення

$$C_p(T) = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_P \quad (2.8)$$

де H – кількість теплоти, необхідна для підвищення температури зразка на один градус при постійному тиску P .

Калориметрична ентальпія переходу ΔH визначається за площею піка під експериментальною кривою відносно базисної лінії

$$\Delta H = \int_{T_2}^{T_1} C_p(T) dT, \quad (2.9)$$

де T_1 и T_2 – початкова та кінцева точки фазового переходу.

Температура будь-якого фазового переходу визначається як екстремум температурної залежності теплового потоку — тобто, як точка, в якій похідна теплового потоку приймає нульове значення. За допомогою відповідного програмного забезпечення «STAR^е SW11.00» також розраховують ентальпії фазових переходів. Гістерезис визначають як різницю значень T_m при нагріванні та охолодженні:

$$h = T_{m(\text{нагр})} - T_{m(\text{охол})} \quad (2.10)$$

де h – величина гістерезиса;

$T_{m(\text{нагр})}$ – температура основного фазового переходу при нагріванні;

$T_{m(\text{охол})}$ – температура основного фазового переходу при охолодженні.

Зсув температури основного фазового переходу обчислюють за формулою:

$$\Delta T_m = T_m - T_m^o, \quad (2.11)$$

де ΔT — зсув температури основного фазового переходу ліпідної мембрани в присутності БАС;

T_m^o — температура фазового переходу ліпідної мембрани;

T_m — температура фазового переходу ліпідної мембрани з БАС.

Масовий параметр мембранотропної активності БАС визначають за формулою:

$$a_{\text{мас}} = \Delta T / c_{\text{мас}} = 20 \Delta T, \quad (2.12)$$

де $a_{\text{мас}}$ — масовий параметр мембранотропної активності;

$c_{\text{мас}}$ — масова концентрація БАС відносно маси фосфоліпиду.

Таким чином, параметр a відбиває величину зсуву температури піка переходу в розрахунку на одиницю масової або мольної концентрації мембранотропного агента в наноматеріалі.

Дослідження методом диференціальної скануючої калориметрії (ДСК) проводили за допомогою калориметра «Mettler DSC 1» (Швейцарія). Досліджувані зразки в кількості 15–25 мг поміщали в алюмінієві тиглі і запечатували. Для кожного зразка проводилося 2 циклу «охолодження - нагрівання» зі швидкістю сканування 2 К/хв.

2.4. ІЧ вимірювання

Фур'є-ІЧ (FTIR) спектри поглинання водних розчинів БАС були отримані за допомогою спектрофотометра Perkin Elmer «Spectrum One». Спектри реєструвалися за стандартних атмосферних умов методом роздавленої краплі між стеклами ZnSe [106]. Процедура обробки оригінальних ІЧ-спектрів містила такі етапи:

перерахування отриманих значень пропускання в поглинання; унормування отриманих спектрів у координатах оптичної щільності по $\nu_s \text{CH}_2$ 2850 cm^{-1} ; урахування поглинання стекол ZnSe; віднімання базисної лінії спектра.

Точність хвильового числа становила 0,2 cm^{-1}

2.5. Оптична мікроскопія дослідження гемолізу еритроцитів

Кров, яку використовували в мікроскопічних дослідженнях, була зібрана з пальців здорових донорів за стандартною клінічною процедурою. Дослідження гемолізу еритроцитів проводили з використанням оптичного мікроскопу –Micromed Polar 3” (Росія), обладнаного цифровою камерою –Canon EOS 1100D”. До суспензії еритроцитів, що знаходилися на предметному скельці, додавали 0.05 % розчин декаметоксину та/або 0.026 % розчин аспірину на фізрозчині, перемішували та накривали покривним скельцем. Мікрофотографії робили кожні 30с, після чого рахували кількість неушкоджених клітин. Експеримент повторювали 4-5 раз. За методом Стьюдента надійність $P = 0.95$.

2.6. Метод малокутового розсіювання рентгенівських променів

Для приготування зразків для досліджень використовували бідистильовану воду, гліцерин та $\text{OEG}_{n=5}$ у концентраційному діапазоні від 0 до 85%, а також 10% розчин нітрату срібла та 0,4% розчин уроканової кислоти в воді. Ліотропні фази ДПФХ отримували шляхом змішування ДПФХ з водою або відповідним розчином у масовому співвідношенні 1:9. А далі аналогічно як для мембран 2:3 (див пункт 2.2)

Експерименти з малокутового розсіювання рентгенівських променів було проведено на спектрометрі RIGAKU нашими колегами з Лабораторії перспективних досліджень мембранних білків Московського фізико-технічного інституту (м.Долгопрудний, Росія) та Об’єднаного інституту ядерних досліджень (м.Дубна, Росія). Зразки знаходились у боросилікатних капілярах діаметром 1,5 мм і товщиною стінки 0,01мм (W. Muller, Berlin, Germany). Капіляри зі зразками були фіксовані на спеціальному температурному тримачі спектрометра. Перед вимірюваннями було проведено калібрування температурного датчика установки. Точність

вимірювання температур складала $0,5^{\circ}\text{C}$. Час вимірювання зразка при кожній температурі – 20 хвилин. Вимірювання проводили в діапазоні температур $(28\div 66)^{\circ}\text{C}$.

Період повторюваності D визначали як

$$D = 2\pi/nq, \quad (2.14)$$

де q – координата положення піка, а n – порядок відбивання.

2.7. Дослідження коефіцієнтів проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для молекул води

Осмотичні реакції сперматозоїдів досліджували *in vitro* на NaCl згідно методики [107]. Коефіцієнти проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для молекул води (L_p) визначали шляхом співставлення експериментальних залежностей відносних об'ємів клітин від часу з розв'язком рівнянь теоретичної моделі [108]. Енергію активації процесу переносу молекул води через мембрани клітин (E_a) розраховували на основі залежностей $\ln L_p$ від оберненої температури, нахил яких, згідно рівняння Ареніуса, дорівнює E_a/R , де R – універсальна газова стала. Експериментальна похибка визначення E_a не перевищувала 8 %.

2.8. Квантово-хімічні розрахунки

Оцінка коефіцієнта ліпофільності біологічно активних субстанцій була проведена за допомогою відкритого електронного ресурсу (<http://www.vcclab.org>) [109] з використанням алгоритмів Pharma Algorithm (AC_logP), Molinspiration Algorithms (miLogP, ALOGP, MLOGP; ПО DragonX) [110, 111], XLOGP2 and XLOGP3 (ПО XLOGP2, XLOGP3) [112], а

токож ALOGPs [113]. Усереднений коефіцієнт ліпофільності, $\langle \log P \rangle$, являє собою середнє арифметичне всіх результатів по кожній БАС.

Такі молекулярні параметри для кожної з розглянутих у роботі БАС, як загальна площа поверхні молекули (S_{total}), молекулярний об'єм (V_m), дипольний момент (μ) та геометричні виміри молекули (r_x , r_y , r_z), було обчислено шляхом повної оптимізації геометрії та мінімізації енергії напівемпіричним методом AM1 та PM6 з використанням програмного забезпечення MORAC 2012, версія 15.347W [114]. Параметр S_{polar} було отримано згідно з [115].

Базуючись на отриманих значеннях, були розраховані і інші молекулярні параметри, такі, як полярна частина площі поверхні молекули (S_{polar}/S_{total}), а також молекулярна анізотропія (k) та площа анізотропної взаємодії (S_k). Деталі використаних методів розрахунків та процедур обчислень викладено в розділі 5.

2.9. Методи комп'ютерного моделювання та обробки даних

Обробка ДСК-термограм проводилася з використанням програмного забезпечення приладу «Mettler DSC 1», а також ПЗ QTiPlot. Були визначені температура і ентальпія основного переходу ліпідних мембран (T_m , ΔH_m), а також предпереходу (T_p , ΔH_p). Стандартне відхилення зазначених параметрів, отримане на підставі аналізу 15 контрольних зразків, склало: $\delta T_m = 0,15^\circ \text{C}$; $\delta T_p = 0,25^\circ \text{C}$; $\delta \Delta H_m = 2,6 \text{ кДж/кг}$; $\delta \Delta H_p = 0,4 \text{ кДж/кг}$. Розщеплення ДСК-пиків на гаусіани і визначення їх параметрів проведено за допомогою ПЗ QTiPlot. Коефіцієнт кореляції r між експериментальною кривою і обвідною становив не менше 0,995.

2.10. Висновки до розділу 2

1. Для досліджень впливу біологічно активних субстанцій (БАС) на фазові стани модельної ліпідної мембрани використано речовини класу фосфотидилхолінів (ДПФХ та його гомолог ДМФХ), як основні структуроутворюючі компоненти модельних мембран, а також широке коло речовин різних хімічних класів та біологічною дією.
2. Наведено молекулярні моделі досліджених БАС, на основі яких проведено розрахунки основних молекулярних параметрів з використанням квантовохімічних методів
3. Базовим методом досліджень була диференціальна скануюча калориметрія, яка дозволяє визначити вплив БАС на температури та інші параметри фазових переходів у ліпідному бішарі.
4. Для уточнення особливостей взаємодії молекул БАС з ліпідним бішаром використано метод Фур'є ІЧ-спектроскопії, а для визначення змін структурних параметрів ліпідних мембран – метод малокутового рентгенівського розсіювання
5. Всі використані експериментальні методи є неінвазивними і не вносять фазових збурень у фосfolіпідні мембрани.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ МЕМБРАНОТРОПНОЇ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СУБСТАНЦІЙ

За допомогою метода диференціальної скануючої калориметрії, а також низки інших фізико-хімічних методів можна визначити вплив окремого типу біологічно активних субстанцій на властивості ліпідного бішару. Такий вплив можна назвати мембранотропною дією. Хімічна природа БАС може бути різноманітною: від окремих іонів до великих та складних білкових молекул. У цій роботі було досліджено мембранотропну дію різних БАС з використанням єдиного методологічного підходу. Були отримані ДСК-термограми модельних мембран, що містять речовини різних хімічних класів (рис. 3.1).

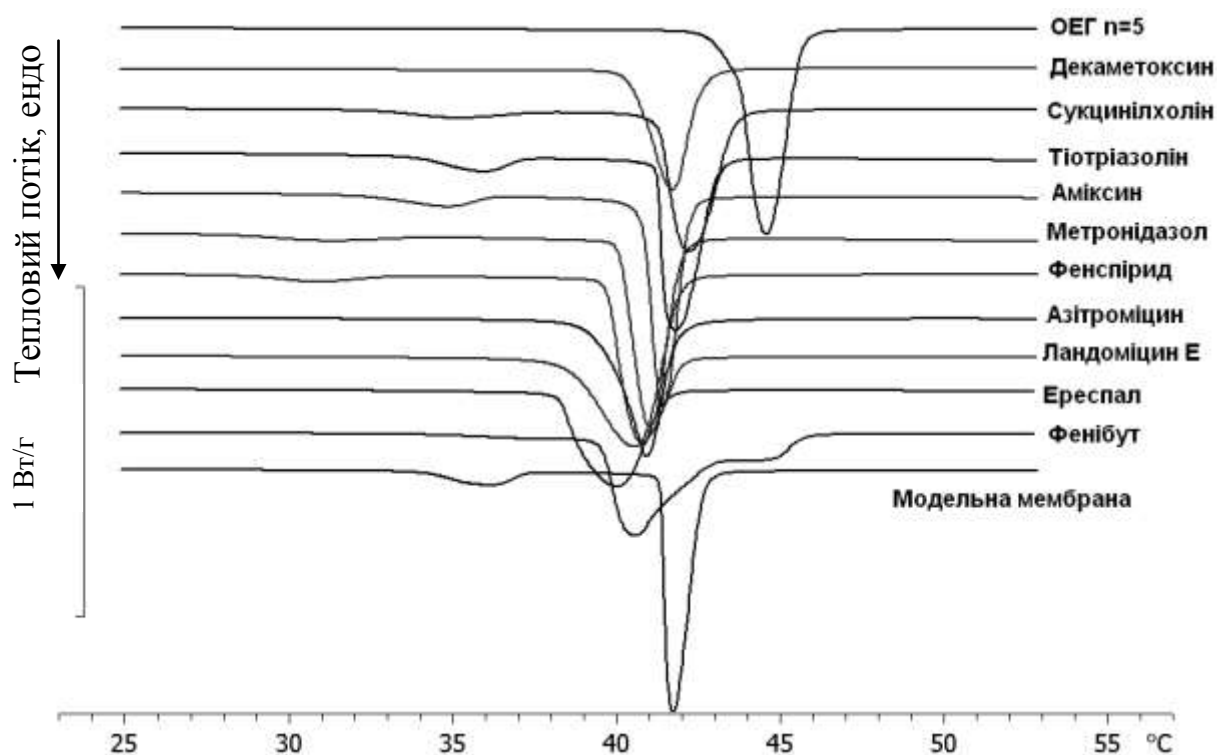


Рисунок 3.1. ДСК-термограми модельних ліпідних мембран, що містять БАС

Для деяких БАС (наприклад, декаметоксин, етоній, тіоній) було проведено контрольні експерименти, і отримані результати узгоджувалися з літературними даними. Мембранотропна дія інших БАС була нами досліджена вперше. Вона відображається в зміні профілю ДСК-термограм. Для всіх БАС були отримані концентраційні залежності T_m , ентальпії ΔH_m , ентропії ΔS_m , гістерезису h , напівширини піку переходу $\Delta T^{1/2}$, а також розраховано розмір кооперативного домену CU та параметр мембранотропної активності (a) БАС (табл. 3.1). Найбільш інформативним параметром є температура основного переходу модельної мембрани (T_m).

Таблиця 3.1.

Мембранотропна активність БАС та термодинамічні параметри
модельних мембран ДПФХ, що містять 1% БАС

Назва БАС	a_{wt} , °C	ΔH_m , кДж/ моль	ΔS_m , Дж/ моль·К	h , °C	$\Delta T^{1/2}$, °C	CU
ДПФХ	-	35,7	113,3	1,0	1,1	75
Азитроміцин	-0,5	33,8	107,4	1,0	1,2	100
Аміксин	-0,3	41,8	132,8	1,1	1,1	72
Аспірин	-1,0	33,5	106,5	3,2	1,9	31
Гліцерин	0,1	34,0	108,0	0,7	1,2	133
Декаметоксин	-0,4	34,3	109,0	1,5	1,7	64
Етамбутол	-0,1	33,0	104,3	2,1	1,9	47
Етоній	-0,3	51,4	163,4	1,6	1,4	40
Ландоміцин Е	-0,9	34,9	111,4	1,0	1,2	90
Метронідазол	-0,3	40,2	127,9	1,0	1,2	82
Мірамістин	-0,4	52,3	166,5	1,3	1,2	48
ОЕГ _{n=5}	0,2	31,7	100,5	0,5	1,2	192

Назва БАС	$a_{wt},$ °C	$\Delta H_m,$ кДж/ моль	$\Delta S_m,$ Дж/ моль·К	$h, ^\circ\text{C}$	$\Delta T^{1/2},$ °C	CU
ОЕГ _{n=25}	0,0	35,3	112,1	0,5	0,9	198
ОЕГ _{n=30}	0,0	34,2	108,7	0,6	1,1	150
Сукцинилхолін	0,1	36,0	114,2	1,1	1,2	83
Тіотриазолін	0,0	36,3	115,3	1,2	1,2	75
Тіоний	-0,4	47,0	149,4	1,8	1,4	39
ТМА	0,3	27,9	88,4	1,3	1,2	95
Транквілар	0,0	54,2	172,0	1,1	1,4	57
Урокановая к-та	0,1	30,8	97,9	1,1	1,2	95
Фенспирид	-0,6	34,3	109,2	1,1	1,3	90
<i>*Експериментальні похибки</i>	$\pm 0,1$	$\pm 1,8$	$\pm 2,3$	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	± 25

Параметр мембранотропної активності відображає зсув температури основного фазового переходу мембрани (який може бути позитивним або негативним), при введенні в систему 1 % домішки, тобто

$$a = (T_m - T_m^0) / c \quad (3.1)$$

де T_m^0 — температура фазового переходу модельної мембрани без БАС;

T_m — температура фазового переходу модельної мембрани з БАС;

c – концентрація БАС у масових або мольних відсотках.

Розмір кооперативного домену визначають за формулою [116]

$$CU = 4RT_m^2 / \Delta T^{1/2} \Delta H_m \quad (3.2)$$

де R — універсальна газова стала,

$\Delta T^{1/2}$ — напівширина піку основного фазового преходу,

ΔH_m — ентальпія основного фазового преходу.

Параметр $\Delta T^{1/2}$ відображає ступінь кооперативності фазового преходу: чим менше $\Delta T^{1/2}$ (більш вузький пік преходу), тим більш кооперативним є фазовий прехід.

Проведено систематичне дослідження низки біологічно активних субстанцій. Встановлено, що більшість БАС знижують T_m пропорційно до їх вмісту в мембрані (рис. 3.2), проте деякі речовини здатні підвищувати T_m , що відображається в збільшенні енергії ліпід-ліпідної взаємодії. Розглянемо випадки «типового» та «нетипового» впливу деяких з досліджених БАС.

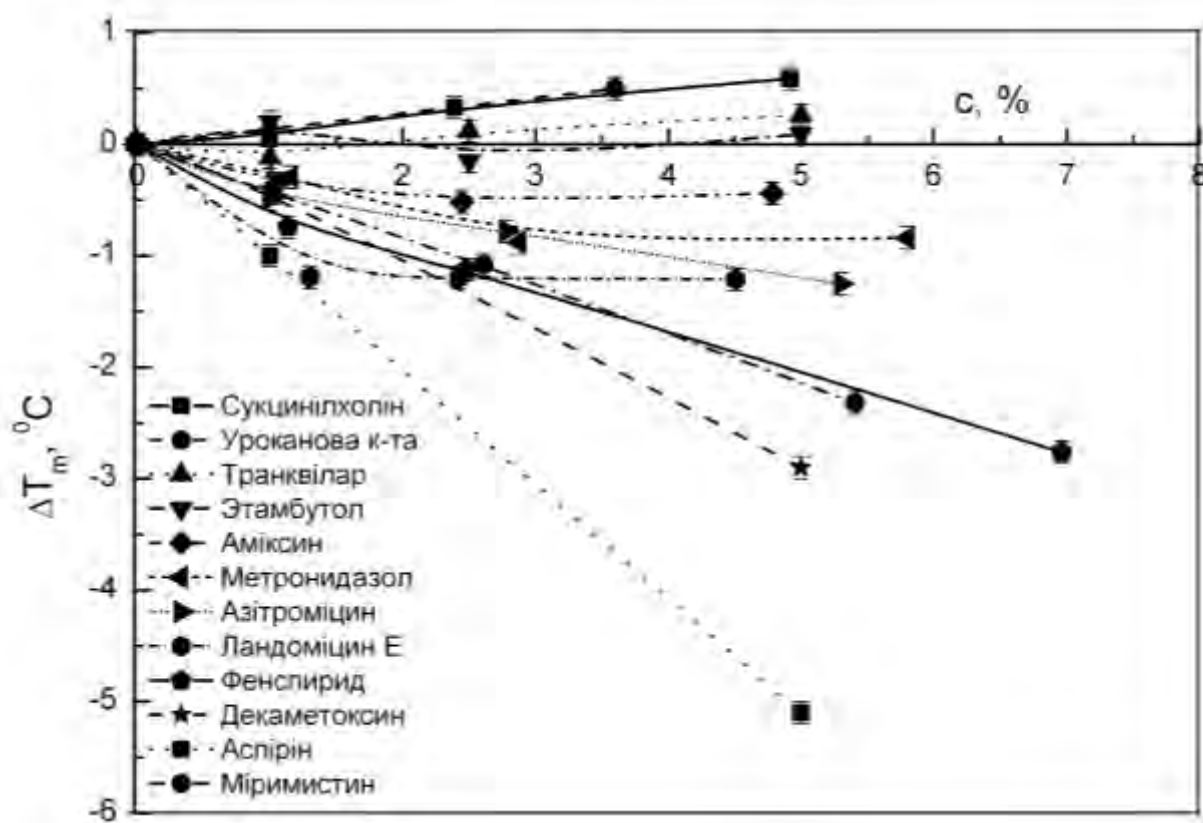


Рисунок 3.2. Концентраційні залежності температури основного фазового преходу модельних ліпідних мембран, що містять БАС

3.1. Індивідуальна мембранотропна дія лікарських субстанцій

3.1.1. Мірамістин

Мірамістин – лікарська субстанція антимікробної дії, що належить до групи катіонних детергентів. Висока проникаюча здатність мірамістину складає один з головних механізмів його протимікробної дії: вбудовуючись у клітинні мембрани мікроорганізмів, мірамістин підвищує їхню проникність, що, в свою чергу, призводить до цитолізу й загибелі мікроорганізму [117].

Мірамістин призводить до суттєвого зменшення температури основного фазового переходу ДПФХ мембран (рис. 3.3). Концентраційна залежність $\Delta T_m(c_{\text{мірамістин}})$ майже лінійна та не демонструє тенденції до насичення (див. рис. 3.1, а), що свідчить про добру змішуваність мірамістину із ліпідом. Варто уваги, що мірамістин дуже слабо впливає на значення ентальпії основного фазового переходу (рис. 3.3, б).

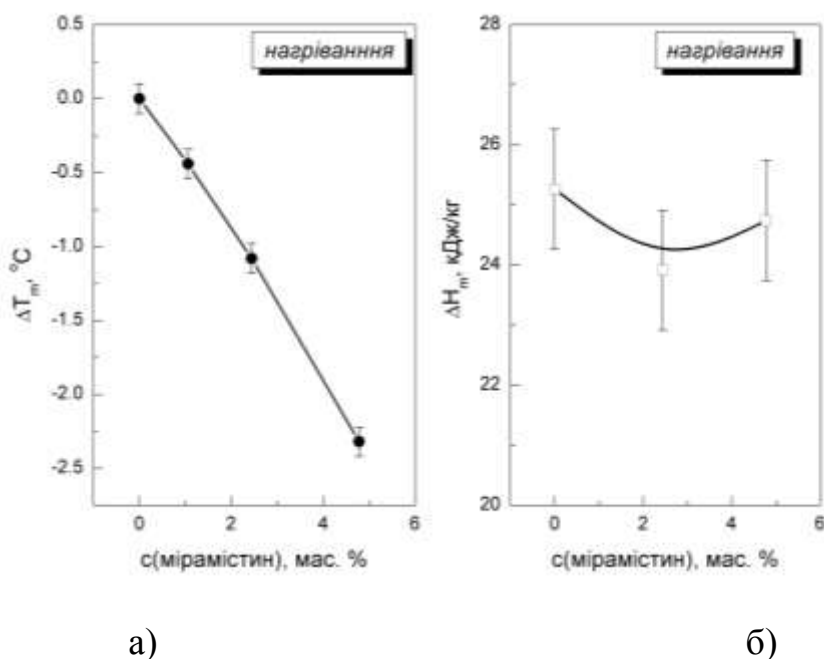


Рисунок 3.3. Концентраційні залежності зсуву температури основного фазового переходу (а) та ентальпії основного фазового переходу (б) для модельних мембран, що містить мірамістин

3.1.2. Азітроміцин

Азітроміцин це антибіотик широкого спектру дії. Залежність температури та ентальпії основного переходу модельної ліпідної мембрани, що містить азітроміцин, наведено на рис. 3.4. Як можна бачити, в області низьких концентрацій азітроміцину ($c_{аз}$) температура основного фазового переходу T_m суттєво знижується із підвищенням $c_{аз}$, тоді як в області більш високих $c_{аз}$ (вище 5 мас. %) хід цієї залежності більш пологий. При цьому ентальпія основного фазового переходу ΔH_m монотонно підвищується.

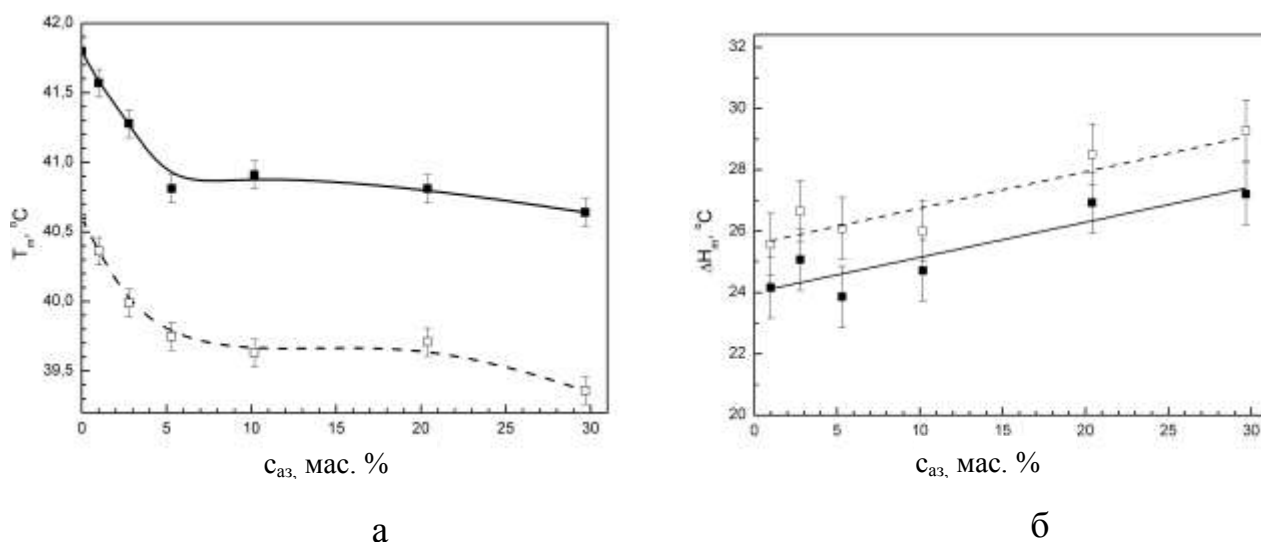


Рисунок 3.4. Залежність температури (а) та ентальпії (б) основного переходу модельної ліпідної мембрани, що містить азітроміцин, при нагріванні (■) та охолодженні (□)

Немонотонна концентраційна залежність T_m може бути пояснена особливостями встроювання азітроміцину у ДПФХ мембрану. Можна припустити, що при невеликих концентраціях (<5 мас. %) азітроміцин локалізується поблизу гідрофільно-гідрофобного інтерфейсу ліпідного бішару та суттєво впливає на значення T_m . При подальшому збільшенні концентрації, азітроміцин проникає глибше в гідрофобну область мембрани, де вуглеводневі ланцюги ліпідів менше впорядковані. При цьому вільний об'єм

центральної області ліпідної мембрани зменшується, що призводить до підвищення ΔH_m без суттєвих змін T_m .

Можна відзначити, що латеральне розподілення азітромцііна в ліпідній мембрані відбувається досить однорідно, без індукування фазового розділення ліпідів. Про це свідчить збереження одного піку фазового переходу та незначні зміни його гістерезису в усьому досліджуваному концентраційному діапазоні.

3.1.3. Доксوروبіцин та ландоміцин Е

На рис. 3.5. наведено термограми ДСК модельних ліпідних мембран із ландоміцином Е та доксوروبіцином. Ландоміцин Е є новою протираковою субстанцією, а доксوروبіцин широко застосовується при лікуванні деяких видів раку.

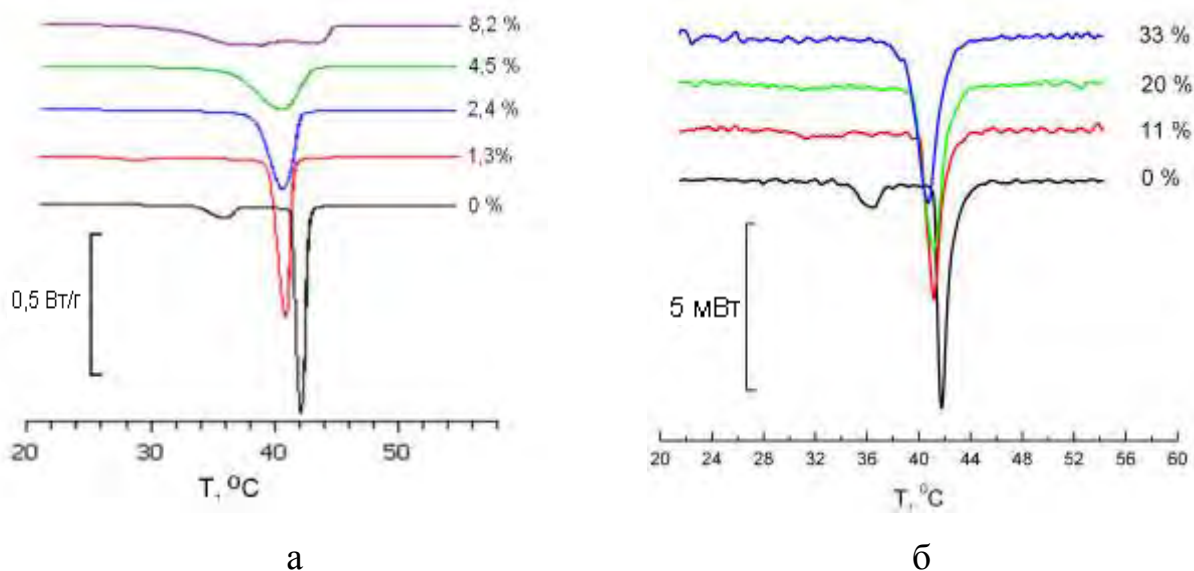


Рисунок 3.5. Термограми ДСК для модельних ліпідних мембран з ландоміцином Е (а) та доксوروبіцином (б) у режимі нагріву

Ландоміцин Е визиває значне розмиття піку основного фазового переходу та зниженням ентальпії вже на концентраціях ~ 4 мас. %. На відміну від нього,

у доксорубіцина навіть при концентрації 33 мас. % пік основного фазового переходу чітким і гострим. Доксорубіцин слабо впливає на напівширину піку, а отже і на параметр кооперативності фазового переходу.

Для доксорубіцину зниження T_m лінійно із концентрацією (аж до 33 мас. %), рис. 3.6, натомість, для ландоміцину Е концентраційна залежність T_m виходить на насичення при ~ 2 мас. % (в режимі нагріву), рис. 3.7, і пік основного фазового переходу сильно розмивається з подальшим збільшенням концентрації.

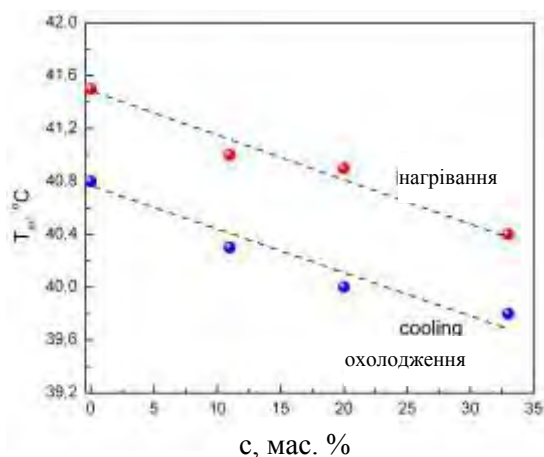


Рисунок 3.6. Концентраційна залежність T_m модельної ліпідної мембрани з доксорубіцином

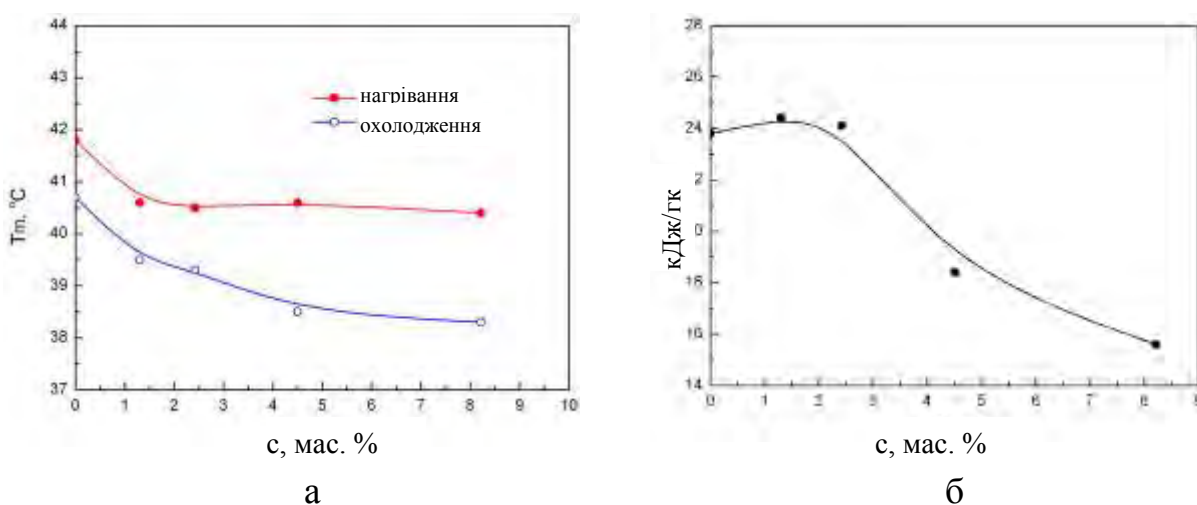


Рисунок 3.7. Концентраційні залежності температури T_m (а) та ентальпії основної фазового переходу ΔH_m (б) ДПФХ мембрани з ландоміцином Е

Тож, ландоміцин Е значно сильніше дестабілізує ліпідну мембрану в порівнянні із доксорубіцином. На основі отриманих залежностей (рис. 3.5-3.7) можна зазначити, що ландоміцин Е та доксорубіцин ведуть себе як типові мембранотропні агенти – зменшують температуру основного фазового переходу ліпідних мембран, знижують ентальпію та призводять до зникнення передпереходу. Останній факт свідчить про переважну взаємодію досліджуваних БАС із полярною областю мембрани.

3.1.4. Сукцинілхолін

Сукцинілхолін - єдиний недеполяризуючий міорелаксant, що застосовується в клінічній практиці [118, 119]. ДСК-термограми ДПФХ мембран, що містять сукцинілхолін, представлені на рис. 3.8. З підвищенням концентрації сукцинілхоліну (від 0% до 5%), піки передпереходу та основного фазового переходу розмиваються, при цьому основний перехід зміщується у високотемпературну область, а передперехід – у низькотемпературну.

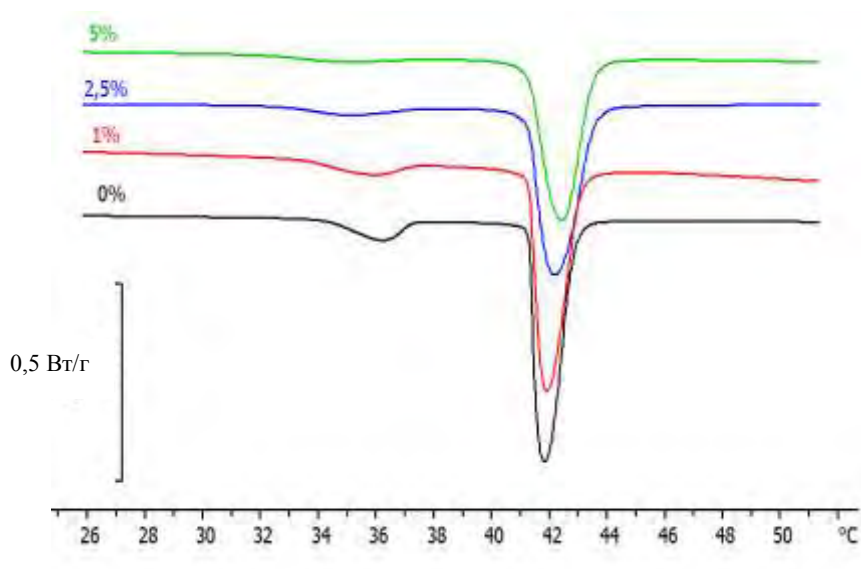


Рисунок 3.8. ДСК-термограми ДПФХ мембран із сукцинілхоліном

Концентраційні залежності зсуву температур основного фазового переходу (ΔT_m) і предпереходу (ΔT_p) представлені на рис. 3.9. Сукцинілхолін розширює температурну область існування P_β -фази, тобто стабілізує її за рахунок низькотемпературної L_β -фази. Підвищення T_m свідчить про ущільнення упаковки ліпідів у L_α -фазі, що може призводити до підвищення мікров'язкості мембрани.

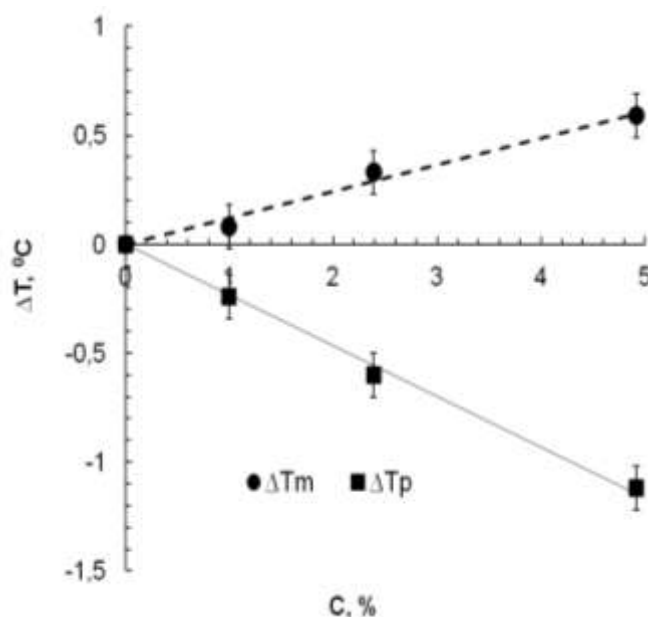


Рисунок 3.9. Зсув температур основного фазового переходу і предперехода в залежності від концентрації сукцинілхоліну

3.1.5. Транквілар

Транквілар – психотропний препарат з широким спектром дії, що має властивості транквілізатора, антидепрессанта, тощо [120, 121].

На термограмах модельних мембран ДПФХ з транквіларом чітко реєструються два піки: предперехід та основний перехід (рис.3.10).

Транквілар у концентрації до 5% майже не впливає на значення T_p , T_m , але призводить до зростання ентальпії основного переходу, що говорить про підвищення енергії взаємодії ліпід-ліпід. Зі збільшенням концентрації транквілару в мембрані спостерігається тенденція до підвищення гистерезису основного фазового переходу.

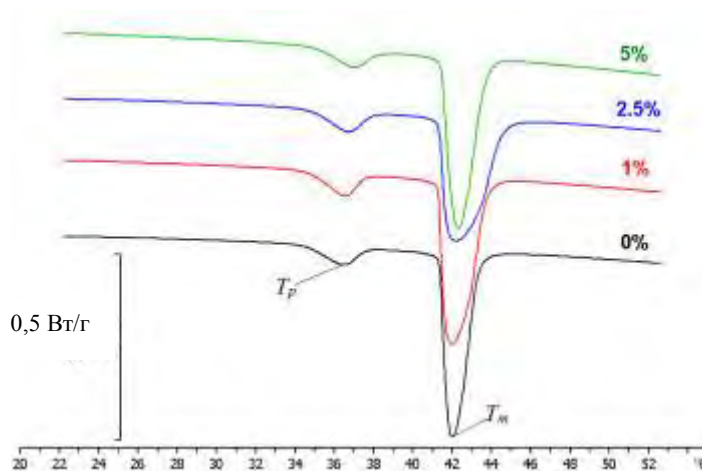


Рисунок 3.10. ДСК термограми модельних мембран, що містять транквілар

3.1.6. Нітрат срібла

Відомо [122, 123], що срібло проявляє антибактеріальну активність тільки в іонній формі. У фармакології срібло застосовується у вигляді іонних розчинів або нанорозмірних металевих частинок, що дисоціюють на іони, потрапляючи у водне середовище [124, 125]. Однією з ефективних фармацевтичних форм препаратів срібла є «Протаргол» – препарат на основі протеїну, де іони срібла відіграють роль протиіонів білкової компоненти.

Було досліджено вплив нітрату срібла на мембрани ДПФХ. Отримані ДСК-термограми (рис. 3.11) свідчать про незвичайну концентраційну залежність: на фоні загального підвищення температури основного фазового переходу мембран спостерігається поява нового високотемпературного піку, що свідчить про утворення нової фази ліпиду. Збільшення гістерезису з концентрацією нітрату срібла свідчить про зростання латеральної неоднорідності ліпідної мембрани.

