

Л. В. Іванов¹, О. В. Щербак², В. Г. Кравченко³,
Л. В. Деримедвідь⁴, О. П. Безугла⁵

Вивчення спорідненості до мембран допоміжних речовин й фармакологічно активних інгредієнтів методами флуоресцентних і спінових зондів

¹Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка Національної академії наук України, м. Київ

²Харківська державна зооветеринарна академія

³Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

⁴Національний фармацевтичний університет, м. Харків

⁵Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів»
Національної академії наук України, м. Харків

Ключові слова: фармакологічно активні інгредієнти, фармацевтичні допоміжні речовини, неводні розчинники, константа дисоціації, ліпосоми, мембрани, флуоресцентні та спінові зонди

Фармакологічна активність багатьох лікарських речовин (місцеві анестетики, антиаритмічні препарати, антиоксиданти, ноотропні засоби та ін.) корелює з їхніми мембранотропними властивостями та певною мірою залежить від спорідненості цих речовин до мембран різних клітин [1, 2]. Вочевидь у механізмах токсичності багатьох лікарських речовин (ЛР) їхня неспецифічна взаємодія з мембранами клітин різних органів і тканин на шляху транспорту ЛР від місця введення до відповідних рецепторів також відіграє суттєву роль. Основні параметри фармакокінетики ЛР – біодоступність (AUC і K_{01}), об'єм розподілу в органах і тканинах (V_p) і час утримання ЛР в організмі (MRT) безпосередньо залежать від здатності ЛР взаємодіяти з мембранами тих чи інших клітин [3, 4]. У той самий час актуальним є також питання про спорідненість до біомембран клітин різних біологічних поверхонь (шкіра, слизова оболонка та ін.) різних фармацевтичних допоміжних речовин (ФДР), які можуть ефективно взаємодіяти з ліпідами біомембран і впливати на їхню структуру, суттєво змінюючи біодос-

тупність різних ЛР. Можна припустити існування конкуренції між фармакологічно активними інгредієнтами (ФАІ) і ФДР готової лікарської форми за місця зв'язування на мембранах клітин у процесах сорбції та всмоктування ЛР. Таких досліджень у літературі дуже мало. Слід зазначити, що фосфоліпіди мембран в основному зв'язують ліпофільні ЛР, що оптимізує процеси всмоктування.

Мета дослідження – порівняльне вивчення спорідненості до ліпосом з фосфатидилхоліну низки гідрофільних неводних розчинників – пропіленгліколю (ПГ), поліетиленгліколей (ПЕГ) з молекулярною масою 400 і 1500 (ПЕГ-400 і ПЕГ-1500), що успішно застосовуються за створення м'яких лікарських форм як допоміжні речовини. Ці результати, разом з власними даними щодо визначення констант дисоціації (K_d) для різних ЛР та ретроспективним аналізом наших попередніх досліджень, допоможуть оцінити й спрогнозувати ступінь конкурентних відносин між ФАІ і ФДР на мембранах у реальних лікарських формах і зміну біодоступності ЛР.

Матеріали та методи. Для вивчення K_d досліджуваних гідрофільних неводних розчинників (ГНР) з ліпосомами використовували метод флуоресцентних зондів, що широко застосовується в молекулярній біології та фармакології

[5]. Ліпосоми з фосфатидилхоліну обра-ні тому, що фосфатидилхолін є осно-вним фосфоліпідом біологічних мемб-ран, й отримані результати можна апроксимувати на більшість біологіч-них мембран.

Як флуоресцентний зонд використо-вували 1-анілінонафталін-8-сульфонат (1,8-АНС) виробництва «Serva» (ФРН). Флуоресценцію зонда 1,8-АНС порушу-вали за довжини хвилі 365 нм, а мак-симум інтенсивності флуоресценції спостерігали за 475 нм. Зонд вводили в ліпосоми з його водного розчину. Кін-цева концентрація зонда в ліпосомах становила 5 мкмоль [3]. Спектри флуо-ресценції реєстрували на спектрофлуо-риметрі – «Hitachi MPF-2A».

Для вивчення залежності мікрів'яз-кості ПЕГ від молекулярної маси вико-ристовували метод спінових зондів [6–8], в якому за спектрами електрон-но-парамагнітного резонансу (ЕПР) визначали мікрів'язкість чистих ПЕГ. Для цього використовували гідрофоб-ний спіновий зонд 1 (рис. 1), який вво-дили в чистий ПЕГ у концентрації 10^{-5} моль/л. Зонд розчинявся й давав помірно загальмований спектр ЕПР.

