

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

БУДЯНСЬКА ЛІЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА



УДК 577.352:536.6:615.31

**ЕФЕКТИ СПІЛЬНОЇ ДІЇ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН У
БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ СИСТЕМАХ
НА ОСНОВІ МОДЕЛЬНИХ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН**

03.00.02 – біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Харків-2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України, м. Харків

Науковий керівник: кандидат фізико-математичних наук, старший науковий співробітник
Ващенко Ольга Валеріївна,
Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України,
старший науковий співробітник відділу
наноструктурних матеріалів.

Офіційні опоненти: доктор фізико-математичних наук, доцент,
Трусова Валерія Михайлівна,
Харківський національний університет
імені В.Н. Каразіна,
завідувач кафедри ядерної та медичної фізики;

кандидат фізико-математичних наук,
Духопельников Євген Володимирович,
Інститут радіофізики та електроніки
імені О.Я. Усикова НАН України,
старший науковий співробітник.

Захист відбудеться “___” _____ 2019 р. о ___ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розіслано “___” _____ 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



В.П. Берест

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Взаємодія ліпідних мембран з лікарськими речовинами (ЛР) - це швидко зростаючий напрямок досліджень, який представляє особливий інтерес для біофізики та має важливі біомедичні застосування. Ліпідний бішар біомембран виконує низку важливих біологічних функцій, а окрім того становить основний шлях доставки в клітину більшості ЛР. Зміна властивостей бішару відбувається як в процесі зв'язування, так і дифузії ЛР крізь нього і складає мембранотропну дію (МД) даної ЛР. На сьогодні зв'язок між МД та терапевтичною дією ЛР встановлено для анестетиків, антибіотиків, антимікробних препаратів, тощо. Для виявлення та оптимізації МД важливим є встановлення зв'язків між властивостями ЛР та ефектами їх МД. Взаємодії мембрани одночасно з декількома ЛР на даний момент порівняно мало вивчені, проте, можуть чинити істотний вплив на ефективність ЛР при спільному застосуванні. Використання ліпідних мембран різного складу, які наближуються до мембран різних типів клітин, є важливим для розробки ліпосомальних форм ЛР, встановлення їх спорідненості до певної ліпідної фази і модуляції їх терапевтичної дії. Для вирішення всіх цих завдань все ширше використовуються модельні ліпідні мембрани як структурні компоненти біомембран.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках наукових тем Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України відповідно до НДР № 0115U003433 «Специфіка відгуку ліпідного наноматеріалу на присутність люмінесцентних зондів та біологічно активних субстанцій» (здобувач – виконавець), № 0116U002612 «Створення наноматеріалів з керованою електро-, фото- та рентген-стимульованою активністю» (здобувач – виконавець), № 0118U002295 «Визначення взаємодії наноносіїв фармпрепаратів з модельними фосфоліпідними мембранами» (здобувач – відповідальний виконавець), а також Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна № 0118U002041 «Біофізичні моделі молекулярної взаємодії граміцидину S» (здобувач – виконавець).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є встановлення ефектів взаємодії лікарських речовин у багатокомпонентних системах на основі модельних ліпідних мембран різного ліпідного складу. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Виявити ефекти спільної МД водорозчинних ЛВ і їх компонентів (іонів, структурних фрагментів) в рівноважному і кінетичному режимах (адсорбція, дифузія та ін.).
2. Визначити зв'язок між хімічною будовою і ефектами спільної МД в парах «циклосерин - допоміжна речовина».
3. Підібрати склад багатокомпонентних ліпідних мембран для наближення до різних типів біомембран.
4. Встановити ефекти МД низки ЛР (граміцидину S, кон'югатів метотрексату та бетулонової кислоти, а також полімерних носіїв фармпрепаратів на основі поліакриламід) на модельні мембрани різного ліпідного складу.

Об'єкт досліджень – ефекти мембранотропної дії ЛР в модельних ліпідних мембранах.

Предмет досліджень – зміни термодинамічних параметрів модельних ліпідних мембран при внесенні ЛР та їх компонентів.

Методи дослідження: диференціальна скануюча калориметрія (ДСК) (параметри фазових переходів модельних ліпідних мембран), Фур'є-ІЧ-спектроскопія (характеристики смуг поглинання функціональних груп ліпідів), термогравіметричний аналіз (ТГА) (характеризація кристалізаційної води), оптична мікроскопія (морфологія еритроцитів), кореляційний аналіз (кореляції між молекулярними параметрами кон'югатів і параметрами їх мембранотропної дії), квантово-хімічні розрахунки (молекулярні параметри ЛР та ліпідів).

Наукова новизна результатів роботи:

1. Вперше кількісно охарактеризовано МД водорозчинних речовин різної природи (космотропи і хаотропи) на основі моделі адсорбції Фрейндліха.
2. Вперше показано зміну ефектів МД основної діючої речовини фармпрепарату (антибіотику циклосерину) в залежності від хімічної будови допоміжної речовини.
3. Вперше запропоновано методику вивчення кінетики спільної МД, за допомогою якої показано полегшення пасивної трансмембранної дифузії тилорону в присутності диметилсульфоксиду.
4. Вперше встановлені високі коефіцієнти лінійної кореляції між молекулярними параметрами (коефіцієнтом ліпофільності та коефіцієнтом анізотропії) кон'югатів метотрексату та бетулонової кислоти і параметрами їх МД (температурами фазових переходів модельної ліпідної мембрани та проникністю *Caco-2* клітин).
5. Вперше показано істотне підвищення зв'язування граміцидину S з мембраною дипальмітоїлфосфатидилхоліну в присутності холестерину.

Практичне значення одержаних результатів. Застосування моделі адсорбції Фрейндліха дозволяє кількісно характеризувати та порівнювати МД водорозчинних ЛР, що важливо у процесах їх конкурентної адсорбції на мембрані. Методика вивчення кінетики спільної МД водорозчинних ЛР може бути застосована для тестування сумісності ЛР, у тому числі, основної та допоміжних речовин фармпрепаратів. Залежність ефектів спільної МД від хімічної будови допоміжної речовини дозволяє оптимізувати склад фармпрепаратів відповідно до потрібних біомедичних застосувань. Встановлена кореляція між коефіцієнтом анізотропії молекули ЛР та її МД у модельних та клітинних мембранах відкриває можливість корегування властивостей ЛР шляхом модифікації їх анізотропії. Встановлення спорідненості ЛР до мембран певного ліпідного складу надає додаткову цінну інформацію щодо механізмів їх дії та може бути застосоване для підвищення селективності між клітинами-мішенями та клітинами організму-хазяїна.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою самостійно отримано результати експериментальних досліджень, проведено їх обробку, виконано первинний аналіз результатів та сформульовано попередні висновки. Постановка задачі та інтерпретація отриманих даних здійснювалися спільно з науковим

керівником та співавторами наукових публікацій. В опублікованих із співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає: у роботах [1-3, 5-16, 18-22] – робота з літературними джерелами, приготування зразків, проведення калориметричних вимірювань, обробка калориметричних даних, участь у обговоренні результатів, написанні тексту статей та тез; у роботах [23, 24] – приготування зразків, отримання та обробка калориметричних даних, обчислення молекулярних параметрів ЛР та ліпідів, проведення кореляційного аналізу, участь у написанні тез; у роботах [4, 17, 23] – приготування зразків для ІЧ-спектроскопії та калориметрії, проведення калориметричних вимірювань, обговорення результатів, участь у підготовці статей та тез.

Апробація роботи. Основні результати досліджень були представлені, обговорені і опубліковані в тезах доповідей вітчизняних та міжнародних наукових конференцій: 7th and 8th International Conferences «Physics of Liquid Matter: Modern problems» (Kyiv, Ukraine, 2016; Kyiv, Ukraine, 2018); VII, VIII and IX International Conference for Professionals & Young Scientists «Low temperature physics» (Kharkiv, Ukraine, 2016; Kharkiv, Ukraine, 2017; Kharkiv, Ukraine, 2018); Школе-семинаре «Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения» (с. Мартовое, Печенежский р-н, Харьковская область, 2016); XXIV Українській конференції з органічної хімії (Полтава, Україна, 2016); IEEE International Young Scientists Forum (Kharkiv, Ukraine, 2016); Международной школе-семинаре «Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения» (с. Мартовое, Печенежский р-н, Харьковская область, 2017); XXIII Galyna Puchkovska International School-Seminar «Spectroscopy of molecules and crystals» (Kyiv, Ukraine, 2017); 5th International Conference «Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects» (Kharkiv, Ukraine, 2017); XI International Conference «Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials (ICEPOM – 11)» (Ivano-Frankivsk, Ukraine, 2018); Міжнародній школі-семінарі «Функціональні матеріали для технічних та біомедичних застосувань» (сел. Мартове, Печенізький район, Харківська область, 2018); XII Міжнародній конференції з прикладної біофізики, біоніки та біокібернетики (Київ, Україна, 2018); VII з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, Україна, 2018).