При підвищенні концентрації AgNO_3 спостерігається перерозподіл інтенсивностей обох піків, причому за досягнення певного мольного співвідношення ДПФХ: AgNO_3 (1:3) «низькотемпературний» пік зникає. Виходячи з цього можна приблизно оцінити склад високотемпературної фази, в якій на 1 молекулу ДПФХ припадає 3 молекули нітрату срібла. Варто уваги,

що це співвідношення подібно до стехіометрії ортофосфату срібла Ag_3PO_4 [126], а в молекулі ДПФХ саме негативно заряджений залишок ортофосфорної кислоти є найбільш вірогіднішим місцем зв'язування іонів срібла [127].

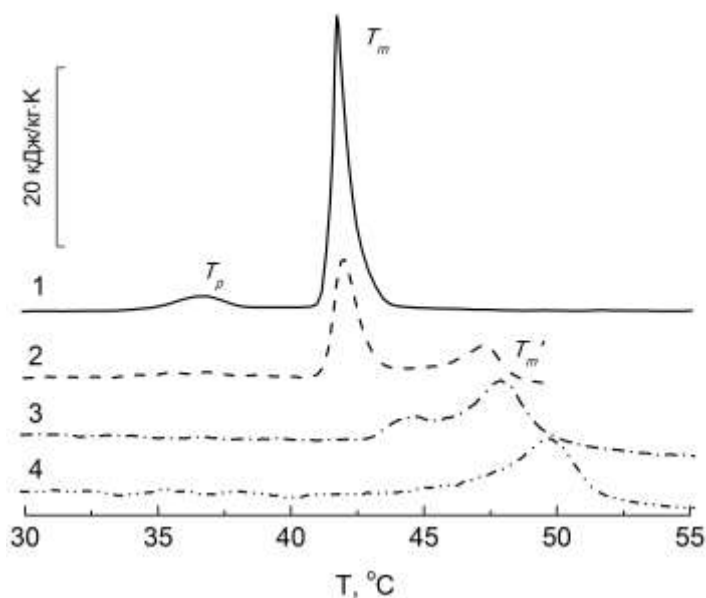


Рисунок 3.11. Питома теплоємність мультибішарів ДПФХ при нагріванні: 1 – ДПФХ, 2 – ДПФХ: AgNO_3 (3:1), 3 – ДПФХ: AgNO_3 (1:2), 4 – ДПФХ: AgNO_3 (1:3) (у дужках наведені мольні співвідношення компонентів)

Таким чином, зв'язування Ag^+ із залишком ортофосфорної кислоти, певно, призводить до часткової дегідратації полярної «голівки» ДПФХ, що, в свою чергу, сприяє з'явленню ущільнених ділянок бішару із підвищеною температурою фазового переходу. Докладніше концентраційні залежності піків фазових переходів відображено на рис. 3.12, з якого видно, що обидва піки мають чітку тенденцію до високотемпературного зсуву при підвищенні концентрації нітрату срібла. Приймаючи до уваги, що дія нітрат-іону на T_m ліпідної мембрани протилежна до дії іону срібла [2], можна зробити висновок, що високотемпературний зсув піків зумовлений дією саме іонів срібла.

Суттєво, що всі відзначені ефекти спостерігаються при концентраціях нітрату срібла, значно вищих за терапевтичну (2 мас. %). На рівні живої клітини неоднорідність ліпідного бішару сприяє зміні ліпідного оточення мембранних білків (і, як наслідок, їх функціонування), а також складу внутрішньоклітинного іонного середовища внаслідок збільшення проникності ліпідної мембрани на дефектах у місцях контакту двох фаз. Усі ці процеси мають безпосередній та суттєвий вплив на життєдіяльність клітини. Можна припустити, що цей вплив є однією зі складових антибактеріальної дії іонів срібла.

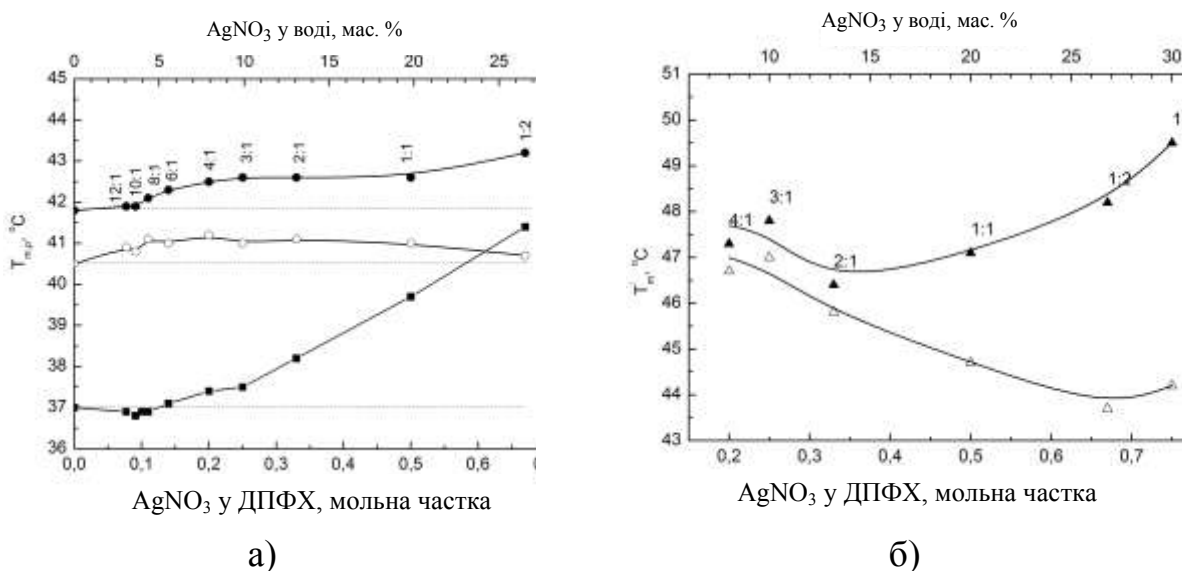


Рисунок 3.12. Залежності значень температур піків фазових переходів мембрани ДПФХ від вмісту нітрату срібла: а) T_m (\bullet , \circ) та T_p (\blacksquare); б) T_m' (\blacktriangle , \triangle) (відкриті символи відповідають значенням, що отримані при охолодженні; пунктирними лініями відзначені відповідні значення T_m та T_p для чистого ДПФХ; у підписах експериментальних точок вказані мольні співвідношення ДПФХ: AgNO_3)

3.1.7. Фенібут

Фенібут належить до психостимулюючих та ноотропних засобів, він покращує функціональний стан мозку за рахунок нормалізації метаболізму тканин та впливу на мозковий кровообіг, має транквілізуючу,

психостимулюючу [128], антиоксидантну дію і імуномодулюючі властивості [129]. Його фізико-хімічна особливість полягає в тому, що, незважаючи на свою гідрофільність, він легко долає клітинні бар'єри, навіть гемато-енцефалічний [130, 131].

Уведення фенібуту до ДПФХ мембран призводить до розщеплення піку основного переходу на складові (рис. 3.13). У результаті цифрової обробки отриманих термограм за допомогою програми «QtiPlot», було встановлено, що оригінальний пік містить три складові: 1 – високотемпературну, 2 – середню (майже незмінну відносно вивідної модельної ліпідної мембрани), 3 – низькотемпературну.

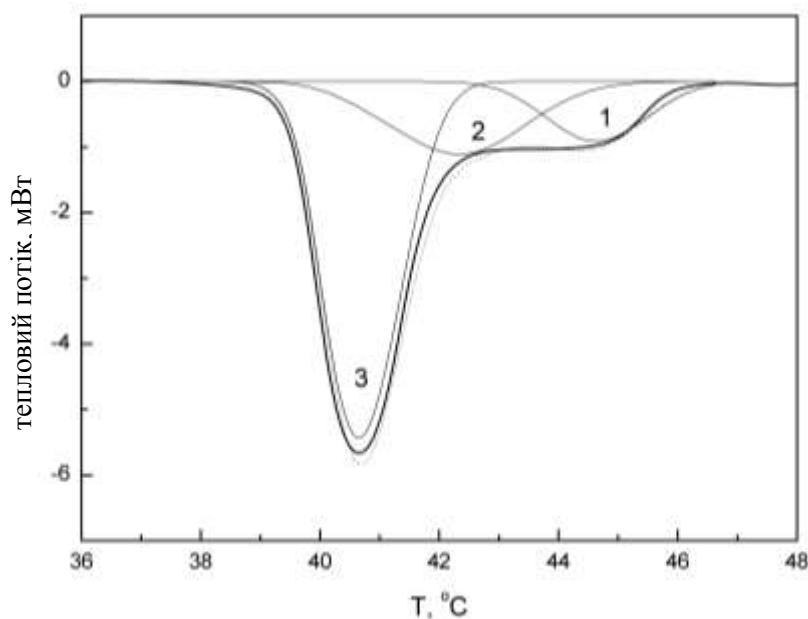


Рисунок 3.13. ДСК-термограма модельної ліпідної мембрани із вмістом 5 мас. % фенібуту (товста лінія) та її складові, отримані в результаті розщеплення (тонкі лінії) та оригінальна крива (пунктирна лінія). 1 – високотемпературний пік, 2 – «середній» пік, 3 – низькотемпературний пік

Розщеплення саме на таку кількість складових є адекватним, оскільки збіг оригінальної кривої із експериментальною дуже добрий ($\geq 0,997$). Очевидно, що пік 1 відповідає ущільненій фазі ліпідів, пік 2 – вивідній

модельній ліпідній мембрані, а пік 3 – розрідженій фазі. З підвищенням концентрації фенібуту відбувається перерозподіл відносного внеску окремих складових у характеристики фазового переходу (рис. 3.14).

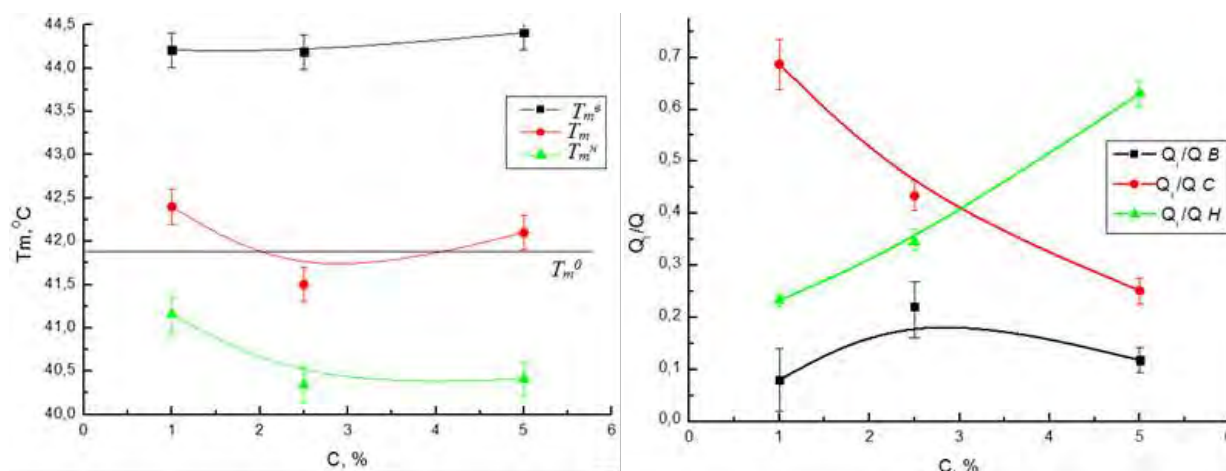


Рисунок 3.14. Концентраційні залежності температур піків – складових основного фазового переходу (а) та доля кожного піку Q_i відносно загальної площі піків Q (б) для модельних мембран, що містять фенібут

Більш детально мембранотропну дію фенібуту, а також деяких інших БАС розглянуто в розділі 4.

3.2. Зміна проникності клітин для води в присутності лікарських речовин

Взаємодія БАС з ліпідними мембранами може призводити до зміни проникності мембрани для води. Цей ефект можна спостерігати *in vitro* на клітинах, у мембранах яких відсутні аквапоріни, і, отже, транспорт води відбувається шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар. У даній роботі була застосована методика [106], де в якості модельних клітин використовувалися сперматозоїди коропа. Відповідно до теоретичної моделі [68], динаміка відносного об'єму клітини в гіпо- або гіпертонічному розчині речовини описується залежністю:

$$\frac{V - V_0}{V_0} = \frac{1 - \alpha}{\pi^{out}} (\pi_0^{in} - \pi^{out}) [1 - \exp(-\mathcal{L}_p \pi^{out} t)] \quad (3.3)$$

де V – поточне значення об'єму клітини в момент часу t ,
 π_0^{in} – осмотичний тиск цитоплазми (внутрішньоклітинний осмотичний тиск),

π^{out} – осмотичний тиск розчину речовини, в якому знаходиться клітина,

α – частина осмотично неактивного об'єму клітини,

γ – поверхнево-об'ємне відношення для клітини,

L_p – проникність клітинної мембрани для молекул води.

Відповідно до рівняння Арреніуса, залежності логарифму проникності від оберненої абсолютної температури дозволяють визначити значення енергії активації переносу води через ліпідну мембрану (E_a).

Як можна бачити (рис. 3.15), у присутності аміксину спостерігається

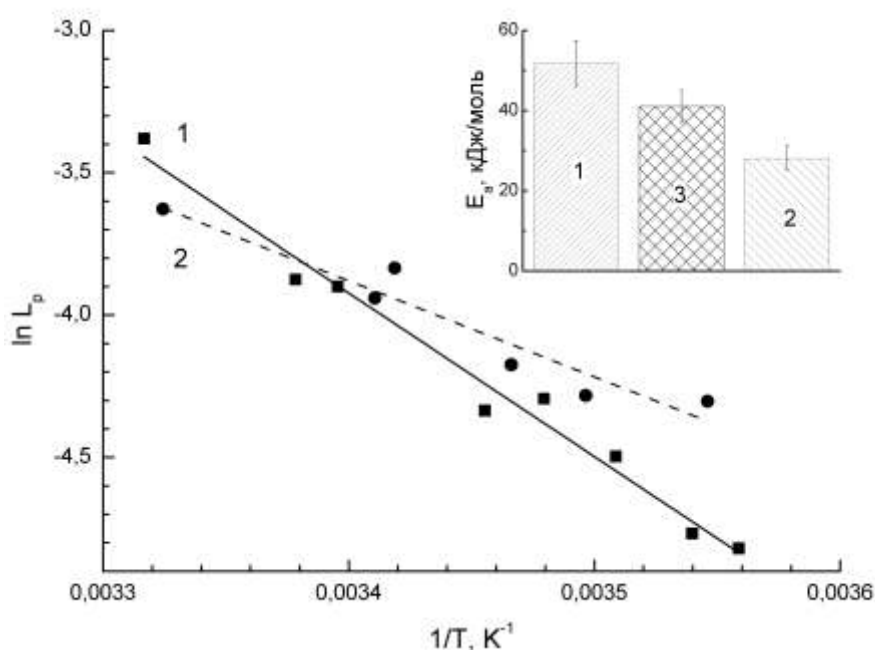


Рисунок 3.15. Проникність клітинної мембрани сперматозоїдів коропа для води (L_p) і значення енергії активації переносу води через ліпідну мембрану (E_a) в фізіологічному розчині (1), та при додаванні 5 мас. % аміксину (2) та фенібуту (3)

зниження E_a на $\sim 40\%$, що добре корелює зі зниженням (ΔT_m). Введення фенібуту в суспензію сперматозоїдів коропа призводить до зниження E_a на $\sim 25\%$. Така зміна проникності може бути обумовлена підвищенням латеральної неоднорідності мембрани внаслідок утворення доменів різної щільності.

3.3. Індивідуальна мембранотропна дія кріопротекторів на основі похідних гліцерину

3.3.1. Термодинамічні властивості модельної ліпідної мембрани на водно-гліцериновій субфазі

Наступним кроком було дослідження мембранотропної дії кріпоротектору гліцерину. На рис. 3.16 наведено ДСК термограми системи ДПФХ/вода/гліцерин при варіюванні концентрації гліцерину у водно-гліцериновій суміші (система 40%ДПФХ+60%(вода+гліцерин)).

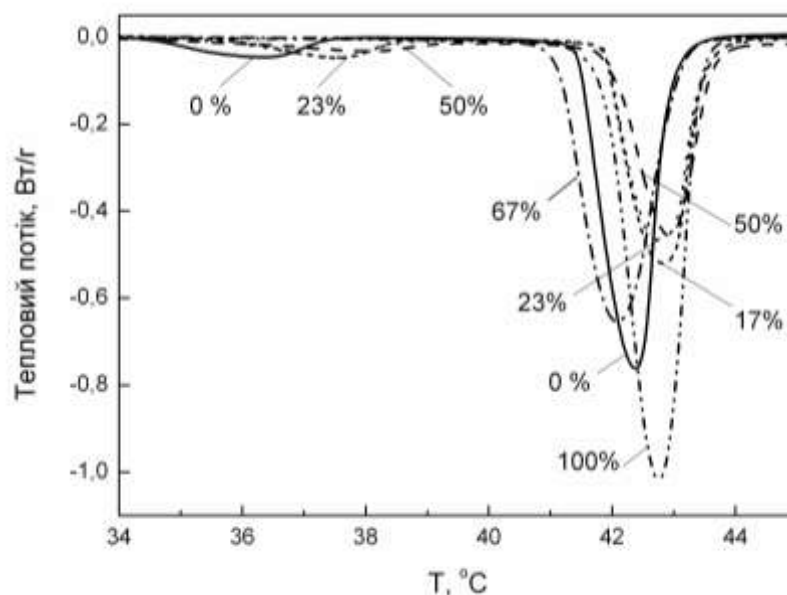


Рисунок 3.16. ДСК термограми модельних ліпідних мембран на водно-гліцериновій субфазі. Цифрами показано вміст гліцерину у водно-гліцериновій суміші (субфазі)

Важливим результатом є збереження піку основного фазового переходу ДПФХ мембрани з підвищенням концентрації гліцерину в системі аж до повної заміни води цим кріопротектором. Концентраційна поведінка T_m та T_p є немонотонною, рис. 3.17. Рост концентрації гліцерину до 50 мас. % призводить до зростання T_m . При вмісті гліцерину >60 мас. % передперехід зникає.

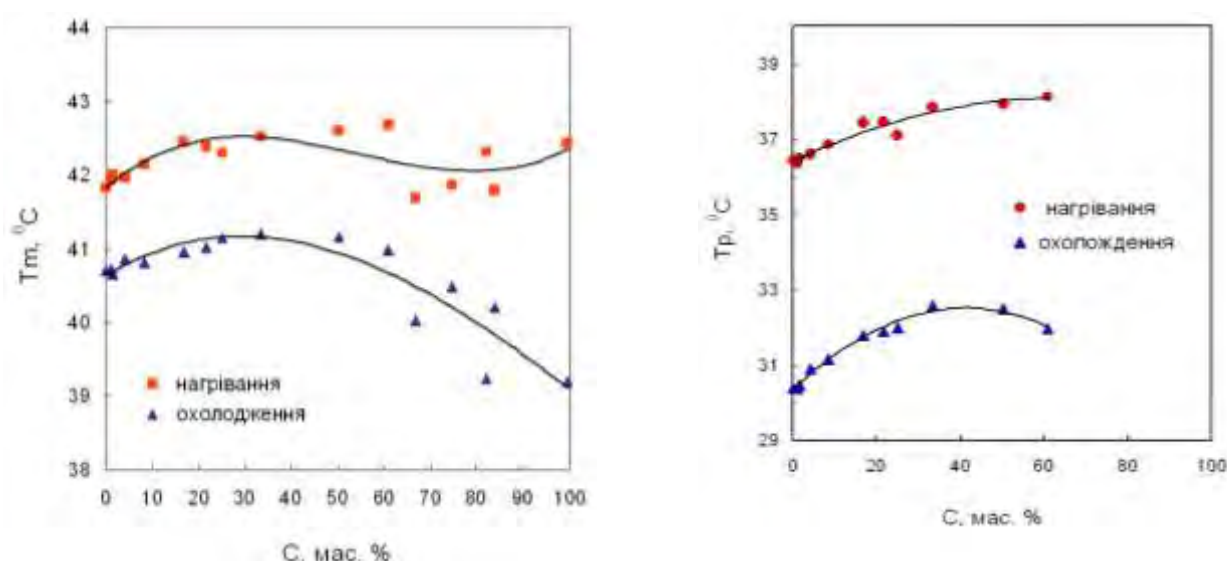


Рисунок 3.17. Залежності температури основного (а) та передпереходу (б) модельної ліпідної мембрани від концентрації гліцерину у водно-гліцериновій субфазі

Зростання T_m ліпідної мембрани при введенні БАС – це незвичайне явище, адже переважна більшість речовин призводить до протилежного ефекту. Якщо говорити в термінах фізики рідких кристалів, то зазвичай немезогені домішки порушують надмолекулярне впорядкування в рідкому кристалі, що призводить до зниження температур мезоморфних фазових переходів системи. Але за умов специфічних міжмолекулярних взаємодій (наприклад, комплексоутворення), або стеричних ефектів упаковки між молекулами рідкого кристалу та домішки можливо зростання орієнтаційного впорядкування в системі, що призводить до підвищення температури

мезоморфного фазового переходу. У випадку ліотропних рідких кристалів ще одним фактором, що може призводити до підвищення T_m , є зменшення гідратації полярної області мембрани. Так, було продемонстровано зростання T_m ліпідної мембрани в присутності катіонів лужних металів першої підгрупи Li^+ та Na^+ [132-139]. Цей ефект було пояснено дегідратацією полярних голівок ДПФХ, що призводило до зменшення ефективної площі полярної голівки в розрахунку на одну молекулу ліпиду [138].

Немонотонна концентраційна поведінка встановлена для гістерезису та ентальпії, рис. 3.18. Обидві величини слабо змінюються до певної концентрації гліцерину (~80% для гістерезису та ~60% для ентальпії), а потім різко зростають. Виходячи із літературних даних [49, 73, 78, 140-144], виражене зростання ентальпії ліпідної мембрани свідчить про утворення нової інтердігітованої гель-фази.

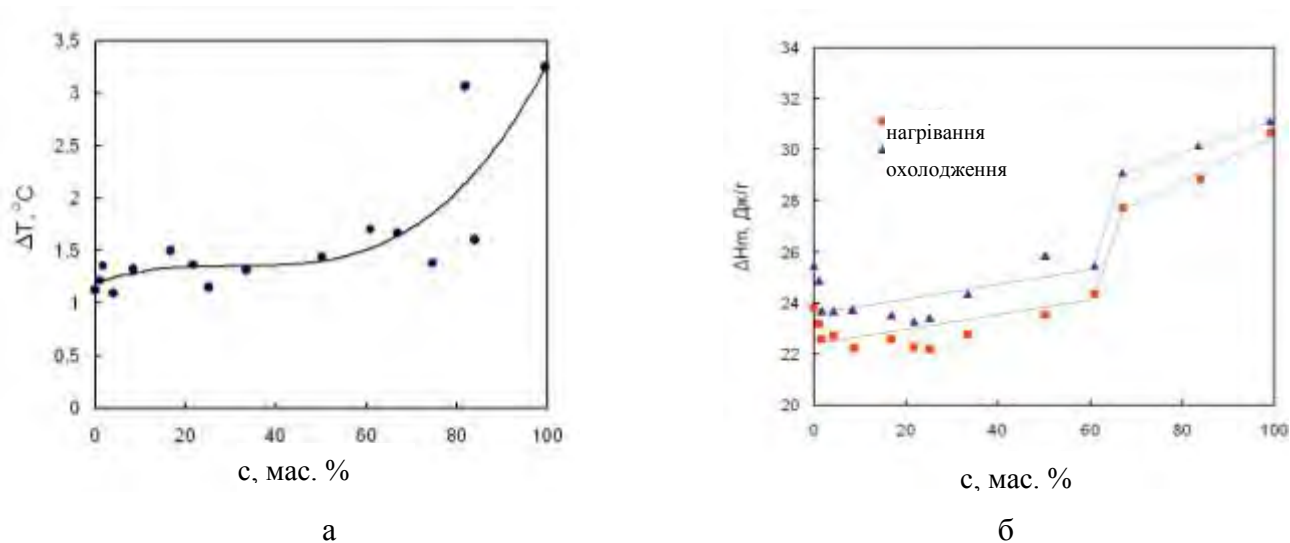


Рисунок 3.18. Залежність гістерезису (а) та ентальпії (б) основного переходу модельної мембрани від концентрації гліцерину у водно-гліцириновій субфазі

Формування інтердігітованої фази в системі ДПФХ/вода/гліцерин було підтверджено даними рентгенівської дифракції та раманівської спектроскопії [142, 143]. Рис. 3.19 демонструє структурні зміни, які відбуваються в ліпідній мембрані при переході ліпідів у інтердігітовану фазу. У цій фазі гідрофобні

ланцюги ліпідів із протилежних шарів мембрани заходять один в одного, що призводить до більш щільного пакування молекул та збільшення енергії Ван-дер-Ваальсової взаємодії між ліпідними хвостами і, відповідно, до зростання ентальпії ліпідного бішару. При цьому товщина ліпідної мембрани зменшується [141-143].

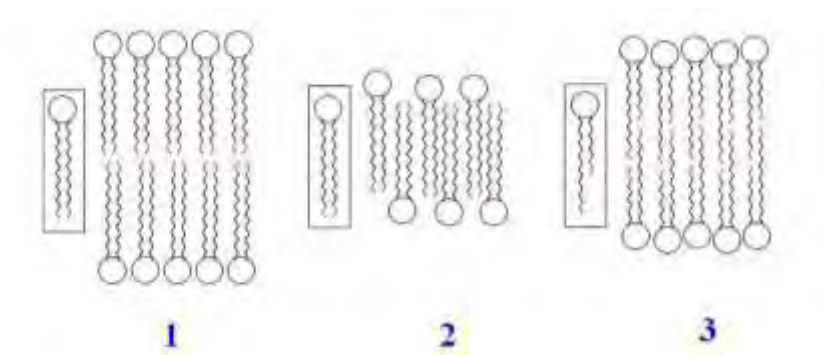


Рисунок 3.19. Схематичне зображення ліпідної мембрани у фазі гелю (1) та при повній (2) або частковій (3) інтердигітації молекул ліпідів

На основі отриманих даних було побудовано фазову діаграму ДПФХ мембрани на водно-гліцериновій субфазі, рис. 3.20.

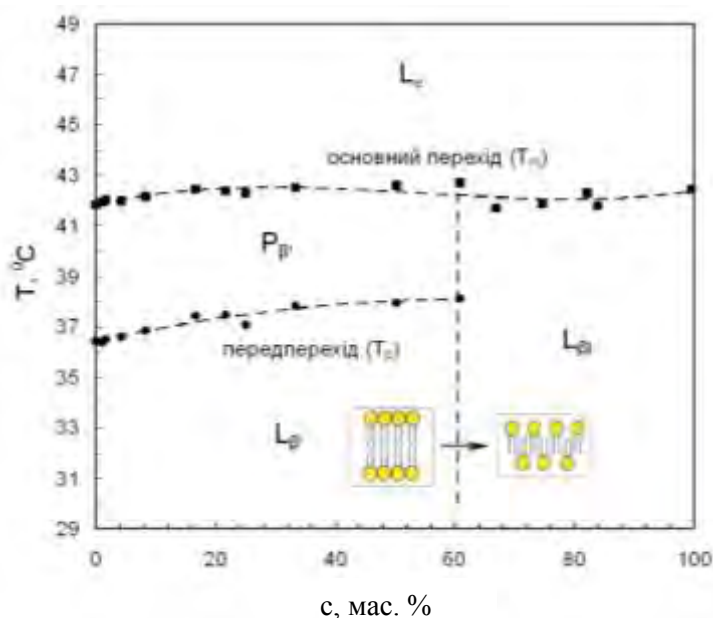


Рисунок 3.20. Фазова діаграма мембран на водно-гліцериновій субфазі при різному вмісті гліцерину в субфазі. L_α – рідкокристалічна фаза, L_β – фаза гелю, P_β – складчаста фаза, $L_{\beta I}$ – інтердигітована фаза

Гліцерин (при концентрації в субфазі ≥ 60 мас. %) індукує фазовий перехід ДПФХ мембрани із неітердігрованої до ітердігрованої фази гелю, що супроводжується зростанням ентальпії основного фазового переходу та зникненням піку передпереходу на ДСК термограмах.

3.3.2. Дослідження ІЧ спектрів модельної ліпідної мембрани на водно-гліцериновій субфазі

Наступним кроком було дослідження інфрачервоних (ІЧ) спектрів мембран ДПФХ на водно-гліцериновій субфазі. Типовий вигляд таких ІЧ спектрів на рис. 3.21. Аналіз ІЧ спектрів ДПФХ мембран ускладнюється перекриванням частот коливань деяких функціональних груп ліпиду з частотами коливань води, які мають значну інтенсивність.

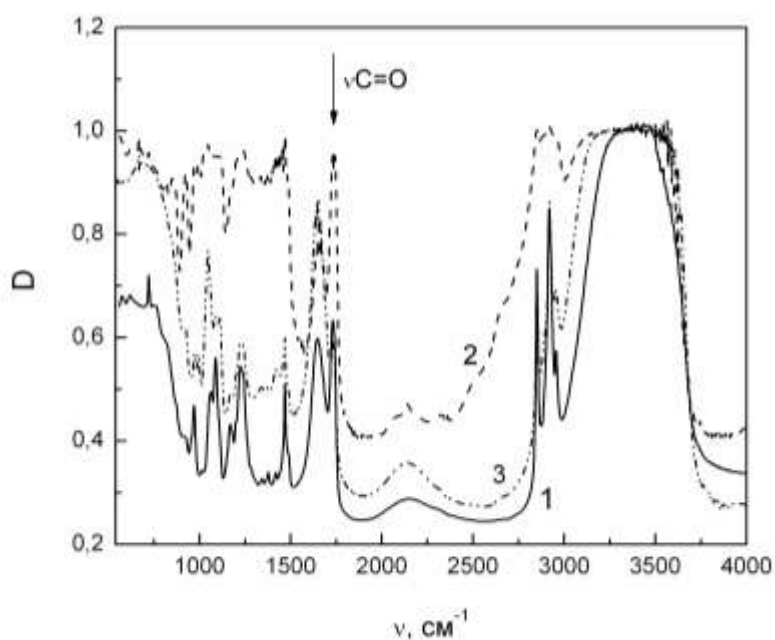


Рисунок 3.21. Нормалізовані ІЧ спектри ДПФХ мембрани на водній (1), гліцериновій (2) та на водно-гліцериновій субфазі з вмістом гліцерину 22 мас. % (3). Стрілкою позначена смуга валентних коливань карбонільної групи ДПФХ ($\nu\text{C=O}$)

Співвідношення смуг в ІЧ-спектрах ДПФХ мембрани було зроблено згідно з [145]. Для більшості ІЧ смуг ДПФХ не було відмічено значних змін при зростанні концентрації гліцерину в субфазі. Виняток являла смуга валентних коливань карбонільної групи.

Згідно з [146, 147] широка смуга коливань $\nu\text{C=O}$ складена із двох близько розташованих смуг, при цьому низькочастотна смуга відповідає карбонільним групам, що утворюють водневий зв'язок з молекулами води (або іншої речовини), а високочастотна – з «вільними» карбонільними групами, тобто з тими, що не утворюють водневий зв'язок.

Кількісне визначення «зв'язаних» та «вільних» карбонільних груп є складною задачею, але можлива якісна оцінка. Для цього в роботах [145, 146] запропоновано використовувати співвідношення площин ІЧ смуг «зв'язаних» (S_b) та «вільних» (S_f) карбонільних груп S_b/S_f . Для досліджуваних систем ДПФХ/вода/гліцерин такий параметр було розраховано, рис. 3.22.

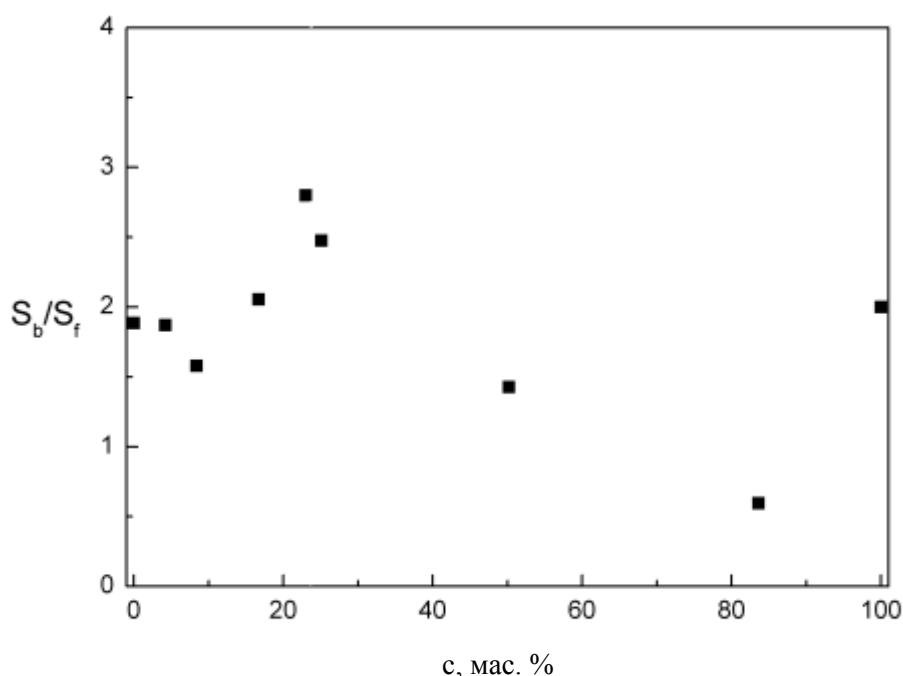


Рисунок 3.22. Залежність параметру S_b/S_f від вмісту гліцерину у водно-гліцериновій субфазі

Можна відмітити, що карбонільні групи ДПФХ ефективно утворюють водневі зв'язки як з водою, так і з гліцерином, що підтверджено близькими значеннями параметра S_b/S_f для водної та гліцеинової субфаз. Значення параметру S_b/S_f від вмісту гліцерину у водно-гліцеиновій суміші є немонотонною та неадитивною функцією концентрації.

3.3.3 Термодинамічні властивості ліпідних мембран на субфазі вода-ОЕГ_n

Оксиетильований гліцерин зі ступенем полімеризації 5, 25 та 30 (ОЕГ_{n=5}, ОЕГ_{n=25} та ОЕГ_{n=30}) було отримано в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). На відміну від «традиційного» кріопротектору гліцерину, його оксиетильовані похідні не проникають усередину клітин, тобто мають екзоцелюлярний тип дії [148-150].

Термограми ДСК для ДПФХ мембран на субфазі вода-ОЕГ_{n=5} з різним вмістом ОЕГ_{n=5} наведено на рис. 3.23. Для систем ДПФХ/вода/ОЕГ_{n=25} та ДПФХ/вода/ОЕГ_{n=30} термограми ДСК мають якісно аналогічний вигляд.

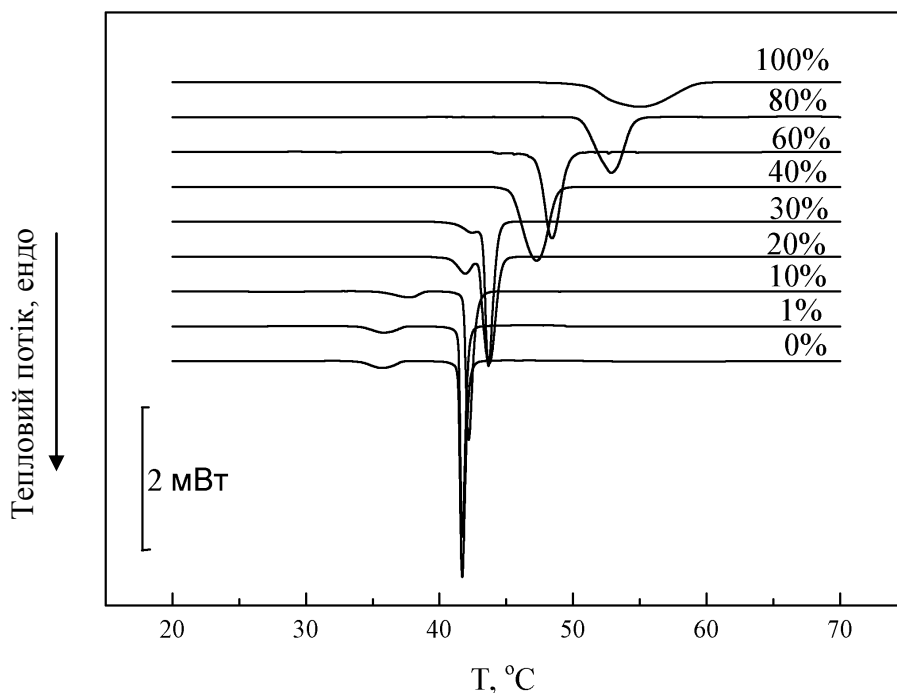


Рисунок 3.23. ДСК термограми модельних ліпідних мембран на субфазі вода-ОЕГ_{n=5}. Цифри відображають масову концентрацію ОЕГ_{n=5} у субфазі

При додаванні в субфазу OEG_n ($n=5, 25$ и 30) для всіх трьох систем характерним є збереження піку основного фазового переходу у всьому концентраційному діапазоні аж до повного заміщення води на OEG_n . При підвищенні концентрації OEG_n у субфазі температури фазових переходів модельної ліпідної мембрани зростають (рис. 3.24), при цьому T_p зростає сильніше, ніж T_m , що свідчить про переважну взаємодію кріопротекторів з полярною областю мембарни.

Пік основного переходу при концентрації OEG_n в субфазі > 30 мас. % розмивається, що свідчить про зниження кооперативності, але зберігається до ~ 100 мас. % OEG_n . Зі збільшенням концентрації $\text{OEG}_{n=5}$ зростання T_m близько к лінійному, а для $\text{OEG}_{n=25}$ и $\text{OEG}_{n=30}$ можна виділити дві ділянки: $0 \div \sim 40$ мас. % OEG_n в субфазі – ріст T_m незначний, $40 \div 100$ мас. % – T_m зростає більш круто.

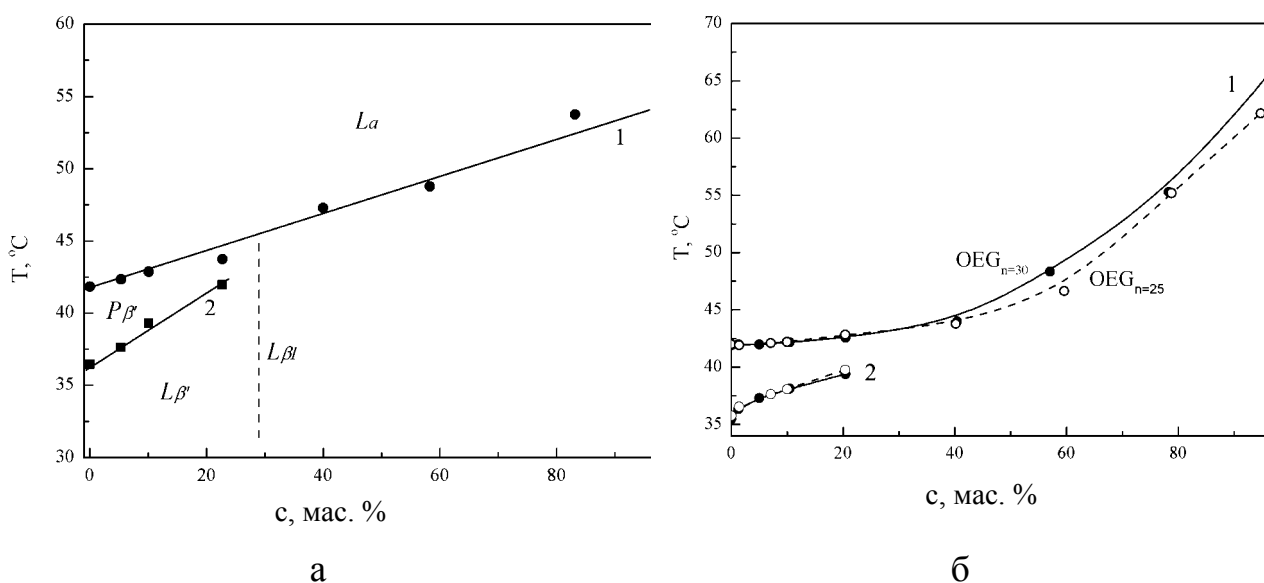


Рисунок 3.24. Залежність температур основного фазового переходу (1) і передпереходу (2) систем ДПФХ/вода/ $\text{OEG}_{n=5}$ (а) та ДПФХ/вода/ $\text{OEG}_{n=25}$ і ДПФХ/вода/ $\text{OEG}_{n=30}$ (б) від концентрації OEG_n

Максимальне збільшення T_m складає 25 °C при $\sim 100\%$ $\text{OEG}_{n=30}$. Можна припустити, що кріопротектори групи OEG_n , як і гліцерин, призводять до

інтердигітації ліпідної мембрани, причому, якщо судити по зникненню передпереходу, при меншій концентрації (~30 мас. %), ніж гліцерин (~60 мас. %). Проте, дані по ентальпії основного переходу ліпідної мембрани підтверджують це припущення тільки для системи ДПФХ/вода/ОЕГ_{n=5}: стрибок ΔH_m от ~24 Дж/г до ~34 Дж/г має місце при підвищенні концентрації кріопротектору в субфазі від 20 до 40 мас. % (рис. 3.25), що відповідає саме концентраційній області зникнення проміжної фази. Для систем ДПФХ/вода/ОЕГ_{n=25} і ДПФХ/вода/ОЕГ_{n=30} вираженого стрибка ΔH_m на концентраційній залежності не спостерігається.

