

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛІВ ВЕЛИКОЇ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ І ДЕКІЛЬКОХ ПОЛОКСАМЕРІВ НА ЦІЛІСНІСТЬ І ПЛИННІСТЬ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ МЕТОДОМ СПІНОВИХ ЗОНДІВ

Л.В. Іванов¹, О.В. Щербак², М.Т. Картель¹

¹Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, E-mail: nikar@kartel.kiev.ua;

²Харківська державна зооветеринарна академія, вул. Академічна, 1, смт. Мала
Данилівка, Дергачівський район, Харківська обл., 62341, Україна, info@hdzva.edu.ua

Методом спінових зондів вивчені механізми впливу поліетиленгліколів (ПЕГ) на плинність ліпідів мембран еритроцитів, можливого плавлення ліпідів мембран і порушення цілісності мембран еритроцитів з часом. Введення 15 % ПЕГ-1500 в еритроцити людини і щура показало збільшення плинності ліпідів мембран еритроцитів на 16 або 30 %, але потім плинність мембран зменшувалась внаслідок дегідратації і стиснення клітини. Введення гідрофільних полуксамерів 407 і 338 в еритроцити приводило до плавлення ліпідів мембран (ефект збільшення плинності мембран 50 – 70 %), але цілісність більшості клітин зберігалася. Перед руйнуванням мембран в'язкість цитозолу різко знижувалась, спостерігалася анізотропія спектрів ЕПР спінових зондів, що пов'язано з суттєвими змінами в структурі цитозолу еритроцитів. Залучення до експерименту полуксамерів, що містять етиленглікольні та пропіленглікольні ланки, показало механізми справжнього плавлення мембран з максимальним збільшенням плинності ліпідів (ефект 70 %), що межує з частковим гемолізом і коагуляцією клітин. Плавлення фосфоліпідів мембран еритроцитів під дією полуксамерів 407 і 338 показало, що справжньою причиною плавлення виступають гідрофобні метиленові групи ПЕГ або ланки пропіленгліколю полуксамерів, що руйнують структуру мембран клітин з усіх напрямків.

Ключові слова: плинність ліпідів, плавлення, мембрани еритроцитів, аксон сідничного нерва, поліетиленгліколі, метод спінових зондів, дегідратація клітин, цілісність еритроцитів.

Поліетиленгліколі (ПЕГ) різної молекулярної маси активно використовуються у кріобіології як кріопротектори [1 – 5]. Кон'югація різних лікарських препаратів, систем доставки лікарських речовин (ЛР) в організм або вуглецевих наночастинок різної структури з ПЕГ великої молекулярної маси призводить до підвищення біосумісності цих об'єктів із клітинами організму [6 – 8]. Крім цього, синтезують кон'югати ПЕГ із ферментами, білками і різними ЛР, отримуючи більш ефективні препарати пролонгованої дії – значне підвищення (у десятки разів) періоду напівжиття лікарських препаратів – нативних білків після пегілювання їхніх макромолекул [8].

Останнім часом з'явилися неодноразові повідомлення про здатність ПЕГ-2000 та ПЕГ-3350 плавити розірвані кінці аксонів і швидко відновлювати цілісність аксонів (PEG-злиття) між проксимальним і дистальним сегментами аксонів шурів, вилучених із розрізаного і розчавленого матеріалу, *in vitro* та *in vivo* після розчавлення сідничного нерва у щура [9 – 13]. Автори повідомили, що PEG-злиття не тільки відновлює цілісність

розщеплених крихитних сціатичних аксонів, як це вимірюється відновленою провідністю потенціалів дії з'єднання (САР) і внутрішньо аксональною дифузією флуоресцентного барвника через місце ураження, але також забезпечує більш швидке відновлення відповідної поведінки руху на хребці [10].