Публікації. Основні результати дисертаційної роботи опубліковано в 24 наукових працях, з них 9 статей у фахових вітчизняних та закордонних журналах [1-9] та 15 тез доповідей на міжнародних і національних наукових конференціях [10-24].

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку літературних джерел та 2 додатків. Загальний обсяг дисертації складає 164 сторінки. Дисертація містить 51 рисунок, 13 таблиць. Список використаних джерел (250 найменувань) займає 29 сторінок. Додатки займають 15 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми досліджень, викладено мету та перелічено основні задачі дисертаційної роботи, що необхідно розв'язати для її

досягнення, визначено наукову новизну та практичне значення отриманих дисертантом результатів, а також особистий внесок здобувача, наведено інформацію про апробацію роботи та публікації здобувача.

У **першому розділі** дано короткий огляд основних типів модельних ліпідних мембран, що утворюють ліпідну складову біомембран, особливостей їх структури та фізичних властивостей. Зокрема, у водному середовищі амфіфільні ліпідні молекули агрегують з утворенням замкнених структур з полярною поверхню та неполярним внутрішнім об'ємом. З точки зору надмолекулярного упорядкування ліпідний бішар є типовою рідкокристалічною структурою, що зазнає фазових переходів 1-го роду, при яких змінюється упорядкованість ліпідів. У досліджених модельних ліпідних мембранах здійснюються фазові переходи з низькотемпературної гелевої фази ($L_{\beta'}$) до високотемпературної рідкокристалічної фази (L_{α}), іноді – з утворенням складчастої фази ($P_{\beta'}$): $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$. Перший з цих переходів, який прийнято називати передпереходом, пов'язаний зі зміною пакування полярних голівок фосфоліпідів внаслідок підвищення їх гідратації; інший – основний перехід, або плавлення мембрани – відбувається зі зміною конформації вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів. Наведено відомості про вплив ЛР на властивості ліпідного бішару, зв'язок терапевтичної дії ЛР з їх МД, розглянуто низку ефектів спільної дії речовин у ліпідній мембрані. Окрему увагу приділено кінетичним ефектам, а також ролі ліпідного складу мембрани. На основі проведеного аналізу літературних даних зроблено висновки про необхідність подальшого детального вивчення спільної дії ЛР на модельні мембрани, а також вивчення дії ЛР у мембранах різного ліпідного складу.

У **другому розділі** обґрунтовано вибір об'єктів дослідження та дана їх характеристика, розглянуто фізичні основи застосованих експериментальних методів (ДСК, Фур'є-ІЧ-спектроскопії, ТГА, оптичної мікроскопії), детально викладена методика експериментів.

Досліджувані модельні мембрани моделюють ліпідний бішар, який є структурно-функціональною основою біомембран. У якості однокомпонентних модельних ліпідних мембран використовувалися мультибішарові ламелярні структури гідратованого L- α -дипальмітоїлфосфатидилхоліну (ДПФХ) та диміристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ). Багатокомпонентні мембрани представляли собою суміші ДПФХ з дипальмітоїлфосфатидилгліцерином (ДПФГ), дипальмітоїлфосфатидилетаноламіном (ДПФЕ), цереброзидами (Ц), кардіоліпіном (КЛ) та холестеринем (Х).

Для досліджень використовувалися основні діючі речовини фармпрепаратів (тилорону дигідрохлорид, фенспірид, диметилсульфоксид, циклосерин, сукцинілхоліну дигідрат, азітроміцину дигідрат, граміцидин S, кон'югати метотрексату та бетулонової кислоти), допоміжні речовини фармпрепаратів (гіпромелоза, кальцію стеарат, магнію стеарат, стеаринова кислота, лауринова кислота, каолін, лактози моногідрат, повідон) і структурні компоненти ЛР (іони тощо).

Основними досліджуваними параметрами модельних ліпідних мембран були параметри передпереходу (індекс p) та основного фазового переходу (індекс m) – температура (T_m , T_p), ентальпія (ΔH_m , ΔH_p), напівширина ($\Delta T_{m1/2}$, $\Delta T_{p1/2}$) та гістерезис (h_m , h_p).

Для графічної ілюстрації експериментальних даних використовували середовище «QtiPlot 0.9.8.9». Квантово-хімічні розрахунки з використанням напівемпіричних методів AM1 та PM6 здійснювали на базі програмного пакету МОРАС 2016, версія 18.305W (вільна академічна ліцензія). Для розрахунку коефіцієнту ліпофільності молекул ($\log P$) використовували ресурс віртуальної обчислювальної хімічної лабораторії (<http://www.vcclab.org>).

Третій розділ присвячено дослідженням взаємодії модельних ліпідних мембран з ЛР у рівноважних умовах. Зокрема, для гідрофільних ЛР диметилсульфоксиду (ДМСО) та тилорону спостерігаються якісно протилежні зсуви температур основного фазового переходу (ΔT_m), що обумовлене, відповідно, їх космотропними та хаотропними властивостями (Рис. 1). Припускаючи, що ΔT_m пропорційна кількості ЛР, адсорбованої на поверхні мембрани, експериментальні дані можуть бути апроксимовані за допомогою аналогу рівняння адсорбції Фрейндліха:

$$\Delta T_m = kc^{1/n}, \quad (1)$$

де k – значення ΔT_m при одиничній концентрації речовини;
 $1/n$ – кут нахилу $\Delta T_m(c)$.

Запропоновано модель, яка описує дію гідрофільних домішок на ліпідний бішар у термінах додаткового латерального тиску $P_{eff}(c)$, негативного для хаотропів та позитивного для космотропів на підставі рівняння Клапейрона-Клаузіуса для двовимірного випадку:

$$\frac{dT_m}{dP} = \frac{T_m}{q} \frac{a_2 - a_1}{q}, \quad (2)$$

де $\alpha_{1,2}$ – молекулярні площі ліпідів до та після переходу,
 q – молекулярна теплота переходу.

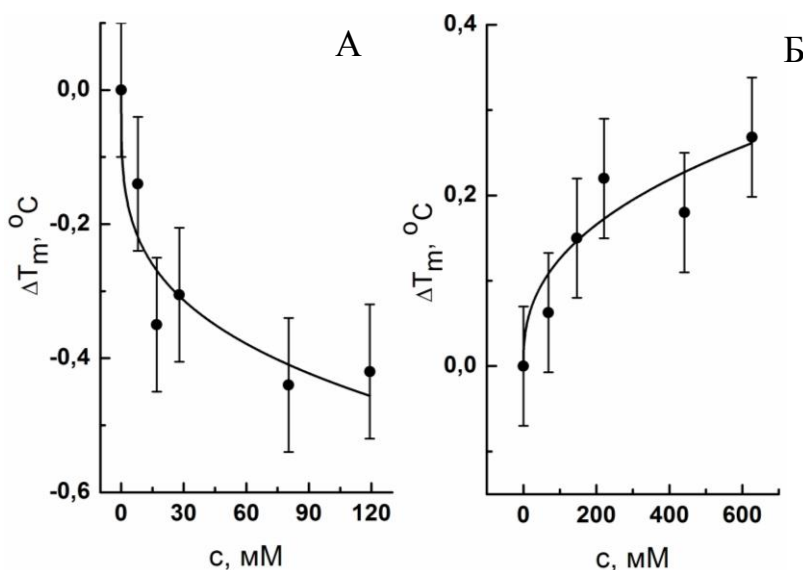


Рисунок 1. Залежність ΔT_m від концентрації ЛР в водному розчині тилорону (А) і диметилсульфоксиду (Б). Точки - експериментальні дані, лінії - апроксимація за рівнянням (1).

З урахуванням експериментально отриманої в літературі залежності $P_{eff} = Bc^\beta$ при $\Delta T_m \ll T_m$, отримуємо

$$\Delta T_m \cdot c \approx \left(T_{m0} \frac{a_2 - a_1}{q} B \right) \cdot c^\beta, \quad (3)$$

де T_{m0} – температура переходу мембрани без домішок, B – константа.

Відмітимо, що рівняння (3) за формою співпадає з емпірично встановленим рівнянням (1), що підтверджує адекватність запропонованої моделі.

В рамках моделі адсорбції Фрейндліха (1) проведено порівняння мембранотропної дії іонів Ce^{3+} і Ca^{2+} у мембранах ДПФХ. Ці іони мають близьке значення іонного радіусу ($\approx 0,10$ нм), тож, згідно літературним даним, можуть бути конкурентами за зв'язування з біомолекулами. Значення ΔT_m було використано як показник іонно-мембранних взаємодій, що виникають в результаті адсорбції іонів на поверхні мембрани. Як можна бачити, обидва іони приводять до збільшення ΔT_m у всіх досліджених концентраціях (Рис. 2), але, як свідчить апроксимація рівнянням (1), для Ce^{3+} значення k на порядок більше, ніж для Ca^{2+} (табл. на Рис. 2). Це, певно, є одним з факторів біологічної дії іонів Ce^{3+} при його конкуренції з Ca^{2+} .

