

Вплив ФАР на фізико-хімічні параметри фосфоліпідних моношарів як модель визначення проникності сполук через біологічні мембрани

О.М. Ляхов*, В.В. Ковалішин, В.В. Прокопенко

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
вул. Мурманська, 1, Київ, 02094, Україна

Резюме. Вивчено вплив ФАР на фізико-хімічні параметри ленгмюрівських моношарових плівок із дистеароїлфосфатидилхоліну. Показано, що такі властивості можуть бути застосовані для прогнозування проникності препаратів через гематоенцефалічний бар'єр та шкіру. Кількісні значення фізико-хімічних параметрів взаємодії ФАР з моношаровими плівками можуть бути використані для побудови більш точних розрахункових моделей для визначення проникності сполук через мембрани.

Ключові слова: фосфоліпідні моношарові плівки, дистеароїлфосфатидилхолін, фізіологічно активні речовини, проникність, біологічні мембрани.

Вступ. Під час створення нового лікарського препарату важливими завданнями є біодоступність і транспортування ліків до їх молекулярних мішеней. Прямі методи визначення проникності препарату через різні типи біомембран мають великі складнощі через високу трудомісткість та вартість, тому на попередніх етапах роботи проводяться модельні дослідження. Серед моделей, що дають змогу оцінити проникність хімічних сполук, найбільш перспективними вважаються комп'ютерні моделі *in silico* [1-7]. Тим не менш, зіставлення розрахункових та експериментальних даних свідчить, що передбачені величини не завжди відповідають реальним, а іноді й дуже далекі від них [1-2]. У низці робіт показано, що прогноз можна поліпшити, якщо як дескриптори для розрахунку використовували експериментально отримані фізико-хімічні параметри цих сполук [2-4]. Такими характеристиками можуть бути ліпофільність сполук, їх розчин-

ність, дані про взаємодію препаратів з модельними ліпідними мембранами [6, 7].

Ми дослідили фізико-хімічні характеристики взаємодії фізіологічно активних речовин (ФАР) з ленгмюрівськими моношаровими мембранами з дистеароїлфосфатидилхоліну (ДСФХ) у контексті використання отриманих даних для прогнозу проникності препаратів через біологічні мембрани.

Матеріали і методи. У роботі досліджено властивості теофіліну, ізадрину, димедролу, пропранололу, адреналіну, ДОФА, натрію салицилату та кислоти антранілової («Sigma», «Aldrich», США). Дистеароїлфосфатидилхолін (ДСФХ), Tris-HCl і хлороформ — «Sigma», США.

Ізотерма стискування ленгмюрівських моношарів. Дослідження проводили на ленгмюрівській ванні «Mini Trough» фірми «Joyce Lovel Automation» (Великобританія) з об'ємом ванни 120 мл. Як субфазу використовували 5 мМ буферний розчин Tris-HCl, рН 7,4, в якому розчинені ФАР у концентрації 10⁻⁴ моль/л. На поверхню субфазу наносили розчин ДСФХ у хлороформі (2 мг ліпиду на 1 мл розчинника). Після формування моношару (5 хв) проводили

* Corresponding author.
Tel.: +38044-5732592
E-mail address: alexey@bpcci.kiev.ua

Зміни поверхневого тиску від часу і критичний поверхневий тиск препаратів

Препарат	ЗПТЧ, 15 мН/м	ЗПТЧ, 20 мН/м	ЗПТЧ, 25 мН/м	π_{cr} , мН/м	C.brain/C.blood [14]
Теофілін	3,0	2,5	2,1	48,2	0,28
Ізадрин	8,2	7,0	5,8	49,2	0,65
Димедрол	5,7	3,3	0,6	26,3*	1,61**
Пропранолол	3,7	2,6	1,0	29,0*	1,25**
Адреналін	8,1	6,9	5,9	51,7	0,67
ДОФА	8,2	6,9	6,0	52,0	0,71
Саліцилат натрію	5,4	3,5	0,7	26,8*	1,53**
Антрапілова кислота	3,7	2,8	0,9	28,8*	1,29**

Примітки. ЗПТЧ — зміна поверхневого тиску від часу; C.brain/C.blood — співвідношення концентрацій препаратів в мозковій речовині та крові відповідно; * — критичний тиск ФАР менший за 30 мН/м, що вказує на здатність препарату проникати через ГЕБ; ** — концентрація ФАР у мозковій речовині вища, ніж у крові, що свідчить про проникність препарату через ГЕБ.