Пряме застосування ПЕГ до розщеплення сідничного нерва зазвичай (97 % всіх спроб) швидко відновлює фізіологічну і морфологічну безперервність деяких аксонів у сідничному нерві. Дійсно, безперервність може бути відновлена для багатьох проксимальних і дистальних частинок аксонів (з невідомими специфічними особливостями). FF-оцінки асиметрії дають кількісну оцінку поведінки рухливості задніх кінцівок і демонструють значно більш швидке відновлення функціональної поведінки, пов'язаної з прямим застосуванням ПЕГ до розбитого сідничного нерва.

Це відповідає вимірам фізіологічної та морфологічної безперервності відновленої тканини аксона. Відео-спостереження FF-випробувань і відкритих польових випробувань також відображає швидке поліпшення поведінки, пов'язаної з прямим застосуванням ПЕГ для зруйнованих сідничних нервів. Тобто всі дані узгоджуються з інтерпретацією того, що ПЕГ з'єднується з проксимальною та дистальною аксональними половинами (ПЕГ-злиття) з достатньою специфічністю, щоб забезпечити значно більш швидке поліпшення рухової поведінки задніх кінцівок, опосередковане сідничним нервом. Отримані дані свідчать, що ПЕГ індукує як фізіологічну (виміряну відновленою провідністю потенціалів дії через місце ураження), так і морфологічну безперервність (внутрішньосудинна дифузія флуоресцентних барвників через місце ураження) між зрізаними або подрібненими кінцями мієлінових аксонів ссавців.

Попередні дослідження, присвячені оцінці поведінкового відновлення після ПЕГ-терапії розрізаних або розчавлених аксонів, були сфокусовані на моделях травм аксонів ЦНС. Повідомлялося, що підшкірні ін'єкції ПЕГ частково відновлюють м'язовий рефлекс *cutaneus trunchi* у морських свинок після травми при роздавлюванні спинного мозку середнього росту [10]. Щури, які отримували внутрішньовенну ін'єкцію ПЕГ після травми компресії спинного мозку при T4, показали поліпшені показники локомоторно в порівнянні з обробленими фізіологічним розчином контрольними групами, вимірюваними за допомогою моторної шкали *Hindlimb* з відкритим полем *Basso – Beattie – Bresnahan*.

У попередньому дослідженні, присвяченому комп'ютерному управлінню поведінковим тестом на відкритому полі, повідомлялось про поліпшену розвідувальну поведінку тварин, які отримують підшкірну ін'єкцію ПЕГ після травматичного пошкодження головного мозку в порівнянні з необробленими тваринами [10].

Раніше Л.В.Івановим із співавторами була опублікована серія робіт, присвячена дослідженню мембранотропних властивостей ПЕГ різної молекулярної маси, вивченню процесів дегідратації і набухання клітин еритроцитів під дією осмотично активних ПЕГ, проведена оцінка можливого впливу ряду фармацевтичних розчинників на біодоступність різних лікарських речовин [14 – 18]. Для цього використовували метод спінових зондів, що широко застосовується в молекулярній біології і біофізиці для оцінки тонких конформаційних змін у білках і мембранах клітин під впливом різних фізико-хімічних факторів, дослідження мікров'язкості мембран клітин і в'язкості внутрішньоклітинної рідини, проникності і цілісності мембран клітин тощо [19, 20]. Показано, що різні фармацевтичні розчинники мають спорідненість до мембран модельних і нативних клітин. Взаємодія осмотично активних ПЕГ з мембранами клітин на першому етапі супроводжується дегідратацією клітин і зменшенням їх внутрішньоклітинного об'єму, а потім набуханням клітин внаслідок проникнення низькомолекулярних розчинників усередину клітин через цитоплазматичну мембрану і вирівнювання осмотичного тиску зовні і всередині клітин. Для високомолекулярних розчинників, які не проникають крізь мембрану, спостерігалася стійка дегідратація клітин [17]. Останнім часом для ряду клітин