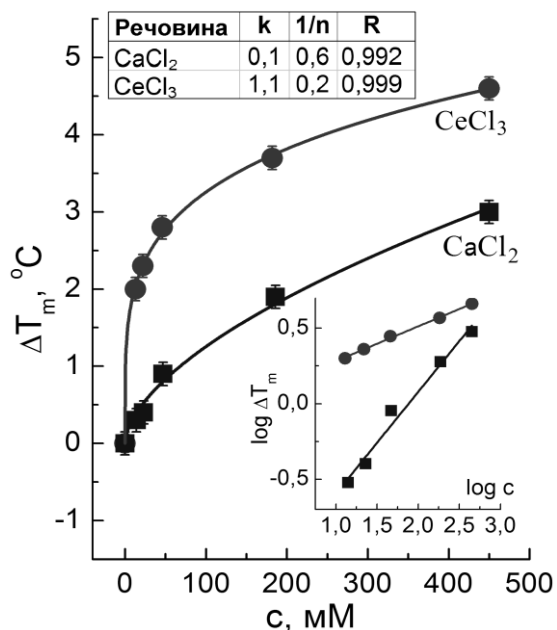


Рисунок 2. Концентраційні залежності ΔT_m (символи) та їх наближення за допомогою рівняння Фрейндліха для адсорбції (лінії) мембран ДПФХ при додаванні розчинів CaCl_2 та CeCl_3 . Параметри в таблиці: n , k – коефіцієнти апроксимації рівняння Фрейндліха; R – коефіцієнт детермінації. Вставка відображає ті ж залежності в подвійній логарфімічній шкалі.

При спільному введенні тилорону і ДМСО до ліпідної мембрани встановлено перевагу зв'язування з мембраною тилорону (Рис. 3, А). В парі тилорон-гіпромелоза, яка моделює міжкомпонентні взаємодії у препараті «Аміксин ІС», спостерігалася адитивність МД обох речовин (Рис. 3, Б). Очевидно, що ефекти спільної дії визначаються хімічною будовою ЛР.

З метою висвітлення залежності ефектів спільної дії компонентів фарм-препаратів від хімічної будови ЛР проведено порівняльне дослідження МД допоміжних речовин (стеарату кальцію (Ca^{2+}St), стеарату магнію (Mg^{2+}St) та стеаринової кислоти (StA)) – як індивідуально, так і у парах з антибіотиком циклосерином (С). Встановлено, що індивідуальна МД допоміжних речовин зростає у послідовності: $\text{Ca}^{2+}\text{St} < \text{Mg}^{2+}\text{St} < \text{StA}$ (Рис. 4). На відміну від них, циклосерин має незначну МД, але розширює температурний діапазон існування складчастої фази мембрани.

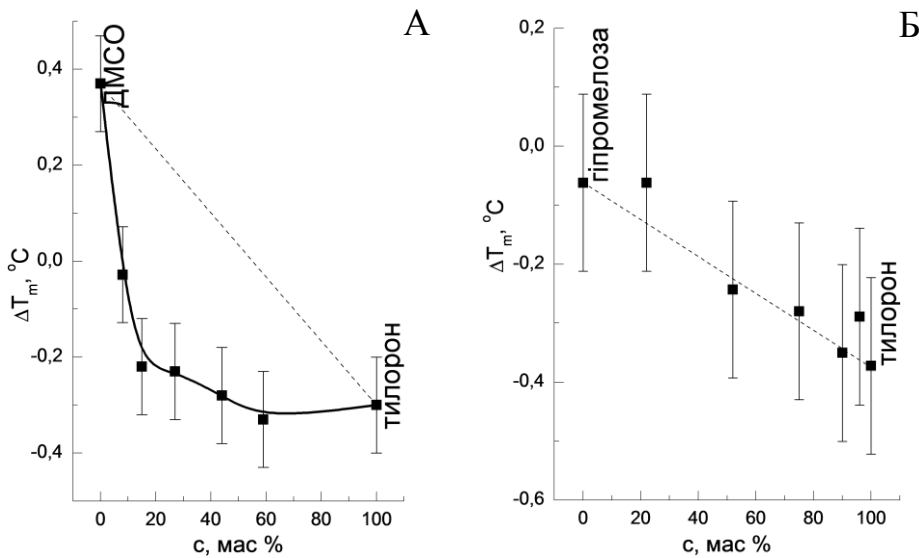


Рисунок 3.
Залежності ΔT_m
від масової
частки тилорону
в парах «тилорон
- ДМСО» (А) та
«тилорон
- гіпромелоза» (Б)

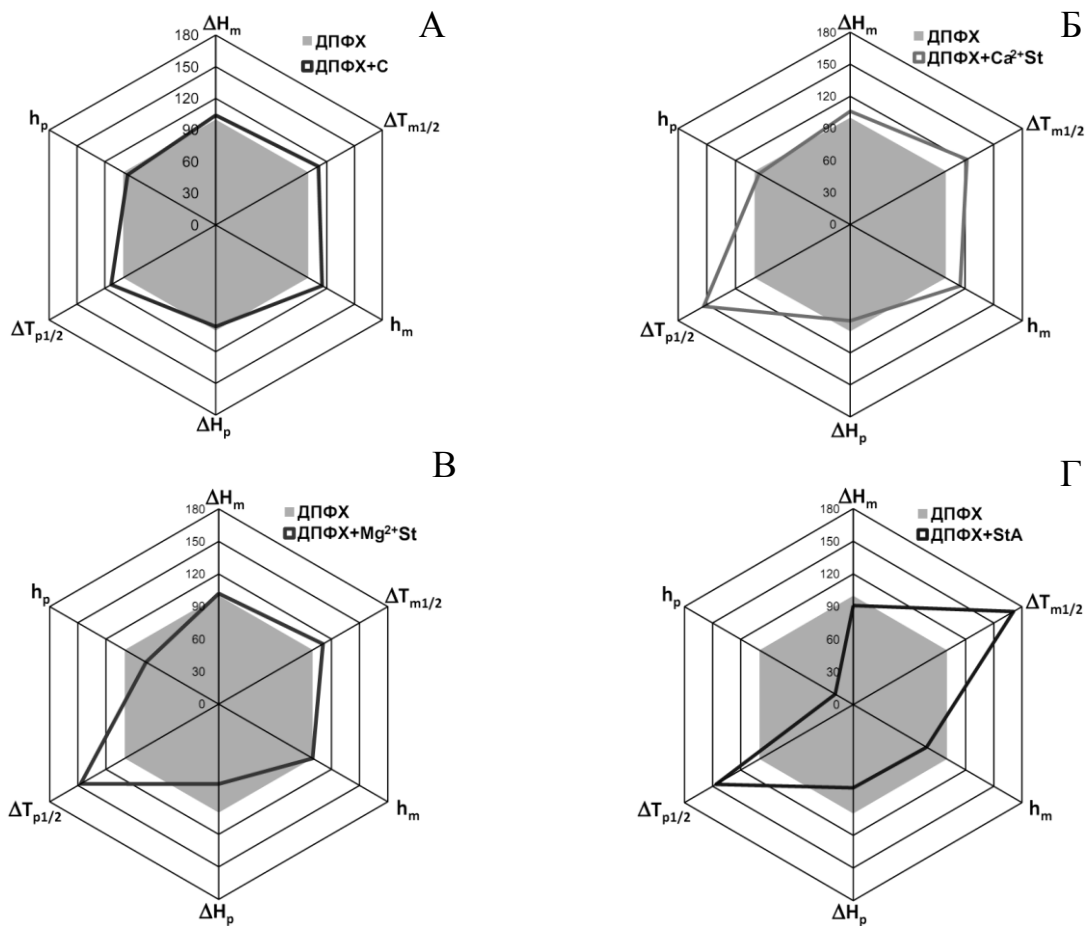
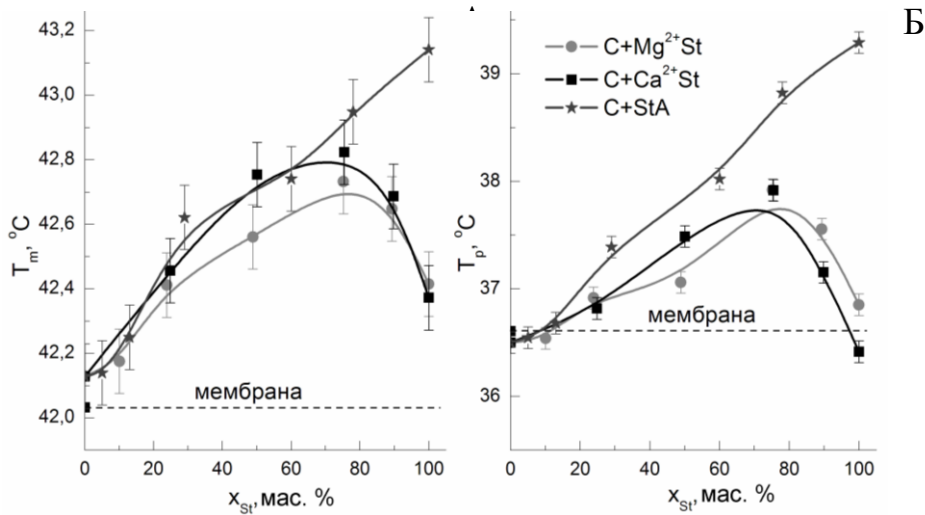