стискування моношару за допомогою рухомого тefлонового бар'єру.

Обробка ізотерм стискування базувалася на результатах досліджень Si-shen Feng і співавторів [8]. Розраховувались площа, яку займає одна молекула ліпиду в моношарі при нульовому поверхневому тиску, параметри, що характеризують енергію взаємодії субфаза-субфаза, субфаза-ліпід і ліпід-ліпід, та зміни вільної енергії поверхні в присутності ліпиду. Детальніше використану методику описано в [9].

Зміну поверхневого тиску від часу (ЗПТЧ)

вимірювали на сформованому моношарі з ДСФХ, що стиснений до поверхневого тиску 20 мН/м, за якого фосфоліпиди знаходяться в гелеподібному стані, найбільш подібному до стану реальних мембран [10]. Також вивчено ЗПТЧ при початковому тиску 15 і 25 мН/м. Після формування моношару в субфазу під поверхню плівки шприцом вводили 1 мл 1 мМ розчину ФАР, субфазу переміщували та рестрували залежність зміни поверхневого тиску від часу.

Розрахункові методи. Розрахунок ADME властивостей сполук проводили з використанням пакета програм ALOGPS 2.1 (<http://www.vcclab.org/lab/alogs/>).

Результати та обговорення. Зміни поверхневого тиску від часу. В основі одного з методів вивчення мембранотропної активності речовин лежить зміна поверхневого тиску ліпідного моношару від часу при вбудовуванні препаратів у структуру мембрани [6]. Чим більші ЗПТЧ, тим активніше молекули препарату

взаємодіють з ліпідною плівкою. Результати визначення ЗПТЧ препаратів наведено в табл. 1. Характер ЗПТЧ моношару в присутності ФАР залежить від наявності функціональних груп у молекулах препаратів, гідрофобних і гідрофільних ділянок, заряджених груп атомів, ароматичних, гетероциклічних та конденсованих структур в їх молекулах. Характер змін свідчить про те, що конденсовані гідрофобні ділянки молекул розташовуються плоско-паралельно фосфохоліновим залишкам фосфоліпідів [6]. Так, під дією пропранололу поверхневий тиск збільшувався на 2,6 мН/м, тоді як під дією димедролу, який не містить гідроксильної групи, спостерігалось збільшення ЗПТЧ на 3,3 мН/м. Наявність ефірного містка поблизу гідрофобних структур у молекулах ФАР пов'язують зі здатністю препаратів взаємодіяти із фосфохоліновими групами молекул фосфоліпідів ліпідних мембран, а не із залишками жирних кислот [11].

Ізотерма стиснення ленгмюрівських моношарів. Результати впливу ФАР на параметри моношарових плівок Ленгмюра з ДСФХ наведено в табл. 2.

Одним із параметрів, які характеризують ізотерму стискування, є площа, що припадає на одну молекулу ліпиду при нульовому поверхневому тиску S_0 . Зміна S_0 свідчить про вбудовування молекул ФАР між молекулами ліпідів або вплив на розміри гідратної оболонки фосфоліпідів. Для досліджених препаратів суттєва зміна S_0 виявлена для ізадрину, адреналіну та ДОФА. Під їх дією так само істотно посилювалася взаємодія між молекулами води

Вплив ФАР на термодинамічні та структурні характеристики моношарових плівок з дистеароїлфосфатидилхоліну