і тканин були вивчені і проаналізовані спектри ЕПР ряду водорозчинних і ліпофільних спінових зондів у цитоплазмі і мембранах клітин, які дозволили отримати нову інформацію про особливості реологічних властивостей компонентів біоповерхонь і прогнозувати можливість трансмембранної дифузії для різних наночастинок [21, 22]. Демонстрація ПЕГ-терапії розрізаних або розчавлених дробу аксонів хребта тварин, здатності ПЕГ безпосередньо плавити і зрощувати кінці аксонів, а також 40-річний досвід робіт стосовно вивчення механізмів впливу ПЕГ на модельні і нативні мембрани клітин вимагає уважного дослідження механізмів взаємодії і впливу ПЕГ-1500, ПЕГ-4000 і ПЕГ-6000 на мікрров'язкість фосфоліпідів мембран різних клітин.

У роботі залучені дані власних досліджень впливу сополімерів етиленгліколю та пропіленгліколю, полоксамерів 407 і 338 на плинність ліпідів мембран еритроцитів, у яких експериментально показано різке збільшення плинності ліпідів у 1,5–1,7 разів, що демонструють плавлення ліпідів мембран клітин [28].

Метою цієї роботи є дослідження умов і механізмів плавлення фосфоліпідів мембран під дією ряду полоксамерів і ПЕГ, механізмів порушення цілісності мембран клітин при цьому. Для цього досліджували вплив ряду осмотично активних ПЕГ великої молекулярної маси на мікрров'язкість мембран еритроцитів крові щурів методом спінових зондів в часі із залученням експериментальних даних за впливом ряду полоксамерів на плинність мембран еритроцитів. Отримані дані зможуть розширити знання про реальний діапазон граничних завантажень на мембрани еритроцитів, а також про практичне використання високомолекулярних ПЕГ та гідроксильних полоксамерів.

Матеріали і методи досліджень

У роботі використаний метод спінових зондів, згідно з яким за спектрами електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) стабільних нітроксильних радикалів з ліпофільним органічним замісником (що дозволяє їм потрапити в ліпофільний шар мембран еритроцитів) оцінювали час кореляції броунівської обертальної дифузії зондів у мембранах клітин.

Було обрано два спінових зонди на основі пальмітинової кислоти. Зонд 1 –нітроксильний радикал 4-пальмітоїламідо-ТЕМПО і водорозчинний зонд 3 ТЕМПОЛ– одержані за методиками [23]; зонд 2 – нітроксильний радикал 4-(N,N-диметил-N-гексадециламонію) -ТЕМПО містить у своєму складі четвертинний амонійний фрагмент, завдяки чому може розглядатися як іоногенний ПАР (рис. 1).

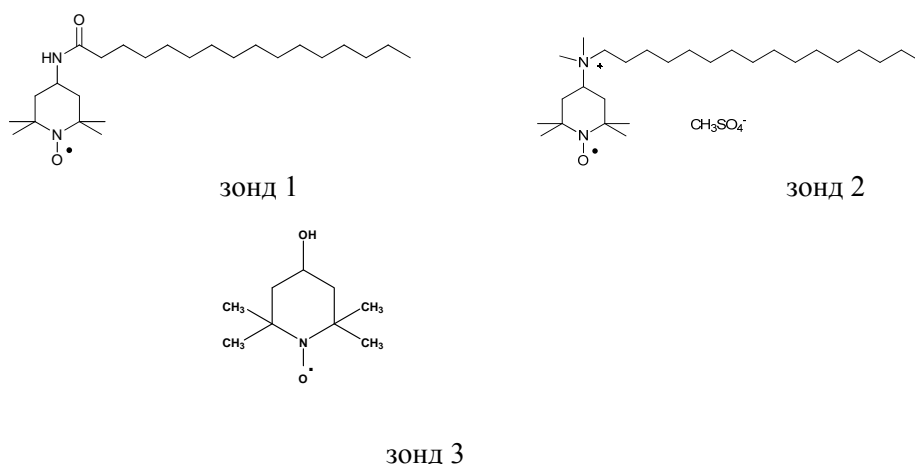


Рис. 1. Спінові зонди, застосовані у роботі.