На практиці при оцінці відносних змін мікрів'язкості біологічних рідин або змін мікрів'язкості ліпідів біо-мембран використовують відносини h_0/h_{-1} або h_0/h_{-1} інтенсивність компонентів спектра ЕПР з магнітним кванто-вим числом ядра ^{14}N , які пропорційні мікрів'язкості досліджуваної системи. Використовували етиленгліколь, діетиленгліколь, триетиленгліколь, ПЕГ-

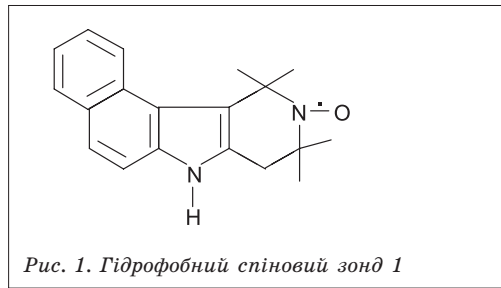


Рис. 1. Гідрофобний спіновий зонд 1

300, ПЕГ-400, ПЕГ-600, ПЕГ-1500 фірми «Merck». Реєстрацію спектрів ЕПР здійснювали на радіоспектриметрі «Bruker» (Німеччина). Ліпосоми отри-мували шляхом ультразвукової оброб-ки багатопшарових везикул з фосфати-дилхоліну з концентрацією 0, ПРО 5 % на частоті 22 кГц протягом 10–15 хв за 37°C в 0,1 моль/л трис-буфері з рН 7,2 [3]. Константи дисоціації K_d досліджу-ваних ГНР з ліпосомами визначали зі спектрів флуоресценції графічним методом у зворотних координатах [9].

Результати та їх обговорення. Ана-ліз кривої залежності мікрів'язкості ПЕГ від молекулярної маси показує наявність точки перегину на кривій у районі молекулярної маси 300–400, що свідчить про компактизацію структури ПЕГ і відповідає даним літератури щодо часткової спіралізації молекули ПЕГ, починаючи з ПЕГ-400 і вище, в якій основну роль відіграють водневі зв'язки молекули ПЕГ (рис. 2).

У цьому разі метиленові гідрофобні залишки ПЕГ виявляються всередині спіралі ПЕГ [10], а полярні групи, що забезпечують молекулам ПЕГ осмотич-но активні властивості та викликають

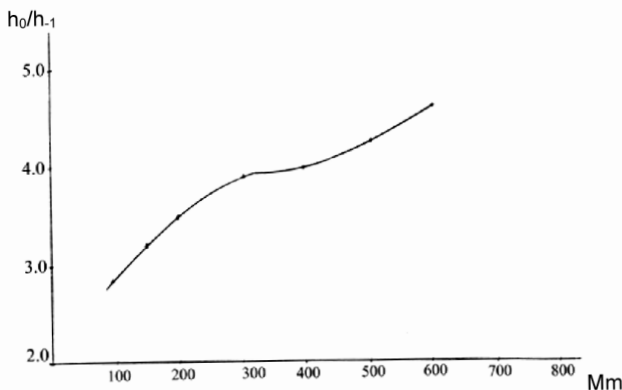


Рис. 2. Залежність параметра спектра електронно-парамагнітного резонансу h_0/h_{-1} , пропорційного мікрів'язкості, від молекулярної маси поліетиленгліколю (25°C)

дегідратацію мембран, виявляються зовні спіралі ПЕГ [6]. Тому зі зростанням молекулярної маси ПЕГ здатність до зневоднення клітин зростає. Метод спінових зондів виявився дуже чутливим біофізичним методом, тому що дозволив виявити компактизацію молекули ПЕГ за появи спіральної структури в молекулі ПЕГ, яку виявили тонким фізичним методом. Похибка за оцінки мікрів'язкості чистого ПЕГ становила 1,5 %.

Наявність у молекулах ПЕГ з різною молекулярною масою гідрофобних метиленових груп і гідрофільних гідроксильних груп впливає на їхню здатність збільшувати біосумісність гідрофобних ЛР і вуглецевих наночастинок, що вводяться в організм, ефективно взаємодіяти з ліпідами біомембран різних клітин, низькомолекулярних ПЕГ дифундувати всередину клітин, викликати дегідратацію клітин і тканин, значно змінювати плинність ліпідів біомембран, за певних концентрацій порушувати цілісність мембран клітин і т. ін. [3, 6, 11–13]. Нами було встановлено, що механізмом підвищення біосумісності за допомогою ПЕГ є здатність їхніх молекул за рахунок компактизації (спіралізації) або розширення молекул приймати оптимальну конформацію структури, надаючи свої гідрофобні або полярні групи для оптимального зв'язування з наночастинами й біооб'єктами [13]. У структурі ПЕГ насамперед закладена здатність розчиняти гідрофобні речовини та змішуватися з біоструктурами. Проведені

нами експерименти показали, що гідрофобні спін мічені карболіни і низка гідрофобних мічених стероїдів добре розчиняються як у чистих ПЕГ, так і у водних розчинах ПЕГ.