Препарат, 10^{-4} М	S_0	H_{11}	H_{12}	H_{22}	ΔG
Буфер (Tris-HCl, pH 7,4)	64 ± 1	44 ± 4	-50 ± 1	-399 ± 13	-25 ± 1
Теофілін	66 ± 2	42 ± 3	-52 ± 4	-412 ± 9	$-30 \pm 2^*$
Ізадрин	$70 \pm 1^*$	37 ± 3	$-72 \pm 2^*$	$-477 \pm 3^*$	$-40 \pm 2^*$
Димедрол	66 ± 2	32 ± 5	$-61 \pm 3^*$	-427 ± 21	$-33 \pm 3^*$
Пропранолол	65 ± 3	38 ± 4	$-63 \pm 5^*$	$-448 \pm 10^*$	-31 ± 6
Адреналін	$69 \pm 2^*$	39 ± 4	$-65 \pm 5^*$	$-451 \pm 6^*$	$-35 \pm 2^*$
ДОФА	68 ± 2	39 ± 3	$-64 \pm 3^*$	$-455 \pm 8^*$	$-36 \pm 3^*$
Натрію саліцилат	68 ± 3	39 ± 2	-59 ± 5	-426 ± 6	-31 ± 4
Кислота антранілова	67 ± 22	42 ± 3	$-70 \pm 4^*$	$-445 \pm 7^*$	$-37 \pm 5^*$

Примітка: * вірогідно ($p < 0,05$) відрізняється від значення для буферного розчину.

та ліпиду, а також між молекулами ліпиду, що може вказувати на компактизацію структури гідратної оболонки молекул фосфоліпідів під дією препаратів, а також про вбудовування молекул препаратів у моношарову плівку.

Застосування методу зміни поверхневого тиску від часу для прогнозування проникності препаратів через гематоенцефалічний бар'єр. Фосфоліпідні моношари широко використовуються для вивчення пасивної дифузії ФАР через мембрани. Однією з важливих характеристик потенційних лікарських препаратів є їх проникність через біомембрани, серед яких суттєве значення має проникність через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). Вивчення ЗПТЧ препаратів дає змогу змодельувати проникність ФАР через ГЕБ [12, 13]. Суть методу полягає у визначенні критичного поверхневого тиску, π_{cr} , шляхом екстраполяції залежності «початковий поверхневий тиск», π_i , — «поверхневий тиск насичення», π_s , до нульового значення π_i (рис. 1). Речовини, що мають здатність проникати через ГЕБ, характеризуються значеннями π_{cr} у діапазоні 23–30 мН/м; ФАР, критичний тиск яких перевищує 40 мН/м, не здатні проникати через гематоенцефалічний бар'єр [10, 12].

Результати визначення критичного поверхневого тиску препаратів наведено в табл. 1. Отримані дані свідчать, що димедрол, пропранолол, натрію саліцилат і кислота антранілова здатні добре проникати через ГЕБ. Завдяки значній ліпофільності ці препарати будуть проникати в мембрани і переноситися через мембрану шляхом дифузії. Теофілін, ізадрин, адреналін та ДОФА, не проникаючи через

ГЕБ, можуть взаємодіяти з мембранами в основному за допомогою дії на рецептори. Отримані результати добре узгоджуються з розрахунковими даними проникності ГЕБ (табл. 1), відповідно до яких ФАР, що здатні до проникнення через ГЕБ, характеризуються значеннями коефіцієнта розподілу більше 1, тобто препарат накопичується переважно в мозковій речовині [14].

Таким чином, метод ЗПТЧ у поєднанні з критичним поверхневим тиском дає змогу оцінити вбудовування молекул ФАР у структуру мембран і проникність препаратів через гематоенцефалічний бар'єр. При цьому ліпофільність сполук може дати додаткову інформацію про здатність речовин проникати через мембрани.