Зонд 2 синтезований із зонду 1 за схемою [25]. Введення зондів 1 або 2 у водну суспензію еритроцитів здійснювали додаванням концентрованого розчину зонду в ДМСО таким чином, щоб кінцева концентрація ДМСО в суспензії еритроцитів була в межах 0,5–

1 %. Реєстрацію спектрів ЕПР здійснювали на радіоспектрометрі «ESR Spectrometer CMS8400» («Adani», Білорусь).

Вимірювання мікрров'язкості мембран еритроцитів проводилось на основі обробки інтенсивності і ширини ліній триплету ЕПР-спектрів нітроксильних радикалів – спінових зондів 1 та 2, що знаходяться в ліпідному бішарі мембран еритроцитів [19 – 22]. Для розрахунку часу кореляції броунівської обертальної дифузії зонду (τ) використовуються такі характеристики спектрів: ширина центральної компоненти (ΔH_0), інтенсивності компонентів спектра ЕПР (h_0, h_{+1}, h_{-1}) з магнітним квантовим числом ядра ^{14}N ($M = 0, +1, -1$), ізотропна константа розщеплення (A_{iso}).

Базовим рівнянням для оцінки в'язкості будь-яких середовищ є рівняння Стокса – Ейнштейна

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

де η – в'язкість середовища, a – ефективний радіус спінового зонда [19 – 22];

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

$$1/\tau_{c(-1)} = 3,6 \cdot 10^9 / [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ c}^{-1} \quad (2 \text{ б})$$

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

Використовували параметр анізотропії спектрів ЕПР $\varepsilon = [(h_0/h_{+1})^{1/2} - 1] / [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1]$, який зв'язує експериментальний параметр анізотропії спектрів (ε) з величиною анізотропії обертання радикала. Коли значення h_{+1} перевищує h_0 , то τ_c і ε мають від'ємне значення. Це буває, коли спектри ЕПР анізотропні і обертова дифузія зонду також анізотропна. Взагалі це свідчить про зміни в структурі середовища, де знаходиться спіновий зонд.

Для визначення місця знаходження нітроксильної головки спінового зонду в мембрані оцінювали полярність мікрооточення нітроксильного фрагмента в присутності або відсутності розчинників за допомогою параметра A_{iso} [19]. При знаходженні нітроксильного радикала у водному оточенні A_{iso} становить 16,7 – 17,2 Гс, а в ліпофільному оточенні в мембрані – 14,0 – 14,5 Гс.

З огляду на витягнуту еліпсоїдну структуру зондів 1 та 2, а також анізотропне обертання їх навколо довгої осі молекули, при аналізі результатів впливу розчинників на мікрров'язкість мембран еритроцитів слід у першу чергу опиратися на час кореляції $\tau_{c+1/-1}$, який враховує анізотропію спектрів ЕПР і анізотропне обертання зондів у мембрані [19, 20].

Розчини ПЕГ готували на середовищах суспендування еритроцитів і покапельно вносили у суспензії клітин при постійному перемішуванні при температурі 0 °С до кінцевої концентрації 15 %. Дану роботу виконували відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом з біоетики (Київ, 2013) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Еритроцити для досліджень отримували з крові білих щурів-самців. Для видалення плазми і лейкоцитів кров центрифугували 5 хв при 1500 g. Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли методом аспірації. Осад еритроцитів тричі відмивали центрифугуванням при 1500 g впродовж 3 хв у 10-кратному обсязі фосфатно-сольового буфера (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4) і зберігали при 4°С впродовж 4 год. Еритроцити людини отримували з свіжо консервованої донорської крові,

заготовленої на глюціцировому консерванті. Кров отримували на Харківській обласній станції переливання крові. З метою уніфікації об'єкта у роботі використовували кров II групи. Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали центрифугуванням при 1500 g впродовж 3 хв у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л хлориду натрію, 0,01 моль/л трис-буфер, рН 7,4).