Рисунок 4. Термодинамічні параметри мембрани ДПФХ в присутності ЛР: Циклосерин (А), $Ca^{2+}St$ (Б), $Mg^{2+}St$ (Б), StA (Г): відсоткова зміна у порівнянні з мембраною ДПФХ без домішок.

Спільне введення кожного стеарату з циклосерином приводило до додаткового підвищення T_m і T_p з неадитивною концентраційною залежністю, тобто до синергізму їх МД; у той же час, для циклосерину зі стеариною спостерігалася адитивність (Рис. 5).



Б

Рисунок 5. T_m (А) і T_p (Б) мембрани ДПФХ при спільному введенні 2 мас.% ЛР.

Значення ефекту спільної МД були оцінені як середнє відхилення експериментально отриманих значень ΔT_m від адитивності:

$$J_{AB} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Delta T_m^{add} - \Delta T_m^i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (1 - c_i) \Delta T_m^A + c_i \Delta T_m^B - \Delta T_m^i, \quad (4)$$

де c_i – масова частка домішки В відносно загального вмісту домішок А та В у мембрані; ΔT_m^A і ΔT_m^B – зсуви T_m внаслідок індивідуального введення домішок; ΔT_m^{add} – адитивне значення ΔT_m ; ΔT_m^i – експериментальне значення при спільному введенні А і В; n – число систем з різними c_i .

Значення J_{AB} зростало зі збільшенням концентрації домішок і було більшим для передпереходу, ніж для основного фазового переходу (Табл. 1). В цілому, ефект спільної МД з циклосерином зменшувався у послідовності $\text{Ca}^{2+}\text{St} \geq \text{Mg}^{2+}\text{St} > \text{StA} \sim 0$, що вказує на визначальну роль структури полярної частини досліджених допоміжних речовин у їх спільній МД з циклосерином.

Таблиця 1

Значення J_{AB} у мембранах ДПФХ із вмістом циклосерину (С), кальцію стеарату (Ca^{2+}St), магнію стеарату (Mg^{2+}St) та стеаринової кислоти (StA)

Суміш	Передперехід		Основний перехід	
	2 %	5	2 %	5 %
C + Ca^{2+}St	0,9	2,2	0,4	0,5
C + Mg^{2+}St	0,5	1,4	0,3	0,4
C + StA	~ 0	—	~ 0	—

Іншим фактором, що суттєво впливає на МД, є ліпідний склад мембран. Для дослідження цього впливу були обрані ЛР з різними типами взаємодії з

мембраною: взаємодія з об'ємом мембрани (лауринова кислота); взаємодія з мембранною поверхнею (каолін) та змішаний тип (фенспірид). Поряд із однокомпонентною мембраною ДПФХ, були використані мембрани ДПФХ-Ц та ДПФХ-ДПФЕ-Х. Згідно з літературними даними, мембрани ДПФХ та ДПФХ-Ц є фазово однорідними, тоді як у мембрані ДПФХ-ДПФЕ-Х співіснують дві ліпідні фази різного складу – холестерин-збагачена та холестерин-збіднена (Рис. 6, А).

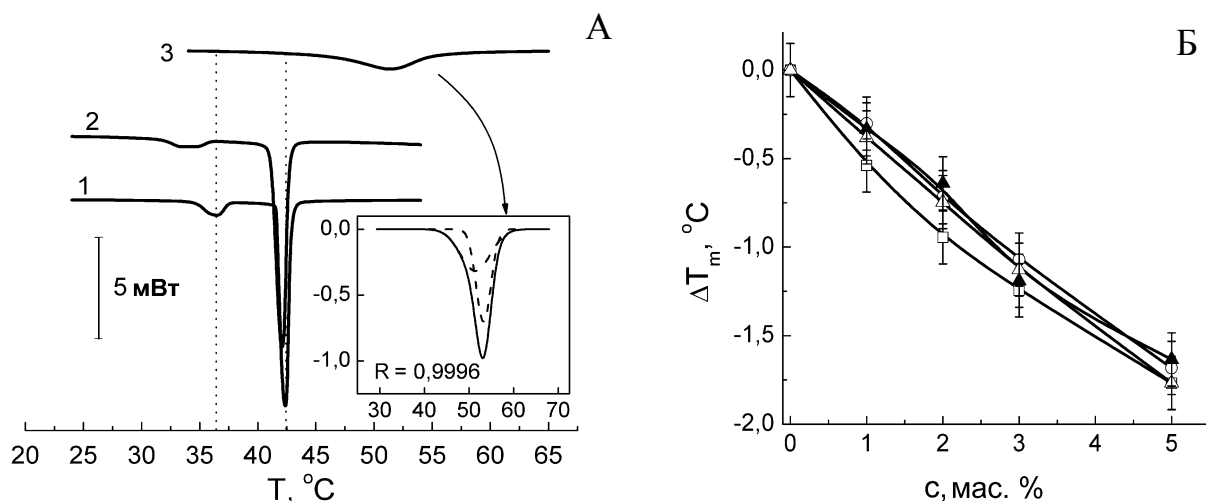


Рисунок 6. А: ДСК-термограми мембран: 1 – ДПФХ, 2 – ДПФХ-Ц, 3 – ДПФХ-ДПФЕ-Х. Вставка: розкладання піку фазового переходу мембрани ДПФХ-ДПФЕ-Х на 2 компоненти: широкий пік – холестерин-збагачена фаза, вузький пік – холестерин-збіднена фаза. Б: Залежність ΔT_m від концентрації фенспіриду в цих мембранах: ДПФХ (□), ДПФХ-Ц (○), ДПФХ-ДПФЕ-Х (Δ).

Показано, що фенспірид в усіх трьох типах мембран мав майже однакову МД (Рис. 6, Б). МД каоліну на мембрани ДПФХ і ДПФХ-Ц виявилася якісно різною: в присутності каоліну спостерігається зниження T_m і T_p в мембрані ДПФХ та збільшення цих параметрів в мембрані ДПФХ-Ц (Рис. 7, А). Ці відмінності можна пояснити зміною гідратації мембран в результаті адсорбції, яка підвищується для мембрани ДПФХ і знижується для мембрани ДПФХ-Ц.

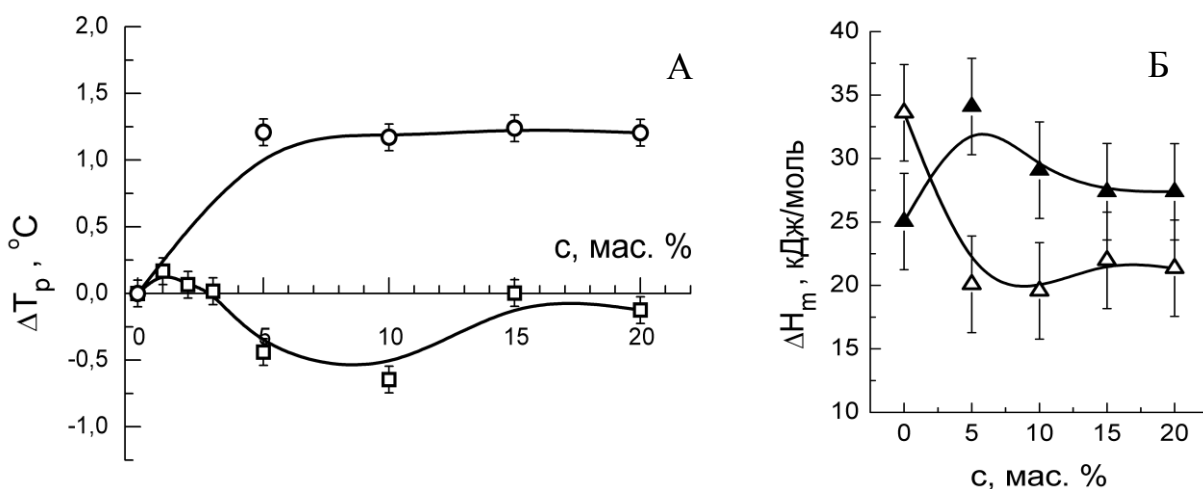


Рисунок 7. Вплив каоліну на ΔT_p (А) в мембранах ДПФХ (□) і ДПФХ-Ц (○) та напівширину (Б) в мембрані ДПФХ-ДПФЕ-Х (▲ - широкий пік, Δ - вузький пік).