Застосування коефіцієнта еластичності моношарових плівок для прогнозування проникності через шкіру. Ще одним методом визначення пасивної дифузії ФАР через мембрани є ізотерми стискування ленгмюрівських

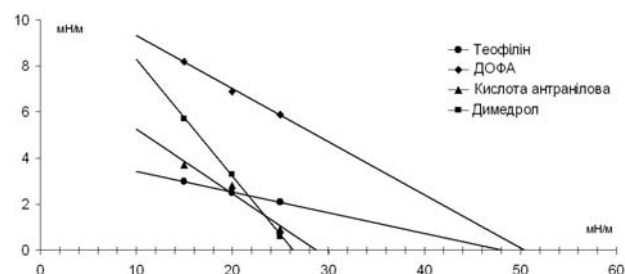


Рис. 1. Визначення критичного поверхневого тиску шляхом екстраполяції залежності «ЗПТЧ» — «початковий поверхневий тиск» до нульового значення початкового поверхневого тиску.

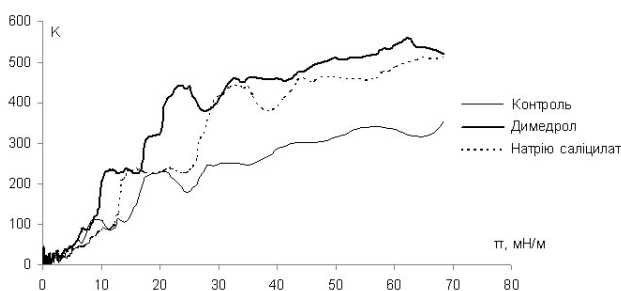


Рис. 2. Залежність коефіцієнта еластичності від поверхневого тиску для димедролу та натрію саліцилату. Чим менше значення коефіцієнта еластичності, тим більша ймовірність проникнення препарату через шкіру.

моношарів, які можуть бути охарактеризовані коефіцієнтом еластичності K , що корелює з проникністю через шкіру [15]:

$$K = -A_{\pi} \cdot (d\pi/dA)_{\pi}$$

де A_{π} — площа моношарової плівки при поверхневому тиску π , E^2 /молекулу; π — поверхневий тиск, мН/м.

Чим менше значення K , тим вище еластичність моношару і тим більш імовірно проникнення (дифузія) ФАР у мембрану [12, 15]. Зростання значення K , у порівнянні з величиною коефіцієнта еластичності моношару без ФАР, буде свідчити про проникність препарату через шкіру [15].

Під впливом димедролу та натрію саліцилату значення коефіцієнта еластичності збільшуються порівняно з контролем — субфазою без ФАР (рис. 2), з чого можна зробити висно-

вок про те, що ці ФАР здатні проникати через шкіру. Це добре узгоджується з розрахунковими даними [15], за якими величини коефіцієнта, що характеризує проникність шкіри для натрію саліцилату та димедролу, найвищі: $\log K_p = -2,04714$ і $-2,15061$ см/год відповідно [15].

Висновки. Результати взаємодії ФАР з моношаровими фосфоліпідними плівками Ленгмюра можуть характеризувати мембранотропність препаратів та пасивну дифузію (проникність) ФАР через мембрани, зокрема через гематоенцефалічний бар'єр і шкіру.

Отримані дані про взаємодію ФАР з моношаровими плівками дають змогу спрогнозувати, що димедрол, пропранолол, натрію саліцилат та кислота антранілова можуть проникати через ГЕБ у мозкову речовину, а ізадрин, теофілін, адреналін і ДОФА не здатні до пасивного проникнення через ГЕБ. Отримані результати дають змогу зробити прогноз проникності через шкіру препаратами: димедрол та натрію саліцилат будуть здатні до такої проникності, для інших речовин проникнення через шкіру відбуватися не буде.

Кількісні значення фізико-хімічних параметрів взаємодії ФАР із ленгмюрівськими моношарами можуть бути використані для побудови більш точних розрахункових моделей проникності сполук через біологічні мембрани.

Надійшла в редакцію 27.12. 2011 р.