Застосовували такі неводні розчинники та поллоксамери: ПЕГ фірми "Merk" з молекулярною масою ПЕГ-1500, ПЕГ-4000 ПЕГ-6000, а також гідрофільні поллоксамери – 338 та 407 (табл. 1), які представлені загальною формулою (*European pharmacopoeia 7.0*): NO – (CH₂-CH₂-O) a- (CH₂-CH₂-CH₃-O) б- (CH₂-CH₂-O) a-H. Номери поллоксамерів містять три цифри – перші дві цифри помножені на 100 приблизно відповідають молекулярній масі гідрофобного ППГ блоку, а остання цифра помножена на 10 показує процентний вміст гідрофільного ПЕГ блоку. 30 %- або 15 %-водні розчини поллоксамерів вводили до суспензії еритроцитів додаванням у завись еритроцитів по краплях у різних співвідношеннях.

Розчинники ПЕГ також вводили у суспензію еритроцитів при додаванні у суспензію по краплях 30 %- або 15 %-водних розчинів у різному співвідношенні. Для статистичної обробки отриманих даних застосовували пакет прикладних програм «Statistica 6.0» (США). Результати дослідження представлені у вигляді середніх значень, відхилення – стандартної помилки середнього. Статистичну значимість розбіжностей між значеннями оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента, значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Використані ліпофільні спінові зонди відрізняються величиною позитивного заряду на атомі азоту поблизу нітроксильної «головки». Таким чином, вони можуть дещо по-різному вбудовуватися в ліпідний бішар мембран клітин. Так, зонд 2 вбудовується в мембрану подібно фосфатидилхоліну, що має позитивно заряджену холінову «головку» і два алкільних «хвоста». Нітроксильний фрагмент зонду 2 із неспареним електроном знаходиться в ліпідах на межі розділу вода-мембрана і чутливий до зв'язування з мембраною великих об'єктів, непроникаючих крізь мембрану.

Нейтральний зонд 1 не так жорстко структурований (орієнтований) в ліпідному бішарі мембран еритроцитів і може знаходитися трохи глибше в мембрані еритроцитів. Тому його спектр ЕПР не змінюється при введенні в суспензію еритроцитів фериціаніду (розширювача сигналу), тобто нітроксильний фрагмент зонду 1 недоступний воді. Обертальна рухливість зонду 1 у мембрані еритроцитів вища, ніж у зонду 2.

Раніше для вивчення цілісності ізольованих клітин і клітин зразків тканин при будь-яких фізико-хімічних факторах був запропонований кількісний експрес-метод оцінки цілих клітин з використанням методу спінових зондів [26]. У цьому методі в суспензію клітин вводять водорозчинний спіновий зонд 3, який швидко проникає всередину клітин. Далі додаються парамагнітні розширювачі спектрів ЕПР – фериціанід калію, або хлористий нікель, які у нормі не проникають всередину клітин, але розширюють спектр ЕПР зондів у позаклітинній воді до нуля (обмінна взаємодія). У результаті цього ми реєструємо спектр ЕПР зонду, що знаходиться виключно всередині клітин. При порушенні цілісності мембран – появи дефектів, розривів, дірок у мембрані – парамагнітні фериціанід калію або хлористий нікель миттєво проникають усередину клітин і сигнал ЕПР зонду всередині клітин зникає. Інтенсивність спектру ЕПР зонду, що знаходиться в цитозолі клітин, пропорційна кількості цілих клітин в суспензії (в %). Помилка методу у визначеннях непошкоджених клітин не перевищує 3 %.