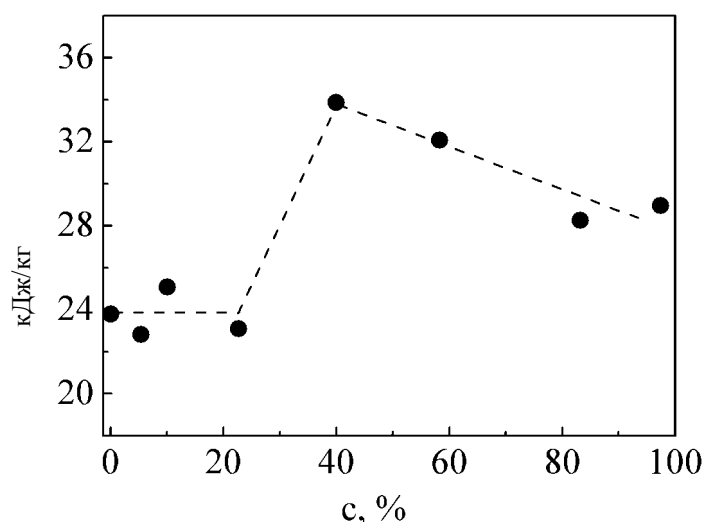


Рисунок 3.25. Залежність ентальпії модельної ліпідної мембрани на субфазі вода/ОЕГ_{n=5} від концентрації кріопротектору

Залежність ΔT_m від вмісту кріопротектору в субфазі для всіх досліджуваних систем наведено на рис. 3.26. Порівняно із гліцерином, ОЕГ_n набагато сильніше впливає на T_m . Можна відзначити, що характер залежності ΔT_m від ступеню полімеризації кріопротектору n , розрізняється в діапазоні малих (до 30-40 мас. %) і великих (більше 40 мас. %) концентрацій ОЕГ_n. На малих концентраціях ОЕГ_{n=5} визиває сильніше підвищення T_m , ніж ОЕГ_{n=25} та ОЕГ_{n=30}. В області великих концентрацій кріопротектору підвищення

температури основного фазового переходу ліпідної мембрани збільшується в напрямку: $\text{OEG}_{n=5} < \text{OEG}_{n=25} < \text{OEG}_{n=30}$.

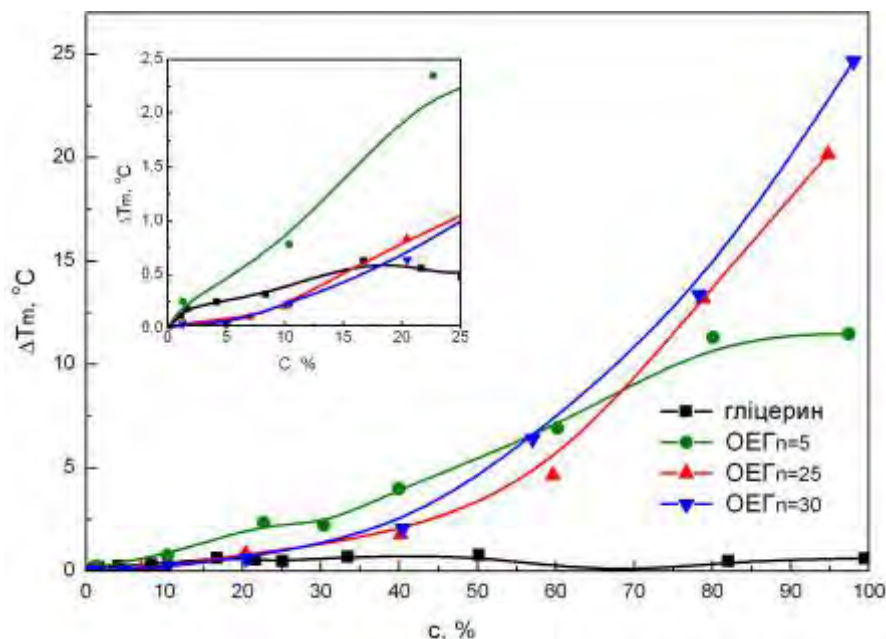


Рисунок 3.26. Зміна температури основного фазового переходу ліпідної мембрани з ростом концентрації кріопротектору в субфазі. На вставці більш детально наведено область малих концентрацій кріопротекторів

Факт суттєвого підвищення T_m ДПФХ мембрани в присутності OEG_n сам по собі є дуже цікавим, адже більшість речовин при введенні в модельну ліпідну мембрану визиває протилежний ефект. Щоб знайти пояснення цьому явищу, для досліджуваних систем було побудовано залежності T_m від концентрації води (рис. 3.27). T_m повністю гідратованого ДПФХ (від ~30 мас. % води і віще) має сталі значення [54, 55, 145]. При прогресуючій дегідратації, коли кількість води в системі ДПФХ+вода стає менше ніж ~30 мас. % (що відповідає ~18 молекулам води на 1 молекулу ДПФХ), T_m різко зростає (досягаючи ~110 °C для сухого ДПФХ [145]) за рахунок збільшення за Ван-дер-Ваальсових взаємодій між гідрофобними ланцюгами ліпідів при зменшенні площі перерізу полярної «голівки» ліпиду [73].

В системах ДПФХ/вода/ОЕГ_n при зменшенні кількості води (при заміщенні води кріопротектором) спочатку спостерігається незначне зростання T_m . Можна припустити, що в цій концентраційній області в системі достатньо води для гідратації як ліпиду, так і ОЕГ_n. При подальшому зниженні концентрації води (<50 мас. % води в субфазі) її вже недостатньо для повної гідратації полярної області ліпідної мембрани і, певно, важливу роль починає відігравати сольватація мембрани молекулами кріопротектору. По мірі подальшої дегідратації системи T_m зростає, проте, не досягає значень для повністю дегідратованого ДПФХ за рахунок сольватації полярної області мембрани молекулами ОЕГ_n (рис. 3.27).

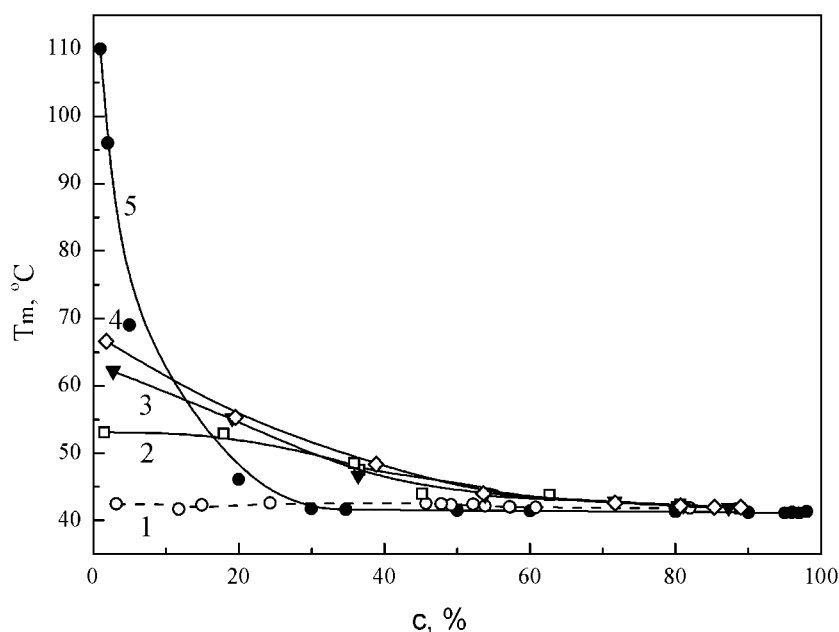


Рисунок 3.27. Температура основного фазового переходу ліпідних мембран у залежності від концентрації води в системі для субфаз вода/гліцерин (1), вода/ОЕГ_{n=5} (2), вода/ОЕГ_{n=25} (3), вода/ОЕГ_{n=30} (4) та вода (5)

У роботах Crowe і соавторів [145, 146, 151, 152] показано, що важливим параметром є зниження T_m дегідратованої ліпідної мембрани при її сольватації кріопротектором. Можна припустити, що ця величина відображає сольватуєчу здатність субфаз по відношенню до ліпідної мембрани.

Отримані данні свідчать, що з ростом n (ступінь полімеризації OEG_n) знижується сольватуюча здатність OEG_n (рис. 3.28). Якщо взяти за референтний зразок воду, то сольватуюча здатність субфази знижується в напрямку: вода > гліцерин > $\text{OEG}_{n=5}$ > $\text{OEG}_{n=25}$ > $\text{OEG}_{n=30}$.

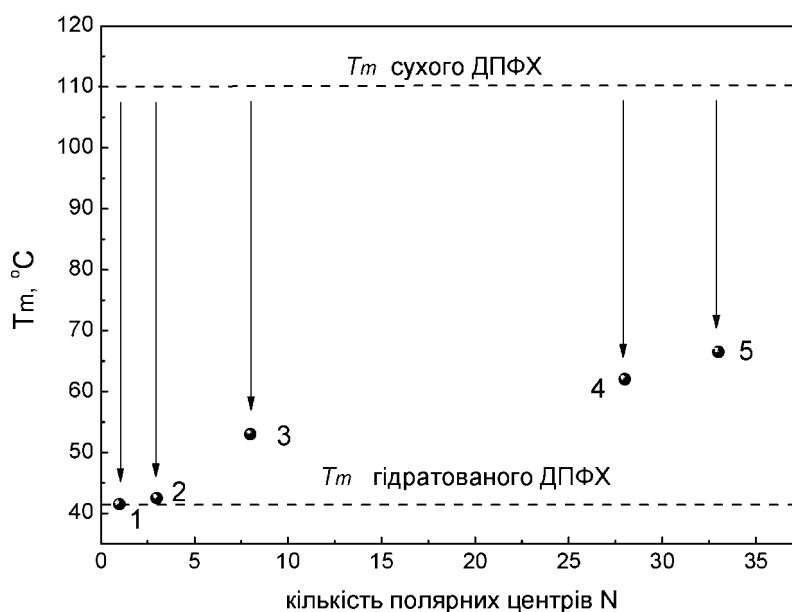


Рисунок 3.28. Температура основного фазового переходу ДПФХ при його сольватації в залежності від кількості полярний центрів у молекулі кріопротектору (N): 1 – вода, 2 – гліцерин, 3 – $\text{OEG}_{n=5}$, 4 – $\text{OEG}_{n=25}$, 5 – $\text{OEG}_{n=30}$

Хоча в цьому ряду зростає кількість полярних груп (груп, що містять атоми кисню) N у молекулі кріопротектору (для води кількість полярний груп $N=1$, для гліцерину $N=3$, для OEG_n $N=3+n$), питома кількість полярних груп (тобто кількість полярних груп N у молекулі, нормованих на її молекулярну масу M) N/M зменшується. При цьому в молекулах OEG_n є два вида полярних центрів, що здатні взаємодіяти з полярною областю мембрани (і з водою) – гідроксильні групи ($-\text{OH}$) та етоксигрупи ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$). Зі збільшенням ступеню полімеризації n питомий внесок гідроксильних груп у

взаємодію з полярною областю мембрани зменшується, а етоксигруп – збільшується.

Можна зробити висновок, що гідроксильні групи більш ефективно сольватують ДПФХ мембрану, ніж етоксигрупи. Окрім того, зі збільшенням молекулярної маси кріопротектора вірогідність ефективної взаємодії всіх його полярних груп з полярними групами ліпиду знижується за рахунок стеричного фактору. Вірогідно, що за рахунок суперпозиції цих факторів з ростом питомої кількості полярних центрів у молекулі кріопротектору, його здатність знижувати T_m сухого ДПФХ зростає (рис. 3.29).

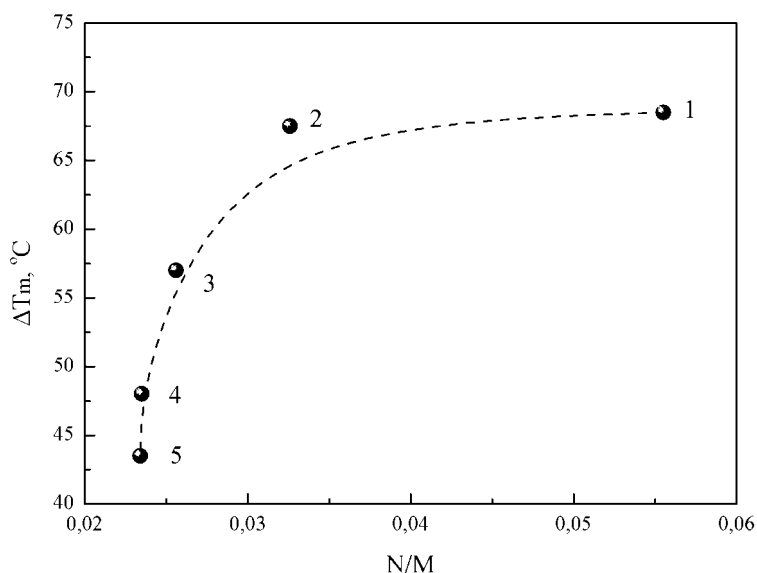


Рисунок 3.29. Зниження температури основного переходу сухого ДПФХ (ΔT_m) при його сольватації в залежності від питомої кількості полярних центрів N/M : 1 – вода, 2 – гліцерин, 3 – ОЕГ_{n=5}, 4 – ОЕГ_{n=25}, 5 – ОЕГ_{n=30}

Повернемося до пояснення зазначених відмінностей у впливі ступеня полімеризації ОЕГ_n на T_m на малих та великих концентраціях кріопротектору, рис. 3.26. Виходячи із зробленого вище висновку, гідроксильні групи більш ефективно сольватують полярну область фосфоліпідної мембрани, ніж етоксигрупи. У той же час, лінійна залежність числа гідратації для гліцерину та ОЕГ_n від молекулярної маси [147, 153] (рис. 3.30) свідчить, що взаємодія з

водою в цих кріопротекторів (у розрахунку на одиницю маси) відбувається з однаковою ефективністю. Логічно припустити, що на малих концентраціях кріопротектору (коли в системі є надлишок води) переважною буде взаємодія кріопротектору з водою, аніж з полярною областю ДПФХ мембрани. Для кріопротектору з ростом n коефіцієнт розподілу «ліпідна мембрана – вода» зменшується завдяки зменшенню питомої кількості гідроксильних груп. Це пояснює сильніший вплив $\text{ОЕГ}_{n=5}$ на температуру основного фазового переходу ліпідної мембрани порівняно з $\text{ОЕГ}_{n=25}$ та $\text{ОЕГ}_{n=30}$ на малих концентраціях, рис. 3.27. Інша картина спостерігається на великих концентраціях кріопротектору, коли на перший план виходять описані вище ефекти дегідратації ДПФХ мембрани.

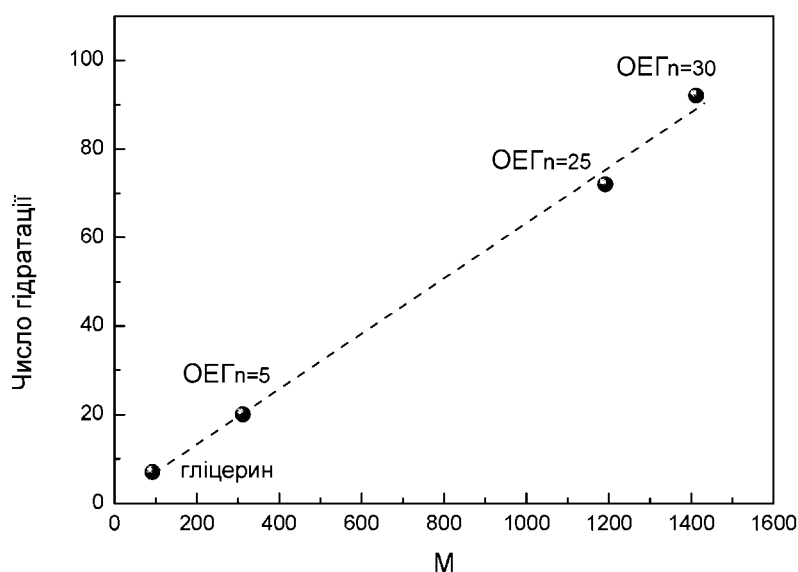


Рисунок 3.30. Залежність числа гідратації від молекулярної маси для досліджуваних кріопротекторів згідно з [147, 152]

3.4. Визначення структурних параметрів модельних ліпідних мембран методом малокутового рентгенівського розсіювання

Структурні параметри мультибішарових ліпідних структур отримують методом малокутового розсіювання X-променів (SAXS). На рис. 3.31

показано типовий вигляд профілей SAXS на прикладі мембран з 30% ОЕГ_{n=5} у воді. З отриманих профілей SAXS обчислюють період повторюваності D мультибішарових структур: $D = 2\pi/nq$, де q – координата положення піка, а n – порядок відбивання. Період повторюваності складається із товщини ліпідного бішару та товщини водного прошарку. На даному приборі окремо ці параметри визначити неможливо. При нагріванні положення піка змінюється, що може відображати зміни у фазовому стані системи.

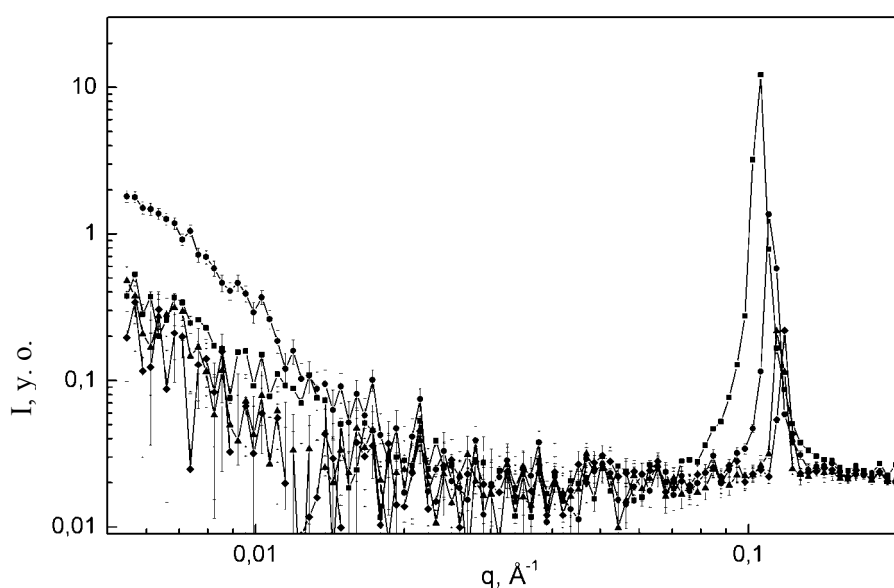


Рисунок 3.31. Профілі малокутового розсіювання X-променів для системи ДПФХ/вода/ОЕГ_{n=5} при різних температурах: 19.5°C (квадрати); 42.8°C (кола); 52.7°C (трикутники), 63.5°C (ромби)

На рис. 3.32 наведено залежності D для системи ДПФХ/вода/гліцерин від температури та концентрації гліцерину у водно-глицериновій суміші. Видно, що фазовий перехід $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ супроводжується різким збільшенням D (на $\sim 8\text{Å}$ для системи ДПФХ/вода), а перехід $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ – зниженням D , причому величина цього скачка зменшується з ростом концентрації гліцерину в системі (рис. 3.32 а). У низькотемпературних фазах $L_{\beta'}$ та $P_{\beta'}$ період повторюваності поступово зростає зі збільшенням концентрації гліцерину аж до $\sim 60\%$ (рис. 3.32 б).

При більш високих концентраціях значення D різко спадає (на ~ 15 Å), що відображає істотні зміни фазового стану: утворення інтердигітованої гел-фази $L_{\beta I}$ [143] та зникненням $P_{\beta'}$ фази. Для цих систем зафіксовано зростання ентальпії ΔH_m методом ДСК. Проте, в L_{α} -фазі загальна тенденція до збільшення D зберігається практично до повного заміщення води гліцерином. Інтерпретація зростання D може бути дана в термінах “розбухання” [154] або “відв’язування” [155] ліпідних бішарів внаслідок зміни балансу між силами притягання і відштовхування між бішарами [156].

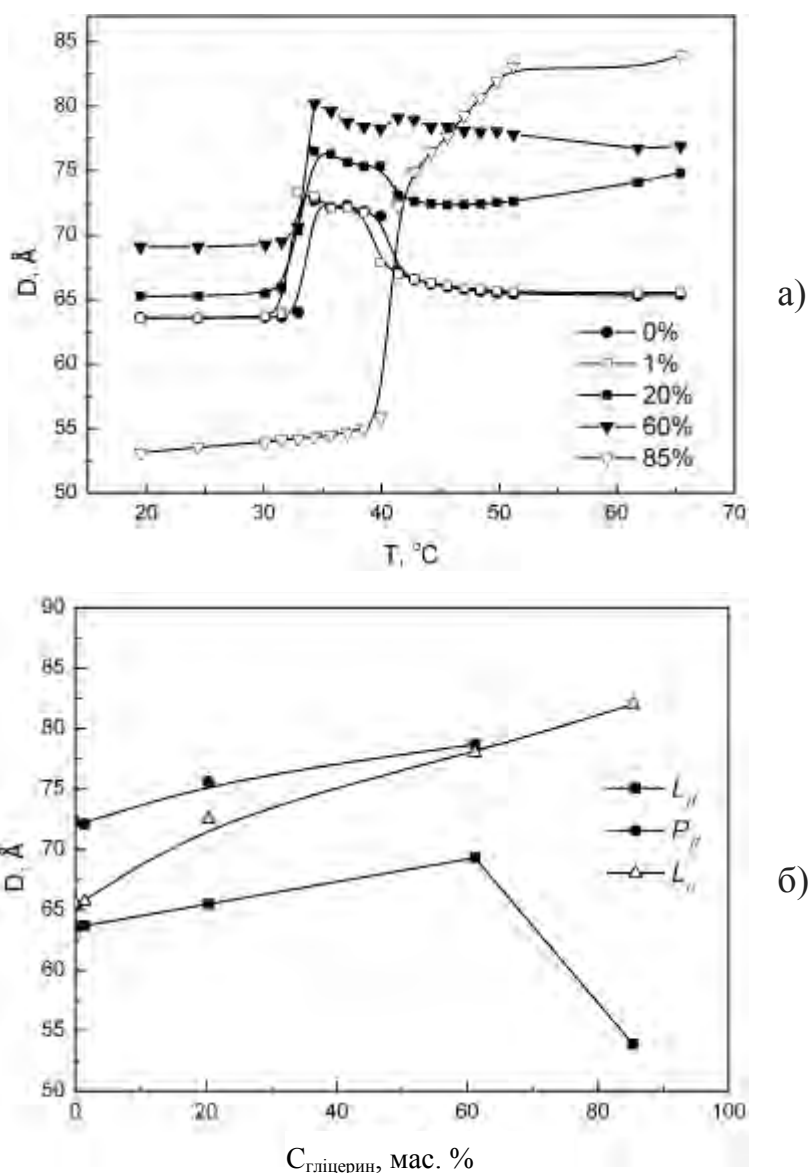


Рисунок 3.32. Період повторюваності D у залежності від температури (а) та концентрації гліцерину в водно-гліцериновому розчині (б)

Концентраційна поведінка періода повторюваності в різних фазах принципово змінюється в системі ДПФХ/вода/ $\text{OEG}_{n=5}$ (рис. 3.33). В усіх фазах D поступово зменшується з концентрацією $\text{OEG}_{n=5}$. Тобто методом SAXS не виявлено признаков утворення інтредігатованої фази в цих системах. Зменшення D може відбуватися як за рахунок товщини ліпідного бішару, так і за рахунок товщини водного прошарку.

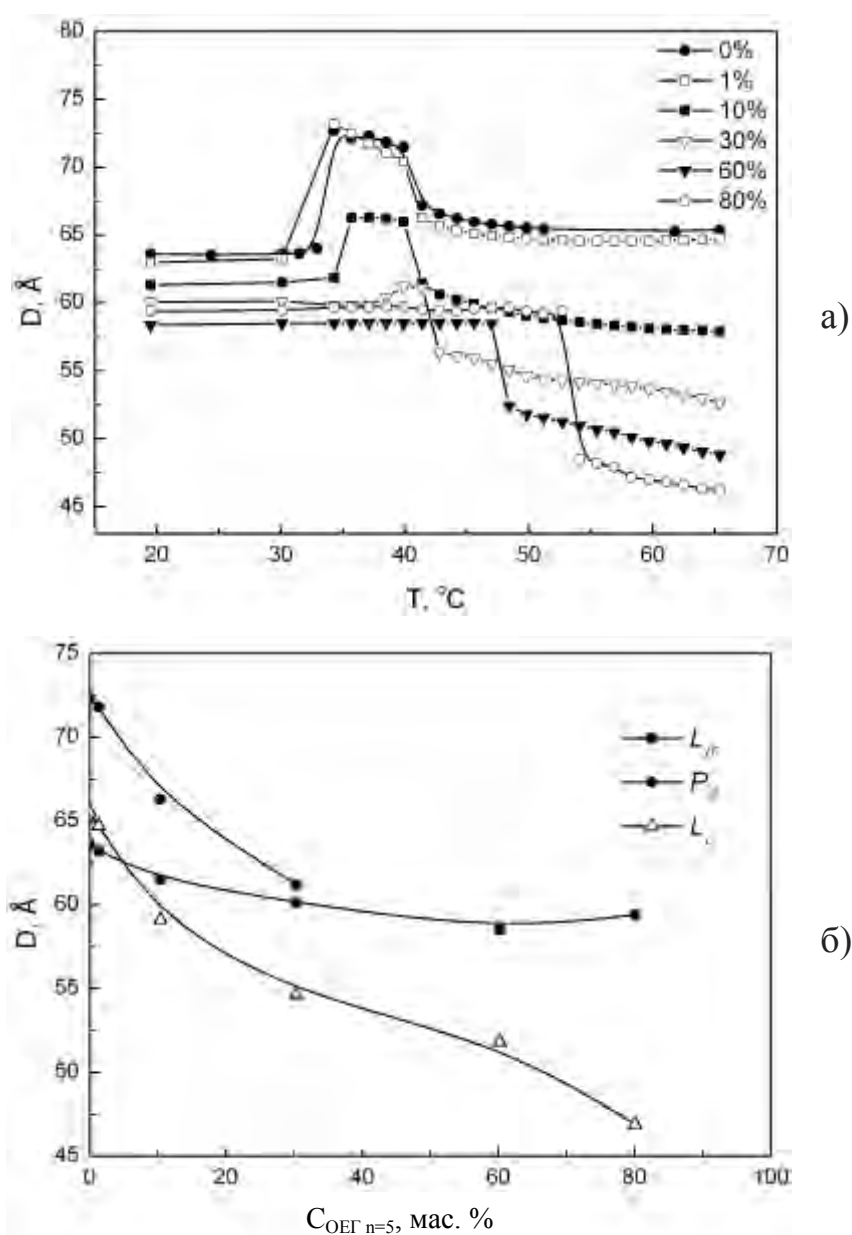


Рис 3.33. Період повторюваності D у залежності від температури (а) та концентрації $\text{OEG}_{n=5}$ у водному розчині (б)

Для можливого узагальнення виявлених закономірностей було цікаво співставити характер залежностей D від температури в L_α -фазі для систем ДПФХ/вода/БАС, що включають БАС різної хімічної природи (рис. 3.34).

Незважаючи на невелику кількість БАС, для яких ми навели порівняльні дані, все ж, оскільки вони репрезентують різні хімічні класи, можна припустити наявність певних закономірностей. Всі розглянуті БАС можна умовно поділити на дві групи згідно з характером температурної зміни періоду повторюваності в L_α -фазі – з $dD/dT > 0$ (гліцерин, нітрат срібла, уроканова кислота) або $dD/dT < 0$ (ОЕГ_{n=5}, диметилсульфоксид (ДМСО)). Така поведінка чітко корелює зі змінами D , що спричинені внесенням відповідної БАС (порівняння з недопованим ДПФХ (рис. 3.34, крива 1). Якщо позначити концентрацію внесеної БАС як c , тоді додатні або від’ємні значення dD/dT відповідають додатнім або від’ємним значенням dD/dc .

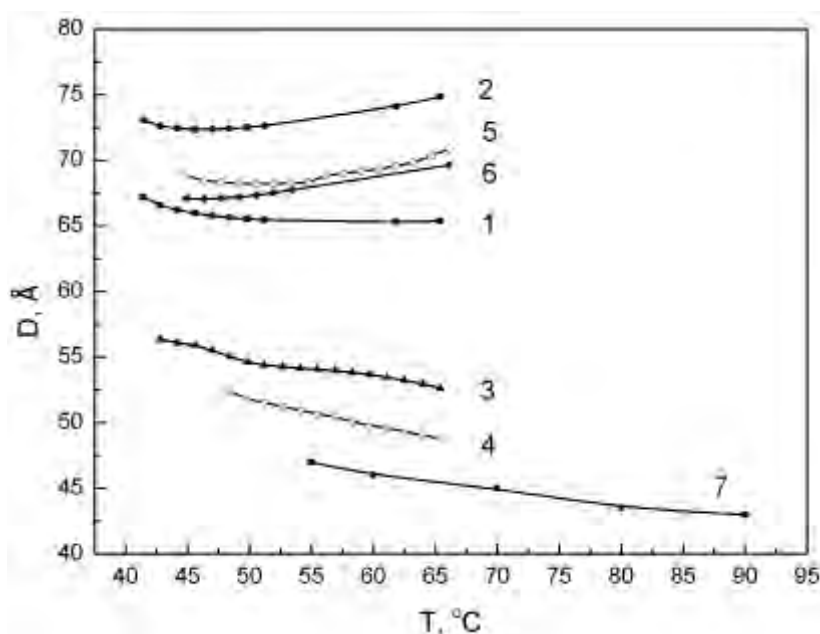


Рисунок 3.34. Період повторюваності D у залежності від температури в L_α фазі для систем: 1 – ДПФХ/вода, 2 – ДПФХ/вода/гліцерин, 3 – ДПФХ/вода/ОЕГ_{n=5} (30%), 4 – ДПФХ/вода/ОЕГ_{n=5} (60%), 5 – ДПФХ/вода/уроканова кислота, 6 – ДПФХ/вода/нітрат срібла, 7 – ДПФХ/вода/диметилсульфоксид за даними [157]

Така поведінка виглядає дуже подібною до аналогічних залежностей кроку холестеричної спіралі p у термотропних рідких кристалах – характер залежностей кроку спіралі від температури і від концентрації внесеної немезогенної домішки однаковий [158]. Тут треба відзначити, що і період повторюваності ліпідного мультибішару, і крок холестеричної спіралі є структурними параметрами, пов'язаними з рідкокристалічним упорядкуванням.

3.5. Висновки до розділу 3

На основі єдиного методологічного підходу визначено мембранотропну дію низки біологічно активних речовин різних хімічних класів.

1. Встановлено, що більшість БАС знижують температуру основного фазового переходу модельної мембрани T_m пропорційно до їх вмісту в мембрані. Для деяких речовин (сукцинілхолін, гліцерин) спостерігається підвищення T_m , що відображає особливості міжмолекулярних взаємодій в системі. Для нітрату срібла та фенібуту встановлено появу додаткових піків на ДСК термограмах, що може бути ознакою фазового розділення.

2. Показано, що ламелярна структура модельних мембран на основі ДПФХ зберігається при заміщенні води кріопротекторами на основі похідних гліцерину. Для оксиетильованих гліцеринів (ОЕГ_n) сольватуюча здатність знижується в ряду: вода > гліцерин > ОЕГ_{n=5} > ОЕГ_{n=25} > ОЕГ_{n=30}.

3. На основі аналізу даних малокутового рентгенівського розсіювання ліпідних мембран, що містять БАС, встановлено, що в L_α -фазі збільшення або зменшення D з температурою корелює зі знаком зміни D чистої мембрани при введенні в неї БАС.

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ СУКУПНОЇ МЕМБРАНОТРОПНОЇ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СУБСТАНЦІЙ

4.1. Дослідження сукупної мембранотропної дії двох БАС у квазібінарних системах

Одним із важливих практичних аспектів застосування модельних мембран може бути їх використання при доклінічному тестуванні фармакологічних субстанцій та препаратів на ефекти, що можуть виникати при їх спільному застосуванні. Як правило, фармакологічні препарати є багатокомпонентними та складаються з одного або кількох активних компонентів (фармакологічних субстанцій) та низки допоміжних речовин. Окрім того, сучасні схеми лікування включають, як правило, одночасне застосування декількох фармакологічних препаратів. Але в такому випадку між фармакологічними субстанціями можливі взаємодії різних рівней складності, що, у свою чергу, може впливати на фармакокінетику, фармакодинаміку субстанцій в організмі і, таким чином, на терапевтичну дію фармпрепаратів. При цьому можливі ефекти антагонізму або синергізму дії фармакологічних субстанцій, що дуже важливо в клінічній практиці.

Ідея нашого підходу полягає у визначенні індивідуальної мембранотропної дії фармакологічних субстанцій та порівняння її з їх сукупною мембранотропною дією. У даному випадку зміни фазового стану модельних ліпідних мембран є аналітичним критерієм, який дозволяє виявити ефекти антагонізму або синергізму сумісної дії фармпрепаратів.

Визначення сукупної мембранотропної дії біологічно активних сполук відбувається шляхом введення БАС до квазібінарних систем [159, 160]. Для цього за отриманими параметрами T_m для модельних ліпідних мембран з БАС будують графіки залежності зсуву температури основного фазового переходу

(ΔT_m) від мольної частки одного з БАС у загальній кількості внесених БАС. Для цього по осі абсцис відкладається мольний вміст одного з БАС у загальній кількості уведених домішок, а по осі ординат — відповідне значення ΔT_m для кожної з досліджуваних систем. Додатково відкладають значення ΔT_m для системи, що містить тільки першу або другу БАС (відповідно, 0 та 1 по осі абсцис). Така система названа квазібінарною, оскільки два БАС розглядаються як чинники, що діють на їх спільне середовище – модельну мембрану. Зміни фазового стану (термодинамічних параметрів фазових переходів, насамперед ΔT_m) є аналітичним критерієм взаємодії двох БАС.

Згідно з уявленнями, розвинутими в роботах [158, 159], адитивність (лінійність) отриманої концентраційної залежності зміни термодинамічних параметрів відповідає випадку відсутності взаємодії між компонентами в системі («ідеальний розчин»). Неадитивність свідчить про наявність у системі специфічних взаємодій (наприклад, утворення комплексу), що призводять до синергізму або антагонізму мембранотропної дії двох досліджуваних БАС (див. табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

Результати аналізу концентраційної залежності зсуву температури основного фазового переходу в квазібінарних системах на адитивність та відповідні висновки про характер сукупної дії двох БАС.

Лінійність	Адитивність	Характер сукупної мембранотропної дії двох досліджуваних БАС
Відхилення від лінійності не перевищують експериментальної похибки вимірювань	Присутня	Адитивність дії БАС
Відхилення в бік значень ΔT_m з тим самим знаком, що значення ΔT_m для однієї з БАС	Відсутня	Синергізм дії другої БАС по відношенню до першої

Лінійність	Адитивність	Характер сукупної мембранотропної дії двох досліджуваних БАС
Відхилення в бік значень ΔT_m , протилежних до значень ΔT_m для однієї з БАС	Відсутня	Антагонізм дії другої БАС по відношенню до першої
Відхилення в бік значень ΔT_m , протилежних до значень ΔT_m для обох БАС	Відсутня	Антагонізм дії БАС

Наявність ефекту синергізму чи антагонізму при сукупній дії двох БАС можна назвати модуляцією мембранотропної дії.

Для визначення співвідношення БАС, при якому ефект модуляції мембранотропної дії максимальний, на побудованій концентраційній залежності ΔT_m для квазібінарних систем знаходять максимальне відхилення ΔT_m від лінійності.

4.1.1. Ефекти сукупної дії антимікробних препаратів на основі бісчетвертинних амонієвих сполук з ацетилсаліциловою кислотою

Одним із прикладів модуляції мембранотропної дії може бути одночасне внесення бісчетвертинних амонієвих сполук (БЧАС). Методом матрично-активованої лазерної десорбційно/іонізаційної масс-спектрометрії (МАЛДІ) було підтверджено утворення нековалентних комплексів бісчетвертинних амонієвих сполук з молекулами ДПФХ [42]. Крім того [161], було виявлено, що дікатион декаметоксину створює стійкі комплекси з аніоном органічної кислоти – 2,5-дігідроксибензойної кислоти (ДГБК) [160], що використовується в МАЛДІ в якості матриці. Квантово-хімічні розрахунки взаємодії ДГБК у нейтральній і аніонній формах з речовиною, що моделює основний структурний елемент четвертинних амонієвих сполук –

тетраметиламонієм (ТМА), підтверджують утворення стабільних комплексів між ними [160, 162].

Розгляймо мембранотропну дію БЧАС та аспірину – ацетилсаліцилову кислоту (АСК). Концентрація домішки може бути виражена в масових або мольних одиницях, тому зазвичай відрізняють масову або мольну мембранотропну активність, відповідно (таблиця 4.2). Мембранотропна активність, виражена в мольних одиницях, застосовується для того, щоб врахувати розмір молекули домішки.

Таблиця 4.2.

Мембранотропна активність досліджених біологічно-активних речовин, виражену в масових та мольних одиницях

мембранотропний агент	молярна маса, г/моль	мембранотропна активність, масові одиниці, К/мас. %	мембранотропна активність, мольні одиниці, К/мол. %
декаметоксин	692,9	-0,4	-0,4
етоній	584,4	-0,32	-0,27
тіоній	644,5	-0,4	-0,35
АСК	180,1	-0,8	-0,20

Тож, серед досліджуваних біологічно активних сполук найбільше значення масової мембранотропної активності в АСК (-0,8 К/мас. %); у декаметосина і тіонія ці значення однакові (-0,4 К/мас. %) і близькі до етонія (-0,32 К/мас. %). Для мольної мембранотропної активності картина дещо інша. Так, через найменшу молярну масу серед досліджуваних домішок, АСК, незважаючи на найвищу масову мембранотропну активність, має найменшу мольну (-0,20 К/мол. %). Найбільшу мольну мембранотропну

активність має декаметоксин, по числовому значенню вона збігається з масовою; далі йде тіоній (-0,35 К/мол. %) і етоній (-0,27 К/мол. %).

Утворення комплексу між БЧАС та АСК буде призводити до відхилення термодинамічних параметрів фазового переходу в гідратованому фосфоліпіді від адитивності. При цьому максимальне відхилення буде відповідати найбільш вірогідній стехіометрії комплексу [159].