У мембрані ДПФХ-ДПФЕ-Х з підвищенням концентрації каоліну ентальпія широкого піку зростає за рахунок зниження ентальпії вузького піку (Рис. 7, Б), тоді як сумарна ентальпія обох піків в межах експериментальної похибки не змінюється, що свідчить про перерозподіл ліпідів між фазами.. Аналогічні залежності спостерігалися і для лауринової кислоти, яка має якісно інший тип взаємодії з мембраною.

На підставі аналізу отриманих даних, можна сказати, що латеральний фазовий перерозподіл ліпідів спостерігається при зв'язуванні ЛР як з поверхнею, так і з об'ємом мембрани.

Метою **четвертого розділу** було дослідження взаємодії модельних ліпідних мембран з ЛР в кінетичному режимі. Кінетику взаємодії ЛР з мембраною вивчали шляхом додавання до неї водних розчинів тилорону та ДМСО і отримання серії послідовних ДСК-термограм. При цьому були використані різні схеми введення речовин в мембрану: (1)тилорон(2)ДМСО; (1)ДМСО(2)тилорон, а також одночасне введення тилорон+ДМСО. Отримані калориметричні піки представляли собою суперпозицію піку мембрани без домішок і піку мембрани з тилороном (Рис. 8, А). Параметр η характеризує частку ліпідів, зв'язаних з тилороном, і, отже, ефективність проникнення тилорону у бішари ДПФХ в процесі дифузії. Як можна бачити, кожна схема введення має свій характерний кінетичний профіль параметру η (Рис. 8, Б), що говорить про суттєві відмінності в кінетиці дифузії тилорону і важливість порядку введення лікарських речовин в мембрану. Аналіз кінетики профілів ДСК при введенні ЛР дозволив виділити два процеси у взаємодії тилорону з мембраною з різними характеристичними часами: сорбцію на мембрані (хвилини) та дифузію крізь ліпідні бішари (години).

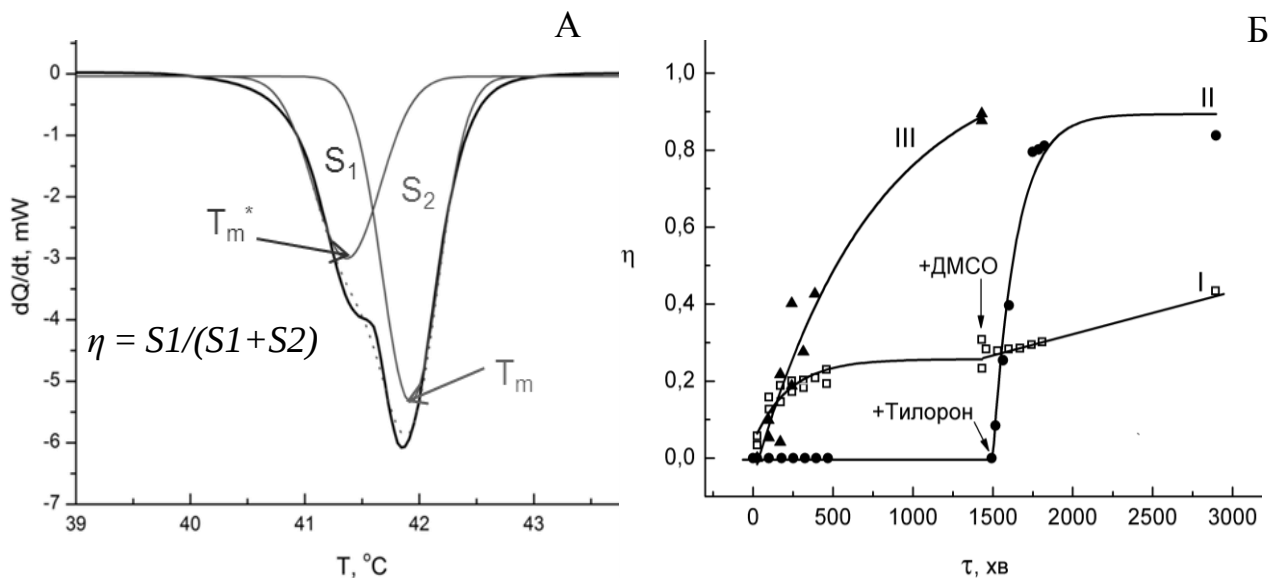


Рисунок 8. А: Розщеплення піку основного фазового переходу: низькотемпературний пік (максимум у T_m^* , область S_1) відповідає мембрані насиченій тилороном; високотемпературний пік (максимум у T_m , площа S_2) відповідає мембрані ДПФХ без домішок. Пунктирна лінія зображує криву огинаючої. Б: Кінетичний профіль η для різних схем введення тилорону та ДМСО: I – (1)тилорон(2)ДМСО; II – (1)ДМСО(2)тилорон; III – тилорон+ДМСО.

Важливою кінетичною характеристикою ліпідних мембран є розмір кооперативного домену ліпідів (CN). Величина CN була визначена для основного фазового переходу модельних ліпідних мембран ДПФХ і ДМФХ за формулою:

$$CN = 4RT_m^2 / (\Delta T_{m1/2} \Delta H_m), \quad (5)$$

де R – універсальна газова стала.

Дослідження, проведені в широкому діапазоні швидкостей сканування x (від 0,1 до 40,0 K/хв), свідчать, що при $x \rightarrow 0$ зниження швидкості сканування приводить до різкого збільшення CN , що є однією з причин великого розкиду (на 1-2 порядки) значення CN в літературних даних (Рис. 9). На підставі отриманих даних встановлено гіперболічну залежність $CN(x)$:

$$CN(x) = c + b/(x + a), \quad (6)$$

де a, b, c – константи.

Дослідження залежності від x інших термодинамічних параметрів, що входять у визначення CN (формула (5)) показало, що вид $CN(x)$ (формула (6)) визначається здебільшого залежністю $\Delta T_{m1/2}(x)$. На підставі цього запропоновано критерій вибору оптимальної швидкості сканування, який мінімізує похибку визначення CN : достовірні значення CN можуть бути отримані, якщо значення $\Delta T_{m1/2}$ статистично достовірно перевищує експериментальну похибку для даної системи.

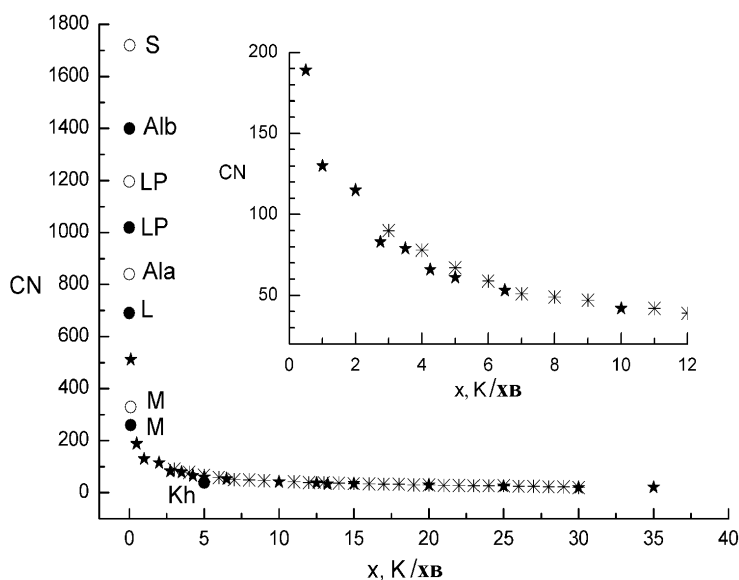


Рисунок 9. Розмір кооперативного домену мембран ДПФХ (★,●) і ДМФХ (*,○) при різних швидкостях сканування (●, ○ літературні дані; ★,* власні данні). Вставка ілюструє різницю між значеннями CN для ДПФХ і ДМФХ в залежності від x .

Широко використовуваним параметром, що характеризує кінетику різних процесів, є енергія активації (E_a). Методом ТГА була визначена E_a дегідратації $Ca^{2+}St$ і $Mg^{2+}St$ за допомогою рівняння Кіссінджера:

$$\ln \frac{x}{T_{dh}^2} = - \frac{E_a}{RT_{dh}} + const, \quad (7)$$

де T_{dh} - температура дегідратації.