Крім цього показано, що введення 20 % водних розчинів ПЕГ з молекулярною масою від ПЕГ-200 до ПЕГ-40000 у розчин альбуміна бика (САБ) сприяє ефективному витисненню гідрофобного спін міченого прогестерону або карболіну з гідрофобної порожнини САБ у воду, конкурентно взаємодіючи з гідрофобною порожниною САБ, що вистлана залишками неполярних амінокислот фенілаланіну, триптофану та тирозину [6]. Отримані результати показують, що ПЕГ демонструють повну біосумісність навіть з гідрофобними біологічними структурами і як речовини, що підвищують біосумісність, є універсальними.

У наших попередніх дослідженнях було вивчено кінетику дегідратації клітин еритроцитів під дією ПЕГ різної молекулярної маси методом спінових зондів [6]. Для цього в суспензію еритроцитів вводили водорозчинний спіновий зонд (який здатен вільно й швидко дифундувати всередину клітини) і за спектрами ЕПР оцінювали швидкість обертальної дифузії зонда всередині клітини. На рисунку 3 надано результати впливу низки розчинників на параметр спектрів ЕПР h_0/h_{-1} водорозчинного зонда в цитоплазмі еритроцитів, який пропорційний в'язкості. Встановлено, що введення неводних розчинників у суспензію еритроцитів

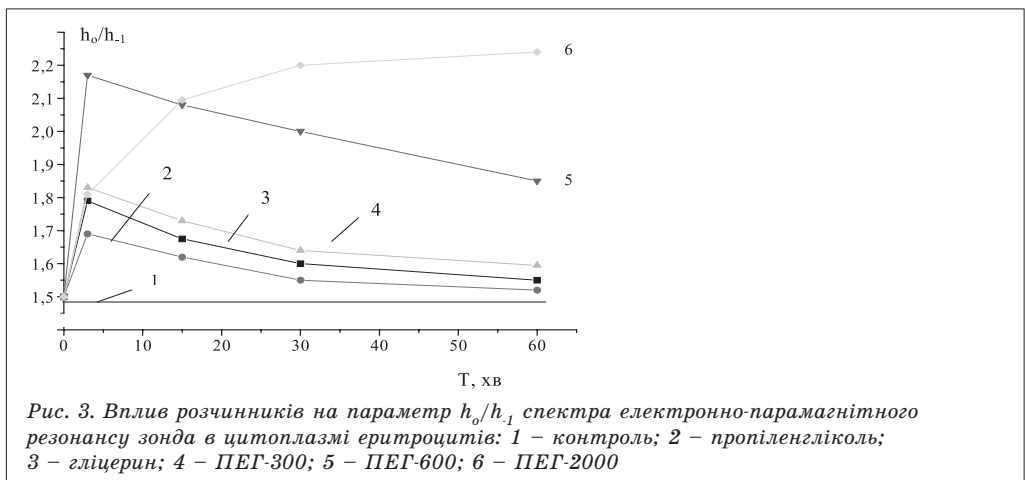


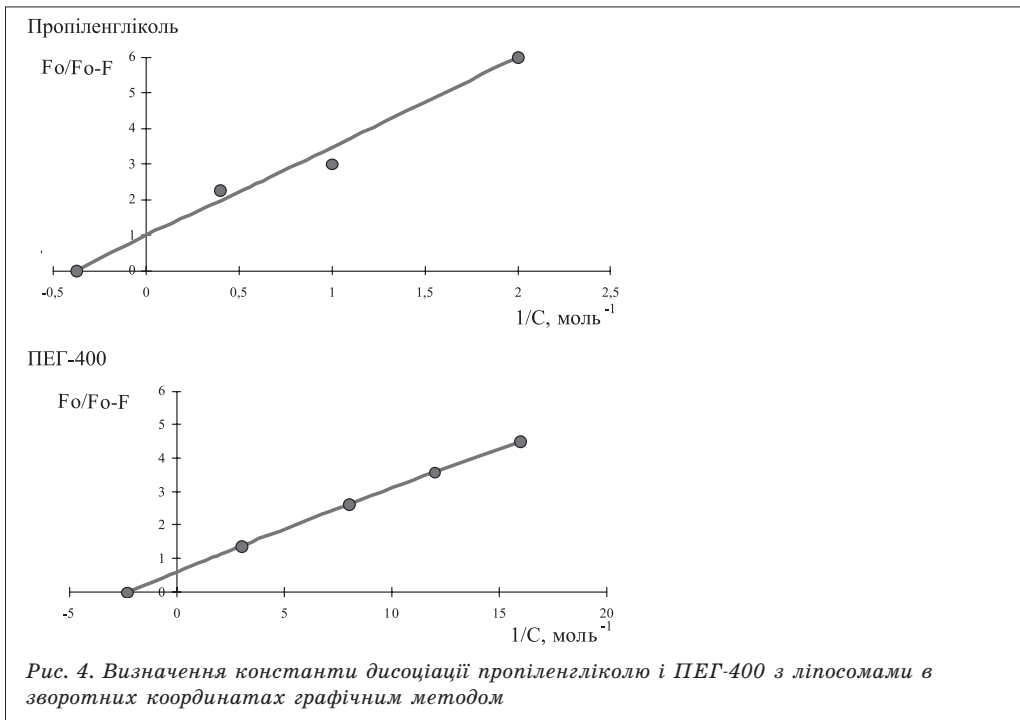
Рис. 3. Вплив розчинників на параметр h_0/h_{-1} спектра електронно-парамагнітного резонансу зонда в цитоплазмі еритроцитів: 1 – контроль; 2 – пропіленгліколь; 3 – гліцерин; 4 – ПЕГ-300; 5 – ПЕГ-600; 6 – ПЕГ-2000