Розглянемо квазібінарні системи на основі гідратованого ДПФХ, що містять домішки БЧАС та АСК у різних мольних співвідношеннях, рис. 4.1. Сумарна концентрація домішок в усіх випадках дорівнює 1 % мас. (відносно маси зневодненого ДПФХ). Слід відзначити, що концентрації домішок виражені в мольних частках. Пряма лінія, що з'єднує дві крайні точки, які відповідають присутності в системі тільки одного компонента – БЧАС або АСК (при концентраціях БЧАС 0,0 та 1,0 моль. част.) демонструє гіпотетичний вид концентраційної залежності ΔT_m при адитивності параметра ΔT_m по концентраціям компонентів, тобто при відсутності взаємодій між домішками. Комплекси з найбільш вірогідною (енергетично вигідною) стехіометрією характеризуються максимальним відхиленням експериментально спостереженої залежності від адитивності. Горизонтальна пунктирна лінія відповідає температурі основного фазового переходу гідратованого ДПФХ без домішок.

Методом ДСК було досліджено вплив декаметоксина і етонія на модельні ліпідні мембрани на основі гідратованого ДПФХ [58, 163]. Продемонстрована взаємодія цих речовин с фосфоліпідною мембраною, яка призводить до значного зниження температури основного фазового переходу, що узгоджується з загальноприйнятим уявленням про мембранотропну дію речовин цього класу. Усі БЧАС призводили до зниження T_m ліпідної мембрани та розмиття піку. Найбільше зниження спостерігалось в присутності АСК ($\Delta T_m = 5,1$ °C). Зниження температури основного фазового переходу модельних ліпідних мембран у присутності АСК підтверджується

літературними даними [164, 165]. Із трьох БЧАС більш суттєве зниження визивав декаметоксин ($\Delta T_m = 2,7$ °C). Дія тіонію та етонію була приблизно однакова з тією різницею, що тіоній призводив до більш вираженого розмиття піку.

Загальний вигляд концентраційних залежностей ΔT_m для трьох антимікробних препаратів БЧАС та АСК подібний. Додавання у систему окремо АСК та кожної з БЧАС призводить до зниження температури основного фазового переходу мембрани, а при спільному введенні домішок цей ефект стає менш вираженим; і для низки концентрацій навіть спостерігається зміна знака зсуву T_m . Тобто комплекс БЧАС + АСК має суттєво інші властивості, ніж його компоненти окремо, і його вплив на мембрану (при певних співвідношеннях БЧАС : АСК) призводить до протилежного ефекту, ніж його складові компоненти – температура основного фазового переходу модельних мембран підвищується, що свідчить про збільшення впорядкування в мембрані. Таким чином, сукупна мембранотропна активність двох домішок може мати знак, протилежний знаку мембанотропної активності кожної домішки окремо.

Для системи ДПФХ + [декаметоксин + ацетилсаліцилова кислота] (рис. 4.1) максимальні відхилення від адитивної залежності спостерігаються для співвідношення декаметоксин : ацетилсаліцилова кислота 1:8, 1:4, 1:2, 1:1. Приймаючи до уваги, що декаметоксин у водному середовищі є дікатіоном, комплекс декаметоксин : АСК (1:2) є електронейтральним, а комплекси декаметоксин : АСК (1:4) і (1:8) є негативно зарядженими. На відміну концентраційної залежності ΔT_m для квазібінарних систем «декаметоксин + АСК» з широким максимумом у вигляді плато, концентраційної залежності ΔT_m для квазібінарних систем «декаметоксин + ДГБК» мають більш різко виражений максимум відхилення від адитивності, який відповідає співвідношенню декаметоксин : ДГБК як 1:2 та 1:4 [160].

Схожий вигляд має концентраційна залежність ΔT_m для квазібінарних систем ДПФХ + «тіоній + ацетилсаліцилова кислота» (рис. 4.1). У данному випадку максимальне відхилення від адитивної залежності має місце при співвідношенні тіоній : АСК 1:8 та 1:4. В аналогічних умовах було отримано концентраційна залежність ΔT_m для квазібінарних системи ДПФХ + «етоній + ацетилсаліцилова кислота» (рис. 4.1). Максимальне відхилення від адитивної залежності в режимі нагрівання має місце при співвідношенні етоній : АСК 1:8, 1:4 та 1:2. На рис. 4.1 для порівняння побудовані концентраційна залежність ΔT_m у режимі нагріву для трьох досліджуваних БЧАС з АСК. Звертає на себе увагу той факт, що тіоній та декаметоксин у концентрації 1 % мас. призводять до однакового зниження T_m (на 0,4 °C) ліпідної мембрани, у той час як зниження T_m у присутності 1 % мас. етонію дещо менше (0,3 °C).

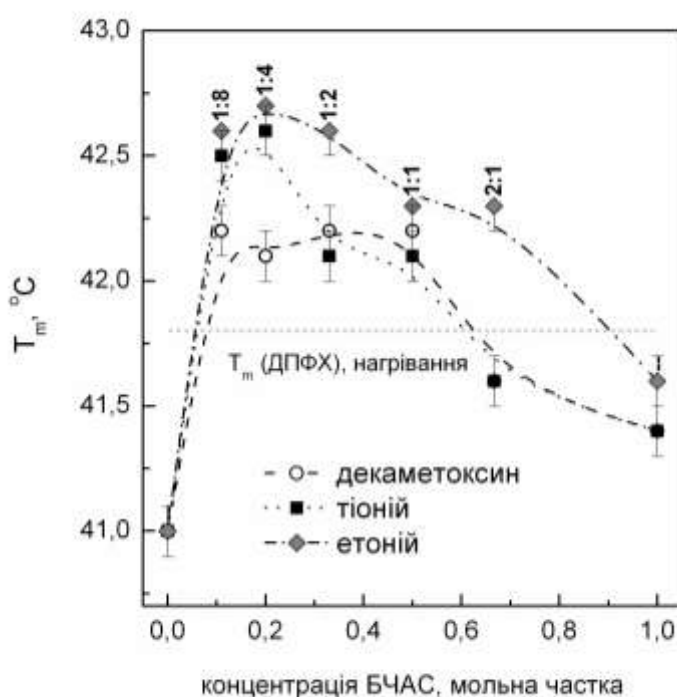


Рисунок 4.1. Температура основного фазового переходу системи ДПФХ+1% «БЧАС+АСК» при різном мольном співвідношенні БЧАС:АСК

Із трьох БЧАС для квазібінарної системи «БЧАС+АСК» максимальне відхилення ΔT_m гідратованого ДПФХ від адитивної залежності демонструє тіоній (з явним максимумом для мольного співвідношення тіоній : АСК 1:8 та 1:4). Спостережений ефект якісної зміни мембранотропної дії досліджуваних речовин (з розупорядкування ліпідного бішару на його ущільнення) можна назвати ефектом модуляції мембранотропної дії БЧАС.

Концентраційна залежність гістерезису досліджуваної системи наведена на рис. 4.2. Для усіх БЧАС гістерезис був меншим, ніж для АСК.

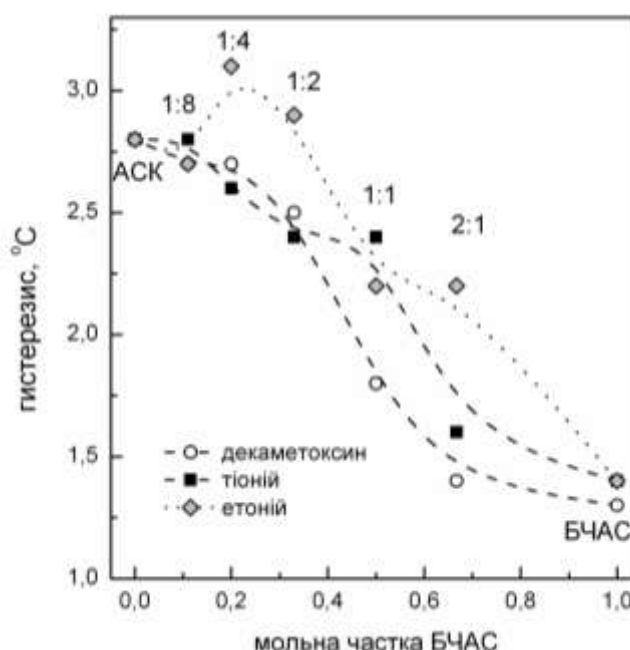


Рисунок 4.2. Залежність гістерезису системи ДПФХ+1%[БЧАС+АСК] при різному мольному співвідношенні БЧАС:АСК

Для систем «тіоній + АСК» та «декаметосин + АСК» залежність гістерезису від концентрації БЧАС близька до лінійної (спостерігаються відхилення від лінійності як у більшу так і в меншу сторони). А для квазібінарної системи «етоній + АСК» для гістерезису спостерігається тільки позитивне відхилення від лінійності по концентраціям АСК і БЧАС з явним максимумом при співвідношенні БЧАС: АСК = 1:4. Згідно з [34], збільшення

гістерезису в системі означає підвищення латеральної гетерогенності ліпідних мембран у межах дальньої впорядкованості.

Таким чином, на прикладі речовин класу БЧАС простежується зв'язок між їх молекулярною структурою та мембранотропною дією, що буде детальніше викладено в розділі 5. Повертаючись до ефекту сукупної мембранотропної дії БЧАС та АСК (рис. 4.1), можна відмітити, що цей ефект збільшується в низці декаметоксин \rightarrow тіоній \rightarrow етоній. Таким чином, структурна організація молекули БЧАС впливає як на її індивідуальну мембранотропну дію, так і на можливість її модуляції з боку інших молекул.

4.1.2. Дослідження індивідуальної та сумісної дії декаметоксину та ацетилсаліцилової кислоти на еритроцитах людини

Наступним кроком після встановлення ефектів сумісної дії фармакологічних субстанцій на рівні модельних ліпідних мембран було вивчення сумісної дії пари ДЕК+АСК на живих клітинах. В якості клітин було обрано еритроцити людини, як класичний об'єкт медико-біологічних та біофізичних досліджень.

Відомо, що червоний колір еритроцитів зумовлений присутністю в них молекул гемоглобіну. Під дією зовнішніх факторів (температура, рН, наявність деяких субстанцій, тощо) можливо руйнування клітин та вихід із них гемоглобіну, що призводить до їх знебарвлення. Цей процес має назву гемолізу, і його можна спостерігати за допомогою оптичного мікроскопу.

Кінетику гемолізу еритроцитів при індивідуальній та сумісній дії ДЕК та АСК було досліджено шляхом отримання серії мікрофотографій поля зору мікроскопа із зразками (рис. 4.3) та обчислення кількості цілих еритроцитів у фіксовані моменти часу. Кількість еритроцитів у початковий момент часу було прийнято за 100 %. Мольне співвідношення ДЕК:АСК 1:2 було обрано на основі попередніх досліджень методом ДСК. Саме це співвідношення відповідало стехіометрії нейтрального комплексу.

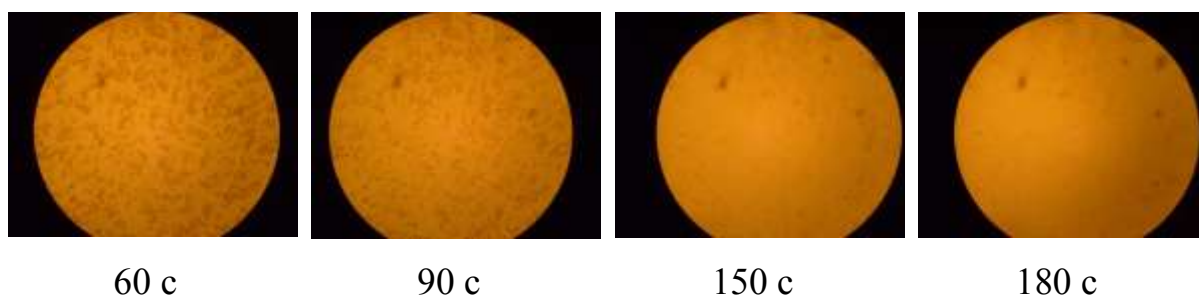


Рисунок 4.3. Мікроскопічні фотографії еритроцитів у розчині 0,1 мас. % ДЕК у різні моменти часу

Результати усереднення трьох незалежних експериментів наведено на рис. 4.4. На відміну від якісно аналогічного впливу ДЕК та АСК на термотропні властивості модельних мембран, на рівні живих еритроцитів дія ДЕК та АСА суттєво різнилася. ДЕК у концентрації 0,1 мас. % призводить до гемолізу еритроцитів, повне зникнення еритроцитів у полі зору спостерігалось менше ніж за 3 хвилини. АСК у такій же концентрації зовсім не викликала гемолізу, усі клітини залишалися цілими, проте спостерігався ехіноцитоз – зміна форми еритроцитів та поява на них «шипів». Одним із факторів, що зумовлює різницю у впливі ДЕК та АСК на еритроцити може бути негативний поверхневий заряд цих клітин, який сприяє зв'язуванню дікатіонів ДЕК із мембраною і, навпаки, заважає взаємодії аніонів АСК з мембраною. Встановлення молекулярного механізму ДЕК-індукованого гемолізу потребує подальших досліджень.

При сумісному введенні ДЕК+АСК гемоліз еритроцитів відбувається, але він уповільнюється порівняно з ефектом від ДЕК (рис. 4.4). Вірогідно, що зменшення швидкості гемолізу еритроцитів у присутності ДЕК+АСК відбувається за рахунок міжмолекулярної взаємодії ДЕК та АСК, призводячи до конкуруючої взаємодії ДЕК з клітинною мембраною та АСК.

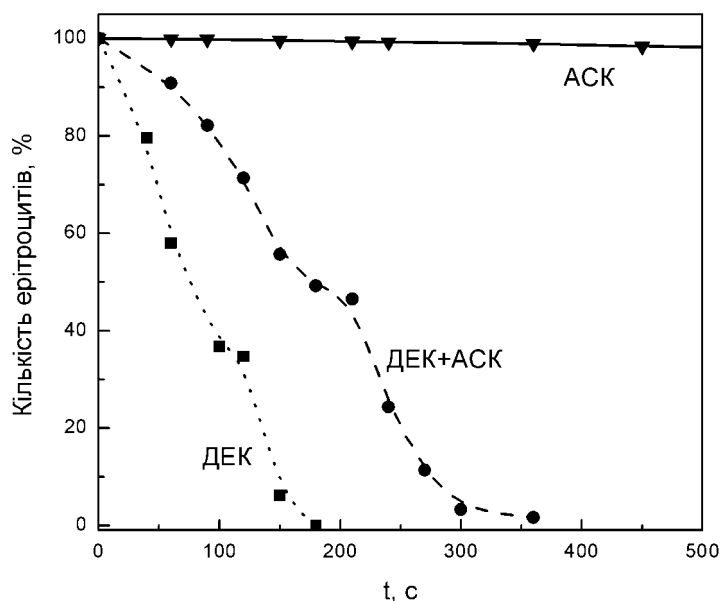


Рисунок 4.4. Кінетика гемолізу еритроцитів під дією ДЕК, АСК та суміші ДЕК+АСК (1:2)

Таким чином, взаємодія між БАС може мати специфічні прояви в модельних та біологічних системах.

4.1.3. Ефекти сукупної дії декаметоксину та уроканової кислоти

Для системи «декаметоксин + уроканова кислота» індивідуальна дія обох компонентів була неоднаковою: для декаметоксину – зниження ΔT_m , а для уроканової кислоти – збільшення ΔT_m . Втім, аналіз концентраційних залежностей ΔT_m , що отримані в режимах нагрівання та охолодження (рис. 4.5, а, б), дозволяє висвітлити відхилення від адитивності в обох режимах температурного сканування.

Слід відзначити, що у випадку уроканової кислоти порівняно до аскорбінової відхилення менш виражене, а також менш специфічне, тобто не дає підстав виокремити одну найвірогіднішу стехіометрію нековалентного комплексу. З отриманих концентраційних залежностей ΔT_m для квазібінарних систем «декаметоксин + уроканова кислота» можна зробити припущення, в ній є більше можливостей комплексоутворення. Це

відбувається, вірогідно, за рахунок додаткових сайтів зв'язування, на роль яких придатні імідазольні фрагменти уроканової кислоти, що можуть утворювати нековалентні комплекси із ментильними фрагментами декаметоксину.

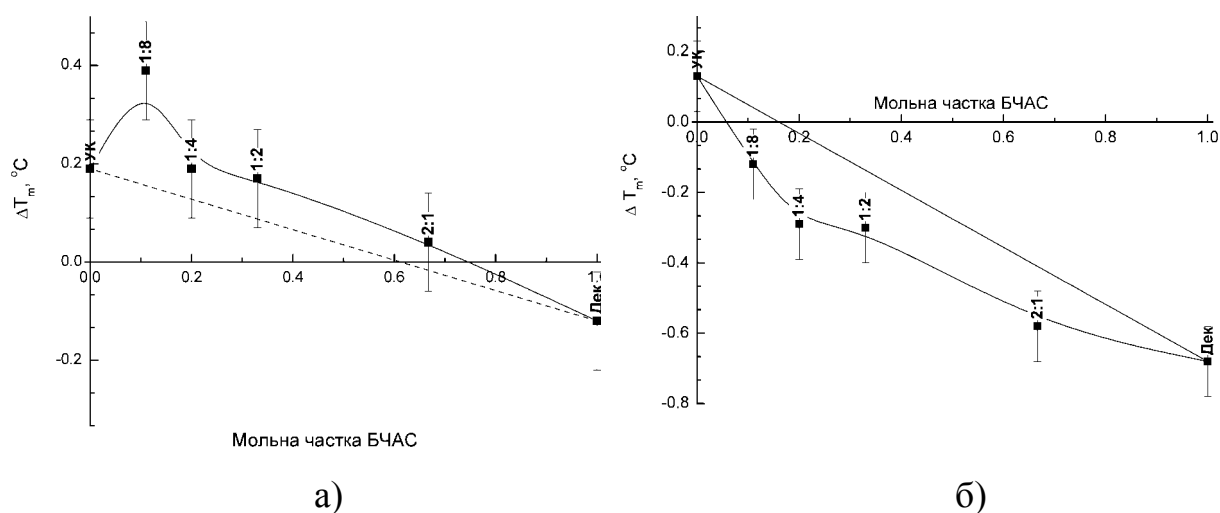


Рисунок 4.5. Концентраційні залежності ΔT_m для квазібінарних систем «декаметоксин (ДЕК) + уроканова кислота (УК)» у модельних ліпідних мембранах у режимах нагрівання (а) та охолодження (б)

4.1.4. Ефекти сукупної дії термотропних мезогенів в модельній ліпідній мембрані

Для перевірки зв'язку між комплексоутворенням БАС і відхиленням термодинамічних параметрів мембрани від адитивності нами були підібрані пари молекул, для яких наявність або відсутність комплексоутворення відома заздалегідь. Одним з добре відомих випадків сильної специфічної взаємодії компонентів термотропних рідкокристалічних (РК) систем є нематичні алкілціанобіфеніли та азоксисполуки, які в їх рідкокристалічній суміші утворюють комплекси з переносом заряду [166, 167]. Холестерилолеїлкарбонат (ХОК), 4-аміл-4'-ціанобіфеніл (5CB) і суміш азокси-нематиків ЖК-440 — це типові представники мезогенних речовин, що

утворюють термотропну рідкокристалічну фазу; наявність або відсутність комплексоутворення між ними проявляється в змінах температур фазових переходів у термотропних рідких кристалах. ХОК – естер холестерину, який також може бути і компонентом клітинної мембрани. У цій роботі ці речовини вперше досліджені в якості компонентів ліотропних рідких кристалів, аналогічно методиці для БАС. Очікувалось, що специфічні взаємодії між молекулами мезогенних речовин виявлять себе в ДСК-термограмах «подвійно допованого» ДПФХ.

У модельних мембранах із додаванням пар мезогенних сполук: 5CB + ЖК-440 та 5CB + ХОК, де 5CB поступово заміщував ЖК-440 або ХОК при постійному загальному вмісті РК-компонентів. Отримані ДСК-термограми вказаних систем наведені на рис. 4.6 а) та б), відповідно.

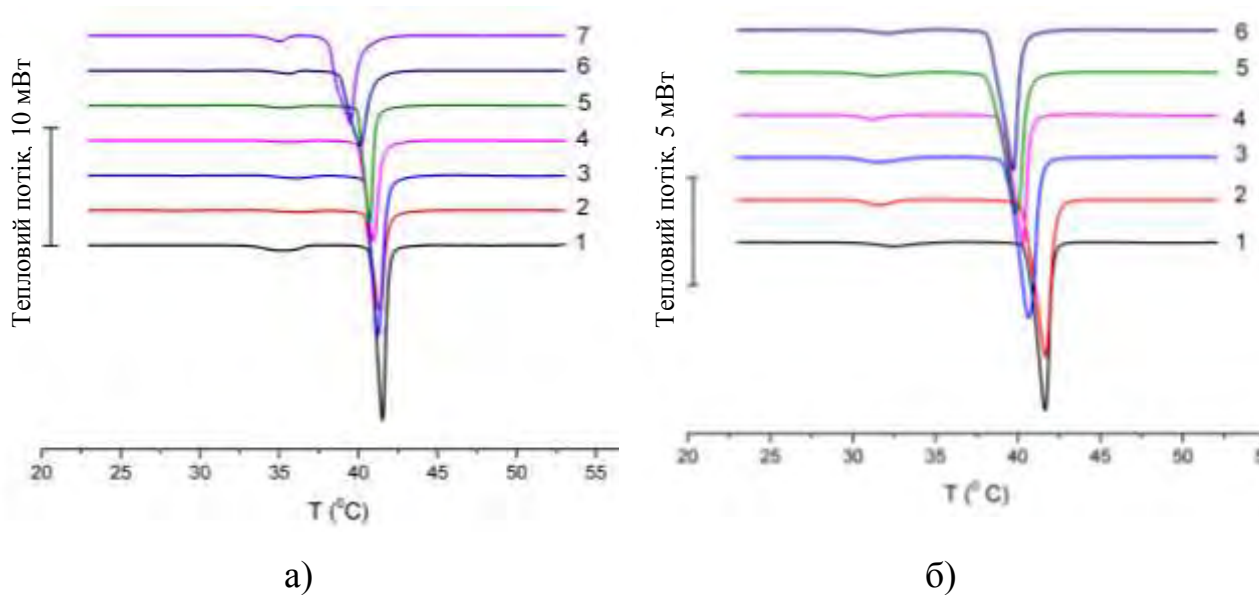


Рисунок 4.6. ДСК термограми модельних мембран, що містять а): 1 – без домішок, 2 – 5% ЖК-440, 3 – 4% ЖК-440 + 1% 5CB, 4 – 3% ЖК-440 + 2% 5CB, 5 – 2% ЖК-440 + 1% 5CB, 6 – 1% ЖК-440 + 4% 5CB, 7 – 5% 5CB
б) 1 – без домішок, 2 – 5% ХОК, 3 – 3.5% ХОК + 1.5% 5CB, 4 – 1.5% ХОК + 3.5% 5CB, 5 – 0.5% ХОК + 4.5% 5CB, 6 – 5% 5CB

На всіх термограмах видно чіткі піки як основного переходу, так і передпереходу. Значення T_m при додаванні ЖК-440 або ХОК лише дуже слабо знижувалось, тоді як 5CB знижував T_m приблизно на 2°C .

Концентраційні залежності ΔT_m для досліджуваних квазібінарних систем наведені на рис. 4.7. Як можна побачити, у системі 5CB + ХОК значення ΔT_m адитивно за концентрацією 5CB, що дозволяє вважати можливі специфічні взаємодії неістотними. Дійсно, ефекти стеричних факторів та молекулярного пакування, які проявляються в термотропних сумішах 5CB+ХОК [168], навряд чи можуть відігравати роль у системі, де молекули 5CB та ХОК хаотично розподілені у великому об'ємі гідратованого ДПФХ.

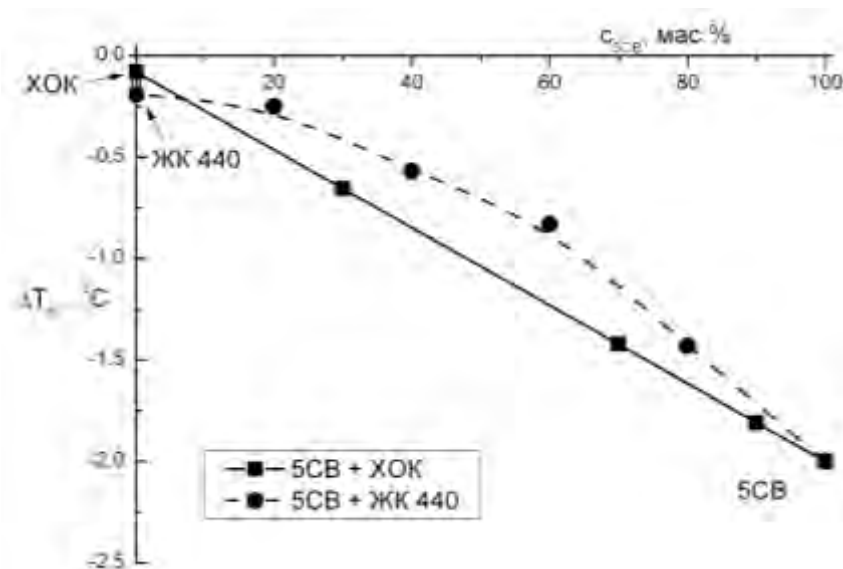


Рисунок 4.7. Концентраційна залежність зсуву температури основного фазового переходу модельних ліпідних мембран, що містять пари 5CB+ХОК та 5CB+ЖК440

Навпаки, комплекси з переносом заряду, які формуються в суміші 5CB + ЖК-440 [165], можуть існувати і в середовищі гідратованого ДПФХ, залишаючись певними надмолекулярними утвореннями. Звідси неадитивна поведінка ΔT_m на рис. 4.7. Від'ємний знак спостережуваного відхилення від лінійності можна пояснити тим, що утворені комплекси, на відміну від

індивідуальних молекул, не проникають у ліпідний бішар, залишаючись у водній фазі. Тому ефект 5CB + ЖК-440 (зниження T_m) більш слабкий, ніж 5CB + ХОК. Можна зробити висновок, що природа взаємодії молекул різнорідних компонентів у рідкокристалічній системі принципово подібна як в термотропних системах, так і в гідратованих фосфоліпідах. Це вповні узгоджується з результатами [1, 8, 10, 161], і можна стверджувати, що ефекти взаємодії між БАС різної хімічної природи, які внесено в ліотропну ламелярну структуру гідратованих фосфоліпідів, подібні до ефектів взаємодії різнорідних мезогенних молекул в термотропних РК-фазах. Таким чином, отримані результати в якомусь сенсі прокладають ще один місток між термотропними РК та фосфоліпідними мембранами.

4.1.5. Виявлення ефектів конкуренції нітратів у модельних ліпідних мембранах

Мембрана живої клітини знаходиться в оточенні різноманітних речовин, що можуть змінювати її властивості та функціональність. Одним з постійних компонентів примембранного середовища є іони, що мають безпосередній вплив як на білково-вуглеводну частину мембрани, так і на ліпідну [3, 132, 169-171]. Окрім участі у фізіологічних процесах, мембранотропна дія іонів може проявлятися на рівні організма як терапевтична або токсична. Так, бактерицидна дія іонів срібла, яка традиційно та широко застосовується у фармпрепаратах [172], здебільшого обумовлена його взаємодією саме із клітинною мембраною [123]. Висока реакційна здатність іонів срібла суттєво обмежує коло речовин для вивчення ефектів інтерференції шляхом опосередкованої взаємодії (без утворення комплексів або сполук). Одними з найбільш придатних є катіони металів, оскільки комплексоутворення між ними відсутнє внаслідок електростатичного відштовхування. Оскільки зв'язування іонів срібла із клітинною мембраною відбувається в багатокомпонентному іонному

середовищі, що містить, зокрема, іони натрію та калію, представляло інтерес встановити ефекти інтерференції іонів срібла із кожним з цих типів катіонів. Ще однією задачею, цікавою із практичної точки зору, є встановлення сумісної дії катіонів срібла та міді, яка також має бактерицидні та мембранотропні властивості [173, 174].

У якості джерела катіонів були обрані солі AgNO_3 , NaNO_3 , KNO_3 и $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. Слід зазначити, що використані в експерименті концентрації нітратів такі, що вони повністю розчинені у воді, тобто катіони і аніони відносно незалежні один від одного. Тоді їх мембранотропну дію формально можна уявити як суперпозицію мембранотропної дії катіонів та аніонів, що було встановлено для нітратів і хлоридів лужноземельних металів [3].

У модельних ліпідних мембранах були досліджені пари нітратів: AgNO_3 – NaNO_3 , AgNO_3 – KNO_3 и AgNO_3 – $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (рис 4.8). Для кожної з досліджуваних систем зберігався однаковим загальний вміст води (60 мас. %) та загальна концентрація нітратів у воді (3 мас. %).

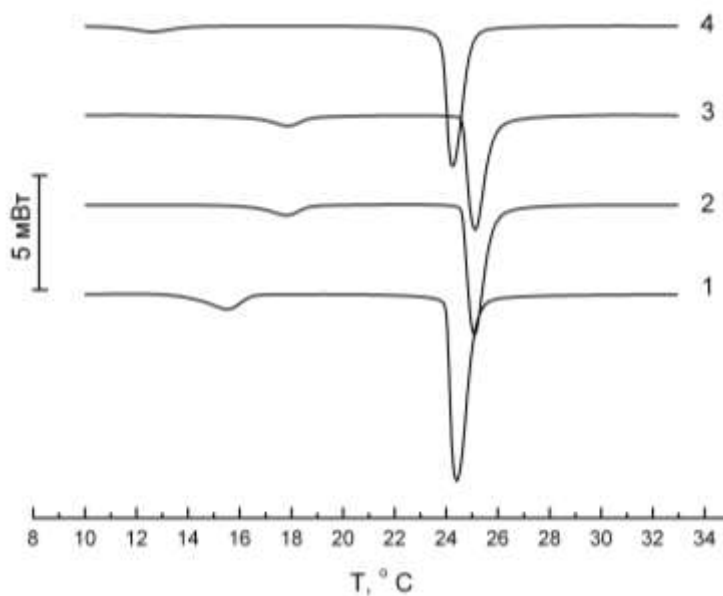


Рис 4.8. ДСК-термограми модельних мембран ДМФХ: 1 – без домішок; 2 – з додаванням AgNO_3 ; 3 – з додаванням AgNO_3 : KNO_3 1 : 1; 4 – з додаванням KNO_3

При цьому мольну долю AgNO_3 (x_{Ag}) змінювали від 0,0 до 1,0. Така постановка експерименту, згідно [159], дозволяла виявити ефекти сукупної дії нітратів у мембранах за відхиленням його термодинамічних параметрів від адитивності по x_{Ag} .

Напочатку були визначені параметри ліпідних мембран у присутності індивідуальних нітратів (табл. 4.3). Як можна побачити, NaNO_3 та KNO_3 знижують температури фазових переходів, тоді як AgNO_3 та $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ їх підвищують. При цьому ефект KNO_3 виявляється більшим за абсолютним значенням, ніж ефект NaNO_3 , а дія $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ – більшим, ніж для AgNO_3 .

Таблиця 4.3.

Параметри фазових переходів модельних мембран, що містять нітрати

БАС	Основний перехід				Передперехід			
	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_m,$ кДж/кг	$\Delta T_m^{1/2},$ $^\circ\text{C}$	$h_m, ^\circ\text{C}$	$T_p, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_p,$ кДж/кг	$\Delta T_p^{1/2},$ $^\circ\text{C}$	$h_p, ^\circ\text{C}$
–	24,7	16,4	0,82	1,0	15,6	2,9	1,51	2,7
AgNO_3	25,1	15,6	0,71	1,2	17,8	2,0	1,27	7,4
NaNO_3	24,3	16,7	0,68	0,9	12,3	1,6	2,25	5,6
KNO_3	24,2	15,5	0,68	0,9	12,6	1,1	1,59	4,7
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	25,9	17,0	0,91	1,4	20,7	0,8	2,12	8,1

На рис. 4.9, а представлені концентраційних залежностей ΔT_m для квазібінарних систем досліджуваних пар нітратів. На рис. 4.9, б представлені відхилення ΔT_m від лінії адитивності – $\delta_m(x_{\text{Ag}})$. Як можна бачити, для всіх досліджуваних систем відхилення є достовірними ($\delta_m = 0,2 \div 0,5^\circ \text{C}$) та відбуваються в бік підвищення T_m . Для пари $\text{AgNO}_3 - \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ максимальне відхилення зареєстроване при $x_{\text{Ag}} \sim 0,3$, що відповідає мольному співвідношенню $\text{Ag}^+ : \text{Cu}^{2+} 2 : 1$ (пунктирна лінія на рис. 4.9, б). Для пар $\text{AgNO}_3 - \text{NaNO}_3$ та $\text{AgNO}_3 - \text{KNO}_3$ максимум відхилення відповідає

еквімолярному вмісту нітратів у модельних мембранах. Треба відмітити, що саме таке співвідношення компонентів є в препараті ляпіс, який є сплавом нітратів срібла та калію [175].

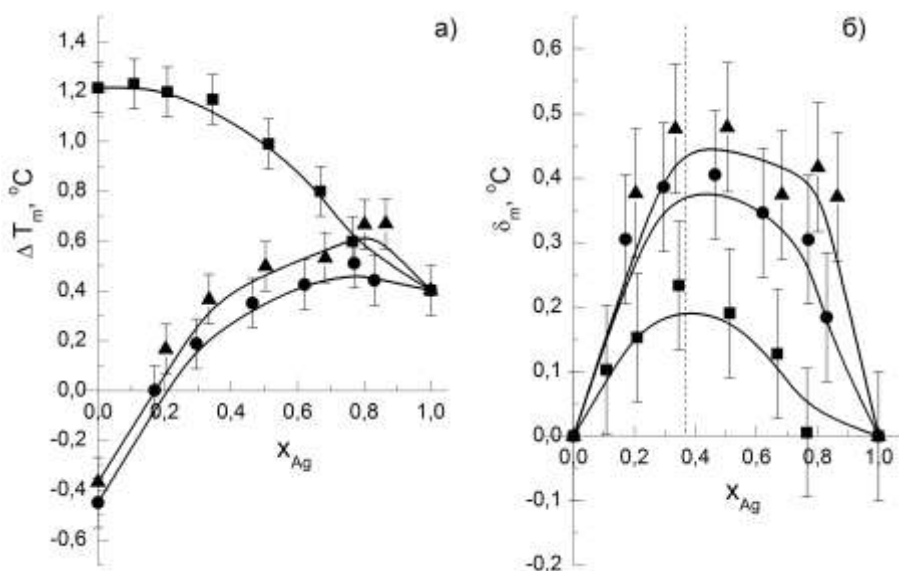


Рисунок 4.9. Значення зсуву температури основного фазового переходу відносно вихідної мембрани (а) та відхилення від адитивності (б) у залежності від долі Ag^+ (x_{Ag}) для модельних мембран, що містять пари $\text{AgNO}_3 - \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (■), $\text{AgNO}_3 - \text{NaNO}_3$ (▲), $\text{AgNO}_3 - \text{KNO}_3$ (●)

Зміна температури передпереходу в усіх досліджуваних системах також зазнає позитивних відхилень від адитивності (δ_p), причому суттєво більших за δ_m ($\delta_p = 0,3 \div 2,7^\circ \text{C}$) (рис. 4.10). У той же час, максимумами δ_p відповідають меншим значенням x_{Ag} порівняно із максимумами δ_m . Це може бути наслідком різного розподілення іонів у мембрані у L_{β}' - та L_{α} -фазах.

Відхилення від адитивності спостерігаються і для інших термодинамічних параметрів досліджуваних систем. На рис. 4.11 представлені залежності гістерезису (h_m) та напівширини ($\Delta T_m^{1/2}$) основного фазового переходу для мембран, що містять $\text{AgNO}_3 - \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. На графіках спостерігаються відхилення обох величин від адитивності до 30 %. При цьому максимумами $h_m(x_{\text{Ag}})$ та $\Delta T_m^{1/2}(x_{\text{Ag}})$ відповідають мольному

співвідношенню $\text{Ag}^+ : \text{Cu}^{2+} = 2 : 1$, так само, як і для ΔT_m (див. рис. 4.10, б). Для пар $\text{AgNO}_3 - \text{NaNO}_3$ та $\text{AgNO}_3 - \text{KNO}_3$ у мембранах також реєструвалося відхилення цих параметрів, втім, вони були менш чітко виражені.

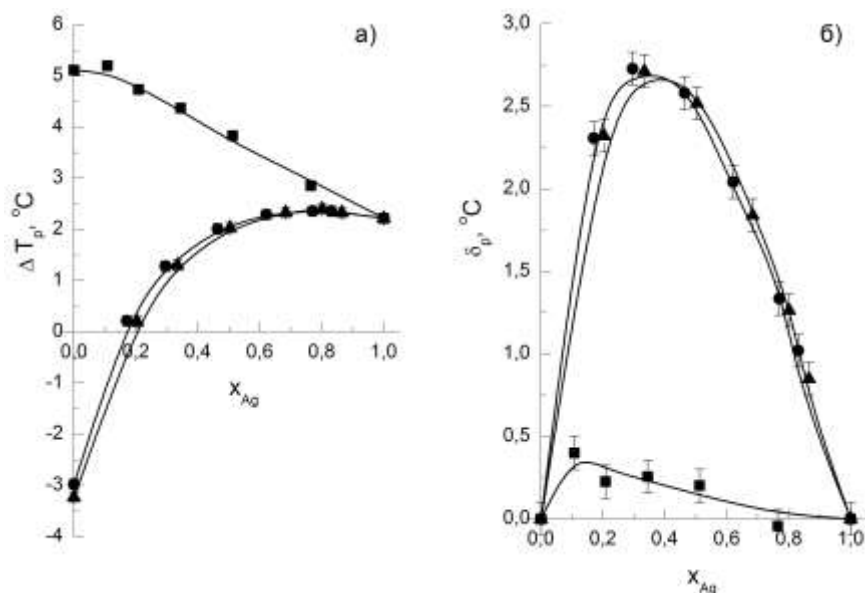


Рисунок 4.10. Значення зсуву температури передпереходу відносно вихідної мембрани (а) та відхилення від адитивності (б) у залежності від долі Ag^+ (x_{Ag}) для модельних мембран, що містять пари $\text{AgNO}_3 - \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (■), $\text{AgNO}_3 - \text{NaNO}_3$ (▲), $\text{AgNO}_3 - \text{KNO}_3$

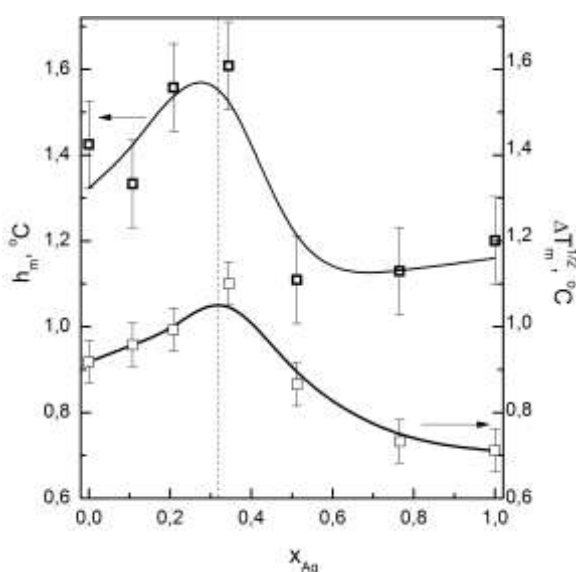


Рисунок 4.11. Залежність гістерезису h_m (■) та напівширини $\Delta T_m^{1/2}$ (□) основного фазового переходу для мембран із парою $\text{AgNO}_3 - \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$

Таким чином, в усіх досліджуваних парах нітратів встановлено відхилення від адитивності низки термодинамічних параметрів, яке проявляється тим сильніше, чим більше різниця індивідуальної дії нітратів.

Окреслимо картину розподілу іонів поблизу поверхні мембрани. З літературних даних відомо, що катіони мають перевагу в адсорбції на поверхні мембрани фосфатидилхолінів внаслідок більшої доступності негативно зарядженої фосфатної групи [1, 172]. Аніони ж, маючи контакт із центром позитивного заряду, екранованим метильними групами ($\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$), розташовуються трохи далі від поверхні бішару [173]. Катіони Na^+ , Ag^+ , Cu^{2+} відносяться до космотропних, а K^+ – до хаотропних іонів [159]; перша група індукує підвищення T_m и T_p , тоді як друга - їх зниження [3]; NO_3^- індукує зниження T_m и T_p [3]. З огляду на те, що аніон NO_3^- є загальним для кожної пари, а безпосередній контакт катіонів виключений в силу електростатичного відштовхування, зафіксоване відхилення параметрів мембрани можна пов'язати з адсорбцією на її поверхні саме катіонів.