Встановлено, що E_a для Ca^{2+}St на 30% більше, ніж для Mg^{2+}St (Рис. 10, А), що може бути важливо при утворенні ними міжмолекулярних комплексів.

Значення E_a фазових переходів мембран ДПФХ і ДМФХ було визначено за допомогою модифікованого рівняння Кіссінджера при $x = 2 \div 35$ К/хв:

$$\log\left(\frac{x}{T_m^2}\right) = -\frac{E_a}{RT_m} + \log\left(\frac{AR}{E_a}\right) + \log(f'(\theta)), \quad (8)$$

де θ - молекули, які зазнали фазовий перехід до температури T_m ; A – константа.

Встановлено, що для ДПФХ значення E_a вище, ніж для ДМФХ (Табл. 2), і підвищуються в присутності лауринової кислоти (Рис. 10, Б).

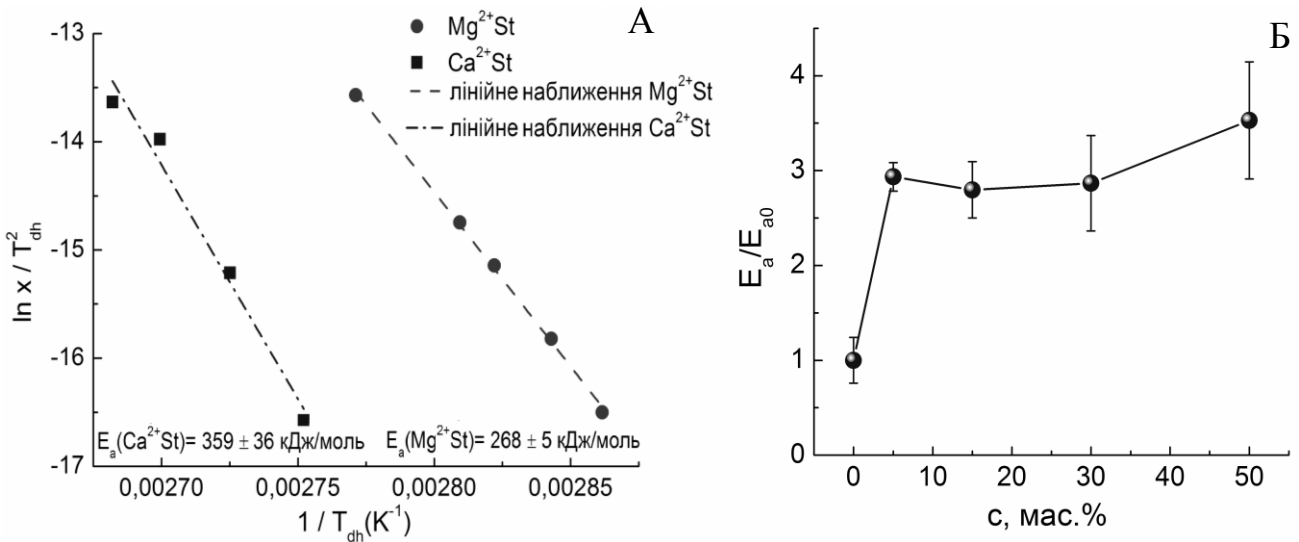


Рисунок 10. А: Визначення E_a десорбції кристалічної води Ca^{2+}St та Mg^{2+}St . Б: Відносна зміна E_a основного фазового переходу мембрани ДПФХ в присутності лауринової кислоти.

Таблиця 2

Значення E_a , розраховані за (8), для мембран ДПФХ та ДМФХ

Параметр	Основний перехід (T_m)		Передперехід (T_p)	
	ДПФХ	ДМФХ	ДПФХ	ДМФХ
E_a , кДж/моль	$77 \pm 0,2$	$73 \pm 0,2$	631 ± 32	422 ± 38

У п'ятому розділі приведено результати досліджень МД компонентів нових (кон'югати метотрексату і бетулонової кислоти) та вже відомих (антибіотик грамідин S) фармпрепаратів на модельні мембрани різного ліпідного складу.

Серед кон'югатів протипухлинного препарату метотрексату і імуномодулятору бетулонової кислоти значення ΔT_m та ΔT_p були найбільшими в присутності кон'югату SA-188. Вказана сполука має найбільш виражену МД і за рядом інших термодинамічних параметрів (Рис. 11).

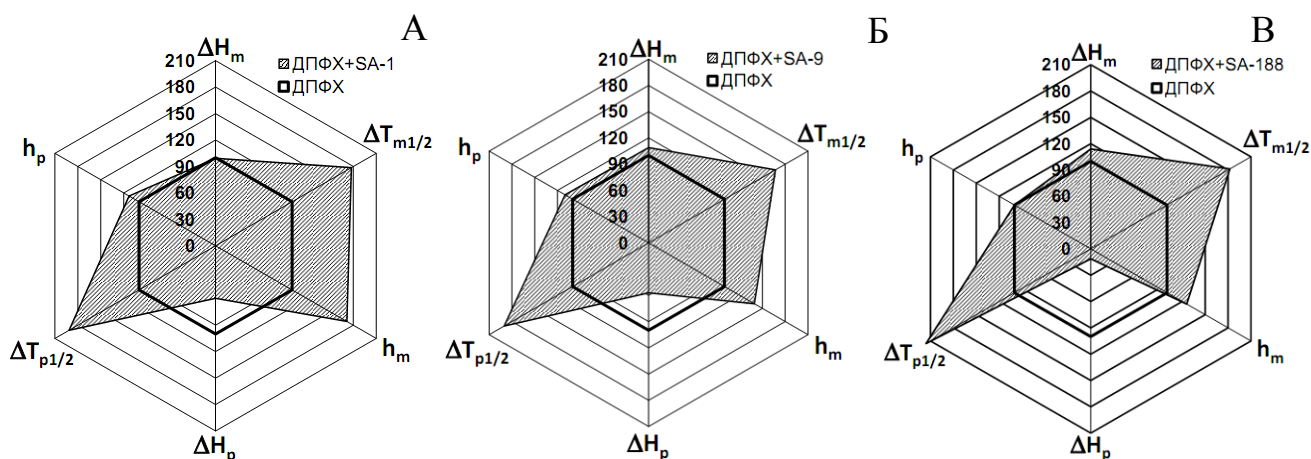


Рисунок 11. Термодинамічні параметри мембрани ДПФХ в присутності кон'югатів SA-1 (А), SA-9 (Б), SA-188 (В) – відсоткова зміна у порівнянні з мембраною ДПФХ без домішок.

Відмінності у хімічній будові кон'югатів полягають у різному розташуванні бетулонових фрагментів (з'єднання по різним карбоксильним групам метотрексату) та у додаванні β -фенілетиламінового фрагменту (у кон'югаті SA-188). Для усіх кон'югатів проведено квантово-хімічні розрахунки та отримано низку молекулярних параметрів: площа поверхні S_m та об'єм молекули V_m , дипольний момент μ , коефіцієнт ліпофільності $\log P$, коефіцієнт анізотрії k_a тощо. Встановлено високі коефіцієнти лінійної кореляції $\log P - \Delta T_m$ ($r = -0,99$) та $k_a - \Delta T_m$ ($r = 0,99$). Показано також, що проникність *Caco-2* клітин для кон'югатів (за даними досліджень компанії «Enamine») має високий коефіцієнт прямої кореляції з k_a ($r = 0,87$) та зворотної – з $\log P$ ($r = -0,78$).

Дослідження МД антибіотику граміцидину S (GS) проводилося у чотирьох типах мембран: у електронейтральній мембрані ДПФХ, негативно зарядженій мембрані ДПФХ–ДПФГ, а також у мембранах ДПФХ–Ц та ДПФХ–Х. Внесення GS в мембрану ДПФХ приводило до виникнення на ДСК-термограмі додаткового низькотемпературного піку T_m^* за концентрацій, які, згідно літературним даним, відповідають зв'язуванню олігомерів GS. У ряді досліджених ліпідних мембран встановлено значний низькотемпературний зсув обох піків в мембрані ДПФХ: холестерин 9:1 моль/моль, який свідчить про підвищення спорідненості GS до мембран такого складу.

При введенні у мембрану ДПФХ, що містить GS, розчинів CaCl_2 встановлено адитивність МД GS та іонів Ca^{2+} .