спочатку супроводжувалося стрибкоподібним збільшенням параметра h_0/h_{-1} , тобто в'язкості цитозолу, що вочевидь пов'язано з швидкою дегідратацією клітин і зменшенням їхнього об'єму. Однак через 20–30 хв для низькомолекулярних розчинників спостерігали зменшення в'язкості цитозолу еритроцитів (набухання клітин) внаслідок трансмембранної дифузії розчинників усередину клітин і вирівнювання осмотичного тиску всередині й зовні еритроцитів. Винятком був ПЕГ-2000, введення якого в суспензію еритроцитів призводило до стійкої дегідратації клітин внаслідок неможливості дифузії ПЕГ-2000 крізь мембрану всередину клітин через його велику молекулярну масу. За здатністю розчинників зневоднювати еритроцити вивчені розчинники можна розташувати в ряду: ПГ < гліцерин < ПЕГ-300 < ПЕГ-600 < ПЕГ-2000. У той самий час спроможність розчинників дифундувати крізь мембрану всередину клітин у цьому ряду, навпаки, падає [6].

З цих експериментів випливає, що даний метод дозволяє спостерігати за кінетикою процесу дегідратації, а також за можливими процесами набухання клітин. Отримані результати

дають інформацію про здатність різних низькомолекулярних речовин дифундувати крізь мембрани клітин і визначати час проникнення цих речовин крізь мембрани. У нашому випадку цей час становить приблизно 60 хв, а для ПЕГ-600 – понад 1 год [6]. Отримані дані корелюють зі спорідненістю цих розчинників до ліпідів мембран і свідчать про те, що дегідратація під впливом цих розчинників починається зі зв'язуванням допоміжних речовин з поверхнею мембран.

Розрахунок константи дисоціації (K_d) ПГ і ПЕГ-400 з мембранами ліпосом графічним методом в зворотних координатах (рис. 4) показав, що за використання флуоресцентного зонда $K_d = 2,5$ моль/л для ПГ і $K_d = 4 \cdot 10^{-1}$ моль/л для ПЕГ-400. Константа зв'язування ($K_{зв}$) визначалася за відрізком, який відсікається експериментальною прямою на осі абсцис, а потім обчислювалася зворотна величина K_d ($K_d = 1/K_{зв}$). Аналіз спектрів ЕПР в зворотних координатах дозволив оцінити $K_d = 10^{-1}$ моль/л для ПЕГ-1500. Таким чином, спорідненість ПЕГ-400 до ліпосом вище, ніж ПГ, а спорідненість до мембран ліпосом ПЕГ-1500 у декілька разів вище, ніж ПГ.



У наших попередніх роботах [3] було показано, що флуоресценція зонда 1,8-АНС у неполярному оточенні (ліпіди мембран клітин) різко зростає, а в воді відбувається гасіння флуоресценції. Це використовується для оцінки спорідненості речовин до мембран за умови витиснення зонда в воду молекулами речовини за її зв'язування з мембранами клітин [3].

На рисунку 5 наведено залежність інтенсивності флуоресценції зонда в ліпосомах від концентрації ПГ або ПЕГ-400.

Введення ПГ і ПЕГ-400 у ліпосоми призводить до ефективного зв'язування їх з мембраною, за якого зонд витисняється в воду. Це може бути одним із шляхів впливу ПГ і ПЕГ-400 на процеси біодоступності, коли ФАІ можуть витиснитися в воду молекулами допоміжних речовин лікарської форми, сповільнювати процес всмоктування ФАІ. Введення ПГ у ліпосоми призводить до монотонного зменшення інтенсивності флуоресценції зонда, що пов'язано з поступовим витисненням зонда з мембран ліпосом молекулами ПГ внаслідок конкуренції за місця зв'язування на мембрані. У разі введення в ліпосоми ПЕГ-400 у концентраціях 5–10 % відбувається збільшення інтенсивності флуоресценції зонда, що вказує на перехід зонда з гідрофільного до гідрофобного мікрооточення. Вочевидь за цих концентрацій ПЕГ-400 відбувається певна деструкція мембран ліпосом типу розпушення, яка призводить до появи додаткових місць зв'язування зонда з мембраною. У разі

подальшого зростання концентрації ПЕГ-400 у суспензії ліпосом відбувається витиснення зонда молекулами ПЕГ-400 з мембран, що підтверджується поступовим падінням інтенсивності флуоресценції [3]. Ці експерименти показали, що введення ПЕГ-400 у суспензію ліпосом призводить до розпушення мембран, тобто до зменшення щільності упаковки фосfolіпідів у мембранах, що може призвести до зміни проникності мембран клітин і підвищення біодоступності. У цьому може полягати інший механізм впливу ПЕГ-400 на біодоступність. Таким чином, дія ПГ на мембрани є більш м'якою порівняно з ПЕГ-400.