Таким чином, за допомогою спінових зондів 1 – 3 можливо отримувати інформацію про вплив ПЕГ і поллоксамерів на мікрров'язкість (плинність, величина, зворотна в'язкість)

ліпідів у поверхневому шарі мембран еритроцитів та цілісність мембран клітин. Аналіз впливу досліджуваних високомолекулярних ПЕГ на мікров'язкість мембран еритроцитів є непростим завданням, тому що осмотично активні розчинники одночасно викликають різноспрямовані ефекти, що формують мікров'язкість. Серед них слід відзначити такі:

- 1) збільшення мікров'язкості мембран на етапі дегідратації та стиснення клітин,
- 2) зменшення мікров'язкості мембран клітин внаслідок деструкції рідиннокристалічної структури мембран, зниження впорядкованості фосfolіпідів у мембрані,
- 3) зменшення мікров'язкості мембран внаслідок порушення білок-ліпідної взаємодії у мембрані при зв'язуванні ПЕГ за допомогою метиленових груп з мембранними білками за гідрофобним механізмом,
- 4) зміна мікров'язкості ліпідного бішару мембран у часі внаслідок дифузії ПЕГ всередину мембран.

Тому в роботі використовували зонд 2, що дає інформацію про конформаційну рухливість поверхневого мембранного шару, і зонд 1, що знаходиться в більш глибоких ліпідних шарах мембран еритроцитів. Реєстрацію спектрів ЕПР проводили через 5, 30 і 60 хв після введення розчинника у суспензію еритроцитів, що дозволило оцінити в часі зміну конформаційної рухливості ліпідів мембран під дією розчинників і стежити за наслідком дифузії розчинників усередину мембрани. Деякі параметри інформативних спектрів ЕПР для зондів 2 і 1 в еритроцитах в присутності ряду розчинників представлені на рис. 2, а в табл. 1 наведені значення часу кореляції τ_c цих зондів у мембрані (пропорційні в'язкості η) для кожного конкретного розчинника в суспензії клітин еритроцитів.

Із рис. 2 випливає, що при введенні розчинників, включаючи ПЕГ, відбувається швидка дегідратація еритроцитів. Це призводить до стрибка в'язкості цитозолу клітин, а потім впродовж години відбувається повільне зниження в'язкості внутрішньоклітинної рідини до норми внаслідок трансмембранної дифузії низькомолекулярних ПЕГ і розчинників у внутрішньоклітинну рідину, за винятком ПЕГ-2000, який не проникає через мембрану всередину клітин і залишається на поверхні мембрани (рис.2, крива 6) [22].

Ці результати показують, що для досліджуваних ПЕГ-1500, ПЕГ-4000 і ПЕГ-6000 змінюється характер їх впливу на ліпіди і мікров'язкість мембран клітин. Основна дія високомолекулярних ПЕГ на мембрани пов'язана з дегідратацією клітин, їх стисненням (збільшення мікров'язкості ліпідів мембран) і руйнуванням рідиннокристалічної структури поверхні мембран і білково-ліпідної взаємодії, що знижує мікров'язкість мембран клітин.