Дані ІЧ-спектроскопії узгоджуються з результатами ДСК і вказують на взаємне ослаблення дегідратуючої дії холестерину і GS на фосфатні групи ДПФХ та ДПФГ, а також на збільшення гідратації карбонільних груп ліпідів в присутності GS. В цілому, МД GS якісно змінюється в залежності від ліпідного складу мембрани, що відбивається у змінах смуг метиленових, карбонільних і фосфатних груп ліпідів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі дано вирішення актуальної наукової задачі – встановлення ефектів спільної дії лікарських речовин у багатокомпонентних системах на основі модельних ліпідних мембран у рівноважному та кінетичному режимах. Основні результати можна підсумувати таким чином:

1. Встановлено та охарактеризовано мембранотропну дію водорозчинних ЛР тилорону та диметилсульфоксиду при їх адсорбції на мембрані ДПФХ. Запропоновано феноменологічну модель, що описує мембранотропну дію водорозчинних ЛР як появу додаткового латерального тиску на мембрану, позитивного для космотропів і негативного для хаотропів.
2. У рамках моделі адсорбції Фрейндліха встановлено, що для Ce^{3+} зсув T_m на одиницю концентрації на порядок більше ніж для Ca^{2+} , що є одним з факторів біологічної дії іонів церію при його конкуренції з Ca^{2+} .
3. Показано зміну ефектів спільної мембранотропної дії антибіотику циклосерину в залежності від хімічної будови допоміжної речовини. Так, в разі стеаратів кальцію і магнію мав місце ефект синергізму, а для стеаринової кислоти – адитивність їх мембранотропної дії з циклосерином.
4. Запропоновано методику вивчення кінетики спільної мембранотропної дії, за допомогою якої показано полегшення пасивної трансмембранної дифузії тилорону в присутності ДМСО.
5. Встановлено, що у багатокомпонентній ліпідній мембрані, яка містить холестерин, кон'югати метотрексату та бетулонової кислоти переважно зв'язуються з холестерин-збагаченою ліпідною фазою. Встановлено високі коефіцієнти лінійної кореляції між молекулярними параметрами кон'югатів (коефіцієнтом ліпофільності та коефіцієнтом анізотропії) і параметрами їх мембранотропної дії (температурами фазових переходів мембрани ДПФХ та проникністю *Caco-2* клітин).
6. За результатами дослідження ряду модельних ліпідних мембран різного складу показано істотне підвищення зв'язування граміцидину S з мембраною ДПФХ:холестерин. При спільному введенні в мембрану ДПФХ граміцидину S та іонів Ca^{2+} встановлено їх незалежне зв'язування з мембраною.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Ващенко О.В., Будянская Л.В. Совместное действие лекарственных веществ в модельных липидных мембранах: калориметрические эффекты // Біофіз. вісн. 2016. Вип. 36 (2). С. 11–18. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).*
2. Ващенко О.В. Будянская Л.В., Касян Н.А., Лисецкий Л.Н. Мембранотропное действие лауриновой кислоты фенспирида и каолина в модельных липидных мембранах: роль липидного состава // Біофіз. вісн. 2018. Вип. 39 (1). С. 27–41.

(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).

3. Vashchenko O.V., Kasian N.A., **Budianska L.V.** Comparative effects of stearic acid, calcium and magnesium stearates as dopants in model lipid membranes // *Func. Mater.* 2018. Vol. 25 (2). P. 300–307. Scopus. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).*
4. Vashchenko O.V., Kasian N.A., Brodskii R.Ye., **Budianska L.V.**, Sofronov D.S., Lisetski L.N. Model lipid bilayers as sensor bionanomaterials for characterization of membranotropic action of water-soluble substances // *Func. Mater.* 2018. Vol. 25 (3). P. 422–431. Scopus. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).*
5. Lonhus K., **Budianska L.**, Lisetski L. Meaning of activation energy in phospholipid multibilayers phase transitions // *Chem. Phys. Lipids.* 2017. Vol. 206. P. 53–59. Scopus. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні статті).*
6. Kutsevol N., Harahuts Yu., Chumachenko V., **Budianska L.V.**, Vashchenko O.V., Kasian N.A., Lisetski L.N. Impact of surface properties of branched polyacrylamides onto model lipid membranes of various compositions // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2018. Vol. 671 (1). P. 9–16. Scopus. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).*
7. Kasian N.A., Vashchenko O.V., **Budianska L.V.**, Brodskii R.Ye., Lisetski L.N. Thermodynamics and kinetics of joint action of antiviral agent tilorone and DMSO on model lipid membranes // *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes.* 2019. Vol. 1861. P. 123–129. Scopus. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).*
8. Vashchenko O.V., Kasian N.A., **Budianska L.V.**, Brodskii R.Ye., Beshpalova I.I., Lisetski L.N. Adsorption of ions on model phospholipid membranes // *J. Mol. Liq.* 2019. Vol. 275. P. 173–177. Scopus. *(Особистий внесок здобувача: участь у аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).*
9. Kasian N., Vashchenko O., **Budianska L.**, Brodskii R., Lisetski L. Cooperative domains in lipid membrane: size determination by calorimetry // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2019. Vol. 136 (2). P. 795–801. Scopus. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

10. Vashchenko O.V., Sadchenko A.O., **Budianska L.V.** Hydration properties of drug compounds by the evidence of thermogravimetry analysis // 7th intern. conf. physics of liquid matter: Modern problems, 27-30 May 2016: abstracts. Kyiv, 2016. P. 40. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
11. **Budianska L.V.**, Vashchenko O.V. Pharmaceutical interactions in model lipid bilayers by means of differential scanning calorimetry // VII intern. conf. for young scientists, 6-10 June 2016: abstracts. Kharkiv, 2016. P. 150. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
12. Семененко О.М., Ліпсон В.В., Бабак М.Л., Гелла І.М., **Будянська Л.В.**, Касян Н.О., Садченко А.О., Ващенко О.В. Нові похідні бетуліну з потенційною протипухлинною активністю // XXIV Укр. конф. з органічної хімії, 19-23 вересня 2016: тези доп. Полтава, 2016. С. 285. *(Особистий внесок здобувача: участь у аналізі літературних даних, проведенні калориметричних вимірювань, інтерпретації результатів).*
13. **Будянская Л.В.**, Ващенко О.В., Касян Н.А., Садченко А.О. Совместное действие компонентов лекарственных препаратов в модельных липидных мембранах // Школа-семинар «Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения», 11-14 сентября 2016: тезисы докл. Харьков, 2016. С.7. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
14. **Budianska L.**, Vashchenko O., Kasian N., Sadchenko A. Combined action of pharmaceuticals in model lipid bilayers studied by means of differential scanning calorimetry // YSF-2016, 10-14 October 2016: abstracts. Kharkiv, 2016. BMP-10. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні тези).*
15. **Budianska L.V.**, Kasian N.A., Vashchenko O.V. Some aspects of joint drugs action in lipid membrane // VIII intern. conf. for professionals & young scientists LOW TEMPERATURE PHYSICS, 29 May - 2 June: abstracts. Kharkiv, 2017. P. 160. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
16. **Будянская Л.В.**, Ващенко О.В., Касян Н.А. Различия в индивидуальном и совместном действии стеаратов кальция и магния // Международная школа-семинар «Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения», 10-13 сентября 2017: тезисы докл. Харьков, 2017. С. 16. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*

експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).

17. **Budianska L.V.**, Kasian N.A., Vashchenko O.V., Sofronov D.S., Lisetski L.N. Mutual effect of amixin and DMSO in model lipid membrane by the evidence of DSC and FTIR // XXIII Galyna Puchkovska Intern. School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, 20-25 September 2017: abstracts. Kyiv, 2017. P. 113. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
18. **Budianska L.V.**, Vashchenko O.V., Kasian N.A., Lisetski L.N. Distinction in individual and joint membranotropic action of calcium and magnesium stearates // 5th intern. conf. «NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects», 2 – 5 October 2017: abstracts. Kharkiv, 2017. P. 42. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
19. **Budianska L.V.**, Vashchenko O.V., Kasian N.A., Lisetski L.N. Membranotropic effects of lauric acid, fenspirid and kaoline in model lipid membranes: impact of lipid composition // 8th intern. conf. physics of liquid matter: Modern problems, 18-22 May 2018: abstracts. Kyiv, 2018. P. 44. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
20. **Budianska L.V.**, Vashchenko O.V., Kasian N.A., Harahuts Yu.I., Lisetski L.N., Kutsevol N.V. Impact of surface properties of branched polyacrylamides on model lipid membranes of various compositions // XI intern. conf. “Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials (ICEPOM – 11)”, 21-25 May 2018: abstracts. Ivano-Frankivsk, 2018. P. 33. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів).*
21. **Budianska L.V.**, Vashchenko O.V., Kasian N.A. Comparative membranotropic action of dopants in model lipid membranes of various compositions // IX intern. conf. for professionals & young scientists "LOW TEMPERATURE PHYSICS" dedicated to the 100th anniversary of the National Academy of Sciences of Ukraine, 4 -8 June 2018: abstracts. Kharkiv, 2018. P. 142. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
22. **Будянская Л.В.**, Ващенко О.В., Касян Н.А. Совместное мембранотропное действие лекарственных веществ в модельных липидных мембранах различного состава // Міжнародна школа-семінар «Функціональні матеріали для технічних та біомедичних застосувань», 05 – 08 вересня 2018: тези доп. Харків, 2018. С. 13. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*
23. **Будянская Л.В.**, Ващенко О.В., Берест В.П., Софронов Д.С. Грамицидин S