Ми вважаємо, що спроможність ПЕГ й інших ГНР розчиняти ліпофільні ФАІ за рахунок метиленових груп ПЕГ відіграє значну роль у процесах зв'язування ФАІ з мембраною, всмоктування та біодоступності, тому що паралельно з процесом всмоктування ЛР паралельно відбувається процес всмоктування низькомолекулярних допоміжних речовин. Причому всмоктування ліпофільних ЛР може відбуватися в оточенні розчинників (допоміжних речовин), що призводить до збільшення біодоступності ФАІ. У разі конкуренції за місця зв'язування на мембранах клітин біологічних поверхонь між ФАІ і ФДР на кілька порядків нижча спорідненість ФДР до мембран компенсується значною кількістю допоміжних речовин у лікарській формі порівняно з ФАІ [14].

Як видно з результатів наших досліджень, наведених у таблиці, більшість

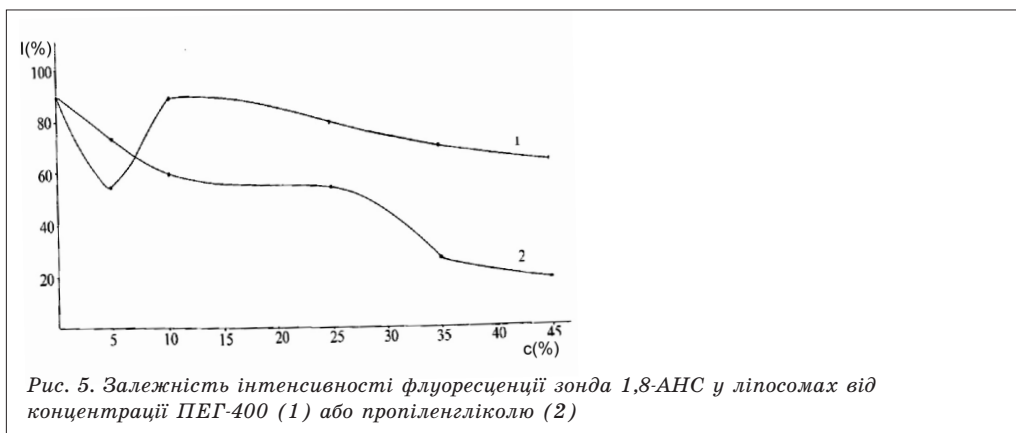


Рис. 5. Залежність інтенсивності флуоресценції зонда 1,8-АНС у ліпосомах від концентрації ПЕГ-400 (1) або пропіленгліколю (2)

Таблиця

Константи дисоціації лікарських речовин з ліпосомами

Лікарська речовина	Константа дисоціації, моль/л
Новокаїнамід	$6 \cdot 10^{-4}$
Тримекаїн	$1,25 \cdot 10^{-4}$
Дикаїн	$1,0 \cdot 10^{-4}$
Піромекаїн	$5,4 \cdot 10^{-5}$
Дигоксин	$1,6 \cdot 10^{-4}$
Конваллятоксин	$1,0 \cdot 10^{-4}$
Тринітроконваллятоксин	$5,0 \cdot 10^{-5}$
Пропранолол	$1,25 \cdot 10^{-4}$
Нітазол	$1,2 \cdot 10^{-4}$
Хлотазол	$5,7 \cdot 10^{-4}$

ЛР незалежно від структури та фармакологічної активності мають велику спорідненість до біологічних мембран. Аналіз констант дисоціації ЛР з ліпосомами, наведених у таблиці, показує, що їхні значення знаходяться приблизно в інтервалі 10^{-4} – 10^{-5} моль/л. У той самий час визначені нами K_d для ПГ, ПЕГ-400 і ПЕГ-1500 дорівнюють 2,5 моль/л, $4 \cdot 10^{-1}$ моль/л і 10^{-1} моль/л відповідно.

Таким чином, спорідненість до ліпосом різних ЛР (таблиця) у 100–1000 разів вище, ніж допоміжних речовин. У разі конкуренції за місця зв'язування на мембранах клітин біологічних поверхонь між ФАІ та ФДР, більш низька (на кілька порядків) спорідненість ФДР до мембран компенсується значною кількістю допоміжних речовин в лікарській формі порівняно з ФАІ [14].

Висновки

Аналіз результатів, отриманих за допомогою методу флуоресцентних зондів і розрахунок констант дисоціації ПГ, ПЕГ-400 з мембранами ліпосом графічним методом у зворотних координатах показав, що $K_d = 2,5$ моль/л для ПГ і $K_d = 4 \cdot 10^{-1}$ моль/л для ПЕГ-400. Спорідненість ПЕГ-400 до ліпосом вище, ніж ПГ, а спорідненість до мембран ліпосом ПЕГ-1500 у кілька разів вища, ніж ПГ.