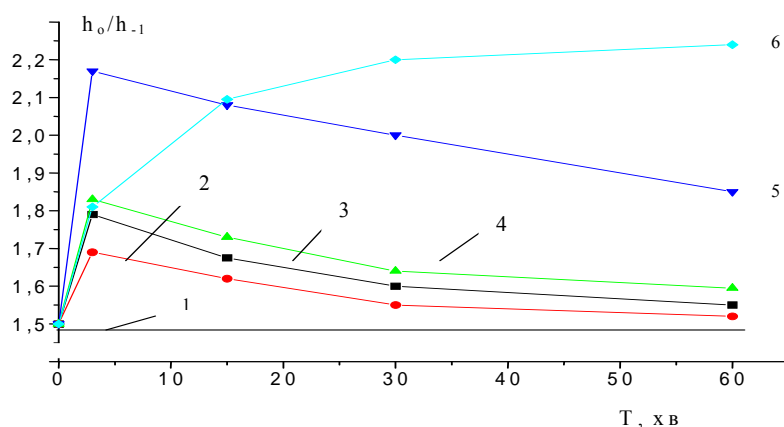


Рис. 2. Вплив розчинників (ПЕГ) на параметр h_0/h_{-1} спектра ЕПР (пропорційний в'язкості) зонда 3 в цитозолі еритроцитів: 1 – контроль; 2 – пропіленгліколь; – гліцерин; 4 – ПЕГ-300; 5 – ПЕГ-600; 6 – ПЕГ-2000.

Раніше при вивченні впливу ПЕГ на структуру макромолекули сироваткового альбуміну бика (САБ) було показано, що ПЕГ різної молекулярної маси здатні витіснити

ліпофільний спін-мічений прогестерон із гідрофобних порожнин САБ за гідрофобним конкурентним механізмом за рахунок метиленових $-CH_2-CH_2-$ груп ПЕГ [22]. Аналогічний процес відбувається при взаємодії ПЕГ з мембранами клітин – ослаблення гідрофобної взаємодії між ліпідами і периферійними або інтегральними білками (ферментами) мембран клітин, коли молекули ПЕГ проникають у місце контактів фосфоліпідів і білків мембрани. Крім цього, взаємодія ПЕГ з мембранами роз'єднує гідрофобну взаємодію між алкільними хвостами фосфоліпідів у мембранах різних клітин. Все це призводить до руйнування рідиннокристалєвої структури мембран клітин і ослаблення білок-ліпідної взаємодії в мембранах. На зміни білок-ліпідної взаємодії у мембранах клітин при взаємодії з кріопротекторами вказується в деяких статтях [24], але без експериментального підтвердження і наукового обґрунтування.

"Плавлення" роздріблених аксонів сідничного нерва шурів під дією ПЕГ-2000 і ПЕГ-3350 з подальшим загоєнням, про який згадувалося на початку нашої роботи [9, 10], у перекладі на мову параметрів мембран означає різке збільшення плинності ліпідів мембран нейронів (зменшення в'язкості). Таке явище ніколи не спостерігалось для ПЕГ середньої молекулярної маси – ПЕГ-300, ПЕГ-400, ПЕГ-600. Тільки при вивченні впливу на мікрров'язкість мембран еритроцитів сополімерів поліетиленгліколю і поліпропіленгліколю полуксамерів (10 %), які мають велику гідрофобність в основному за рахунок ланок пропіленгліколю, нами спостерігався ефект плавлення мембран еритроцитів, при якому плинність мембран зростає в 1,5 – 1,7 разів до критичного рівня – появи часткового гемолізу і коагуляції еритроцитів (див. нижче). Це при тому, що мембрана еритроцитів прошита тривимірною сіткою білка спектрина дуже міцна (тому ніжна тканина нейронів повинна плавитися подібно олову при нагріванні) [28].

На цьому етапі, згідно з даними табл. 1, можна відзначити, що полуксамер 407 містить найбільшу кількість гідрофобних ланок пропіленгліколю з вивчених (в абсолютних величинах) і значну макромолекулу (друге місце). На другому місці полуксамер 338 (перше місце за розміром макромолекули), який має достатню кількість ланок пропіленгліколю і дуже велику кількість ланок етиленгліколю, що містять гідрофобні метиленові групи і компенсують нестачу ланок пропіленгліколю в порівнянні з полуксамером 407.