Відхилення одержаних параметрів у бік певного катіона вказує на його перевагу в конкурентній взаємодії при зв'язуванні з ліпідною мембраною. Так, у парі $\text{Ag}^+ - \text{Cu}^{2+}$ перевагу в зв'язуванні з мембраною мають катіони Cu^{2+} , що пояснюється їх більшим зарядом. Тут необхідно зазначити, що подвійна кількість молей нітрат-іона в складі $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ вносить додатковий негативний внесок у ΔT_m та входить у мембранотропну дію нітрату міді (див. рис. 4.10, $x_{\text{Ag}} = 0$) і, отже, не повинна розглядатися як самостійний фактор.

Конкурентна взаємодія в парах $\text{Ag}^+ - \text{Na}^+$ и $\text{Ag}^+ - \text{K}^+$ може бути пояснено емпіричним правилом Пескова-Фаянса. Згідно з цим правилом, перевагу в конкурентній адсорбції має той іон, який може утворювати з одним з іонів, що входять до складу адсорбенту, малорозчинне з'єднання [176]. Іоном, що зв'язує катіони на поверхні мембрани, є залишок ортофосфорної кислоти, при цьому розчинність фосфату срібла в воді істотно менше розчинності фосфатів

калію і натрію [177]. Таким чином, у парах $\text{Ag}^+ - \text{Na}^+$ и $\text{Ag}^+ - \text{K}^+$ перевагу в зв'язуванні з ліпідною мембраною мають катіони Ag^+ .

4.2. Дослідження сукупної мембранотропної дії основної діючої речовини фармпрепарату з допоміжними речовинами

У попередньому розділі було досліджено індивідуальну мембранотропну дію БАС, багато з яких є основною діючою речовиною (ОДР) фармпрепаратів. Так як сучасні фармпрепарати складаються із ОДР та низки допоміжних речовин (ДР), цікаво було визначити мембранотропну дію ДР та встановити вплив ДР на сумісну мембранотропну дію ОДР + ДР на прикладі існуючих фармпрепаратів. Ця локальна задача є ланкою масштабної задачі сучасної фармакології – порівняння властивостей генериків, відповідність генеричних форм оригінальним, вибір ДР для оптимізації дії основної діючої речовини, тощо.

З цією метою було досліджено порівняльну мембранотропну дію низки промислових ФП із їхньою ОДР. Досліджувані препарати, їх склад, а також деякі фізико-хімічні властивості їх ОДР наведені в табл. 4.4.

Згідно з даними табл. 4.4, усі досліджувані речовини є досить малими молекулами ($M < 450$ Да) із різноманітними коефіцієнтами ліпофільності [114]: від ліпофільного аміксину до гідрофільного фенібуту. Усі вони, за виключенням катіону срібла, за даними [178], мають високу проникну здатність, особливо фенібут, який долає навіть гемато-енцефалічний бар'єр, непроникний для більшості фармпрепаратів.

Таблиця 4.4.

Досліджувані препарати та їх характеристики

Назва препарату	ОДР	Фізико-хімічні властивості ОДР	Всмоктування тканинами	ДР
Протаргол	Ag^+	хаотропний катіон $M = 106,9$ Да $r = 1,15$ Å	низьке	протеїн, фізіологічний розчин

Назва препарату	ОДР	Фізико-хімічні властивості ОДР	Всмоктування тканинами	ДР
Аспірин-Комплекс	ацетил-саліцилова кислота	$C_{18}H_{14}O_7$ M = 342,3 Да XLogP3: 2,5	високе	кислота лимонна, натрію гідрокарбонат, ароматизатор, барвник
Аміксин ІС	аміксин	$C_{25}H_{34}N_2O_3$ M = 410,5 Да XLogP3: 4.7	високе	кальцію гідрофосфат, гідроксипропілметилцелюлоза, целюлоза, повідон, крохмаль картопляний, поліетиленгліколь, кремнію діоксид, барвники
Ереспал	фенспірид гідро-хлорид	$C_{15}H_{20}N_2O_2$ M = 260.3 Да XLogP3: 2.1	високе	кальцію гідрофосфат, гіпромелоза, повідон, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарин, титану діоксид, гліцерин, макрогол
Нообут ІС	фенібут	$C_{10}H_{13}NO_2$ M = 179.2 Да XLogP3: -1.6	дуже високе (проникає через гемато-енцефалічний бар'єр)	лактози моногідрат, крохмаль картопляний, повідон, кальцію стеарат

4.2.1. Препарати срібла

При порівняльному тестуванні розчинів нітрату срібла та протарголу на ліпідній модельній мембрані можна побачити якісно різні картини (рис.

4.12). У той час, коли срібло в складі нітрату знижує температуру основного фазового переходу мембрани ($\Delta T_m > 0$), у складі протарголу, із білковою ДР, ця дія стає якісно протилежною – температура основного фазового переходу мембрани підвищується ($\Delta T_m < 0$).

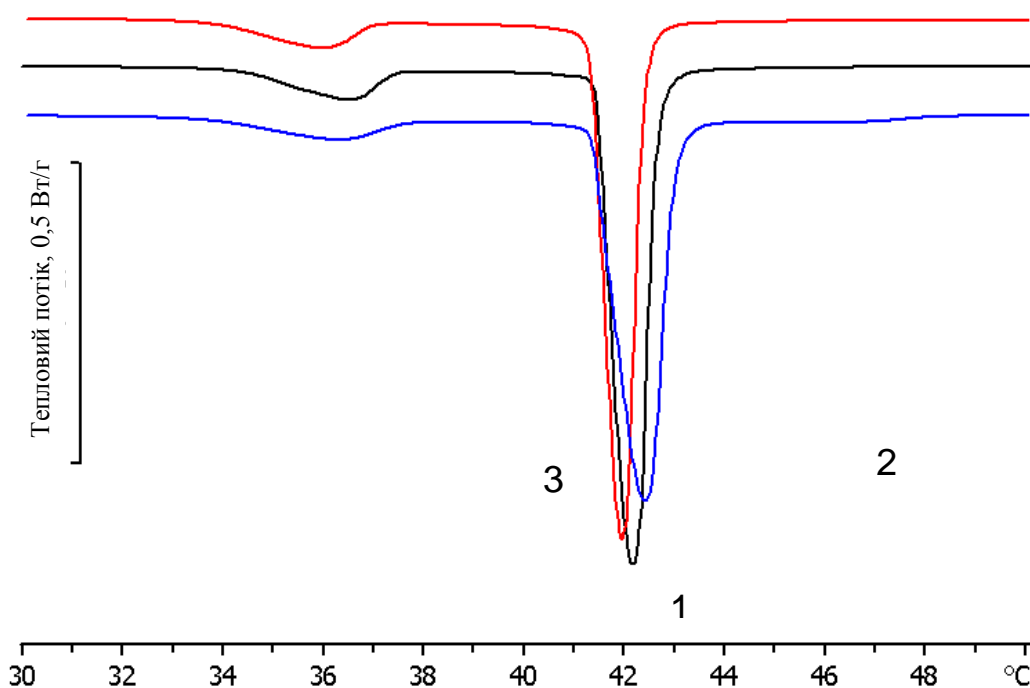


Рисунок 4.12. Оригінальні ДСК-термограми вивідної модельної ліпідної мембрани (1), та модельні мембрани із вмістом нітрату срібла (2) та протарголу (3)

4.2.2. Аспірин

Аспірин (ацетилсаліцилова кислота) є препаратом широкого спектру дії. Його широко застосовують як жарознижувачий та протизапальний засіб, також він має анагетичні та антиагрегаційні властивості [177]. Препарату «Аспірин Комплекс» окрім ацетилсаліцилової кислоти містить ще дві діючі речовини – фенілефрін (судинозвужувальне) та хлорфенирамін (протиалергічне), але їх вміст відносно ацетилсаліцилової кислоти становить 3,1 та 0,4 %, відповідно. Тому можна припустити, що їх внесок у мембранотропну дію препарату не є дуже значним.

Концентраційні залежності зсуву температури основного фазового переходу модельних ліпідних мембран від вмісту аспірину у вигляді індивідуальної речовини та в складі фармпрепарату представлені на рис. 4.13.

Як можна побачити, для препарату «Аспірин Комплекс» в обох режимах температурного сканування спостерігався значно менший зсув T_m , ніж для індивідуального аспірину.

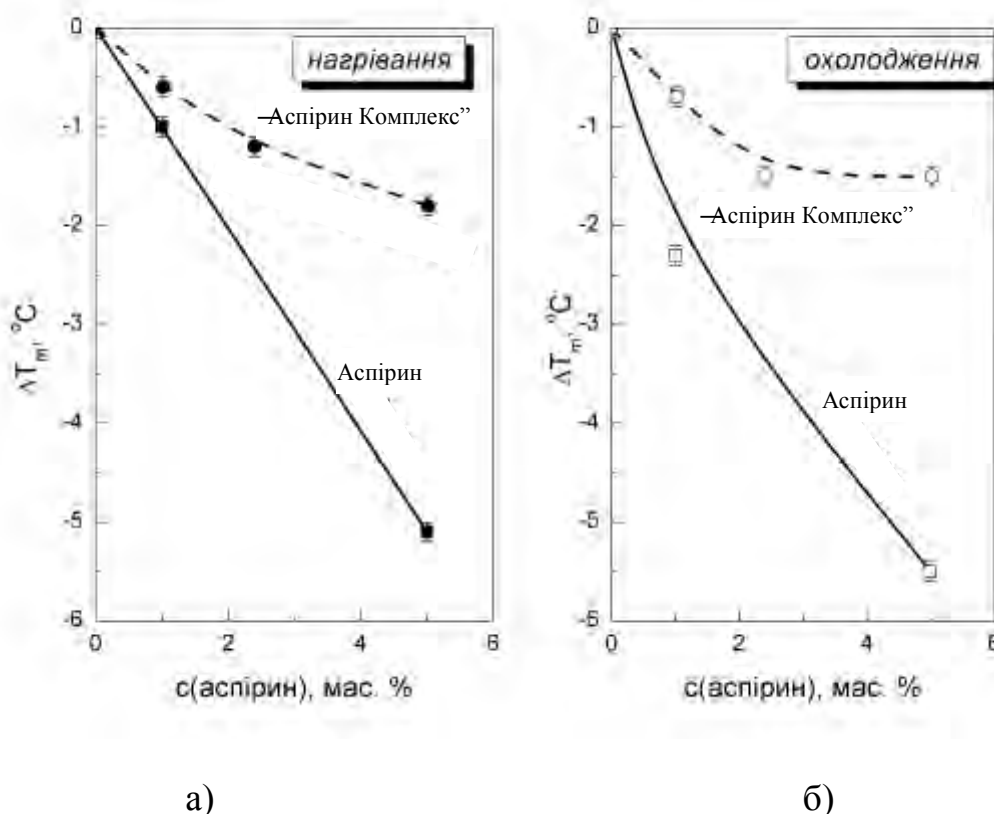


Рисунок 4.13. Концентраційні залежності зсуву температури основного фазового переходу модельних ліпідних мембран від вмісту аспірину при нагріванні (а) та охолодженні (б) для препарату «Аспірин Комплекс» та чистого аспірину

4.2.3. Аміксин

Препарат «Аміксин ІС» – це новий препарат противірусної дії. Як можна побачити з рис. 4.14, у фармпрепараті ΔT_m в абсолютному значенні зменшується, порівняно з ОДР, завдяки присутності ДР у складі.

Треба також відзначити, що отримані концентраційні залежності мають немонотонний характер. Так, максимальне (за абсолютною величиною) значення ΔT_m відповідає концентрації аміксіну близько 2,5 мас. %. Ця концентрація відзначається й на концентраційних залежностях ентальпії основного фазового переходу.

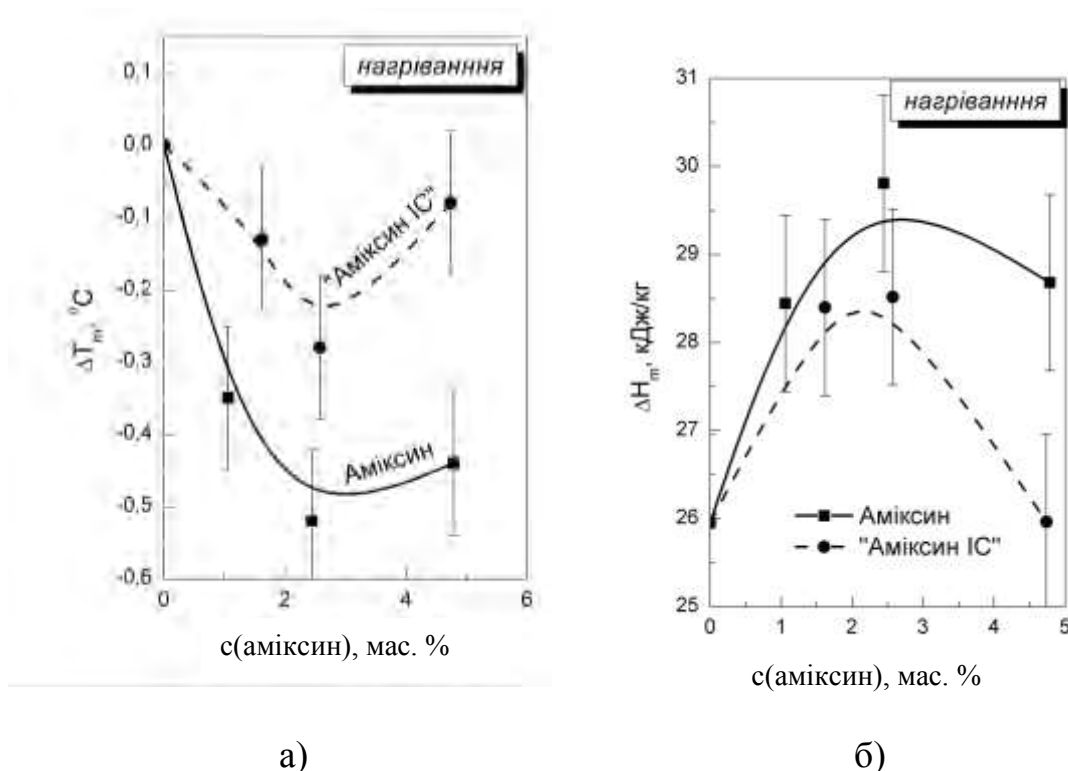


Рисунок 4.14. Концентраційні залежності температури (а) та ентальпії (б) основного фазового переходу модельної ліпідної мембрани від вмісту аміксіну при нагріванні для препарату «Аміксин ІС» та чистого аміксіну

4.2.4. Фенспірид

Фенспірид – протизапальний препарат, який також має спазмолітичну дію [177]. Фенспірид – ОДР препарату «Ереспал». Як можна побачити з концентраційних залежностей (рис. 4.15), введення фенспіриду в модельні ліпідні мембрани призводить до поступового зниження температури

основного фазового переходу із ростом вмісту досліджуваної речовини. Передперехід при охолодженні не простежується, а при нагріванні зникає при концентрації фенспіриду вище 2,5 %. Для фенспірида зареєстровано підвищення ΔH_m та зниження ΔH_p (рис. 4.15 б). Вплив ОДР фенспірид на ентальпію основного переходу виявляється більшим, ніж фармпрепарату «Ереспал». Спадання T_p відбувається набагато сильніше, ніж спадання T_m , що є типовим для гідрофільних речовин, які збурюють гідратну оболонку бішару. Докладніше гідратаційні взаємодії фенспіриду із модельними ліпідними мембранами окреслені у п. 4.3.

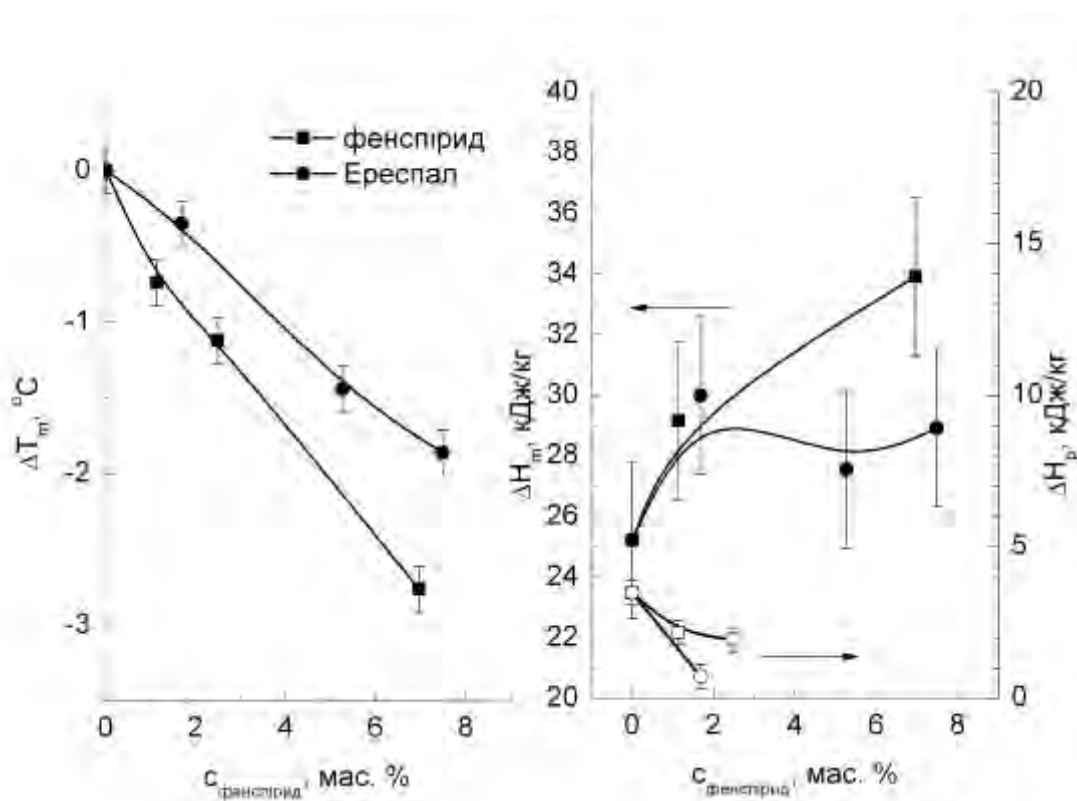


Рисунок 4.15. Концентраційні залежності температури основного фазового переходу а), ентальпії основного переходу (заповнені символи) та передпереходу (відкриті символи) б) модельних ліпідних мембран із вмістом фенспіриду та Ереспалу

4.2.5. Фенібут

Фенібут (індивідуальну мембранотропну дію див. п. 3.1.7) є ОДР фармпрепарату «Нообут ІС». Для модельної ліпідної мембрани із вмістом препарату «Нообут ІС» було зареєстроване таке ж за характером розщеплення, як і для фенібуту: оригінальний пік ДСК-термограми містить три складові: 1 – високотемпературну, 2 – середню (майже незмінну відносно вивідної мембрани ДПФХ), 3 – низькотемпературну. Очевидно, що пік 1 відповідає ущільненій фазі ліпідів, пік 2 – вихідній модельній ліпідній мембрані, а пік 3 – розрідженій фазі.

Для співставлення та інтерпретації отриманих результатів нами були визначені температури всіх піків (рис. 4.16), а також доля площі кожного з піків Q/Q_i відносно загальної площі піку на термограмі (рис. 4.17). Параметр Q/Q_i дає змогу приблизно оцінити долю ліпідів, що входять до складу відповідної фази.

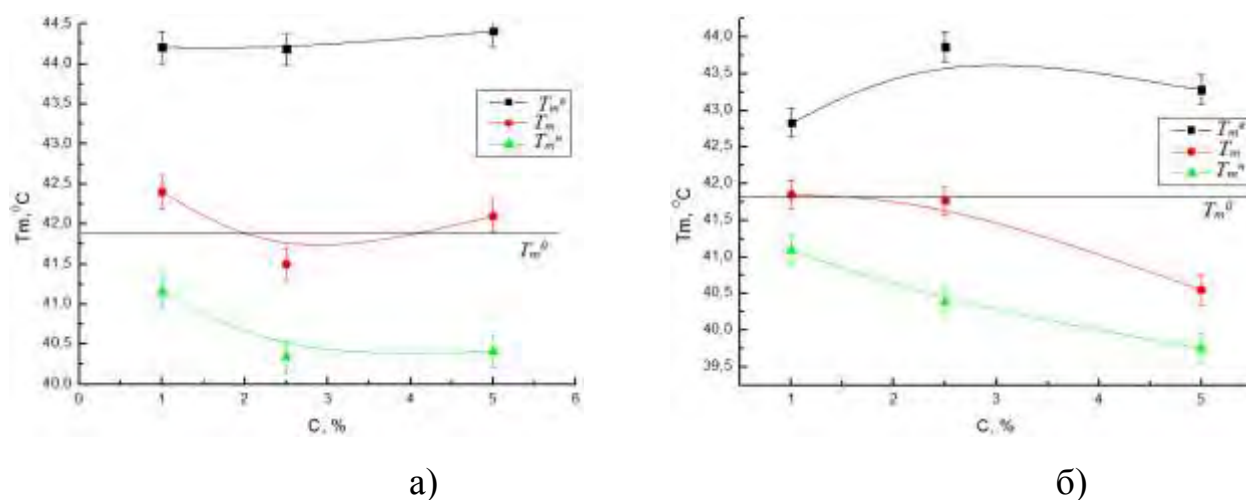


Рисунок 4.16. Концентраційні залежності температур піків-складових основного фазового переходу для низькотемпературної, середньої та високотемпературної фаз модельних мембран, що містить фенібут (а) та «Нообут ІС» (б)

Отже, по-перше, треба відзначити однаковий загальний характер змін

усіх отриманих параметрів. Це свідчить про те, що вказані ефекти притаманні саме ОДР фенібут, а допоміжні речовини в препараті змінюють цю картину тільки кількісно, але не якісно. По-друге, всі три типи піків є концентраційно-залежними. По-третє, складові фармпрепарату «Нообут ІС» зсувають як температурні параметри, так і параметри Q/Q_i досліджуваних систем. Нарешті, усі температури піків для модельної ліпідної мембрани із вмістом фармпрепарату «Нообут ІС» мають загальну тенденцію до зменшення порівняно із модельними ліпідними мембранами з фенібутутом.

Щодо параметрів Q/Q_i , то для чистого фенібуту із підвищенням його концентрації в модельних мембранах спостерігається взаємопов'язане зменшення Q/Q_2 та зростання Q/Q_3 , тобто має місце перерозподілення ліпідів із основної фази в низькотемпературну. Доля високотемпературної фази ліпідів v_1 змінюється незначно (у межах від 0,1 до 0,2) у досліджуваному концентраційному діапазоні. У модельних мембранах із вмістом «Нообуту ІС» вказане перерозподілення зсувається в бік основної фази ліпідів Q/Q_2 , в основному за рахунок зменшення долі розрідженої фази ліпідів Q/Q_3 .

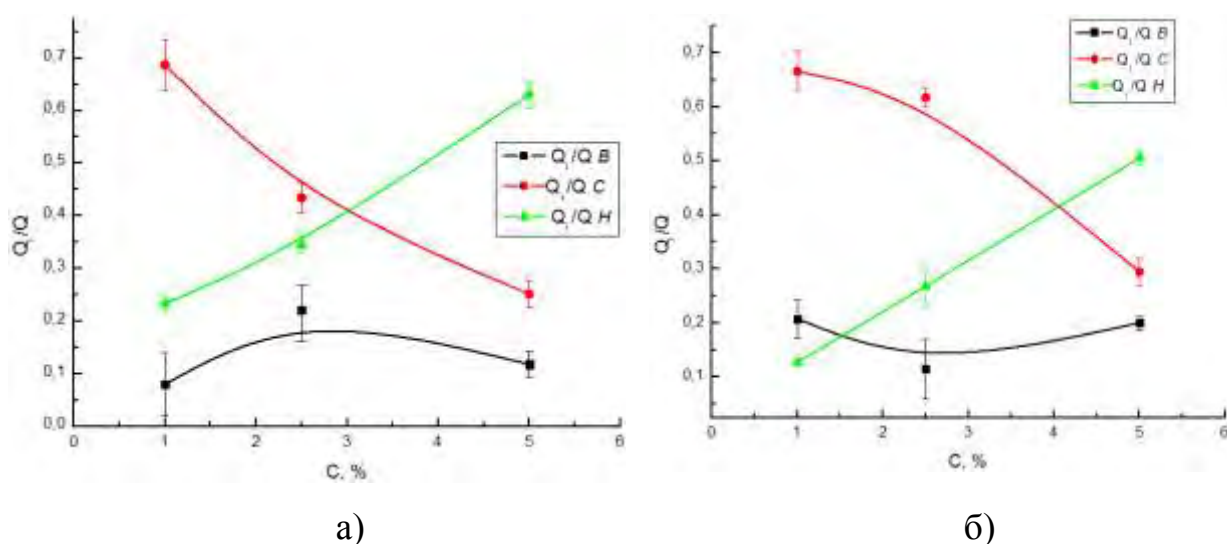


Рис. 4.17. Перерозподіл долі піків плавлення кожної з фаз модельних мембран, що містить фенібут (а) та «Нообут ІС» (б)

Усі вищевказані особливості мембранотропної дії фенібуту можуть мати безпосереднє відношення до механізмів його проникнення крізь клітинні мембрани. Відомо, що неоднорідність ліпідної фази створює додаткові можливості для проникнення різноманітних речовин, вірогідність якої різко підвищується на межах фаз [179]. Таким чином, механізм проникнення фенібуту крізь ліпідний бішар може полягати саме в створенні зон мікронеоднорідностей (дефектів), через які дифузія фенібуту виявляється полегшеною.

4.3. Гідратаційні властивості БАС за даними Фур'є-ІЧ спектроскопії

Оскільки властивості поверхні ліпідного бішару значною мірою визначаються властивостями гідратної оболонки [55], усі чинники, що змінюють ці властивості, автоматично будуть мати відгук у вигляді змін параметрів бішару. Тож, введення БАС до складу модельної ліпідної мембрани ДПФХ не тільки змінює відносний вміст зв'язаної води, але й впливає на нерозривно пов'язані із ним енергетичні параметри ліпід-ліпідної взаємодії.

На поверхні модельних мембран експоновані полярні групи ДПФХ: фосфатна (PO_4^-) та холінова ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$). Фосфатна група є центром негативного заряду молекули ДПФХ, амонійова ($\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$), що входить до складу холінової, є центром позитивного заряду. Зв'язування БАС із поверхнею мембрани може призводити до змін мікрооточення обох груп, що відбивається у Фур'є-ІЧ спектрах.

За допомогою Фур'є-ІЧ спектроскопії було досліджено низку модельних мембран, що містили ФП «Нообут ІС», «Аміксин ІС», «Ереспал», «Етамбутол» та ОДР метронідазол та ФП на його основі. Отримані спектри наведено на рис. 4.18.

З усіх досліджених БАС вплив на властивості функціональних груп поверхні ліпідного бішару був встановлений тільки для ФП «Нообут ІС». Для

нього був зареєстрований батохромний зсув смуги поглинання симетричних валентних коливань фосфатної групи ($\nu_s \text{P=O}$) 1082 cm^{-1} (рис. 4.19). Тож, можна сказати, що складові цього ФП взаємодіють із поверхнею ДПФХ мембрани та змінюють її параметри.

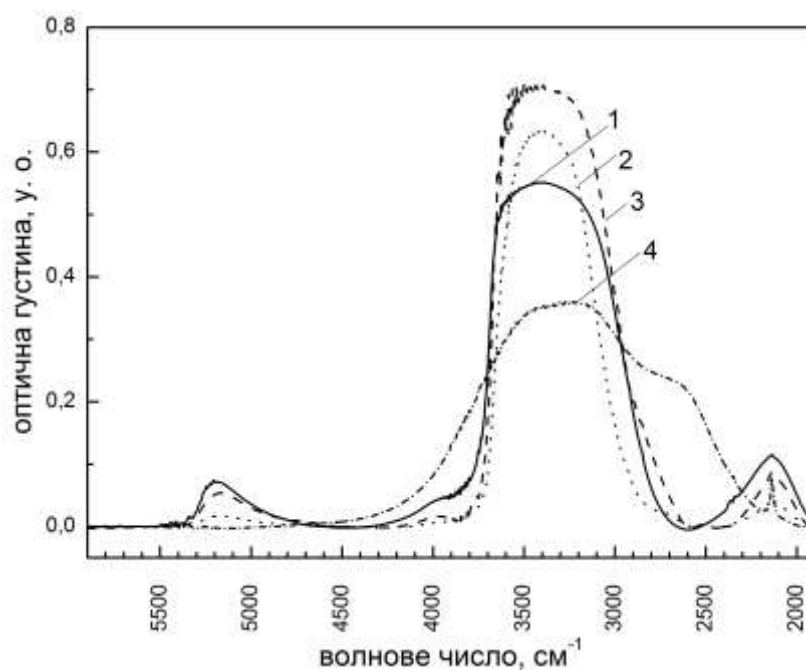


Рисунок 4.18. Нормовані Фур'є-ІЧ-спектри поглинання води (1) та 13 % водних розчинів аміксину (2), фенібуту (3) та «Ереспалу» (4)

Гідратаційні сили – одні з основних сил у формуванні ліпідних структур. Як можна побачити, присутність ФП дуже сильно змінює форму смуг поглинання води 5200 cm^{-1} , 3400 cm^{-1} та 2140 cm^{-1} [180, 181]. Особливо помітні зміни в широкій смузі 3400 cm^{-1} , де для аміксину є звуження, тоді як для «Ереспалу» – суттєве розширення (рис. 4.20). «Ереспал» призводить до кардинальних змін смуг 5200 cm^{-1} та 2140 cm^{-1} . Перша з них для цього ФП майже зникає, тоді як друга має різко зменшену напівширину.

Згідно із літературними даними [179], смуга 3400 cm^{-1} є суперпозицією щонайменш трьох складових: симетричних валентних коливань

гідроксильних груп води ($\nu_s\text{OH}$), асиметричних коливань цих груп ($\nu_{as}\text{OH}$) та валентні коливання груп деструктурованої, «мультимерної», ($\nu_m\text{OH}$).

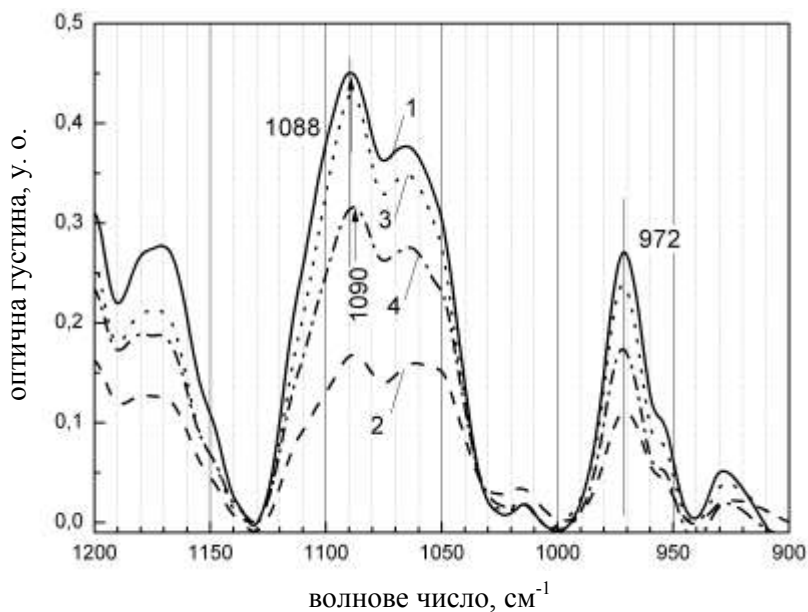


Рисунок 4.19. Смуги поглинання фосфатної групи ДПФХ для системи ДПФХ+«Нообут ІС»: 1 – 0 %; 2 – 1 %; 3 – 2,5 %; 4 – 5 % «Нообут ІС»

Значення цих смуг були отримані шляхом розкладання складного піку на складові в гаусовій формі за допомогою вільного ПО «QtiPlot». Треба відмітити, що таке розкладання не є абсолютно точним, щонайменш з трьох причин. По-перше, форма піка поглинання не обов'язково є гаусовою, а в загальному випадку, гаусово-лоренцевою [182]. По-друге, у досліджуваних системах смуга νOH води частково перекривається зі смугою νCH_2 ДПФХ, тому розкладання мало проводиться одразу на всі складові. По-третє, нормування спектрів та віднімання базисної лінії також вносило певну похибку. На рис. 4.20 приведений зразок розкладу смуги νOH води з урахуванням смуги νCH_2 .

Аналогічне розкладання було виконано для ДПФХ мембран із БАС; його результати підсумовані в табл. 4.5. Коефіцієнт кореляції між первинним спектром та оригінальною кривою для всіх систем перевищував 0,99. Доля

відповідного піку в смузі поглинання (x_i) визначалась за співвідношенням його площі до загальної площі смуги поглинання νOH води. Результати, наведені в табл. 4.5, можуть дати загальне уявлення щодо тенденцій змін гідратації мембран у присутності БАС. Так, найбільш чутливим параметром виявилось положення смуги симетричних коливань $\nu_s\text{OH}$, яке суттєво зменшується в присутності усіх досліджуваних БАС.

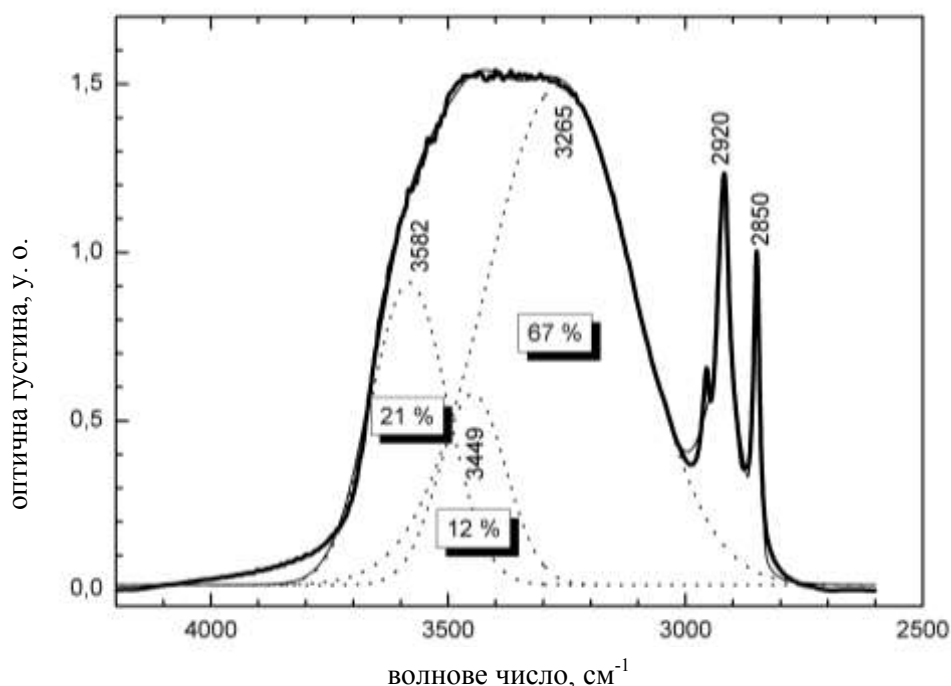


Рисунок 4.20. Розкладання ІЧ-спектру в області поглинання води: товста лінія – первинний спектр; крапчасті лінії – виокремленні піки νOH (піки νCH_2 не вказані); тонка лінія – сумарна оригінальна крива. У рамках позначена доля кожного піку відносно сумарного поглинання νOH

Смуга $\nu_{as}\text{OH}$, навпаки, зазнає гіпсохромного зсуву при введенні БАС до мембрани. При цьому доля піку асиметричних коливань (x_{as}) зменшується за рахунок фракцій симетричних коливань (x_s) та деструктурованої води (x_m). Треба відмітити, що максимум $\nu_s\text{CH}_2$ ДПФХ не змінюється в межах похибки визначення, тоді як $\nu_{as}\text{CH}_2$ має тенденцію до батохромного зсуву у випадку ФП «Ереспал». Треба зазначити, що для більшості систем розкладання було

схожим на те, що наведене на рис. 4.20, але не для всіх. Виключенням виявився ФП «Ереспал», для якого спостерігалось з'явлення додаткового короткохвильового піку 3818 см^{-1} (рис. 4.21). За даними табл. 4.5 можна побачити, що формування цієї фракції води йде за рахунок усіх фракцій води, про що свідчить зменшення значень x_i . Тож, з усіх досліджуваних БАС «Ереспал» має найсуттєвішу дію на водне оточення.

Таблиця 4.5.

Смуги поглинання метильних груп ДПФХ та гідроксильних груп води в ліпідних мембранах із різними ФП, отримані за результатами розкладання первинного спектру. Похибки визначення: $\delta\nu_{as} = 4\text{ см}^{-1}$; $\delta x_i = 2\%$

ФП	ДПФХ		Вода					
	$\nu_s\text{CH}_2$, см^{-1}	$\nu_{as}\text{CH}_2$, см^{-1}	$\nu_s\text{OH}$, см^{-1}	x_s , %	$\nu_{as}\text{OH}$, см^{-1}	x_{as} , %	$\nu_m\text{OH}$, см^{-1}	x_m , %
—	2850	2920	3265	67	3449	12	3582	21
«Аміксин IC»	2850	2917	3157	58	3500	36	3635	5
«Нообут IC»	2850	2914	3146	53	3491	42	3627	5
«Ереспал»	2848	2911	3104	44	3478	31	3636	4

Зрозуміло, що зміни полос поглинання різних фракцій води в присутності БАС залежать не тільки від виду БАС, але й від його концентрації в мембрані. Із збільшенням концентрації аміксіну максимумами коливань $\nu_s\text{OH}$ зазнають батохромного зсуву, тоді як $\nu_{as}\text{OH}$ та $\nu_m\text{OH}$ — гіпсхромного. Неоднаковий характер визначається й у параметрах x_i : величина x_{as} достовірно збільшується, x_m — дещо зменшується, тоді як значення x_s визначено недостовірно, певно, через вищезазначені труднощі розкладання.

В цілому можна стверджувати, що присутність БАС у модельних ліпідних мембранах суттєво змінює властивості водного оточення, що має враховуватися як одна з складових мембранотропної дії БАС.

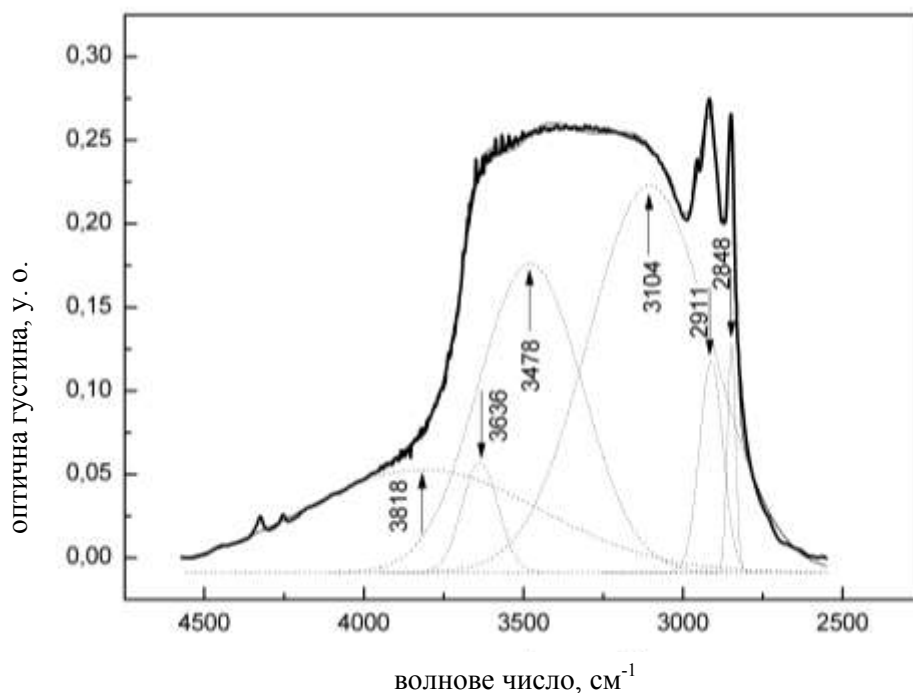


Рисунок 4.21. Розкладання ІЧ-спектру мембран із ФП «Ереспал» (20,3 мас. %) в області поглинання води. Позначення такіж, як на рис. 4.22

Для подальшого вивчення та з'ясування спостережених ефектів були приготовлені та досліджені за аналогічною методикою водні розчини ОДР вищевказаних препаратів. Отримані результати представлені на рис. 4.22. Як можна побачити, у водних розчинах ОДР значення $\nu_s\text{OH}$ та $\nu_{as}\text{OH}$ достовірно збільшуються із підвищенням концентрації ОДР, тоді як $\nu_m\text{OH}$ не змінюється (дані не наведені). Для ОДР аміксину та фенібуту відповідні криві досягають насичення за концентрацій близько 3 мас. %, тоді як для ОДР етамбутолу зміни мають місце в усьому досліджуваному концентраційному діапазоні. Дуже цікаві залежності отримані для величин x_i (рис. 4.22, г). Значення x_s та x_{as} симетрично змінюються, тоді як x_m залишається на одному рівні, про що свідчить незмінність суми x_s та x_{as} .