Встановлено, що ПГ і ПЕГ-400 ефективно зв'язуються з мембраною ліпосом, витисняючи флуоресцентний зонд з мембрани в воду. Це може бути одним з механізмів впливу ПГ і ПЕГ-400 на біодоступність, коли ФАІ можуть витиснитися в воду молекулами допоміжних речовин лікарської форми, сповільнюючи процес всмоктування ФАІ. Введення ПЕГ-400 у суспензію ліпосом на відміну від ПГ призводить до розпушення мембран, тобто до зменшення щільності упаковки фосфоліпідів у мембранах, що може призводити до зміни проникності мембран клітин і підвищення біодоступності.

Дія ПГ на мембрани є більш м'якою, ніж ПЕГ-400. У разі конкуренції за місця зв'язування на мембранах клітин між ФАІ і ФДР на кілька порядків нижча спорідненість ФДР до мембран компенсується значною кількістю допоміжних речовин у лікарській формі порівняно з ФАІ. Показано, що механізмом підвищення біосумісності за допомогою ПЕГ є здатність їхніх молекул за рахунок компактизації (спіралізації) або розпушення приймати оптимальну конформацію, надаючи свої гідрофобні або полярні групи для оптимального зв'язування з наночастинками, ЛР і біоб'єктами.

1. К вопросу о мембранных механизмах действия ноотропных препаратов. И. Г. Семина, И. И. Семина, Н. М. Азангеев и др. *Биол. мембраны*. 2001. Т. 18, № 5. С. 363–369.
2. Особенности молекулярных механизмов действия местноанестезирующих средств. К. М. Резников, Г. А. Исаева, П. П. Исаев и др. X Российский национальный конгресс: Человек и лекарство. Тез. докл. Москва, 2003. С. 653.
3. Иванов Л. В., Орлова И. Н. Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойств и пути введения лекарственных препаратов. Сборник «Технология и стандартизация лекарств». Т. 2. Харьков, 2000. С. 558–615.
4. Соловьев В. Н., Фирсов А. А., Филон В. А. Фармакокинетика. Москва : Медицина, 1980. 423 с.
5. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. Москва : Наука, 1980. 320 с.

6. Иванов Л. В., Картель Н. Т. Характеризация реологических свойств поверхности нанобио-объектов методом спиновых зондов. *Поверхность*. 2012. Вып. 4 (19). С. 334–348.
7. The evaluation of carbon nanotubes impact on mitochondrial activity of cells in different organs tissues by means of spin probes method. N. T. Kartel, L. V. Ivanov, O. A. Nardyd et al. *Modern Science – Moderni Veda. Praha*. 2016. № 2. P. 123–129.
8. Исследование взаимодействия окисленного графена с мембранами эритроцитов и белками плазмы крови крыс методом спиновых зондов. Академик НАН Украины Н. Т. Картель, Л. В. Иванов, В. А. Карачевцев и др. *Доповіди НАН України*. 2017. № 8. С. 71–79.
9. Study of improvement of efficiency of drug substance liposomal delivery systems, as well as of delivery systems by means of carbon nanotubes to target cells due to controlled change of liposome charge, nanotubes charge or target cell membranes charge by fluorescent and spin probes methods. N. T. Kartel, L. V. Ivanov, A. N. Lyapunov et al. *Scientific Light (Wroclaw, Poland)*. 2017. V. 1, № 5. P. 107–113.
10. Моисеев В. А. Молекулярные механизмы криповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: дис. на соиск. ученой степени докт. биол. наук; ИПКиК АН СССР. Харьков, 1984. 331 с.
11. Изучение механизмов расширения спектра цитотоксичности пегилированных липосомальных систем доставки противоопухолевых препаратов методом спиновых зондов. Л. В. Иванов, Е. В. Щербак, В. Г. Кравченко, Л. В. Деримедведь и др. *World Science*. 2019. V. 3, 6 (46). P. 26–36.
12. Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов. Л. В. Иванов, А. Н. Ляпунов, Н. Т. Картель, О. А. Нардид, Я. О. Черкашина, Л. В. Деримедведь. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 1 (47). С. 72–80.
13. Изучение механизмов повышения биосовместимости различных веществ с биологическими структурами с помощью полиэтиленгликолей методом спиновых зондов. Л. В. Иванов, Н. Т. Картель, Е. В. Щербак, В. Г. Кравченко. *Поверхность*. 2019. Вып. 11 (26). С. 556–565.
14. Иванов Л. В. Мембранотропные свойства лекарственных веществ. Проблемы поиска, скрининга и биодоступности. *Фармаком*. 2004. № 2. С. 78–83.