в многокомпонентных липидных мембранах: роль липидного состава // XII Міжнародна конференція по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці, 18-20 жовтня 2018: тези доп. Київ, 2018. С. 10. *(Особистий внесок здобувача: участь у аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, інтерпретації результатів, написанні тези).*

24. **Budianska L.V.**, Vashchenko O.V., Kasian N.A., Semenenko A.N., Lipson V.V., Zozulya S.A., Zhuravel E.V., Yurchenko V.V., Lisetski L.N. Membranotropic properties of different methotrexate – betulonic acid conjugates // Тематичний VII з'їзд Українського біофізичного товариства, 29-31 жовтня 2018: тези доп. Київ, 2018. С. 42. *(Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, аналізі літературних даних, підготовці зразків, проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації результатів, написанні тези).*

АНОТАЦІЯ

Будянська Л.В. Ефекти спільної дії лікарських речовин у багатокомпонентних системах на основі модельних ліпідних мембран. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України; Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України, Харків, 2019.

Досліджено ефекти взаємодії лікарських речовин у багатокомпонентних системах на основі модельних ліпідних мембран різного ліпідного складу методами диференціальної скануючої калориметрії, Фур'є-ІЧ-спектроскопії, термогравіметричного аналізу та оптичної мікроскопії. Запропоновано методiku вивчення кінетики спільної мембранотропної дії (МД), за допомогою якої показано полегшення пасивної трансмембранної дифузії тилорону в присутності диметилсульфоксиду та важливість порядку внесення лікарських речовин до мембрани. Показано зміну ефектів спільної МД антимікробної речовини циклосерину в залежності від хімічної будови допоміжної речовини. Так, в разі стеаратів кальцію і магнію мав місце ефект синергізму МД; для стеаринової кислоти подібного ефекту не спостерігалось. Встановлено високі коефіцієнти лінійної кореляції між молекулярними параметрами кон'югатів (коефіцієнтом ліпофільності і коефіцієнтом анізотропії) та параметрами їх МД (температурами фазових переходів мембрани ДПФХ і проникністю *Saco-2* клітин). За результатами дослідження низки модельних мембран різного складу показано істотне підвищення зв'язування грамїцидину *S* з мембраною ДПФХ в присутності холестерину.

Ключові слова: модельні ліпідні мембрани, фосфоліпіди, лікарські речовини, холестерин, фазові переходи, спільна дія, диференціальна скануюча калориметрія.

АННОТАЦИЯ

Будянская Л.В. Эффекты совместного действия лекарственных веществ в многокомпонентных системах на основе модельных липидных

мембран. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины; Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина МОН Украины, Харьков, 2019.

Исследованы эффекты взаимодействия лекарственных веществ в многокомпонентных системах на основе модельных мембран различного липидного состава мембранах методами дифференциальной сканирующей калориметрии, Фурье-ИК-спектроскопии, термогравиметрического анализа и оптической микроскопии. Предложена методика изучения кинетики совместного мембранотропного действия (МД), с помощью которой показано облегчение пассивной трансмембранной диффузии тилорона в присутствии диметилсульфоксида и важность порядка введения лекарственных веществ в мембрану. Показано изменение эффектов совместного МД антимикробного вещества циклосерина в зависимости от химического строения вспомогательного вещества. Так, в случае стеаратов кальция и магния имел место эффект синергизма МД; для стеариновой кислоты подобного эффекта не наблюдалось. Установлены высокие коэффициенты линейной корреляции между молекулярными параметрами конъюгатов (коэффициентом липофильности и коэффициентом анизотропии) и параметрами их МД (температурами фазовых переходов мембраны ДПФХ и проницаемостью *Caco-2* клеток). По результатам исследования ряда модельных мембран различного состава показано существенное повышение связывания грамицидина S с мембраной ДПФХ в присутствии холестерина.

Ключевые слова: модельные липидные мембраны, фосфолипиды, лекарственные вещества, холестерин, фазовые переходы, совместное действие, дифференциальная сканирующая калориметрия.

ABSTRACT

Budianska L.V. **Effects of joint action of pharmaceutical substances in multi-compound systems based on model lipid membranes.** – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for the scientific degree of candidate of sciences in physics and mathematics, specialty 03.00.02 – Biophysics. – Institute for Scintillation Materials of NAS of Ukraine; V. N. Karazin Kharkiv National University of MES of Ukraine, Kharkiv, 2019.

Effects of pharmaceutical substances (PS) is on multi-compound systems based on model lipid membranes with various lipid composition has been studied by differential scanning calorimetry, Fourier IR spectroscopy, thermogravimetry analysis and optical microscopy.

A technique was supposed to study joint membranotropic action (MA) of water-soluble PS in L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) membranes in kinetic regime. By means of the technique, facilitation of passive transmembrane diffusion of antiviral PS tilorone in the presence of anti-inflammatory PS dimethylsulfoxide was shown, as well as impact of the order of drug administration. Advantage of tilorone binding with DPPC membranes was established under its joint introduction with dimethylsulfoxide. For the first time, MA of water-soluble PS of various nature (kosmotropes and chaotropes) was qualitatively characterized using Freundlich adsorption model.

For anti-tubercular antibiotic cycloserine, a set of joint effects was observed in DPPC membrane with such excipients as stearic acid, calcium stearate and magnesium stearate. Individual MA of the excipients detected on the basis of complex analysis of phase transition parameters increase in order $\text{CaSt} < \text{MgSt} < \text{StA}$. Cycloserine extends the temperature range of the ripple phase of the membrane. Joint addition of each stearate with cycloserine resulted in a previously unknown synergic membranotropic effect reflected as additional elevation of phase transition temperatures with non-additive concentration dependence. The synergic effect grows with dopants concentration and appears more pronounced for pre-transition than for main transition. Meanwhile, no synergic effect was observed for stearic acid with cycloserine. The values of the joint effects could be ranged as: $\text{Ca}^{2+}\text{St} \geq \text{Mg}^{2+}\text{St} > \text{StA} \sim 0$. Dependence of the joint effects on chemical structure of the excipients was traced, which could be used with the purpose of optimization of drug formulation.

Using a set of PS with various types of membrane interactions (fenspiride, lauric acid and kaoline) it was shown that lipid re-arrangement in multi-compound membranes took place both for kaoline which interacts with the membrane surface and for lauric acid which primary interacts with the membrane interior. Both lauric acid and kaoline induced lipid rearrangement between cholesterol-enriched and cholesterol-depleted phases. Fenspiride manifested similar fluidizing MA on all types of model membranes examined.

A number of conjugates of anti-tumor PS methotrexate and immunomodulator betulonic acid was examined in lipid membranes of various compositions. For each conjugate, such parameters as molecular volume, molecular surface, dipole moment, lipophilicity coefficient ($\log P$), water solubility coefficient, geometrical dimensions, anisometry coefficient (k_a) were obtained by means of quantum-chemical calculations. High linear correlation coefficients were established between MA of the conjugates and its $\log P$ and k_a values. Besides, MA of the conjugates constituents, methotrexate and betulonic acid, was separately examined in DPPC membrane. The former was found to have no significant influence on membrane properties. The latter, in contrast, caused lowering and broadening of the DSC peak in a cholesterol-like manner. So it seems believable that it is betulonic acid which provides the membranotropic effect of the conjugates.

For antibiotic gramicidin S, two types of its binding with DPPC membranes were established and characterized, which correspond to binding of monomer and oligomer forms. Basing on the results for a set of model membranes with various lipid compositions, essential elevation of gramicidin S was established for DPPC membranes containing cholesterol. Under joint introduction of gramicidin S and Ca^{2+} ions in DPPC membrane, their independent interaction with membrane was observed.

In kinetic studies, main phase transition of DPPC membranes as well as other thermodynamic parameters (temperature, enthalpy, halfwidth, and cooperative number (CN)) were determined in the broad range of scanning rates x , from 0.1 to 40.0 K min⁻¹. Marked dependence on scanning rate was obtained for CN , while for other parameters it was much weaker. A hyperbolic dependence $CN(x) = c + b/(x+a)$ was established (a , b , c are constants). Basing on the data obtained, a criterion is proposed for the choice of optimum scanning rate that would minimize the error in CN determination.

Keywords: model lipid membranes, phospholipids, pharmaceutical substances, cholesterol, phase transitions, joint action, differential scanning calorimetry.