Якщо проводити порівняння із мембранами, що містять відповідні ФП, можна побачити, що не всі отримані параметри мають різні залежності у водних розчинах та в системах на основі модельних мембран. Найбільш цікавим є спостереження, що зміни x_s та x_{as} у водних розчинах та в модельних мембранах протилежні. Тож, можна дійти висновку, що на характеристики гідратації впливають як ОДР ФП, так і його ДР, а поверхня мембрани є вирішальним фактором [18].

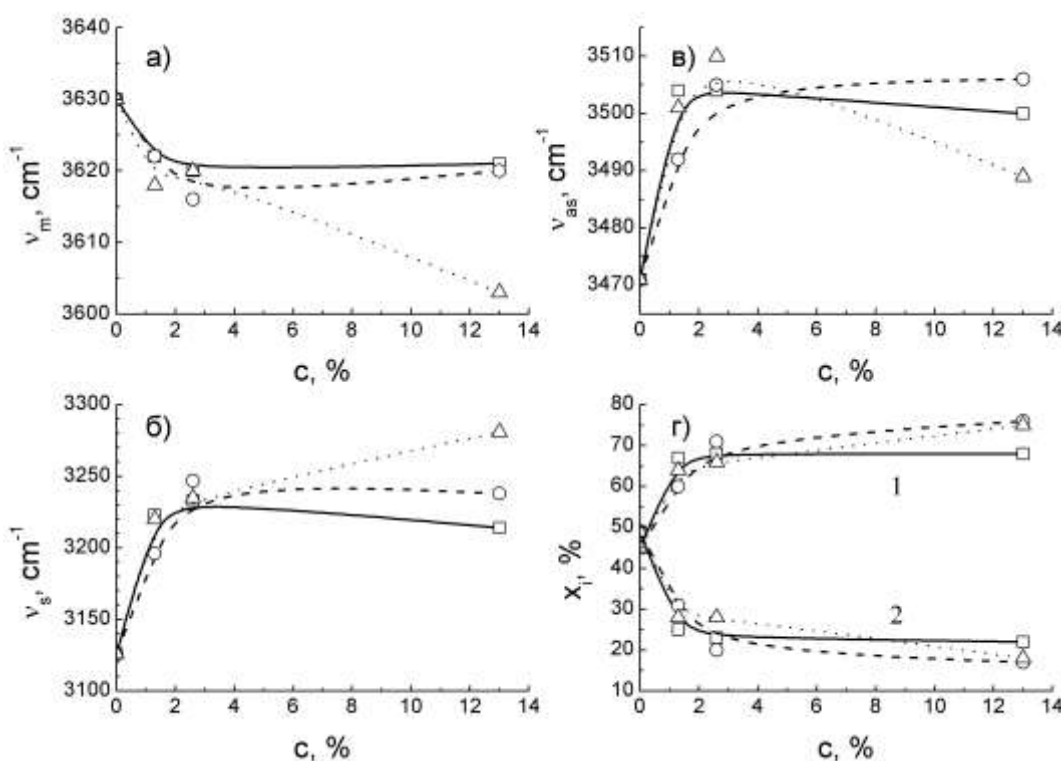


Рисунок 4.22. Зміни параметрів полос поглинання фракцій води в модельних мембранах із ОДР аміксином (лінія), фенібутотом (пунктирна лінія) та етамбутотом (крапчаста лінія) залежно від концентрації ОДР аміксину: $\nu_m \text{OH}$ (а), $\nu_s \text{OH}$ (б), $\nu_{as} \text{OH}$ (в), x_s (г, 1) та x_{as} (г, 2)

Параметри смуги νOH води, отримані для мембран ДПФХ, що містять ФП, відрізнялися від параметрів для мембран, що містять тільки відповідний ОДР. Так, для ФП «Аспірин-Комплекс» та «Ереспал» було зареєстровано

підвищення $\nu_s OH$, тоді як для ФП «Нообут ІС» і «Метронідазол Юрія-Фарм» – зниження. Параметри x_s і x_{as} також зазнавали різні зміни: для ФП «Аспірин-Комплекс» і, особливо, «Ереспал» спостерігалось підвищення x_{as} , та зниження x_s , тоді як для ФП «Нообут ІС» спостерігались протилежні зміни.

Підводячи підсумки, можна сказати, що встановлено чутливість гідратної складової ліпідної мембрани до присутності ФП та ОДР, а також показана суттєва роль поверхні мембрани в її формуванні. Тож, можна провести кореляцію між гідратаційними властивостями ЛС та їх мембранотропною дією. Взагалі, усі досліджувані ЛС мають специфічний вплив на гідратацію поверхні мембрани та дають внесок у зміни їх термодинамічних параметрів, але доля цього внеску може бути різною.

4.4. Порівняльні дослідження мембранотропної дії фармацевтичних аналогів

4.4.1. Препарати-аналоги метронідазолу

Виходячи з того, що склад ФП вирає дуже значну роль у його мембранотропних властивостях і, вірогідно, у його здатності всмоктуватися в тканини організму шляхом абсорбції, важливою задачею виявлялося порівняння мембранотропної дії ФП-аналогів. Такі препарати містять однакову ОДР в однаковій кількості, але відрізняються за складом ДР.

Були досліджені препарати-аналоги метронідазолу (див. табл. 4.6), а також ОДР метронідазол.

Таблиця 4.6.

Препарати-аналоги метронідазолу, досліджені в модельних мембранах

Назва препарату	Лікарська форма	ДР
«Метрогіл»	розчин	натрію хлорид, кислота лимонна моногідрат, натрію гідрофосфат, вода

Назва препарату	Лікарська форма	ДР
«Метронідазол Юрія-фарм»	розчин	натрію хлорид, дінатрію едетат, вода
«Трикасайд»	капсули	целюлоза мікрокристалічна, натрію хлорид, магнію стеарат, кремнію діоксид

Метронідазол – протимікробний препарат, який легко долає клітинні мембрани, проникаючи в мозок та плаценту. Як можна бачити, ця його властивість добре узгоджується із зниженням T_m та T_p (рис. 4.23 та 4.24). Незалежними методами показано, що наявність метронідазолу призводить до дезорганізації фосфоліпідних бішару [183].

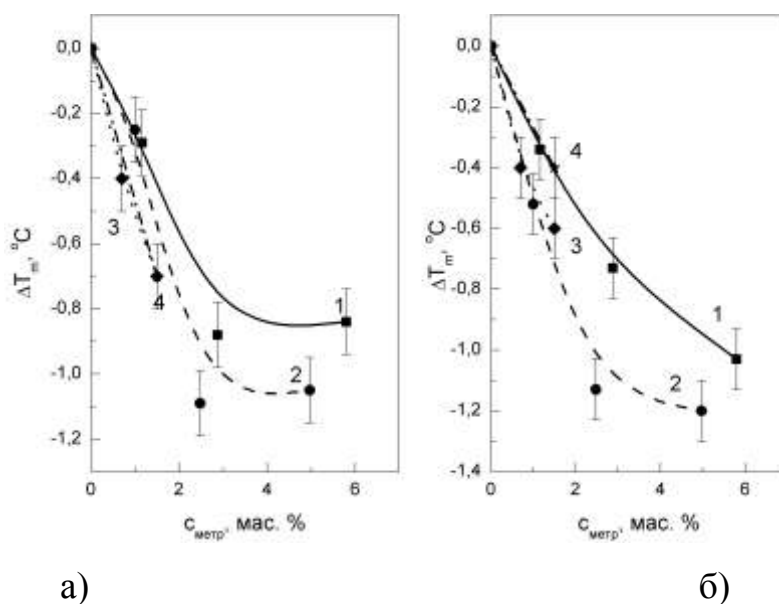


Рисунок 4.23. Залежності зсуву температури основного фазового переходу від вмісту метронідазолу при нагріванні (а) та охолодженні (б) для мембран, що містить: 1 – ОДР метронідазол; 2 – «Метрогіл»; 3 – «Метронідазол Юрія-фарм»; 4 – «Трикасайд»

За зсувом T_m найбільший ефект має «Метронідазол Юрія-фарм», тоді як на T_p найсильніше впливає «Метрогіл». Можна побачити й різницю зсувів T_p та T_m при нагріванні та охолодженні. Це, згідно з [34], може бути пов'язано

із впливом БАС не тільки на термостабільність, але й на гомогенність структури модельних мембран. Ефект ФП «Метронідазол Юрія-фарм», можливо, обумовлений присутністю в його складі дінатрію едетату – гідрофільної речовини, що має здатність створювати численні водневі зв'язки [114]. Можна також відмітити різницю в значеннях T_m , отриманих у режимах нагрівання та охолодження, яка особливо велика для ФП «Трикасайд» (рис. 4.23 та 4.24). Такий зсув зазвичай є результатом підвищення неоднорідності мембран у присутності БАС.

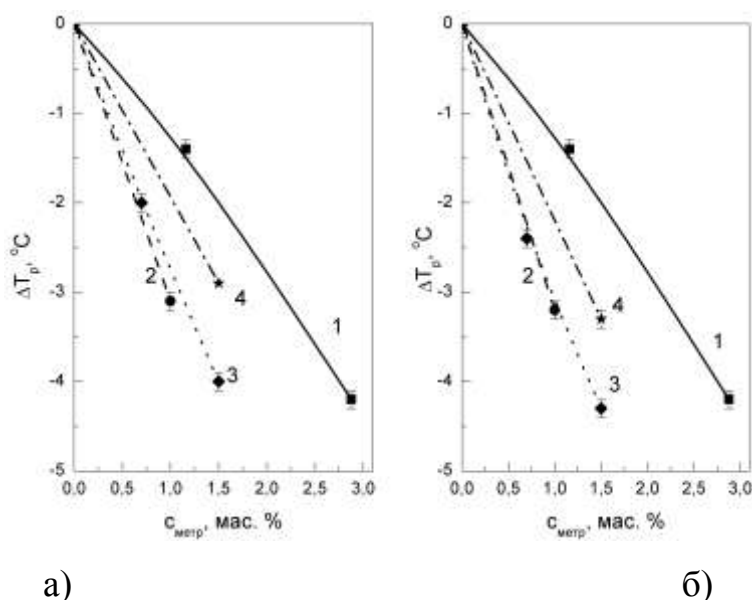


Рисунок 4.24. Залежності зсуву температури передпереходу від вмісту метронідазолу при нагріванні (а) та охолодженні (б) для мембран, що містить: 1 – ОДР метронідазол; 2 – «Метрогіл»; 3 – «Метронідазол Юрія-фарм»; 4 – «Трикасайд»

4.4.2. Препарати-аналоги азітроміцину

Параметри фазових переходів модельних ліпідних мембран, що містять препарати азітроміцину та ОДР азітроміцин, наведені у табл. 4.7.

В цілому група азітроміцину характеризується розмитим та зниженим передпереходом (T_p) у поєднанні із більш високими значеннями ентальпії

(ΔH_p). У групі азітроміцину можна відмітити загальне зниження T_m та T_p без суттєвих змін в ΔH_p , ΔH_m та h . Найбільш виражений ефект зареєстрований для препарату «Азітроміцин».

Мембранотропна дія азітроміцину узгоджується із його високим коефіцієнтом ліпофільності (див. табл. 2.1), що сприяє його проникненню крізь ліпідний бішар клітинної мембрани. Про високу проникаючу здібність азітроміцину свідчать також медичні дані щодо його накопичення в різних тканинах організму, у тому числі в головному мозку [39].

Таблиця 4.7.

Параметри фазових переходів модельних фосфоліпідних мембран, що містять антибіотик азітроміцин у складі відповідних препаратів

Препарат	Нагрівання				Охолодження		h , °C
	T_p , °C	ΔH_p , кДж/кг	T_m , °C	ΔH_m , кДж/кг	T_m , °C	ΔH_m , кДж/кг	
—	35,3	3	41,8	24	40,6	25	1,2
Азітроміцин дігідрат	33,6	1	41,6	25	40,4	27	1,2
«Азіцин»	34,3	1	41,5	26	40,4	28	1,2
«Азітроміцин»	31,8	1	41,3	24	40,4	25	1,0
«Хеоміцин»	32,2	1	41,6	22	40,5	22	1,1

Індивідуальна мембранотропна дія азітроміцину була детально розглянута в розділі 3.1.2. Концентраційні залежності $T_m(c_{аз})$, отримані для чистого азітроміцину та для всіх досліджених його ФП, наведені на рис. 4.25.

Тут також має місце немонотонний хід залежності з мінімумом близько 5 мас. %. Немонотонність особливо чітко виражена для «Азітроміцину» та «Хеоміцину», яким, до того ж притаманні найбільш суттєві відмінності від

ОДР, тоді як для «Азіцину» отримані характеристики близькі до чистого азітроміцину.

Спостережуваний ефект логічно зв'язати із відмінностями в складі ДР, оскільки це є одним з важливих факторів, що впливають на біодоступність фармпрепаратів [184]. Зв'язуючись із модельними ліпідними мембранами, ДР можуть модифікувати її властивості, у тому числі й у бік зниження щільності упаковки ліпідів. У такому випадку за однакової концентрації водного розчину розподілення азітроміцину в мембрану відбуватиметься більш ефективно. Саме цим може пояснюватися посилення вищевказаних ефектів, тобто зниження T_m за невеликих значень $c_{аз}$, а також підвищення T_m за більш високих $c_{аз}$.

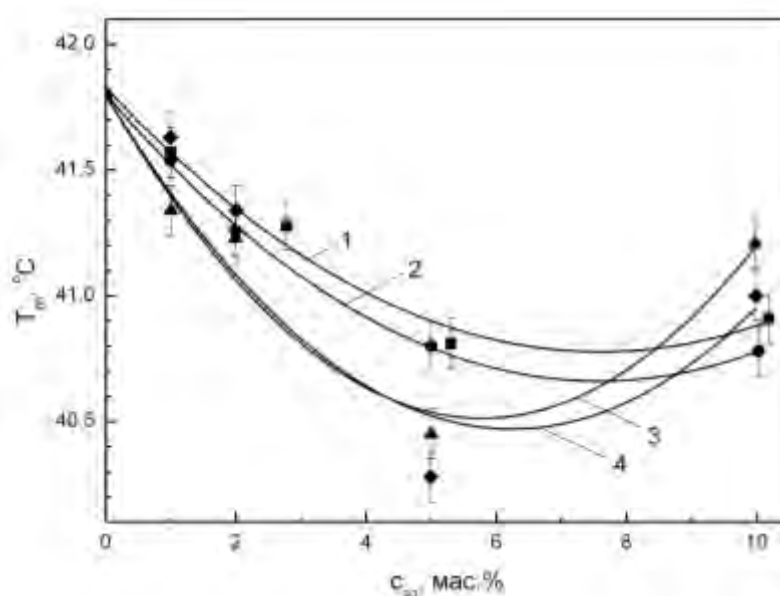


Рисунок 4.25. Концентраційні залежності T_m для модельних ліпідних мембран, що містять азітроміцину дігідрат (1) та препарати азітроміцину: «Азіцин» (2), «Азітроміцин» (3) та «Хеоміцин» (4).

Таким чином, очевидним є ефект інтерференції мембранотропної дії ОДР та ДР у складі фармпрепарата, який може призводити до зміни фармакокінетики ФП.

4.5. Аналіз ролі допоміжних речовин у мембранотропній дії фармпрепаратів

4.5.1. Аналіз мембранотропної дії ДР у фармпрепаратів-аналогів, що містять азитроміцин

Зважаючи на те, що фармпрепарати азитроміцину призводять до більш вираженого зниження T_m , ніж ОДР (азитроміцину дигідрат) (розділ 4.4.2), було розглянуто ДР, які входять у склад ФП та можуть посилювати мембранотропний ефект ОДР. У табл. 4.8 наведено склад ДР досліджуваних фармпрепаратів. Відмінні ДР (кол. 3 табл. 4.8) були визначені після виключення таких речовин:

- 1) компоненти оболонки (барвники, діоксин титану тощо), які були видалені в процесі підготовки зразків;
- 2) нерозчинні компоненти, що видалені в процесі фільтрування (тальк);
- 3) загальні для всієї даної групи компоненти, оскільки вони не викликали відмінностей мембранотропної дії серед представників групи.

Таблиця 4.8.

Склад ДР препаратів-аналогів антибіотика азитроміцину

Найменування препарату	ДР	Відмінні ДР
«Азіцин»	лактози моногідрат, натрію лаурілсульфат, повідон, магнію стеарат	повідон, натрію лаурілсульфат,
«Азитромицин»	лактоза безводна, натрію кроскармелоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, повідон, магнію стеарат, тальк, крохмаль кукурудзяний, калию поліакрилін, гіпромелоза, таллію діоксин (E171), макрогол 4000, заліза оксид жовтий (E172)	повідон, крохмаль кукурудзяний, калию поліакрилін, гіпромелоза, макрогол
«Хеоміцин»	лактоза безводна, крохмаль кукурудзяний, магнію стеарат, натрію лаурілсульфат	крохмаль кукурудзяний, натрію лаурілсульфат

З відмінних ДР макрогол слід віднести до речовин, що підвищують T_m , оскільки його хімічна структура майже співпадає зі структурою оксиетильованого гліцерину, мембранотропний ефект якого було нами досліджено раніше [5, 6]. Лаурилсульфат натрію є детергентом, який широко використовують завдяки його здатності підвищувати проникність клітинних мембран для фармпрепаратів [185]. Однак, відмінності в мембранотропній дії «Азіцину» (єдиного з досліджуваних аналогів, що містив лаурилсульфат натрію), від чистого азітроміцину були незначними в порівнянні із дією інших досліджуваних препаратів-аналогів. Тобто, у даному експерименті вплив лаурилсульфату натрію був далеко не найсуттєвішим серед усіх ДР. Повідон, крохмаль, крохмальгліколят та гіпромелоза є гідрофільними полімерами, які, внаслідок цього, не проникали вглиб ліпідного бішару. У літературі містяться відомості, що гіпромелоза не має суттєвого впливу на проникність клітинних мембран [184], тоді як для інших перелічених ДР мембранотропну дію достовірно не встановлено.

Аналізуючи склад ДР для препаратів-аналогів азітроміцину, можна виключити ще набір ДР для «Азіцину», оскільки його дія майже не відрізнялася від дії чистого азітроміцину.

Тоді єдина ДР, спільна для «Хеоміцину» та «Азітроміцину», для яких був виявлені найбільші зміни, – це крохмаль кукурудзяний. Крім того, можна очікувати, що ефект зниження T_m дають поліакрилін та гіпромелоза, оскільки їх дія має «перекривати» ефект макроголу, який підвищує T_m .

Такий висновок є дуже нетривіальним, тому що усі перелічені речовини є гідрофільними, внаслідок чого взаємодіють із поверхнею ліпідного бішару, тоді як азітроміцин є гідрофобною речовиною та взаємодіє із об'ємом ліпідного бішару. Очевидно, що тут було б доречно запропонувати механізм такого ефекту.

4.5.2. Фізико-хімічний механізм сукупної мембранотропної дії для гідрофобної та гідрофільної

Насьогодні вже добре відомим є механізм сумісної **мембранотропної** дії між двома гідрофобними речовинами, однією з яких є холестерин. Схематично такий процес представлений на рис. 4.26. Речовина, уведена в ліпідну мембрану, знаходиться в ліпідній фазі в концентрації c_{lipid} , а у водній – у концентрації c_{water} (рис. 4.26, а). Співвідношення $c_{\text{lipid}}/c_{\text{water}}$ характеризує розподілення даної речовини між водною та ліпідною фазами, яке залежить від характеристик як речовини (коефіцієнту ліпофільності, геометричних розмірів, зарядового стану тощо), так і ліпідного бішару (товщини, ліпідного складу, властивостей поверхні тощо).

Відомо, що холестерин призводить до зменшення вільного об'єму ліпідного бішару (ущільнююча дія). У присутності холестерину властивості бішару змінюються, головним чином за рахунок того, що зменшується величина вільного об'єму в гідрофобній області бішару. Внаслідок цього відбувається перерозподілення речовини між бішаром та водною фазою з утворенням відповідних концентрацій c'_{lipid} та c'_{water} . При цьому $c'_{\text{lipid}} < c_{\text{lipid}}$, а $c'_{\text{water}} > c_{\text{water}}$ (рис. 4.26, б), тобто розподілення ліпід/вода зсувається в бік води.

Таке уявлення щодо модифікацій властивостей бішару є загальноприйнятим у випадку з холестерином [186]. Можна, однак, поширити його й на інші гідрофобні речовини, які, розподіляючись у бішар, зменшують його вільний об'єм. Тож, схема, запропонована на рис. 4.26, описує механізм сумісної мембранотропної дії за гідрофобним типом.

Щоб розібратися в механізмі сумісної мембранотропної дії за гідрофільним типом, треба докладніше зупинитися на модифікації бішару при взаємодії із гідрофільною молекулою. Виходячи із амфіфільності ліпідних молекул, що формують бішар, гідрофільна молекула, особливо полімер, який має значний розмір, може взаємодіяти тільки із гідрофільною поверхнею бішару та не проникає вглиб бішару. Залишаючись на поверхні, гідрофобна

молекула має взаємодіяти тільки із полярною областю бішару – голівками ліпідів.

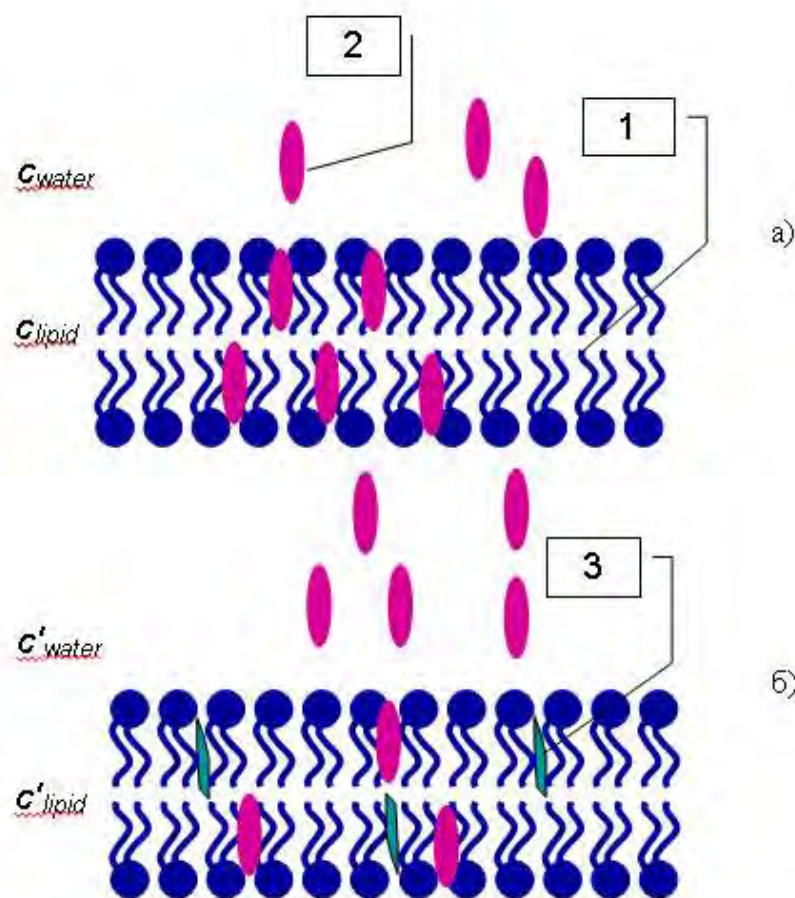


Рисунок 4.26. Сукупна мембранотропної дія гідрофобної та гідрофільної речовин. 1 – ліпідний бішар, 2 – гідрофобна молекула, 3 – молекула холестерину. c_{water} та c_{lipid} – концентрації гідрофобної речовини у воді та ліпіді, відповідно, за відсутності холестерину; c'_{water} та c'_{lipid} – відповідні концентрації в присутності холестерину

Треба взяти до уваги, що ця полярна область оточена потужною гідратною оболонкою, як і сама гідрофільна молекула. Тобто, без урахування змін гідратних оболонок неможливо коректно змодельовати процеси, що відбуваються на поверхні бішару. У деяких випадках такі взаємодії взагалі можуть відбуватися тільки на рівні гідратних оболонок, без безпосереднього контакту двох молекул, але призводити до суттєвих модифікацій властивостей бішару [139].

Залежно від властивостей гідратної оболонки гідрофільної молекули [126], поверхня бішару може зазнавати додаткової або недостатньої гідратації, що призводить до розріджування або ущільнення бішару [139]. На рис. 4.27 схематично наведені модифікації бішару у випадку, коли ступінь гідратації поверхні бішару збільшується. У цьому випадку збільшується площа перерізу ліпідної голівки, що викликає зміну її форми з циліндричної (1) на конусовидну (2). На рівні бішару це призводить до переваги площі, що зайнята гідрофільними частинами молекул, над площею, що зайнята гідрофобними частинами, а втім – до тенденції втрати бішаром планарності.

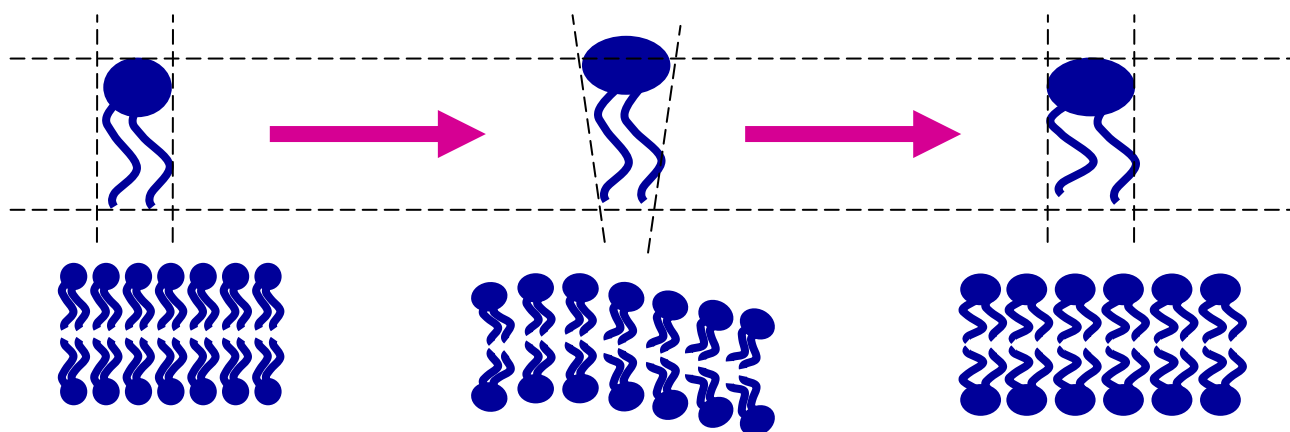


Рис. 4.27. Модифікація ліпідного бішару при гідратації поверхні

Такий стан є термодинамічно невідповідним, система прагне мінімізувати натяг шляхом надання молекулі циліндричної форми, яка забезпечує планарність структури бішару [55]. Це стає можливим за рахунок розупорядкування вуглеводневих ланцюгів у гідрофобній області бішару (3). Як наслідок такого процесу, вільний об'єм бішару збільшується. Таким чином, взаємодія бішару із гідрофільною молекулою, яка підвищує гідратацію поверхні ліпідного бішару, може призводити й до підвищення вільного об'єму гідрофобної області. Пам'ятаючи це, можна переходити до розглянення інтерференції мембранотропної дії речовин за гідрофільним типом. Фізико-

химична механізм зміни властивостей бішару та пов'язаний із цим перерозподіл гідрофобної речовини між ліпідним бішаром та водною фазою наведені на рис. 4.28. За певного початкового розподілення $c_{\text{lipid}}/c_{\text{water}}$ (рис. 4.28, а) система набуває динамічної рівноваги. При взаємодії гідрофільної молекули із поверхнею бішару останній зазнає модифікацій, внаслідок яких, як було показано на рис. 4.27, вільний об'єм бішару збільшується (рис. 4.28, б). Завдяки цьому розподіл гідрофобної речовини зсувається в бік ліпідної, тобто $c'_{\text{lipid}} > c_{\text{lipid}}$, а $c'_{\text{water}} < c_{\text{water}}$ (рис. 4.28, в).

Таким чином, при незмінній загальній концентрації речовини її вміст саме в бішарі збільшується. Це, звісно, відбивається в зміні термодинамічних параметрів ліпідних мембран.

Взагалі можна сказати, що ефекти сукупної мембранотропної дії є важко прогнозованими, тому що можуть бути опосередкованими через модифікацію властивостей ліпідного бішару. Втім, мембранотропна дія для ДР та ефекти інтерференції можуть з'явитися дуже важливим фактором, що впливає на фармакокінетику та біодоступність лікарського засобу, тому мають ретельно вивчатися. Це є особливо важливим для тих лікарських засобів, терапевтична концентрація ОДР в яких має вузький концентраційний діапазон.

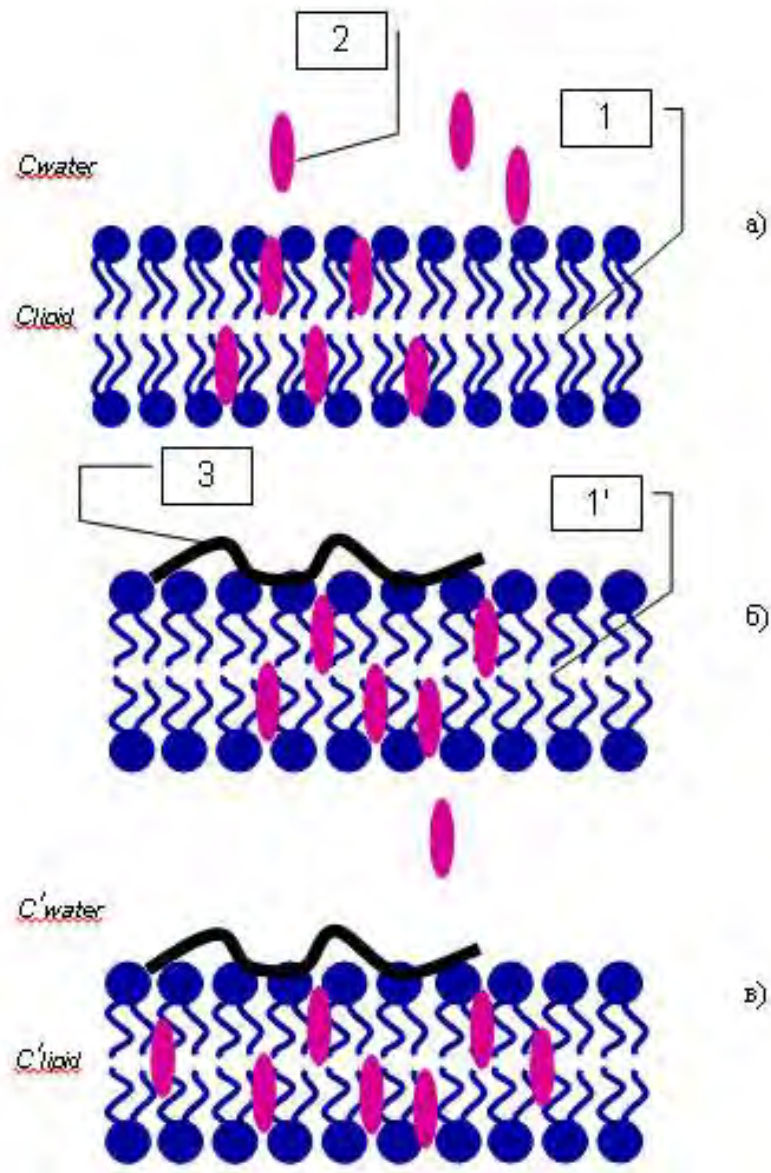


Рисунок 4.28. Сукупна мембранотропної дія гідрофобної та гідрофільної речовин. 1 – ліпідний бішар, 1' – модифікований ліпідний бішар, 2 – гідрофобна молекула, 3 – гідрофільна молекула. C_{water} та C_{lipid} – концентрації гідрофобної речовини у воді та ліпіді, відповідно, за відсутності гідрофільної молекули; C'_{water} та C'_{lipid} – відповідні концентрації в присутності гідрофільної молекули.

4.6. Висновки до розділу 4

1. Розвинуто методику досліджень сукупної дії БАС у квазібінарних системах на основі модельних ліпідних мембранах.
2. Показано, що сукупна мембранотропна дія окремих пар БАС може істотно відрізнятися від дії індивідуальних речовин внаслідок взаємодії молекул БАС у ліпідній мембрані (утворення міжмолекулярних комплексів або опосередкованої взаємодії за механізмом конкурентної адсорбції). Конкретними прикладами неадитивності мембранотропної дії є пари «бісчетвертинна амонієва сполука – аспірин», а також «нітрат срібла – нітрати лужних металів».
3. Запропоновано методику порівняння мембранотропної дії фармпрепаратів-аналогів. Визначено вплив допоміжних речовин на мембранотропну дію фармпрепаратів.
4. В досліджуваних фармпрепаратах визначальну мембранотропну дію має основна діюча речовина. Показано, що внесок допоміжних речовин у мембранотропну дію фармпрепаратів виявлявся в зміні температури основного фазового переходу модельної мембрани (підвищенні або зниженні), появі додаткових піків на ДСК-термограмах та зміні параметрів гідратації в системі.

РОЗДІЛ 5

ТЕОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ КОРЕЛЯЦІЙ МІЖ МОЛЕКУЛЯРНИМИ ПАРАМЕТРАМИ БАС ТА ЇХ МЕМБРАНОТРОПНОЮ АКТИВНІСТЮ

В розділі 3 нами було отримано низку експериментальних даних з впливу різноманітних речовин (біологічно активних субстанцій, БАС) на температури фазових переходів модельних фосфоліпідних мембран на основі гідратованого ДПФХ. Для порівняння результатів різних експериментів нами було запропоновано використовувати параметр мембранотропної активності (a_m). У цьому контексті він відповідає зміні температури основного фазового переходу T_m від внесення певної концентрації (1 % по масі) досліджуваних БАС:

$$a_m = \frac{\Delta T_m}{c}, \quad (5.1)$$

де ΔT_m – зсув T_m , c – масова концентрація внесеної речовини по відношенню до зневодненого ДПФХ. У відсутності хімічних та інших специфічних взаємодій у системі припускається масово-адитивна концентраційна залежність ΔT_m як найбільш адекватна (ще точніше було б використовувати об'ємні концентрації) [10, 80, 159].

Запропоновану нами класифікацію мембранотропних ефектів, яка базується як на літературних, так і власних (розділ 3) даних [3, 5, 10, 19, 54, 138, 141, 187-189], представлено на рис. 5.1. Можна виокремити два основні механізми мембранотропних ефектів, а саме: (1) переважна взаємодія молекули БАС з гідрофобною частиною ліпідів (абсорбція) та (2) переважна взаємодія з гідрофільною частиною (адсорбція). На рівні мембрани такі взаємодії призводять до (1) зміни об'єму неполярної області мембрани внаслідок збільшення /зменшення вільного об'єму та (2) зміни об'єму полярної області мембрани внаслідок процесів гідратації /дегідратації. Оскільки головною умовою існування планарної мембрани є форма ліпідних

молекул, близька до циліндричної, зміни в одній області мембрани викликають відповідні зміни в іншій [54]. Проявами обох механізмів є підвищення або зниження T_m , а також можливе утворення нових фаз (проявом чого може бути поява додаткового піка фазового переходу поряд з первинним, як для Ag^+ [3] та фенібуту [19]). В останньому випадку можна говорити про появу латеральної неоднорідності ліпідної мембрани або інших ознак утворення нової фази (наприклад, різка зміна значення ΔH_m для первинного піка у випадку гліцерину [73]).

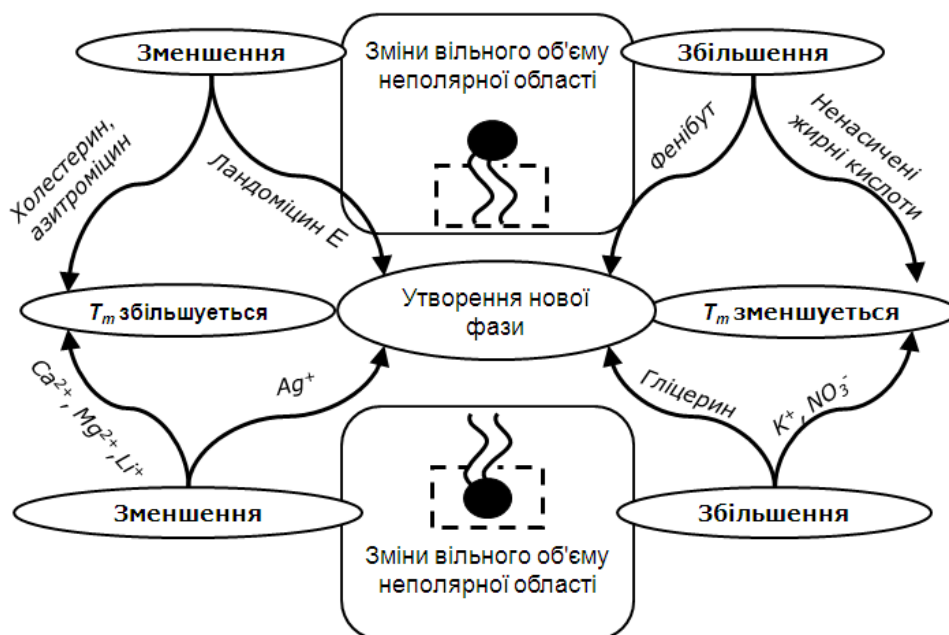


Рисунок 5.1. Загальна схема класифікації мембранотропних ефектів

Аналіз літературних та власних експериментальних даних дозволив нам виокремити та класифікувати основні фактори, що визначають мембранотропну дію індивідуальних речовин (рис. 5.2). Зрозуміло, що хімічна структура та геометричні параметри молекули є *a priori* важливими для визначення всіх властивостей. Також мають значення і електростатичні властивості, оскільки електростатичні взаємодії поміж нековалентних взаємодій є найсильнішими.