Л. В. Иванов, О. В. Щербак, В. Г. Кравченко, Л. В. Деримедведь, О. П. Безугла
Вивчення спорідненості до мембран допоміжних речовин й фармакологічно
активних інгредієнтів методами флуоресцентних і спинових зондів

Мета дослідження – порівняльне вивчення спорідненості до ліпосом з фосфатидилхоліну низки гідрофільних неводних розчинників пропіленгліколю (ПГ), поліетиленгліколей (ПЕГ) з молекулярною масою 400 і 1500 (ПЕГ-400 і ПЕГ-1500), що успішно застосовуються за створення м'яких лікарських форм як допоміжних речовин.

Проведено аналіз результатів, отриманих за допомогою методу флуоресцентних зондів, і розрахунок константи дисоціації (K_d) неводних розчинників ПГ, ПЕГ-400 і ПЕГ-1500 з мембранами ліпосом з фосфатидилхоліну графічним методом у зворотних координатах. Показано, що $K_d = 2,5$ моль/л для ПГ і $K_d = 4 \cdot 10^{-1}$ моль/л для ПЕГ-400. Аналіз спектрів електронно-парамагнітного резонансу (ЕПР) у зворотних координатах дозволив оцінити K_d для ПЕГ-1500, що дорівнює 10^{-1} моль/л. Досліджено вплив ПГ і ПЕГ-400 на мембрани ліпосом. ПГ і ПЕГ-400 ефективно зв'язуються з мембраною ліпосом, витісняючи флуоресцентний зонд з мембрани в воду. Це може бути одним із механізмів впливу ПГ і ПЕГ-400 на біодоступність, коли фармакологічно активні інгредієнти (ФАІ) можуть витіснятися в воду молекулами допоміжних речовин, сповільнюючи процес всмоктування ФАІ. Введення ПЕГ-400 у суспензію ліпосом призводить до розпушення мембран, тобто, до зменшення щільності упаковки фосfolіпідів у мембранах, що може призводити до зміни їхньої проникності та підвищення біодоступності. Дія ПГ на мембрани є більш м'якою, ніж ПЕГ-400.

Вочевидь у зоні всмоктування ФАІ на мембрані паралельно відбувається процес всмоктування низькомолекулярних допоміжних речовин, наприклад, неводних розчинників. Причому всмоктування ліпофільних ФАІ може відбуватися в оточенні розчинників (допоміжних речовин), що призводить до збільшення біодоступності ФАІ. У разі конкуренції за місця зв'язування на мембранах клітин біо-поверхонь між ФАІ і неводними розчинниками більш низька (на кілька порядків) спорідненість розчинників до мембран компенсується значною кількістю розчинників у м'якій лікарській формі порівняно з ФАІ.

Механізмом підвищення біосумісності за допомогою ПЕГ є здатність їхніх молекул за рахунок компактизації (спіралізації) або розпушення приймати оптимальну конформацію структури, надаючи свої гідрофобні або полярні групи для оптимального зв'язування з наночастинками, лікарськими речовинами та біоб'єктами.

Ключові слова: фармакологічно активні інгредієнти, фармацевтичні допоміжні речовини, неводні розчинники, константа дисоціації, ліпосоми, мембрани, флуоресцентні та спинові зонди

Л. В. Иванов, Е. В. Щербак, В. Г. Кравченко, Л. В. Деримедведь, Е. П. Безуглая
Изучения сродства к мембранам вспомогательных веществ и
фармакологически активных ингредиентов методами флуоресцентных
и спиновых зондов

Цель исследования – сравнительное изучение сродства к фосфатидилхолиновым липосомам ряда гидрофильных неводных растворителей: пропиленгликоля (ПГ), полиэтиленгликолей (ПЭГ) с молекулярной массой 400 и 1500 (ПЭГ-400 и ПЭГ-1500), которые применяются при создании мягких лекарственных форм в качестве вспомогательных веществ.

Проведен анализ результатов, полученных при помощи метода флуоресцентных зондов, и расчет констант диссоциации (K_d) неводных растворителей – ПГ, ПЭГ: ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 с мембранами фосфатидилхолиновых липосом графическим методом в обратных координатах.

Установлено, что K_d равна 2,5 моль/л для ПГ и $4 \cdot 10^{-1}$ моль/л для ПЭГ-400. Анализ спектров электронно-парамагнитного резонанса в обратных координатах показал, что K_d для ПЭГ-1500 равна 10^{-1} моль/л. ПГ и ПЭГ-400 эффективно связывались с мембраной липосом, вытесняя флуоресцентный зонд из мембраны в воду. Это может быть одним из механизмов влияния ПГ и ПЭГ-400 на биодоступность, когда фармакологически активные ингредиенты (ФАИ) могут вытесняться в воду молекулами вспомогательных веществ, замедляя процесс всасывания ФАИ. Введение ПЭГ-400 в суспензию липосом приводит к разрыхлению мембран, то есть, к уменьшению плотности упаковки фосфолипидов в мембранах, что может приводить к изменению проницаемости мембран клеток и повышению биодоступности ФАИ. Действие ПГ на мембраны является более мягким, чем ПЭГ-400. Очевидно в зоне всасывания ФАИ на мембране параллельно происходит процесс всасывания низкомолекулярных вспомогательных веществ, например, неводных растворителей. При этом всасывание липофильных ФАИ может происходить в окружении растворителей (вспомогательных веществ), что приводит к увеличению биодоступности ФАИ. При конкуренции за места связывания на мембранах клеток биологических поверхностей между ФАИ и неводными растворителями, более низкое на несколько порядков сродство растворителей к мембранам компенсируется большим количеством растворителей в мягкой лекарственной форме по сравнению с ФАИ.