Influence of drugs on physico-chemical parameters phospholipid monolayers as a model for determination of permeability compounds across biological membranes

A.M. Lyakhov, V.V. Kovalishin, V.V. Prokopenko

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine
1, Murmanska Str., Kyiv, 02094, Ukraine

Summary. The effect of drugs on physico-chemical parameters of the monolayer films made of distearoylphosphatidylcholine were studied. It is shown, that this properties can be used to predict the permeability of drugs through the blood-brain barrier and skin. Quantitative values of physico-chemical monolayer films parameters can be used to build more accurate computer models of permeability compounds across biological membranes.

Keywords: phospholipids monolayer films, distearoylphosphatidylcholine, drugs, permeability, biological membranes.

Перелік літератури

1. *van de Waterbeemd H., Gifford E.* ADMET in silico modelling towards prediction paradise? // Nat. Rev. Drug Discov. — 2003. — 2. — P. 192-204.

2. *Hari Narayana Moorthy N.S., Sousa S.F., Ramos M.J., Fernandes P.A.* In silico-based structural analysis of arylthiophene derivatives for FTase inhibito-

ry activity, hERG, and other toxic effects // J. Biomol. Screen. — 2011. — 16, No. 9. — P. 1037-1046.

3. *Mannhold R., Poda G., Ostermann C., Tetko I.* Calculation of molecular lipophilicity: state-of-the-art and comparison of Log P methods on more Than 96,000 compounds // J. of Pharmaceutic. Sci. — 2009. — 98, No. 3. — P. 861-893.

4. *H. van de Waterbeemd H.L., Artursson P.* Drug Bioavailability. — Weinheim: Wiley-VCH, 2003. — P. 1-6.
5. *Cheng, T., Zhao, Y., Li, X. et al.* Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge // *J. Chem. Inf. Model.* — 2007. — 47. — P. 2140-2148.
6. *Langner M., Kubica K.* The electrostatics of lipid surfaces // *Chem. Phys. Lipids.* — 1999. — 101, No. 1. — P. 3-35.
7. *Lukacova V., Ming Peng, Fanucci G. et al.* Drug-membrane interactions studied in phospholipid monolayers adsorbed on nonporous alkylated microspheres // *J. Biomol. Screen.* — 2007. — 12. — P. 186-202.
8. *Feng Si-Shen, Brockman L.H., Mac-Donald R.C.* On osmotic-type equations of state for liquid-expanded monolayers of lipids at the air-water interface // *Langmuir.* — 1994. — 10. — P. 3188-3194.
9. *Ляхов О.М., Прокопенко В.В., Прокопенко Р.А., Мозилевич С.Є.* Взаємодія модуляторів фосфоліпідної та аденілатциклазної сигнальних систем клітини з фосфоліпідними моношарами при різних температурах // *Доп. НАН України.* — 2002. — № 12. — С. 113-118.
10. *Ganellin C.R.* Uses of partition coefficients by brain penetration applied to the design of H₂-receptor histamine antagonists // Elsevier. — 1991. — P. 103-110.
11. *Avdeef A., Box K.J., Comer J.E.A. et al.* pH-Metric logPOW 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs // *Pharm. Res.* — 1998. — 15, No. 2. — P. 209-215.
12. *Yongjun W., Jin S., Hongzhuo L., Zhonggui H.* Rapidly profiling blood-brain barrier penetration with liposome EKC // *Electrophoresis.* — 2007. — 28, No. 14. — P. 2391-2395.
13. *Singh S., Singh J.* Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review // *Med. Res. Rev.* — 1993. — 13. — P. 569-621.
14. *Ajay, Bemis G.W., Murcko M.A.* Designing libraries with CNS activity // *J. Med. Chem.* — 1999. — 42. — P. 4942-4951.
15. *El Maghraby G.M.M., Williams A.C., Barry B.W.* Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes // *Int. J. Pharm.* — 2004. — 276, No. 1-2. — P. 143-161.