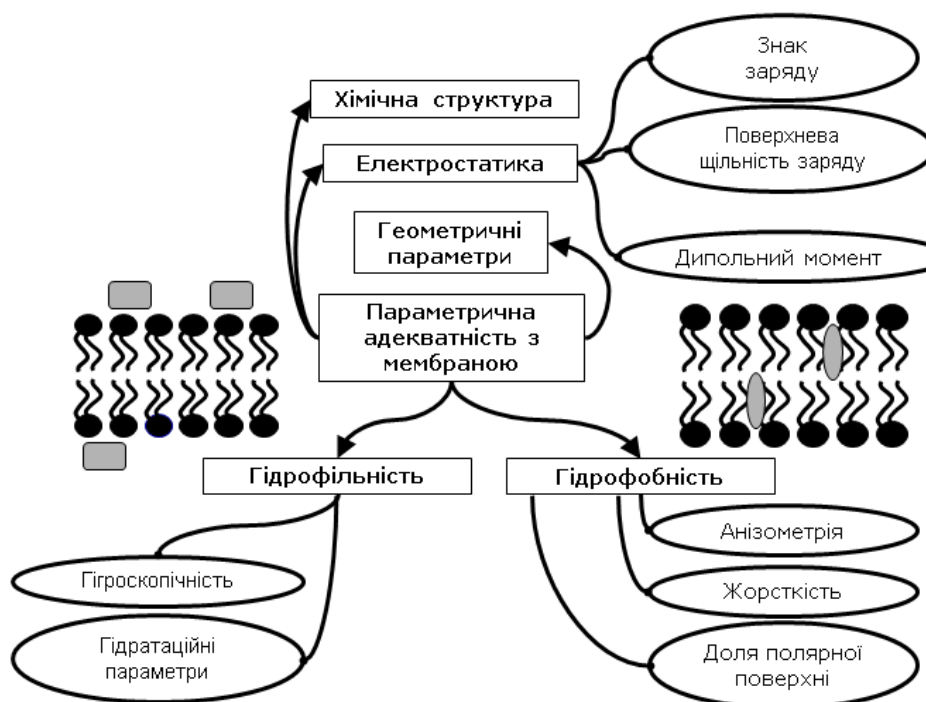


Рисунок 5.2. Найбільш істотні молекулярні параметри, що визначають мембранотропну дію

Загальновизнаним є розгляд ліпофільності як важливої характеристики [54]. Ми вважаємо, що саме ліпофільність молекули в основному визначає її взаємодію з мембраною (за механізмами адсорбції чи абсорбції). Коефіцієнт ліпофільності $\log P$ було визначено за допомогою Virtual Computing Chemical Laboratory [108], для цього використали декілька різних методів, зокрема, Pharma Algorithm (AC $\log P$), Molinspiration Algorithms (miLogP, ALOGP, MLOGP; soft DragonX) [109, 110], XLOGP2 and XLOGP3 (soft XLOGP2, XLOGP3) [111], а також ALOGPs [112] (див. табл. 5.1). Окрім цього, різні методи розрахунків дають досить різні значення, тому для подальшого аналізу ми використовували середні значення $\log P$ ($\langle \log P \rangle$).

Ліпофільні молекули абсорбуються, частково або повністю, внутрішньою частиною мембрани, тоді як гідрофільні головним чином адсорбуються на поверхні розділу ліпід-вода.

Таблиця 5.1.

Коефіцієнт ліпофільності досліджених БАС

БАС \ $\log P$	ALOGPs	AC logP	miLogP	ALOGP	MLOGP	XLOGP ₂	XLOGP ₃	$\langle \log P \rangle$
Азитроміцин	3,03	2,28	2,73	2,08	0,14	1,89	4,02	2,31 ± 1,19
Аміксин	4,64	4,59	4,85	4,56	3,33	4,72	4,67	4,48 ± 0,52
Аспірин	1,43	1,43	1,43	1,20	1,70	1,42	1,19	1,40 ± 0,17
Гліцерин	-1,93	-1,08	-1,60	-1,41	-1,37	-1,88	-1,76	-1,58 ± 0,31
Декаметоксин	2,26	9,48	3,02	7,24	-1,5	6,64	10,73	5,41 ± 4,34
Етамбутол	-0,12	0,14	0,35	0,11	0,37	-0,34	-0,08	0,06 ± 0,26
Етоній	2,10	8,52	1,08	5,72	-1,65	4,83	9,18	4,25 ± 3,97
Ландоміцин Е	1,82	2,58	2,23	2,58	0,45	1,28	2,53	1,93 ± 0,81
Метронідазол	-0,15	-0,19	-0,47	-0,34	0,44	-0,14	-0,02	-0,12 ± 0,29
Мірамістин	3,13	7,73	3,83	5,49	2,21	5,60	7,69	5,10 ± 2,16
ОЕГ _{n=5}	-1,14	-1,4	-2,43	-2,06	-1,85	-2,83	-2,50	-2,03 ± 0,61
ОЕГ _{n=25}	-0,75	-2,68	-5,25	—	—	-6,63	-5,45	-4,15 ± 2,39
ОЕГ _{n=30}	-0,58	-3,00	-5,51	—	—	-7,58	-6,19	-4,57 ± 2,78
Сукцинілхолін	-2,49	1,15	-5,60	-2,34	-6,08	-2,91	0,56	2,53 ± 2,75
Тіоній	2,20	9,20	1,61	6,34	-1,27	5,80	9,83	4,81 ± 4,12
ТМА	-4,07	0,83	-3,63	-1,03	-2,88	-1,21	0,28	-1,67 ± 1,90
Транквілар	-0,74	0,44	-0,17	-0,58	-0,22	-1,01	-0,88	-0,42 ± 0,53
Уроканова кислота	0,00	-0,23	-0,04	0,08	-0,14	-0,14	0,05	-0,06 ± 0,11

БАС \ $\log P$	ALOGPs	AC logP	miLogP	ALOGP	MLOGP	XLOGP ₂	XLOGP ₃	$\langle \log P \rangle$
Фенібут	-1,27	0,70	-1,10	0,73	1,55	0,71	-1,59	-0,04 ± 1,24
Фенспірид	1,42	2,01	2,10	1,71	1,72	1,93	2,08	1,85 ± 0,25
ХОК	10,66	15,69	10,21	15,67	9,99	16,22	17,42	13,69 ± 3,25
Холестерин	7,02	7,44	7,62	7,38	6,39	8,20	8,27	7,54 ± 0,76
5CB	5,71	5,54	5,86	5,54	4,57	6,29	5,42	5,56 ± 0,52

Таким чином, для ліпофільних речовин найбільш значні ефекти повинні бути пов'язані з тими ж самими молекулярними параметрами, які є визначальними для немезогенних домішок у термотропних рідких кристалах, а саме, анізотрія молекули та її жорсткість [190]. Розгляду ще один молекулярний параметр – полярну частину площі поверхні молекули, що видається нам досить доцільним та інформативним. Цей параметр, який буде детально розглянуто нижче, можна визначити як відношення площі полярної частини до загальної площі поверхні молекули (S_{polar}/S_{total}) (табл. 5.2). Далі, для гідрофільних речовин важливими є характеристики, пов'язані з гідратацією – гігроскопічність [17, 161], космоетропність [126, 138] тощо. Нарешті, важливе значення має параметрична адекватність між відповідними параметрами молекули і мембрани [138, 191, 192].

Були обчислені коефіцієнти лінійної кореляції між значеннями $\log P$, отриманими різними способами (див. розділ 2) і параметром a_m . Для сукупності всіх досліджених речовин у цілому кореляція виявилась досить слабкою і ненадійною ($r = -0.22 \div -0.42$). На нашу думку, цей результат підтверджує, що мембранотропні ефекти визначаються не тільки ліпофільністю, а і багатьма різними молекулярними параметрами (рис. 5.2).

Таблиця 5.2.

Молекулярні параметри досліджених речовин

БАС	a_m	S_{polar}	S_{total}	V_m	X	Y	Z	μ	S_{polar}/S_{total}	k
Азітроміцин	-0,5	180,0	596,90	907,40	14,27	13,86	8,52	6,68	0,30	1,65
Аміксин	-0,3	42,0	460,55	521,40	20,44	8,34	6,97	1,43	0,09	2,06
Аспірин	-1,0	63,6	199,04	203,07	8,04	6,13	1,90	1,99	0,32	3,72
Гліцерин	0,1	60,7	124,57	113,94	4,81	3,49	3,18	0,74	0,49	1,31
Декаметоксин	-0,4	52,6	753,13	908,14	32,06	10,33	5,74	6,40	0,07	3,69
Етамбутол	-0,1	64,5	272,27	285,74	11,94	8,71	3,20	0,06	0,24	3,23
Етоній	-0,3	52,6	668,18	729,91	36,85	6,24	4,80	0,26	0,08	4,49
Ландоміцин Е	-0,9	211,0	635,83	786,02	25,54	9,46	5,28	8,17	0,33	3,32
Метронідазол	-0,3	83,9	205,46	215,63	7,40	7,39	2,59	4,79	0,41	2,86
Мірамістин	-0,4	29,1	528,53	585,89	27,25	7,33	3,89	2,24	0,06	4,44
ОЕГ _{n=5}	0,2	—	370,37	393,77	13,47	10,45	3,73	2,55	—	3,21
ОЕГ _{n=25}	0,0	—	1154,06	1511,69	41,03	10,87	5,60	3,44	—	4,64
ОЕГ _{n=30}	0,0	—	1389,38	1796,21	47,38	14,80	7,99	4,79	—	3,89
Сукцинілхолін	0,1	52,6	362,04	391,51	17,52	5,11	4,54	0,93	0,15	2,49
ТМА	0,3	0,0	129,04	124,33	4,27	4,27	3,02	0,00	0,00	1,41
Тіоній	-0,4	77,9	729,44	804,00	39,76	5,85	5,01	5,58	0,11	4,55
Транквілар	0,0	47,1	213,49	235,95	7,44	7,26	3,32	1,76	0,22	2,21
Уроканова кислота	0,1	66,0	169,25	160,75	8,93	3,97	0,01	2,41	0,39	—
Фенспірид	-0,6	41,6	294,73	329,26	13,51	5,28	4,59	2,86	0,14	2,05
ХОК	0,0	35,5	819,33	964,55	39,19	9,28	5,63	0,54	0,04	4,30
Холестерин	-0,1	20,2	430,69	538,99	15,64	8,42	5,91	1,85	0,05	2,04
5 СВ	-0,4	23,8	301,02	318,07	14,82	4,83	2,94	6,69	0,08	3,34

Графік кореляції між $\langle \log P \rangle$ та a_m (рис. 5.3) дозволяє вибрати велику групу речовин зі значеннями $\langle \log P \rangle$ від 1 до 14 з високим ступенем лінійної кореляції ($r = 0,86$). Єдиним винятком є сукцинілхолін – дікатіон, який, скоріш за все, адсорбується на поверхні розділу ліпід/вода. Всі інші молекули цієї групи, ймовірно, абсорбуються ліпідною мембраною. Всі молекули з від'ємними значеннями $\langle \log P \rangle$ є полярними або несуть заряди, і можна очікувати, що вони адсорбуються тільки на поверхні мембрани і не

проникають в її внутрішню частину. Решта речовин (з $\langle \log P \rangle \sim 0$) будуть обговорені далі.

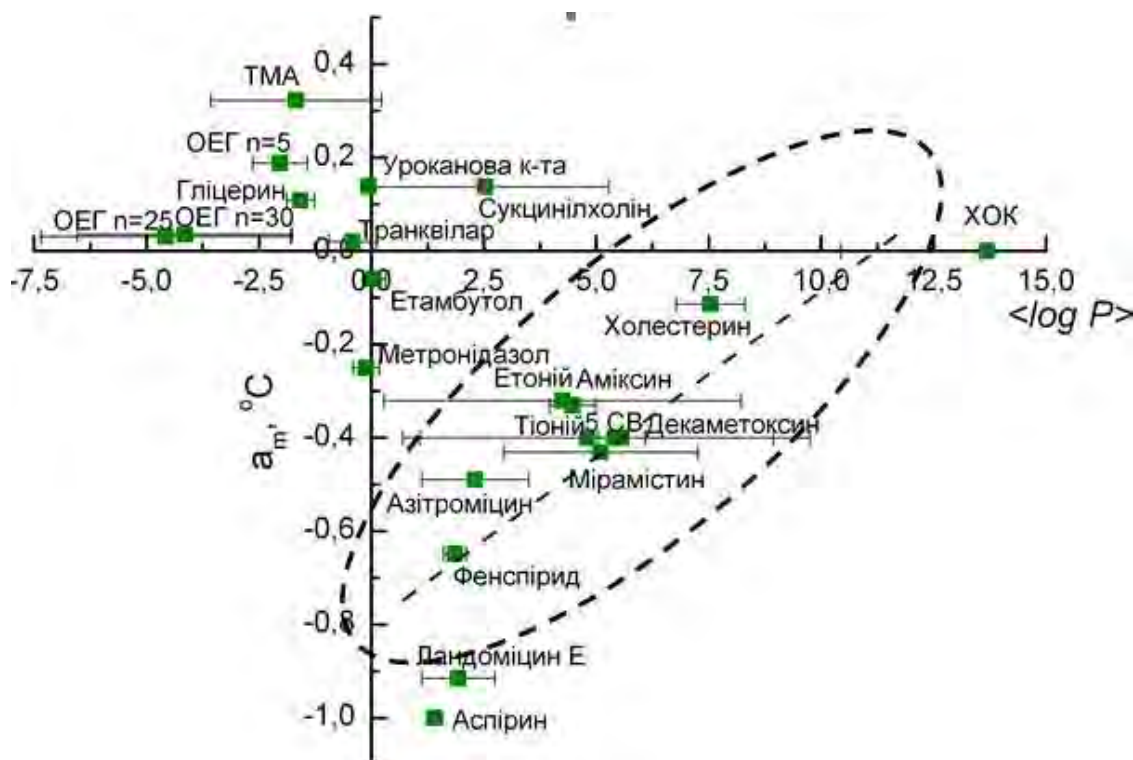


Рисунок 5.3. Усереднені значення коефіцієнтів ліпофільності та мембранотропна активність у модельній мембрані

Враховуючи вищенаведену класифікацію (рис.5.2), було потрібно отримати та проаналізувати інші молекулярні параметри. На рис.5.4. наведено дані з a_m та S_{polar}/S_{total} для досліджених речовин (окрім ОЕГ, оскільки для них дані з S_{polar} відсутні). Схематично можна виокремити дві групи речовин, а саме, зі зворотною лінійною залежністю a_m від S_{polar}/S_{total} та без чітко виявленої залежності. На нашу думку, ці дві групи якраз і відповідають двом механізмам взаємодії з мембранами, а саме, абсорбції вглиб мембрани та адсорбції на поверхні мембрани. Дійсно, якщо молекули абсорбуються в гідрофобну частину (утворену вуглеводневими ланцюгами ліпідів), то чим більше значення S_{polar}/S_{total} , тим більшим буде їх руйнівний ефект на пакування ланцюгів. Цей ефект призводить до зниження a_m , тому залежність a_m від S_{polar}/S_{total} буде зворотною.



Рисунок 5.4. Доля полярної частини поверхні молекули та мембранотропна активність БАС у модельній мембрані

У випадку адсорбції на поверхні мембрани, молекули БАС безпосередньо контактують з водним прошарком. Вони мають можливість контактувати з полярною частиною, не порушуючи пакування ліпідів, тому в цьому випадку значення a_m повинні майже не залежати від S_{polar}/S_{total} . Треба відзначити, що в загальному випадку такий чіткий розподіл за механізмами взаємодії не завжди буде коректним (наприклад, для протеїнів) внаслідок складної молекулярної структури. Проте ми вважаємо, що розглянутий підхід може бути доцільним для багатьох речовин, молекули яких не є надто великими в порівнянні з ДПФХ (молекулярні маси досліджених нами БАС – від 75 до 750 Да проти 734,1 Да для ДПФХ).

Повертаючись до групи речовин, виділеної на рис. 5.4, можна відзначити, що ця група практично співпадає з групою ліпофільних речовин, виділених на рис. 5.3. Це підтверджує уявлення про те, що ці речовини схильні до проникнення вглиб мембрани, не залишаючись на поверхні. Речовини з $\langle \log P \rangle \geq 0$ не входять в цю групу, бо взаємодіють з мембраною

за адсорбційним механізмом. Якщо $\langle \log P \rangle$ близький до нуля, модифікація ліпідної поверхні внаслідок адсорбції таких молекул може призводити як до зниження, так і до підвищення T_m (відповідно, $a_m < 0$ або $a_m > 0$, рис. 5.3). Можливий механізм такої подвійної дії було запропоновано в [137] для випадку адсорбції одновалентних іонів.

Для різних груп речовин (табл. 5.3 – 5.5) було складено матриці коефіцієнтів лінійної кореляції згідно рівняння (2). У табл. 5.3 розглянуто групу гідрофільних речовин. Перш за все треба відзначити, що ця група включає речовини з різними молекулярними структурами, геометричними параметрами (S_{total} , V_m , k) та дипольними моментами ($\mu = 0 \div 8,5$), але з відносно невеликими молекулярними масами.

Таблиця 5.3.

Матриця коефіцієнтів лінійної кореляції між молекулярними параметрами та мембранотропною дією для гідрофобних речовин групи III

<i>Parameters</i>	a_m	$\langle \log P \rangle$	S_{total}	V_m	μ	k	S_{polar}/S_{total}	S_k
a_m	1.00	0.86	0.46	0.41	-0.40	-0.39	-0.83	0.43
$\langle \log P \rangle$		1.00	0.16	0.41	-0.38	0.41	-0.67	0.51
S_{total}			1.00	0.96	0.11	0.50	-0.25	0.79
V_m				1.00	0.22	0.27	-0.09	0.60
μ					1.00	-0.16	0.45	-0.13
k						1.00	-0.64	0.90
S_{polar}/S_{total}							1.00	-0.50
S_k								1.00

Враховуючи таку різноманітність молекул, висока зворотня лінійна кореляція між a_m та S_{polar}/S_{total} ($r = -0,83$) виглядає досить вражаючою. З іншого боку, величина анізотропії k пов'язана з a_m досить слабо ($r = -0,27$). Це означає, що цей параметр не є таким важливим для ліотропних фаз фосфоліпідних мембран, яким він є для термотропних мезогенів, що,

вочевидь, пов'язано з більш складним характером надмолекулярного впорядкування в ліпідних мембранах. Дуже висока кореляція між S_{total} та V_m ($r = 0,96$) може вважатися певним підтвердженням адекватності проведених розрахунків. Кращу кореляцію можна спостерігати в групах речовин, близьких за хімічною природою, наприклад, для амонієвих сполук (таблиця 5.4) та похідних гліцерину (таблиця 5.5).

Таблиця 5.4.

Матриця коефіцієнтів лінійної кореляції між молекулярними параметрами та мембранотропною дією для групи бісчетвертинних амонієвих сполук (декаметоксин, етоній, тіоній).

<i>Parameters</i>	a_m	$\langle \log P \rangle$	S_{total}	V_m	μ	S_{polar}/S_{total}
a_m	1.00	-0.86	-0.96	-0.81	-0.99	-0.29
$\langle \log P \rangle$		1.00	0.96	1.00	0.91	-0.25
S_{total}			1.00	0.94	0.99	0.02
V_m				1.00	0.88	-0.32
μ					1.00	0.17
S_{polar}/S_{total}						1.00

Таблиця 5.5.

Матриця коефіцієнтів лінійної кореляції між молекулярними параметрами та мембранотропною дією для групи гліцерину та його похідних (ОЕГ_{n=5}, ОЕГ_{n=25}, ОЕГ_{n=30}).

<i>Parameters</i>	a_m	$\langle \log P \rangle$	S_{total}	V_m	μ
a_m	1.00	0.84	-0.81	-0.82	-0.87
$\langle \log P \rangle$		1.00	-1.00	-1.00	-0.92
S_{total}			1.00	1.00	0.94
V_m				1.00	0.93
μ					1.00

Для цих груп параметр k було важко визначити внаслідок високої конформаційної рухливості вуглеводневих ланцюгів, тому тут він був виключений із розгляду. Як можна бачити з таблиць 5.4, 5.5, кореляція a_m з багатьма молекулярними параметрами, зокрема, S_{total} , V_m та μ ($r = -0.81 \div -0.99$), є високою. Від'ємний знак коефіцієнтів кореляції означає, що a_m зменшується (тобто пакування ліпідів погіршується) зі зростанням цих параметрів, що виглядає природним. Тобто, всі встановлені лінійні кореляції відповідають фізичній картині.

Висновки до розділу 5

1. Встановлено кореляції між розрахованими квантово-хімічними методами молекулярними параметрами БАС (молекулярний об'єм, площа поверхні молекули, дипольний момент, ступінь анізотрії тощо), внесених у модельні фосфоліпідні мембрани, та їх експериментально визначеним впливом на температури фазових переходів.

2. Всі досліджені БАС можна класифікувати за переважним механізмом їх взаємодії з фосфоліпідними мембранами (адсорбція на поверхні розділу «полярна частина молекули ліпиду – вода» або абсорбція молекул БАС в об'ємі ліпідного бішару з їх переважною взаємодією з вуглеводневими ланцюгами ліпідів. Кількісним критерієм при цьому може бути ступінь кореляції між S_{polar}/S_{total} (відносною площею поверхні полярної частини молекули БАС) та a_m (мембранотропною дією, тобто зсувом температури фазового переходу при внесенні одиничної концентрації БАС).

3. Для великої групи гідрофобних БАС різної хімічної природи встановлено високу лінійну кореляцію ($|r| > 0,8$) між ступенем ліпофільності БАС та їх мембранотропною активністю. Для кількох виокремлених груп речовин подібної хімічної будови отримано значення коефіцієнтів лінійної кореляції, більші за 0,9.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі дано вирішення актуальної наукової задачі - визначення механізмів індивідуальної та сукупної дії БАС на термодинамічні та структурні параметри модельних ліпідних мембран. Основні результати можна підсумувати таким чином:

1. У рамках єдиного методологічного підходу визначено мембранотропну дію біологічно активних субстанцій (БАС) різних хімічних класів, які полягають у зміні властивостей модельних ліпідних мембран, – термодинамічних параметрів фазових переходів, періоду повторюваності ламелярної структури, латеральному фазовому розділенні, а також зміні гідратації.
2. Встановлено високу лінійну кореляцію ($|r| \sim 0,8$) між мембранотропною активністю БАС і їх коефіцієнтом липофільності, а також між мембранотропною активністю і часткою полярної поверхні молекули для великої групи досліджених речовин різних хімічних класів.
3. Показано, що при введенні в ліпідну мембрану кріопротекторів групи оксиетильованих похідних гліцерину L_α -фаза зберігається аж до повної заміни води кріопротектором. При цьому сольватуюча здатність, обумовлена відносною зміною температури переходу в L_α -фазі, знижується в ряду вода > гліцерин > ОЕГ_{n=5} > ОЕГ_{n=25} > ОЕГ_{n=30}.
4. Визначено температурні залежності періоду повторюваності D ламелярної структури ліпідних мембран, що містять БАС. Встановлено, що в L_α -фазі збільшення або зменшення D корелює зі знаком зміни D чистої мембрани при введенні в неї БАС.
5. Показана неадитивність термодинамічних параметрів фазових переходів мембрани при введенні окремих пар БАС, що може бути пов'язано з утворенням міжмолекулярних комплексів (БЧАС + аспірин,

декаметосмин + уроканова кислота, термотропні мезогени) або з непрямою взаємодією, опосередкованою мембраною (нітрати).

6. При спільному введенні в мембрану різних БЧАС (декаметоксин, етоній, тионов) і аспіріну відмічено підвищення температури переходу в L_{α} -фазі, тоді як введення кожного з цих речовин окремо призводить до її зниження.
7. Методом диференціальної скануючої калориметрії виявлено відмінності мембранотропні дії для низки фармпрепаратів-аналогів, які обумовлені внеском допоміжних речовин.
8. Запропоновано механізм інтерференції мембранотропні дії гідрофобної і гідрофільної речовини, що приводить до зміни коефіцієнта розподілу гідрофільної речовини між водною і ліпідною фазою.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kasian N.A. Probing of the combined effect of bisquaternary ammonium antimicrobial agents and acetylsalicylic acid on model phospholipid membranes: differential scanning calorimetry and mass spectrometry studies / N.A. Kasian, V. A. Pashynska, O.V. Vashchenko, A.O. Krasnikova, A.Gömöry, M.V. Kosevich, L.N. Lisetski // *Molecular BioSystems*. — 2014. — Vol. 10. — P. 3155-3162.
2. Красникова А.О. Термодинамические параметры фазовых переходов модельных липидных мембран как маркер мембранотропного действия антибиотиков в препаратах-аналогах / А.О. Красникова, О.В. Ващенко, Н.А. Касян, Ю.Л. Ермак, Н.А. Маркевич // *Біофізичний вісник*. — 2014. — Вип. 32 (2) — С. 27-38.
3. Ващенко О. В. Влияние нитрата серебра на фазовое состояние модельных мультибислойных мембран / О.В.Ващенко, Ю.Л. Ермак, А.О. Красникова, Л.Н. Лисецкий // *Биофизика*. — 2015. — Т. 60, № 2. — С. 307-315. (Vashchenko O.V. The effects of silver nitrate on the phase state of model multibilayer membranes / O.V. Vashchenko, Iu.L. Iermak, A.O. Krasnikova, L.N. Lisetski // *Biophysics*. — 2015. — Vol. 60, № 2. — P. 244–250.)
4. Bulavin L.A. Lyotropic model membrane structures of hydrated DPPC: DSC and small-angle X-ray scattering studies of phase transitions in the presence of membranotropic agents / L.A. Bulavin, D.V. Soloviov, V.I. Gordeliy, O.S. Svechnikova, A.O. Krasnikova, N.A. Kasian, O.V. Vashchenko, L.N. Lisetski // *Phase Transitions*. — 2015. — Vol. 88, № 6. — P. 582-592.
5. Kasian N.A. Effects of oxyethylated glycerol cryoprotectants on phase transitions of DPPC model membranes / N.A. Kasian, A.O. Krasnikova, O.V. Vashchenko, L.N. Lisetski, A.V. Zinchenko, A.M. Kompaniets, M.V. Ratushna // *Biopolymers and Cell*. — 2015. — Vol. 31. № 2. — P. 146–153.

6. Bulavin L.A. Small-angle X-ray scattering and differential scanning calorimetry studies of DPPC multilamellar structures containing membranotropic agents of different chemical nature / L.A. Bulavin, D.V. Soloviov, A.I. Kuklin, L.N. Lisetski, N.A. Kasian, A.O. Krasnikova, O.V. Vashchenko, A.V. Zinchenko // *Ukrainian Journal of Physics*. — 2015. — Vol. 60, № 9. — P. 905-909.
7. Lisetski L. N. Mixtures of thermotropic mesogens as components of model DPPC membranes: effects of intermolecular interactions on phase transitions / L.N. Lisetski, A.O. Krasnikova, S.I. Torgova // *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. — 2015. — Vol. 623. — P. 113-118.
8. Vashchenko O.V. Intermolecular interactions of decamethoxinum and acetylsalicylic acid in systems of various complexity levels / O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, M.V. Kosevich, A.O. Krasnikova, V.A. Pashynska, D.N. Tishko, T.V. Tishko, V.P. Titov, L.N. Lisetski // *Біофізичний вісник*. — 2015. — Вип. 34 (2). — С. 5-15.
9. Sadchenko A.O. Correlations between thermostability of multibilayer lipid structure and molecular parameters of guest molecules / A.O. Sadchenko, O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, L.V. Budjanskaya, L.N. Lisetski // *Functional materials*. — 2016. — Vol. 23, № 2. — P. 230-235.
10. Lisetski L.N. Liquid crystal ordering and nanostructuring in model lipid membranes. In: *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications* / L.N. Lisetski, O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, A.O. Krasnikova // *Nanobiophysics Fundamentals and Applications* / Pan Stanford Publishing Ed. by V.A. Karachevtsev. — Singapore: Taylor & Francis Group, 2016. — Chapter 6. — P. 163-192.
11. Ващенко О.В. Влияние нитрата серебра на фазовое состояние модельных мультибислоиных мембран / О.В. Ващенко, Ю.Л. Ермак, А.О. Красникова, Н.А. Касян, Л.Н. Лисецкий // *Материалы международной междисциплинарной научной конференции «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и*

применения», Новый Свет, Украина. — 27 мая-1 июня 2013. — Т. 2. — С. 431.

12. Pashynska V.A. The harnessing of phospholipid biomimetic structures in investigations of membranotropic drugs effect / V.A. Pashynska, O.V. Vashchenko, V.V. Chagovets, N.A. Kasian, A.O. Krasnikova, M.V. Kosevich, L.N. Lisetski // Book of abstracts of 3rd European Lipidomic Meeting (ELM 2013), Pardubice, Czech Republic. — July 2-4 2013. — P. 19.

13. Krasnikova A.O. Intermolecular interactions in a ternary system «glycerol – phospholipid – water» / A.O. Krasnikova, O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, A.V. Zinchenko, D.S. Sofronov, L.N. Lisetski // Book of abstracts of XXI Galyna Puchkovska international school-seminar «Spectroscopy of molecules and crystals», Beregove, Ukraine. — September 22-29 2013. — P. 242.

14. Lisetski L.N. Model lipid membranes: a new vision and possibilities of applications / L.N. Lisetski, O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, A.O. Krasnikova // Book of abstracts of 3rd international conference «Nanobiophysics: fundamental and applied aspects», Kharkov, Ukraine. — October 7-10 2013. — P. 19.

15. Vashchenko O.V. Effects of non-lipid components on the phase states of model lipid membranes / O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, A.O. Krasnikova, L.N. Lisetski // Abstracts of the V Young scientists conference «Problem of theoretical physics», Kyiv, Ukraine. — December 24-27 2013. — P. 22.

16. Krasnikova A.O. Modification of DPPC membrane phase behavior by oxyethylated derivatives of glycerol / A.O. Krasnikova, M.V. Ratushnaya, O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, A.V. Zinchenko, L.N. Lisetski // Proceedings of XIV Kharkiv young scientists conference on radiophysics, electronics, photonics and biophysics, Kharkov, Ukraine. — October 14-17 2014. — BIO-5.

17. Красникова А.О. Влияние криопротекторов группы оскиэгилировавших производных глицерина на структуру и фазовые переходы модельных липидных мембран / А.О. Красникова, Н.А. Касян, О.В. Ващенко, Л.Н. Лисецкий, А.М. Компаниец, А.В. Зинченко, Д.В. Соловьев,

Л.А. Булавин // Тезисы докладов 39-й ежегодной конференции молодых ученых, посвященной 70-летию ЮНЕСКО «Холод в биологии и медицине», Харьков, Украина. – 20-21 мая 2015г. – С. 39.

18. Ващенко О.В. Мембранотропна дія та гідратаційні властивості сукцинілхоліну / О.В. Ващенко, А.О. Краснікова, Н.А. Касян, Л.Н. Лисецький, Г.О. Максименко // Матеріали VI з'їзду Українського біофізичного товариства, Луцьк - Світязь, Україна. — 27-29 травня 2015. – С. 41.

19. Vashchenko O.V. Hydration of model membranes surface in the presence of drugs bu the evidence of FTIR-spectroscopy / O.V. Vashchenko, A.O. Krasnikova, N.A. Kasian, L.N. Lisetski, D.S. Sofronov, L.V. Budyanskaya // XXII Galina Puchkovska international school-seminar spectroscopy of molecules and crystals, Chynadiyovo, Zakarpattia, Ukraine. — September 27 - October 4 2015. — P. 50.

20. Krasnikova A.O. Phospholipid membrane medium as a matrix to study drug-lipids interactions / A.O. Krasnikova, O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, L.N. Lisetski, L.V. Budyanskaya, Y.M. Al-Muhghrabi, A.V. Mashchenko // Book of abstracts of 4th International conference «Nanobiophysics: fundamental and applied aspects», Kyiv, Ukraine. — October 1-4 2015. — P. 46.

21. Садченко А.О. Некоторые аспекты мембранотропного действия лекарственных средств нообута и амиксина / А.О. Садченко, А.Ю. Пуговкин, Л.В. Будянская, А.В. Мащенко // Матеріали X Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, Україна. — 2-4 грудня 2015. — С. 26-27.

22. Sadchenko A.O. Search for relationship between parameters of guest molecules and their effects on model phospholipid membranes / A.O. Sadchenko, L.V. Budianska, O.V. Vashchenko, N.A. Kasian // Abstracts of 7th International conference physics of liquid matter: Modern problems, Kyiv, Ukraine. — May 27-30 2016.— P. 34.

23. Bourgaux C. Interactions of anticancer drugs with biomembranes: what can we learn from model membranes? / C. Bourgaux, P. Couvreur // *Journal of Controlled Release*. — 2014. — Vol. 190. — P. 127-138.
24. Yonar D. Spectroscopic and calorimetric studies on trazodone hydrochloride-phosphatidylcholine liposome interactions in the presence and absence of cholesterol / D. Yonar, M. M. Sunnetcioglu // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2014. — Vol. 1838. — P. 2369-2379.
25. Yonar D. Effect of cis-(Z)-flupentixol on DPPC membranes in the presence and absence of cholesterol / D. Yonar, M. M. Sunnetcioglu // *Chemistry and Physics of Lipids*. — 2016. — Vol. 198. — P. 61-71.
26. Seddon A. M. Drug interactions with lipid membranes / A. M. Seddon, D. Casey, R. V. Law, A. Gee, R. H. Templer, O. Ces // *Chemical Society Reviews*. — 2009. — Vol. 38. — P. 2509-2519.
27. Escriba P. V. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine / P. V. Escriba // *Home: Trends in Molecular Medicine*. — 2006. — Vol. 12. — P. 34-43.
28. Балткайс Я. Я. Взаимодействие лекарственных веществ / Я. Я. Балткайс, В. А. Фатеев. — К.: Медицина, М. — 1991. — 304 с.
29. Alves A. C. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies / A. C. Alves, D. Ribeiro, C. Nunes, S. Reis // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2016. — Vol. 1858. — P. 2231-2244.
30. Peetla C. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery / C. Peetla, A. Stine, V. Labhasetwar // *Molecular Pharmaceutics*. — 2009. — Vol. 6. — P. 1264-1276.
31. Orme M. Drug absorption in the gut / M. Orme // *British Journal of Anaesthesia*. — 1984. — Vol. 56. — P. 59-67.
32. Pignatello R. Drug-membrane interaction studies: The application of calorimetric techniques / R. Pignatello. — Woodhead Publishing, 2013. — 440 p.

33. Peetla C. Biophysical interactions with model lipid membranes: application in drug discovery and drug delivery / C. Peetla, A. Stine, V. Labhasetwar // *Molecular Pharmaceutics*. — 2009. — Vol. 6, №5. — P. 1264-1276.
34. Харакоз Д. П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах // *Успехи биологической химии*. — 2001. — Т. 41., № 2. — С. 333-364.
35. Hironori Tsuchiya / Interaction of local anesthetics with biomembranes consisting of phospholipids and cholesterol: mechanistic and clinical implications for anesthetic and cardiotoxic effects / Tsuchiya Hironori, Maki Mizogami // *Anesthesiology research and practice*. — Vol. 2013, №2013. — P 18.
36. Weizenmann N. Interaction of local anesthetics with lipid bilayers investigated by ¹H MAS NMR spectroscopy / N. Weizenmann, D. Huster, H.A. Scheidt // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2012. — Vol. 1818. — P. 3010-3018.
37. Gulfo N. Effect of Inhalation Anesthetics on Spin-Labeled Cholesterol Containing DPPC Vesicles / N. Gulfo, R. Bartucci, L. Sportelli // *Z. Naturforsch.* — 1988. — Vol. 43. — P. 264-268.
38. Takashi Hata. Effect of local anesthetics on the phase transition temperatures of ether- and ester-linked phospholipid bilayer membranes / Hata Takashi, Matsuki Hitoshi, Kaneshina Shoji // *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*. — 2000. — Vol. 18. — P. 41-50.
39. Davila D. Pharmacokinetics of azithromycin after single oral dosing of experimental animals / D. Davila, L. Kolacny-Babić, F. Plavsić // *Biopharm Drug Dispos.* — 1991. — Vol. 12, №7. — P. 505-514.
40. Schreier S. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects / S. Schreier, S.V. Malheiros, E. de Paula // *Biochim Biophys Acta*. — 2000. — Vol. 1508. — P. 210-234.

41. Heerklotz H. Interactions of surfactants with lipid membranes / H Heerklotz // Quarterly Reviews of Biophysics. — 2008. — Vol. 41. — P. 205-64.
42. Pashinskaja V. A. Investigation of mechanisms of interaction of bisquaternary antimicrobial agents with model phospholipid membranes / V. A. Pashinskaja, M. V. Kosevich, A. Gomory, O. V. Vashchenko, L. N. Lisetski // Rapid Communications in Mass Spectrometry. — 2002. — Vol. 16. — P. 1706.
43. Pignatello R. Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies: involvement in design and development / R. Pignatello, T. Musumeci, L. Basile, C. Carbone, G. Puglisi // Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences. — 2011. — Vol.3, №1. — P. 4-14.
44. Саватеева Т. Н. «...Структура — функция — терапевтический эффект...» (к вопросу о лечебных свойствах генериков и инновационных препаратов на примере центральных холинергических веществ) / Т. Н. Саватеева, П. П. Якуцени, И. Ю. Лукьянова, В. В. Афанасьев // Атмосфера. Нервные болезни. — 2011. — Вып. 2. — С. 27-36.
45. Pinheiro M. Interactions of isoniazid with membrane models: Implications for drug mechanism of action / M Pinheiro, A. S. Silva, S. Pisco, S. Reis // Chemistry and Physics of Lipids. — 2014. — Vol. 183. — P. 184-190.
46. Castillo J. A. Comparative study of the antimicrobial activity of bis (Na-caproyl-L-arginine) -1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against Staphylococcus aureus and Escherichia coli / J. A. Castillo, P. Clape's, M. R. Infante, J. Comas, A. Manresa // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 2006. — Vol. 57. — P. 691-698.
47. Hill K. Amphiphilic nature of new antitubercular drug candidates and their interaction with lipid monolayer / K. Hill, C. B. Péntzes, B. G. Vértessy, Z. Szabadka, V. Grolmusz, É. Kiss // Progress in Colloid and Polymer Science. — 2008. — Vol. 135. — P. 87-92.

48. Knobloch J. Membrane-drug interactions studied using model membrane systems / J. Knobloch, D. K. Suhendro, J. L. Zieleniecki, J. G. Shapter, I. Köper // *Saudi Journal of Biological Sciences*. — 2015. — Vol. 22, №6. — P. 714-718.
49. Koukoulitsa C. The role of the anticancer drug vinorelbine in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular modeling / C. Koukoulitsa, I. Kyrikou, C. Demetzos, T. Mavromoustakos // *Chemistry and Physics of Lipids*. — 2006. — Vol. 144. — P. 85-95.
50. Seydel J.K. Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling / J.K. Seydel, W. Michael. — Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002 – 350 p.
51. Seydel J. K. Drug Membrane Interaction and the Importance for Drug transport, Distribution, Accumulation, Efficacy and Resistance / J. K. Seydel, E. A. Coats, H. P. Cordes, M. Wiese // *Arch Pharm*. — 1994. — Vol. 327. — P. 601-610.
52. Mavromoustakos T. M. The use of differential scanning calorimetry to study drug-membrane interactions / T. M. Mavromoustakos // *Methods in Molecular Biology*. — 2007. — Vol. 400. — P. 587-600.
53. Молекулярная биология клетки: пер. с англ. / Б. Албертс, Брей Д., Дж. Льюис и др. — М.: Мир, 1994. — 517 с.
54. Ивков В.Г. Динамическая структура липидного бислоя / В.Г. Ивков, Г.Н. Берестовский. — М.: Наука, 1981. — 293 с.
55. Ивков В.Г. Липидный бислой биологических мембран / В.Г. Ивков, Г.Н. Берестовский. — М.: Наука, 1982. — 224 с.
56. Pott T. Fluid or gel phase lipid bilayers to study peptide-membrane interactions? / T. Pott, J. Dufourcq, E. J. Dufourc // *European Biophysics Journal*. — 1996. — Vol. 25. — P. 55-59.

57. Al-Saidan S. Differential scanning calorimetry of human and animal stratum corneum membranes / S. Al-Saidan, B. Barry, A. Williams // *International Journal of Pharmaceutics*. — 1998. — Vol. 168, №1. — P. 17-22.
58. Lisetski L. N. Effect of membranotropic agents on mono- and multilayers of dipalmitoylphosphatidylcholine / L. N. Lisetski, O. V. Vashchenko, A. V. Tolmachev, K. B. Vodolazhskiy // *European Biophysics Journal*. — 2002. — V. 31. — P. 554-558.
59. Парсон Д.С. Биологические мембраны. Двенадцать очерков о структуре, свойствах и функциях мембран: пер. с англ. / Д.С. Парсон, Р.Д.Ж.П.Уильямс, Г.Б. Робинсон и др. — М.: Атомиздат, 1978. — 231 с.
60. Финдлея Дж.Б.С. Биологические мембраны: пер. с англ. / Дж.Б.С. Финдлея, В.Х. Эванза — М.: Мир, 1990. — 424 с.
61. Рубин А.Б. Биофизика. Книга 2. Биофизика клеточных процессов / А.Б. Рубин. — Т.2 — М.: Высшая школа, 1987. — 461 с.
62. Jewell S. A. Living systems and liquid crystals / S. A. Jewell // *Liquid Crystals*. — 2011. — Vol. 38, №11-12. — P. 1699-1714.
63. Seddon J.M. Polymorphism of lipid-water systems / J.M. Seddon, R.H. Templer // *Lipowsky R. Handbook of Biological Physics* / R. Lipowsky, E. Sakhman. — Berlin.: Elsevier Science B.V., 1995. — Vol. 1, Chapt. 3. — P. 97-160.
64. Epand R. M. Lipid polymorphism in protein-lipid interactions / R. M. Epand // *Biochimica biophysica acta*. — 1998. — Vol. 1376. — P. 353-368.
65. Щипунов Ю. А. Самоорганизующиеся структуры лецитина / Ю. А. Щипунов // *Успехи химии*. — 1997. — Вып. 66, № 4. — С. 328-352.
66. Kucerka N. Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using X-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles / N. Kucerka, Y. Liu, N. Chu, H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle // *Biophysical journal*. — 2005. — Vol. 88, №4. — P. 2626-2637.