Показано, что механизмом повышения биосовместимости с помощью ПЭГ является способность молекул ПЭГ за счет компактизации (спирализации) или расширения молекул принимать оптимальную конформацию структуры, предоставляя свои гидрофобные или полярные группы для оптимального связывания с наночастицами, лекарственными веществами и биообъектами. Эти результаты, вместе с данными о K_d для различных лекарственных веществ, помогут спрогнозировать степень конкурентных отношений между ФАИ и вспомогательными веществами на мембранах в лекарственных формах и изменение биодоступности лекарств.

Ключевые слова: фармакологически активные ингредиенты, фармацевтические вспомогательные вещества, неводные растворители, константа диссоциации, липосомы, мембраны, флуоресцентные и спиновые зонды

L. V. Ivanov, O. V. Shcherbak, V. G. Kravchenko, L. V. Derymedvid, O. P. Bezugla
Studying of membranes affinity for auxiliary substances and pharmacologically
active ingredients by methods of fluorescent and spin probes

The aim of the study was a comparative research of the phosphatidylcholine liposomes affinity for some hydrophilic non-aqueous solvents: propylene glycol (PG), polyethylene glycol (PEG) with mol. m. 400 and 1500 (PEG-400 and PEG-1500), which are used to create soft dosage forms as excipients. The dissociation constant (C_d) of non-aqueous solvents of PG and PEG: PEG-400 and PEG-1500 with phosphatidylcholine liposome membranes was graphically analyzed in the inverse coordinates based on results of fluorescent probes method. It was found that C_d is 2,5 M for propylene glycol and $C_d = 4 \cdot 10^{-1}$ M for PEG-400. An analysis of the electron-paramagnetic resonance spectra parameters in reverse coordinates showed that the C_d for PEG-1500 is 10^{-1} M. The effect of propylene glycol and PEG-400 in liposome membranes was studied. Propylene glycol and PEG-400 bind efficiently to the liposome membrane, displacing the fluorescent probe from the membrane into water. This may be one of the mechanisms of the influence of PG and PEG-400 on bioavailability, when pharmacologically active ingredients (FAI) can be displaced into water by excipient molecules, slowing down the absorption process of FAI. The introduction of PEG-400 into a suspension of liposomes leads to a decrease in the packing density of phospholipids in the membranes, which can result to change in the permeability of cell membranes and increase the bioavailability of FAI. The action of PG on membranes is milder than PEG-400. Obviously, in the absorption zone of the FAI on the membrane, the process of absorption of low molecular weight auxiliary substances, for example, non-aqueous solvents, takes place in parallel. In this case, the absorption of lipophilic FAI can occur surrounded by solvents (excipients), which leads to an increase in the bioavailability of FAI. When competing for binding sites on biological membranes of cell surfaces between FAI and non-aqueous solvents, the affinity of solvents lower by several orders of magnitude is compensated by a large number of solvents in a soft dosage form compared with FAI.

It has been shown that the mechanism of biocompatibility increasing by PEG (PEG) is the ability of their molecules (due to compaction (spiralization) or the expansion of molecules) to take the optimal conformation

of the structure, providing their hydrophobic or polar groups for optimal binding to nanoparticles, medicinal substances, and biological objects.

These results, together with data on C_d for various medicinal substances, will help to assess and predict the degree of competition between FAI and excipients on membranes in dosage forms and predict changes in the bioavailability of drugs.

Key words: pharmacologically active ingredients, auxiliary substances, non-aqueous solvents, dissociation constant, liposomes, membranes, fluorescent probes, membranes affinity

ORCID ID авторів:

Іванов Л. В. (ORCID ID 0000-0002-4235-2982);

Щербак О. В. (ORCID ID 0000-0002-4265-3355);

Кравченко В. Г. (ORCID ID 0000-0001-5538-3991);

Деримедвідь Л. В. (ORCID ID 0000-0002-5064-6550).

Надійшла: 22 листопада 2019 р.

Прийнята до друку: 17 грудня 2019 р.

Контактна особа: Іванов Леонід Вікторович, кандидат хімічних наук, провідний науковий співробітник, буд. 17, вул. Генерала Наумова, Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАНУ, м. Київ, 03164. Тел.: + 38 0 68 307 72 29. Електронна пошта: ivleon@ukr.net