67. Mantsch H. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy / H. Mantsch, R. McElhaney // *Chemistry and physics of lipids*. — 1991. — Vol. 57, №2-3. — P. 213-226.
68. Гордієнко Е.О. Фізика біомембран: підручник / Е.О. Гордієнко, В.В. Товстяк. — К.: Наукова думка, 2009. — 272 с.
69. De Vries A. H. Molecular structure of the lecithin ripple phase / A. H. de Vries, S. Yefimov, A. E. Mark, S. J. Marrink // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2005. — Vol. 102, №15. — P. 5392-5396.
70. Lewis R. The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers / R. Lewis, R. McElhaney // *The Structure of Biological Membranes*/ ed. by P. Yeagle; CRC Press. — 2012. — P. 19-89.
71. Simons K. Functional rafts in cell membranes / K. Simons, E. Ikonen // *Nature*. — 1997. — Vol. 387, №6633. — P. 569-572.
72. Winter R. Synchrotron X-ray and neutron small-angle scattering of lyotropic lipid mesophases, model biomembranes and proteins in solution at high pressure / R. Winter // *Biochimica et biophysica acta*. — 2002. — Vol. 1595, №1-2. — P. 160-184.
73. Mavromoustakos T. Partial interdigitation of lipid bilayers / T. Mavromoustakos, P. Chatzigeorgiou, C. Koukoulitsa, S. Durgagi // *International Journal of Quantum Chemistry*. — 2011. — Vol. 111, №6. — P. 1172-1183.
74. Koukoulitsa C. The role of anticancer drug vinorelbine in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular modeling / C. Koukoulitsa, I. Kyrikou, C. Dentros, T. Mavromoustakos // *Chemistry and Physics of Lipids*. — 2006. — Vol. 144, №1. — P. 85-95.
75. Koukoilitsa C. Comparison of thermal effects of stilbenoid analogs in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular dynamics: correlation of thermal effects and topographical position with antioxidant activity / C. Koukoilitsa, S. Durdag, E. Siapi, C. Villalonga-Barber, X. Alexi, B. R. Steele,

M. Micha-Screttas, M. N. Alexis, A. Tsantili-Kakoulidou, T. Mavromoustakos // *European Biophysics Journal*. — 2011. — Vol. 40. — P. 865-875.

76. Kyrikou I. Interactions of the dipeptide paralyisin β -Ala-Tyr and the aminoacid Glu with phospholipid bilayers / I. Kyrikou, N. P. Benetis, P. Chatzigeorgiou, M. Zervou, K. Viras, C. Poulos, T. Mavromoustakos // *Biochimica biophysica acta*. — 2008. — Vol. 1778. — P. 113-124.

77. Ntountantiotis D. Thermal, dynamic and structural properties of drug AT1 antagonist olmesartan in lipid bilayers / D. Ntountantiotis, G. Mali, S. G. Gradolnik, M. Halabalaki, A.-L. Skaltsounis, C. Potamitis, E. Siapi, P. Chatzigeorgiou, N. Rappolt, T. Mavromoustakis // *Biochimica biophysica acta*. — 2011. — Vol. 1808. — P. 2995-3006.

78. Potamitis C. Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers / C. Potamitis, P. Chatzigeorgiou, E. Siapi, K. Viras, T. Mavromoustakos, A. Hodzic, G. Pabst // *Biochimica biophysica acta*. — 2011. — Vol. 1808. — P.1753-1763.

79. Jain M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer / M. Jain, N. Wu // *Journal of Membrane Biology*. — 1977. — Vol. 34. — P. 157-201.

80. Ващенко О.В. Липидные мембраны как модельная среда для решения прикладных биомедицинских задач / О.В. Ващенко, Н.А. Касян, В.А. Пашинская, М.В. Косевич, Ю.Л. Ермак, Л.Н. Лисецкий // *Функциональные материалы для сцинтилляционной техники и биомедицины*. — Харьков: ИСМА, 2012. — С. 324-354.

81. Benesch M. G. K. A calorimetric and spectrometric comparison of the effects of lathosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes / M. G. K. Benesch, D. A. Mannock, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney // *Biochemistry*. — 2011. — Vol. 50, №46. — P. 9982-9997.

82. Wack D. Synchrotron x-ray study of the lamellar phase P β ' in the lecithin-water system . / D. Wack, W. Webb // *Physical Review A*. — 1989. — Vol. 40, №5. — P. 2712-2730.

83. Юдінцев А.В. Молекулярні механізми взаємодії координаційних комплексів європію із модельними мембранами: дисертація кандидата фізико-математичних наук : 03.00.02. / Юдінцев Андрій Вікторович. — Х., 2012. — 159 с.

84. Deleu M. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: a review / M. Deleu, J. M. Crowet, M. N. Nasir, L. Lins // *Biochimica biophysica acta* — 2014. — Vol. 1838.— P. 3171-3190.

85. Lucio M. Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry/ M. Lucio, J. L. Lima, S. Reis // *Current Medicinal Chemistry*. — 2010. — Vol. 17. — P. 1795-1809.

86. Alves A. C. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies / A. C. Alves, D. Ribeiro, C. Nunes, S. Reis// *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2016. — Vol. 1858. — P. 2231-2244.

87. Matos C. Liposomes as a model for the biological membrane: studies on daunorubicin bilayer interaction / C. Matos, C. Moutinho, P. Lobao // *The Journal of Membrane Biology*. — 2012. — Vol. 245. — P. 69-75.

88. Gallois L. The overall partitioning of anthracyclines into phosphatidylcontaining model membranes depends neither on the drug charge nor the presence of anionic phospholipids / L. Gallois, M. Fiallo, A. Laigle, W. Priable, A. Garnier-Suillerot // *European Journal of Biochemistry*. — 1996. — Vol. 241. — P. 879-887.

89. Matos C. Liposomes as a model for the biological membrane: studies on daunorubicin bilayer interaction / C. Matos, C. Moutinho, P. Lobao // *Journal of Membrane Biology*. — 2012. — Vol. 245. — P. 69–75.

90. Pentak D. Physicochemical properties of liposomes as potential anticancer drugs carriers. Interaction of etoposide and cytarabine with the membrane: spectroscopic studies / D. Pentak // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2014. — Vol. 122. — P. 451-460.

91. De Wolf F. A. Characterization of the interaction of doxorubicin with (poly) phosphoinositides in model systems. Evidence for specific interaction with phosphatidylinositol-monophosphate and -diphosphate / F.A. de Wolf, et al. // *FEBS Letters*. — 1991. — Vol. 288. — P. 237-240.

92. Gallois L. Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles. Circular dichroism study / L. Gallois, M. Fiallo, A. Garnier-Suillerot // *Biochimica biophysica acta*. — 1998. — Vol. 1370. — P. 31-40.

93. Bilge D. Acyl chain length and charge effect on tamoxifen- lipid model membrane interactions / D. Bilge, N. Kazanci, F. Severcan // *Journal of Molecular Structure*. — 2013. — Vol. 1040. — P. 75-82.

94. Bilge D. Interactions of tamoxifen with distearoyl phosphatidylcholine multilamellar vesicles: FTIR and DSC studies / D. Bilge, I. Sahin, N. Kazanci, F. Severcan // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2014. — Vol. 130. — P. 250-256.

95. Jensen M. Cisplatin interaction with phosphatidylserine bilayer studied by solid-state NMR spectroscopy / M. Jensen, M. Bjerring, N. C. Nielsen, W. Nerdal // *Journal of biological inorganic chemistry*. — 2010. — Vol. 15. — P. 213-223.

96. Gaber M.H. Interaction of doxorubicin with phospholipid monolayer and liposomes/ M H. Gaber, M.M. Ghannam, S.A. Ali, W.A. Khalil // *Biophysical chemistry*. — 1998. — Vol. 70. — P. 223-229.

97. Zhao L. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within

lipid bilayer membrane / L. Zhao, S. S. Feng, N. Kocherginsky, I. Kostetski // International journal of pharmaceutics. — 2007. — Vol. 338. — P. 258-266.

98. Gomide A. B. Disrupting membrane raft domains by alkylphospholipids / A. B. Gomide, et al. // Biochimica biophysica acta. — 2013. — Vol. 1828. — P. 1384-1389.

99. Martin M.L. The role of membrane fatty acid remodeling in the antitumor mechanism of action of 2-hydroxyoleic acid / M.L. Martin, et al. // Biochimica biophysica acta. — 2013. — Vol. 1828. — P. 1405-1413.

100. Bildstein L. Interaction of an amphiphilic squalenoyl prodrug of gemcitabine with cellular membranes / L. Bildstein, et al. // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. — 2011. — Vol. 79. — P. 612-620.

101. Nieciecka D. Partitioning of doxorubicin into Langmuir and Langmuir-Blodgett biomimetic mixed monolayers: electrochemical and spectroscopic studies / D. Nieciecka, A. Królikowska, A. Joniec, P. Kryszinski // Journal of electroanalytical chemistry. — 2013. — Vol. 710. — P. 59-69.

102. Wiecek A. Interactions between an anticancer drug - edelfosine - and cholesterol in Langmuir monolayers / A. Wiecek, P. Dynarowicz-Latka, J. Minones, O. Conde, M. Casas // Thin Solid Films. — 2008. — Vol. 516. — P. 8829-8833.

103. Nobre T.M. Interactions of bioactive molecules & nanomaterials with Langmuir monolayers as cell membrane models / T.M. Nobre, et al. // Thin Solid Films. — 2015. — Vol. 593. — P. 158-188.

104. Stefaniu C. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces / C. Stefaniu, G. Brezesinski, H. Möhwald // Advances in colloid and interface science. — 2014. — Vol. 208. — P. 197-213.

105. Giner-Casares J.J. Langmuir monolayers as unique physical models / J.J. Giner-Casares, G. Brezesinski, H. Möhwald // Current opinion in colloid and interface science. — 2014. — Vol. 19. — P. 176-182.

106. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия: пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 328 с.
107. Пуговкин А. Ю. Исследование проницаемости мембран сперматозоидов карпа для молекул воды / А. Ю. Пуговкин, Е. Ф. Копейка, О. А. Нардид, Я. О. Черкашина // Биофизика. — 2014. — Вып. 59, № 3. — С. 481-487.
108. Патент № 104809 Україна, МПК G01N 33/48, G01N 15/00(2006.001). Спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води / А.Ю Пуговкін., Є.Ф.Копейка, Є.О. Гордієнко, О.А. Нардід. — № а 2012 15035 ; заявл. 27.12.2012. опубл. 11.03.2014, Бюл.№ 5.
109. <http://www.vcclab.org> [Електронний ресурс].
110. Moriguchi I. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient / I. Moriguchi, S. Hirono, Q. Liu, I. Nakagome, Y. Matsushita // Chemical and pharmaceutical bulletin. — 1992. — Vol. 40. — P. 127-130.
111. Viswanadhan V.N. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics / V.N. Viswanadhan, A.K. Ghose, G.R. Revankar, R.K. Robins // Journal of chemical information and computer sciences. — 1989. — Vol. 29. — P. 163-172.
112. Tetko I. V. Computing chemistry on the web / I. V. Tetko // Drug Discovery Today. — 2005. — Vol. 10. — P. 1497-1500.
113. Tetko I. V. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program / I. V. Tetko, V. Tanchuk // Journal of chemical information and computer sciences. — 2002. — Vol. 42. — P. 1136-1145.

114. Stewart Computational Chemistry [electronic resource] / J.J.P. Stewart. // web: HTTP://OpenMOPAC.net Chem. Theory Comput. —2012. — P. 3072-3081.
115. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. [Электронный ресурс]
116. McElhaney R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes / R. N. McElhaney // Chemistry and Physics of Lipids. — 1982. — Vol. 30. — P. 229-259.
117. Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. — 15-е изд. — М.: Новая волна. — 2005. — 1119 с.
118. Морган Э.Дж. Клиническая анестезиология. Книга 1: в 3 т. Т. 1. / Э.Дж. Морган. — М.: СПб.: Бином Невский Диалект, 2001. — 396 с.
119. Gissen A. J. Neuromuscular block in man during prolonged arterial infusion with succinylcholine / A.J. Gissen, R.L. Katz, J.H. Karis, E.M. Papper // Anesthesiology. — 1966. — Vol. 27, №3. — P. 242-249.
120. Вальдман А. В Бюллетень экспериментальной биологии и медицины [Электронный ресурс] / А.В. Вальдман, И.В. Заиконникова, М.М. Козловская, И.Е. Зимакова // Научная электронная библиотека — 1980. — Вып. 5. — С. 568-570. — режим доступа к журн. : <http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1224689>
121. Khafizianova R. Kh. Antidepressant Therapy at the Dawn of the Third Millennium / R. Kh. Khafizianova, A. Y. Zimakov, I. J. Zimakova, A. M. Karpov // Castres-France. — 1997. — P. 19.
122. Кульский Л.А. Серебряная вода. — Киев: Наукова думка, 1987. — 136 с.
123. Bragg P.D. The effect of silver ions on the respiratory chain of Escherichia coli / P.D. Bragg, D.J. Rainnie // Canadian journal of microbiology. — 1974. — Vol. 20. — P. 881-889.

124. Крисс Е.Е. Взаимодействие нуклеиновых кислот с металлами / Е.Е. Крисс, К.Б. Яцимирский // Успехи химии. — 1966. — Т. 35. — Вып. 2. — С. 349-365
125. Lara H.H. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds / H.H. Lara, E.N. Garza-Trevico. L. Ixtapan-Turrent, D.K. Singh // Journal of nanobiotechnol. — 2011. — Vol. 9, № 30. — P. 1-8.
126. Пятницкий И.В. Аналитическая химия серебра / И.В. Пятницкий В.В. Сухан. — М.: Наука, 1975 — 264 с.
127. Collins K.D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and crystallization processes / K.D. Collins // Methods. — 2004. — Vol. 34. — P. 300-311.
128. Severny A.A. Recognition and treatment of psychopathological disorders in paediatric / A. A. Severny, I. P. Kireeva, V. I. Brutman et. al. // European Psychiatry. — 1996. — Vol. 11, №4. — P. 330.
129. Tiurenkov I.N. Comparative study of immunomodulating properties of phenibut and gammoxin / I.N. Tiurenkov, M.A. Samotruieva, N.R. Kuleshevskaya et. al // Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. — 2010. — Vol. 73, №12. — P. 7.
130. Lapin I.P. Phenibut (beta-phenyl-GABA): A tranquilizer and nootropic drug / I.P. Lapin // CNS Drug Reviews. — 2001. — Vol. 7, №4. — P. 471-481.
131. Odujibe O.A. Phenibut Withdrawal - a novel "nutritional supplement" / O.A. Odujibe, R.S. Hoffman, L. S. Nelson // Clinical Toxicology. — 2008. — Vol. 46, №7. — P. 605.
132. Aroti A. Effects of monovalent anions of the Hofmeister series on DPPC lipid bilayers. Part I: Swelling and in-plane equations of state / A. Aroti, E. Leontidis, M. Dubois, T. Zemb // Biophysical Journal. — 2007. — Vol. 93, №5. — P. 1580-1590.
133. Bartucci R. ESR investigation on the phase transitions of DPPC vesicles in presence of high concentrations of Li⁺, Na⁺, K⁺ and Cs⁺ / R. Bartucci,

L. Sportelli / Colloid and Polymer Science. — 1993. — Vol. 271, №3. — P. 262-267.

134. Cunningham B.A. The influence of ion species on phosphatidylcholine bilayer structure and packing / B.A. Cunningham, J.E. Shimotake, W. Tamura-Lis, T. Mastran, W.M. Kwok, J.W. Kauffman, L.J. Lis // Chemistry and Physics of Lipids. — 1986. — Vol. 39, №1-2. — P. 135-143.

135. Pandit S.A. Molecular dynamics simulation of a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with NaCl / S.A. Pandit, D. Bostick, M.L. Berkowitz // Biophysical journal. — 2003. — Vol. 84. — P. 3743-3750.

136. Fukada K. Phase separation of phosphatidylcholine — water systems below the main transition temperature induced by monovalent ions / K. Fukada, N. Miki // Bulletin of the Chemical Society of Japan. — 2009. — Vol. 82, №4. — P. 439-445.

137. Rappolt M. Salt-induced phase separation in the liquid crystalline phase of phosphatidylcholines / M. Rappolt, G. Pabst, H. Amenitsch, P. Laggner // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2001. — Vol. 183-185. — P. 171-181.

138. Prudent M. Formation and study of single metal ion-phospholipid complexes in biphasic electrospray ionization mass spectrometry / M. Prudent, M.A. Mendez, D.F. Jana, C. Corminboeuf, H.H. Girault // Metallomics. — 2010. — Vol. 2. — P. 400-406.

139. Ващенко О.В. Одновалентные ионы в модельных липидных мембранах: термодинамические и гидратационные аспекты / О. В. Ващенко, Ю. Л. Ермак, Л. Н. Лисецкий // Биофизика. — 2013. — Т. 58. — Вып. 4. — С. 663-673.

140. Maswadeh H. A molecular basis explanation of the dynamic and thermal effects of vinblastine sulfate upon dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes / H. Maswadeh, C. Demetzos, I. Daliani, I. Kyrikou,

T. Mavromoustakos, A. Tsortos, G. Nounesis // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2002. — Vol. 1567. — P. 49-55.

141. Swamy M. J. Thermodynamics of Interdigitated Phases of Phosphatidylcholine in Glycerol / M. J. Swamy, D. Marsh // *Biophysical Journal*. — 1995. — Vol. 69. — P. 1402-1408.

142. Smith E.A. Differential scanning calorimetry studies of phospholipid membranes: the interdigitated gel phase / E.A. Smith, Ph.K. Dea // *Application of Calorimetry in a wide context – differential scanning calorimetry, Isothermal titration calorimetry and microcalorimetry* — Rijeka: Intech, 2012. — Chapter 18. — p. 407-444.

143. Veiro J. A. Effect of n-alcohols and glycerol on the pretransition of dipalmitoylphosphatidylcholine / J.A. Veiro, P. Nambi, L.L. Herold, E.S. Rowe // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 1987. — Vol. 900. — P. 230-238.

144. McDaniel R.V. Nonelectrolyte substitution for water in phosphatidylcholine bilayers / R.V. McDaniel, T.J. McIntosh, S.A. Simon // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 1983. — Vol. 731. — P. 97-108.

145. Lee D.C. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes / D.C. Lee, D. Chapman // *Bioscience reports*. — 1986. — Vol. 6. — P. 235-256.

146. Crowe J. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration / J. Crowe, L. Crowe, F. Hoekstra // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. — 1989. — Vol. 21, №1. — P. 77-91.

147. Crowe J. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose / J. Crowe, L. Crowe, D. Chapman // *Science*. — 1984. — Vol. 223, №4637. — P. 701-703.

148. Животова Е. Н. Физические состояния гидратированных систем на основе оксиэтилированных производных глицерина и ацетамида при температурах ниже 273 К: диссертация кандидата физико-математических наук : 01.04.14. / Животова Елена Николаевна. — Х., 2008. — 147 с.

149. Матвиец Н. И. Оксигилирование глицерина — метод создания криозащитных веществ / Н. И. Матвиец // Современные проблемы криобиологии. — К.: Наукова думка, 1976. — С. 15-19.

150. Zhivotova E. N. Physical states of aqueous solutions of oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n = 30$ at temperatures lower than 283 K / E. N. Zhivotova, A. V. Zinchenko, L. G. Kuleshova, V. V. Chekanova, A. M. Kompaniets // CryoLetters. — 2007. — Vol. 28, №4. — P. 261-270.

151. Oliver A. Methods for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification / A. Oliver, L. Crowe, J. Crowe // Seed science research. — 1998. — Vol. 8, №2. — P. 211-221.

152. Crowe L. Interaction of carbohydrates with dry dipalmitoylphosphatidylcholine / L. Crowe, J. Crowe, D. Chapman // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 1985. — Vol. 236, №1. — P. 289-296.

153. Животова Е. Н. Оценка количества воды, связанной с оксигилированными производными глицерина / Е. Н. Животова, Е. В. Духопельников // Доповіді Національної академії наук України. — 2008. — Вип. 5. — С. 89-93.

154. Pozo-Navas B. Discontinuous unbinding of lipid multilayers / B. Pozo-Navas, V.A. Raghunathan, J. Katsaras, M. Rappolt, K. Lohner, G. Pabst // Physical review letters. — 2003. — Vol. 91, №2. — 028101 — P. 1-4.

155. Petrache H. Swelling of phospholipids by monovalent salt / H. Petrache, S. Tristram-Nagle, D. Harries, N. Kucherka, J.F. Nagle, V.A. Parsegian // Biochimica biophysica acta. — 2006. — Vol. 47. — P. 302-309.

156. Rand R.P. Hydration forces between phospholipid bilayers / R.P. Rand, V.A. Parsegian // Biochimica Biophysica Acta. — 1989. — Vol. 988. — P. 351.

157. Gordeliy V.I. Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide-water mixtures / V.I. Gordeliy, M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.V. Pole, J. Teixeira // *Biophys journal*. — 1998. — Vol. 75, №5. — P. 23-43.

158. Serbina M.I. Helical twisting in nemato-cholesteric systems based on cholesterol derivatives and photosensitive azoxy compounds / M.I. Serbina, N.A. Kasian, L.N. Lisetsk // *Crystallography Reports*. — 2013. — Vol. 58, №1. — P. 155-159.

159. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции / Р. Геннис. — М.: Мир, 1997. - 624 с.

160. Фиалков Ю.Я. Физическая химия неводных растворов / Ю.Я. Фиалков, А.Н. Житомирски, Ю.А. Тарасенко. — Л.: Химия, 1973. — 240 с.

161. Ващенко О. В. Изучение совместного воздействия четвертичных аммониевых соединений и органической кислоты на модельные фосфолипидные мембраны / О. В. Ващенко, В. А. Пашинская, М. В. Косевич, О. А. Боряк, Н. А. Касян, Л. Н. Лисецкий // *Біофізичний вісник*. — 2010. Вип. 2, №25. — С. 5-23.

162. Vashchenko O. Lyotropic mesophase of hydrated phospholipids as model medium for studies of antimicrobial agents activity / O. Vashchenko, V. Pashynska, M. Kosevich, V. Panikarska, L. Lisetski // *Molecular crystals and liquid crystals*. — 2011. — Vol. 507. — P.155-163.

163. Korzovskaya O.V. Interaciton of antimicrobial agents decamethoxinum and aethonium with model membranes / O.V. Korzovskaya, V.A. Pashinskaya, M.V. Kosevich, L.N. Lisetski // *Вісник харківського університету*. — 1999. — С. 35-39.

164. Panicker L. Interaction of aspirin with DPPC in the lyotriopic DPPC-aspirin-H₂O/D₂O membrane / L. Panicker, V. K. Sharma, G. Datta, K. Deniz, P. S. Parvathanathan, K. V. Ramanathan, K. C. Khetrapal // *Molecular crystals and liquid crystals*. — 1995. — Vol. 260. — P. 611-621.

165. Semalty A. Development and characterization of aspirin-phospholipid complex for improved drug deliver / A. Semalty, M. Semalty, D. Singh et. al. // International journal parhmaceutical sciences and nanotechnology. — 2010. — Vol. 3. — P. 940-947.

166. Waclawek W. On the intermolecular forces operating in induced smectics. / W.Waclawek, R. Dabrowski, A. Domagala // Molecular crystals and liquid crystals. — 1982. — Vol. 84. — P. 255-265.

167. Heppke G. Induktion smektischer Phasen in binären Mischungen nematischer Flüssigkristalle / G. Heppke, E.J.Richter // Naturforsch. — 1978. — Vol. 33a. — 185-189.

168. Lebovka N.I. Anomalous selective reflection in cholesterol oleyl carbonate - nematic 5CB mixtures and effects of their doping by single-walled carbon nanotubes / N.I. Lebovka, L.N. Lisetski, M.I. Nesterenko, V.D. Panikarskaya, N.A. Kasian, S.S. Minenko, M.S. Soskin // Liquid crystal. — 2013. Vol. 40. — P. 968-975

169. Веренинов А.А Транспорт ионов у клеток в культуре / А.А Веренинов, И.И. Марахова. — Л.: Наука, 1986. — 292 с.

170. Przyczyna A. The effect of selected anions on dipalmitoylphosphatidylcholine phase transitions / A. Przyczyna, B. Różycka-Roszka, M. Z. Langner // Naturforsch. — 2002. — Vol. 57. — P. 712-716.

171. Rappolt M. Lalpha-phase separation in phosphatidylcholine-water systems induced by alkali chlorides / M. Rappolt, K. Pressl, G. Pabst, P. Laggner / Biochimica biophysica acta. — 1998. — Vol. 1372. — P. 389-393.

172. Щербаков А. Б. Препараты серебра: вчера, сегодня и завтра / А. Б. Щербаков // Фармацевтический журнал. — 2006. — Vol. 5. — С. 45-57.

173. Popova O. B. Effects of copper and cadmium ions on the physicochemical properties of lipids of the marine bacterium *Pseudomonas putida* IB28 at different growth temperatures / O.B. Popova, N.M. Sanina,

G.N. Likhatskaya, I.P. Bezverbnaya / Russian Journal of Marine Biology. — 2008. — Vol. 34, № 3. — P. 179-185.

174. Егорова Е. М. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах / Е. М. Егорова, А. А. Ревина, Т. Н. Ростовщикова, О. И. Киселева // Вестник Московского университета, серия 2, Химия. — 2001. — Вип. 42, №5. — С. 332-338.

175. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Изд. 15. – М. Новая волна. – 2006. –532 с.

176. Хмельницкий Р.А. Физическая и коллоидная химия / Р.А. Хмельницкий. — М.: Высшая школа, 1988. — 400 с.

177. Ефимов А.И. Свойства неорганических соединений: справочник / А.И. Ефимов. — Л.: Химия, 1983. — 392 с.

178. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей. Изд. 15-е. М.: Новая волна, 2005. – 1119 с.

179. Антонов В.Ф. Липидные мембраны при фазовых превращениях / В.Ф. Антонов, Е.Ю. Смирнова, Е.В. Шевченко. – М.: Наука, 1992. – 136 с.

180. Binder H. Water near lipid membranes as seen by infrared spectroscopy / H. Binder // European biophysics journal. — 2007. — V. 36, №4-5. — P. 265-279.

181. Korkmaz F. Temperature influence on the dipalmitoylphosphatidylcholyne model membranes studied by FTIR / F. Korkmaz, F. Severcan, M. Aflori, D.O. Dorohoi // Digest journal nanomatetials and biostructures. — 2008. — Vol. 3, №2. — P. 55-61.

182. Малеев В.Я. Методы биофизических исследований : монография / В.Я. Малеев. – Х.: ХНУ имени В.Н. Каразина, 2014. – 457 с.

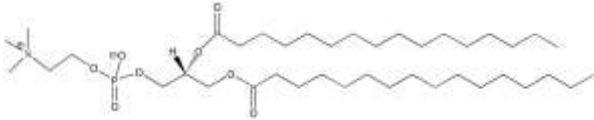
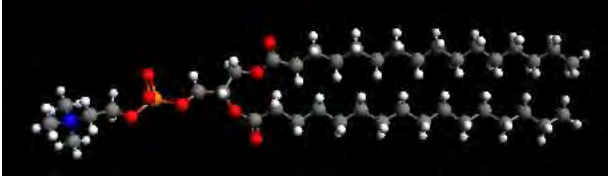
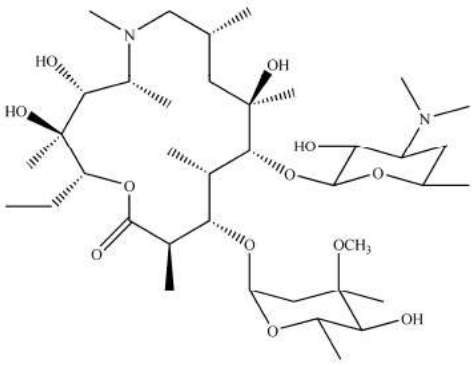
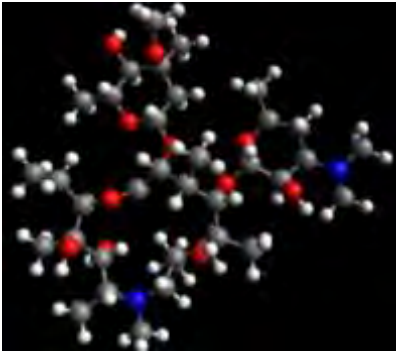
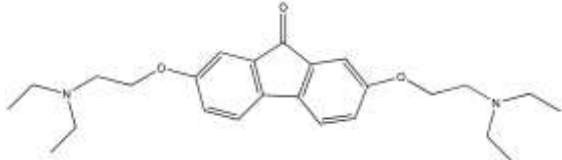
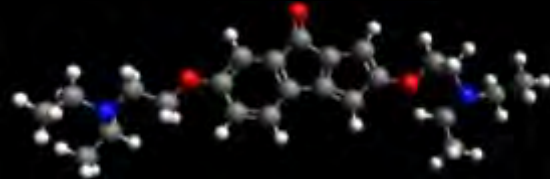
183. Bardonnnet P.L. Pre-formulation of liposomes against Helicobacter pylori: characterization and interaction with the bacteria / P.L. Bardonnnet, V. Faivre, P. Boullanger, J.C. Piffaretti, F. Falson // European journal of pharmaceuics and biopharmaceuics. — 2008. — Vol. 69, № 3. — P. 908-922.

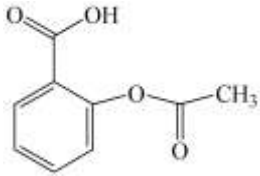
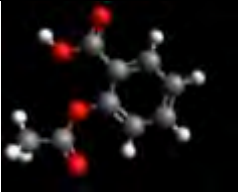
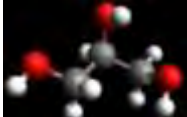
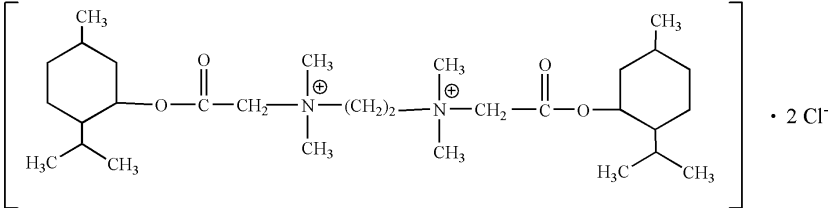

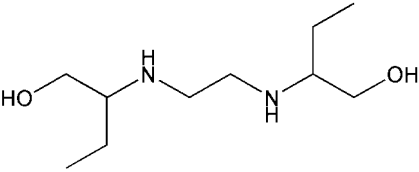
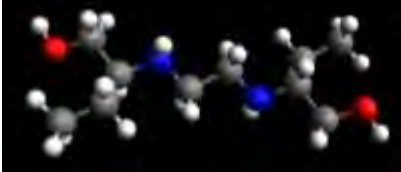
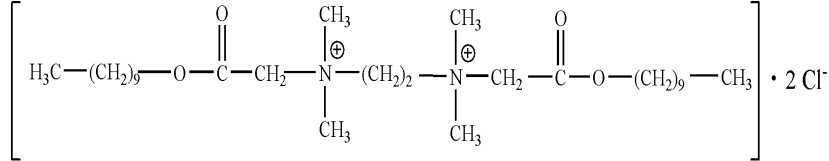
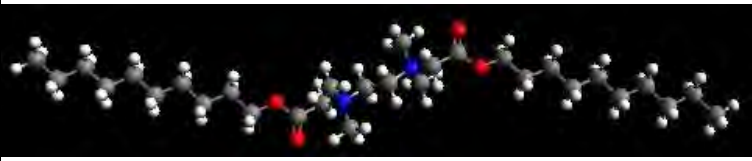
184. Кондратьева Т.С. Технология лекарственных форм. Т. 1. / Под ред. Т.С. Кондратьевой. — М.: Медицина, 1991. — 495 с.
185. Rege B.D. Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs / B.D. Rege, L.X. Yu, A.S. Hussain, J.E. Polli // *Journal of pharmaceutical sciences*. — 2001. — Vol. 90, №11. — P. 1776-1786.
186. Ohvo-Rekilä H. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes / H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J.P. Slotte // *Progress in lipid research*. — 2002. — Vol. 41. — P. 66-97.
187. Anderson T. G. Condensed complexes and the calorimetry of cholesterol-phospholipid bilayers / T. G. Anderson, H. M. McConnell // *Biophysical journal*. — 2001. — Vol. 81. — P. 2774-2785.
188. Ipsen J. H. Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order: the effect of cholesterol / J. H. Ipsen, O. G. Mouritsen, M. Bloom // *Biophysical journal*. — 1990. — Vol. 57. — P. 405-412.
189. Nowacka A. Small polar molecules like glycerol and urea can preserve the fluidity of lipid bilayers under dry conditions / A. Nowacka, S. Douezan, L. Wads, D. Topgaard, E. Sparr // *Soft Matter*. — 2012. — Vol. 8. — P. 1482-1491.
190. . Lisetski L.N, Cholesteric liquid crystals doped with molecules of organic scintillator materials / L. N. Lisetski , L. N. Zavora , N. A. Kasian , O. V. Vashchenko, V. D. Panikarskaya // *Molecular crystals and liquid crystals*. — 2009. — Vol. 510. — P. 1240-1249.
191. Killian J.A. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes / J.A. Killian // *Biochimica biophysica acta*. — 1998. — Vol. 1376. — P. 401-416.
192. Helenius A. Solubilization of membranes by detergents / A. Helenius, K. Simons // *Biochimica biophysica acta*. — 1975. — Vol. 415, №1. — P. 29-79.

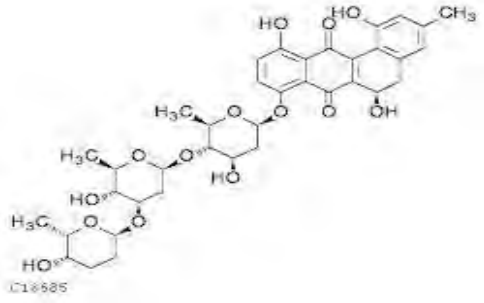
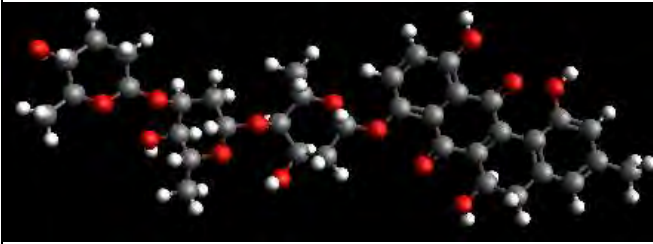
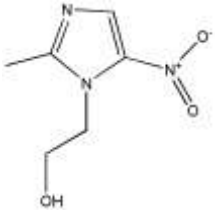
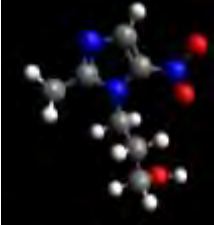
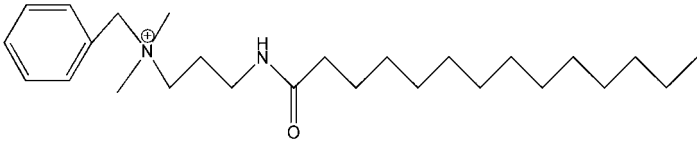

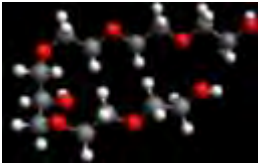
ДОДАТОК

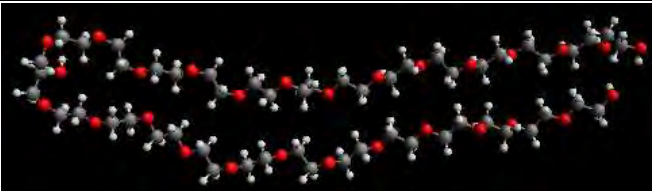
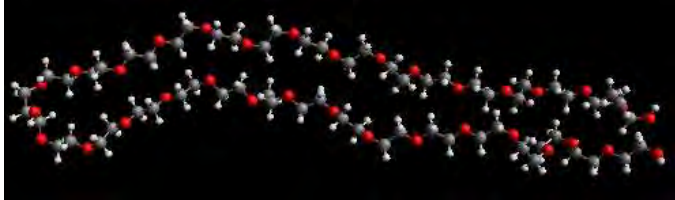
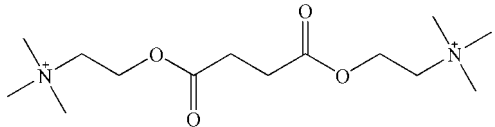
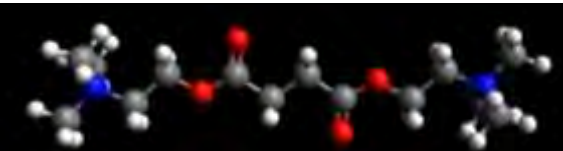
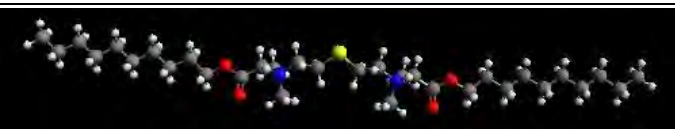
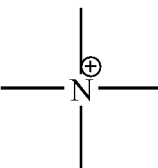
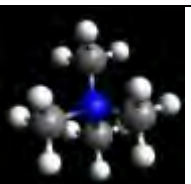
Додаток А.

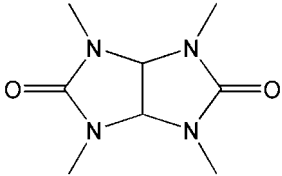
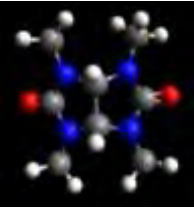
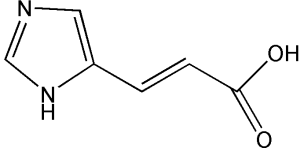

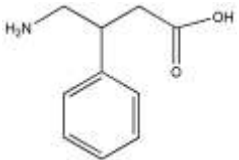
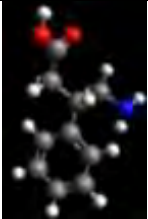
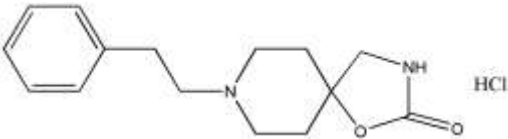
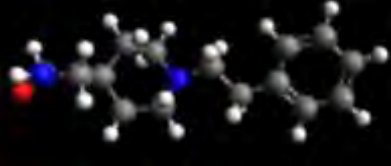
Характеристики ДПФХ та БАС:

Назва БАС	Структурна формула	Молекулярна модель
ДПФХ		
Азітроміцин		
Аміксин		

Назва БАС	Структурна формула	Молекулярна модель
Аспірин		
Гліцерин	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$	
Декаметоксин		
Етамбутол		
Етоній		

Назва БАС	Структурна формула	Молекулярна модель
Ландоміцин Е		
Метронідазол		
Мірамістин		
ОЕГ _{n=5}	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{H} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{5-k}\text{H} \end{array} $	

Назва БАС	Структурна формула	Молекулярна модель
ОЕГ _{n=25}	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{H} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{25-k}\text{H} \end{array} $	
ОЕГ _{n=30}	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{H} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{30-k}\text{H} \end{array} $	
Сукцинілхолін		
Тіоній	$ \left[\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_9-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_2-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}_3 \right] \cdot 2 \text{Cl}^- $	
ТМА		

Назва БАС	Структурна формула	Молекулярна модель
Транквілар		
Уроканова кислота		
Фенібут		
Фенспіріда гідрохлорид		
Холестерин	