Таблиця 1. Характеристики полуксамерів

Тип полуксамеру	Ланки етиленоксиду (а)	Ланки пропіленоксиду (б)	Вміст оксиетилєну, %	Середня молекулярна маса
188	75-85 (мол. м. 3500)	25–30	79,9–83,7	7680–9510
237	60-68 (мол. м. 2800)	35–40	70,5–74,3	6840–8830
338	137-146 (мол. м. 6200)	42–47	81,4–84,9	12700–17400
407	95-105 (мол. м. 4400)	54–60	71,5–74,9	9840–14600

Таким чином, ефект збільшення плинності ліпідів мембран клітин (ефект плавлення ліпідів) залежить від абсолютної кількості гідрофобних ланок у молекулі полуксамеру, що припадають на одну клітину еритроцитів, які здатні ефективно трансформувати структуру поверхні мембран (непроникаючі ПЕГ) у бік збільшення плинності мембран.

Із рис. 3 – 5 видно, що рухливість ліпофільного спінового зонда 2 у ліпідах мембран еритроцитів помітно зростає з часом (через 30 хв) для полуксамерів 407 і 338. У роботах кріобіологів, де ПЕГ-1500 використовують як кріопротектор, показано, що ПЕГ-1500 необхідно по краплях додавати до еритроцитів на холод, в результаті чого утворюється його міцний комплекс з мембраною, який при відмиванні ПЕГ-1500 викликає розрив клітин еритроцитів (гемоліз) [24]. У табл. 2 представлені дані про вплив високомолекулярних ПЕГ і ряду полуксамерів на час кореляції спінового зонда 2 в ліпідах мембран еритроцитів.

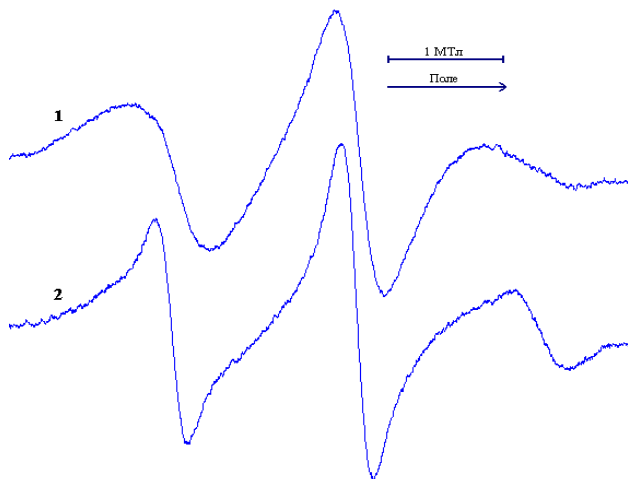


Рис. 3. Спектри ЕПР спінового зонда 1 у мембранах еритроцитів людини: 1 – контроль, 2 – у присутності 5% полосамеру 407 через 30 хв після введення в еритроцити при 25°С.

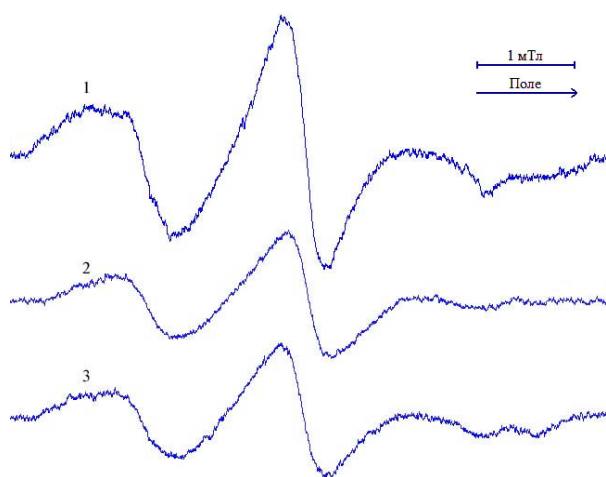


Рис. 4. Спектри ЕПР зонда 2 в еритроцитах при 25°С: 1 – контроль; 2 – через 30 хв після введення ПЕГ-1500 (15%) у суспензію еритроцитів, 3 – через 5 хв після введення ПЕГ-4000 (15%) у суспензію еритроцитів.

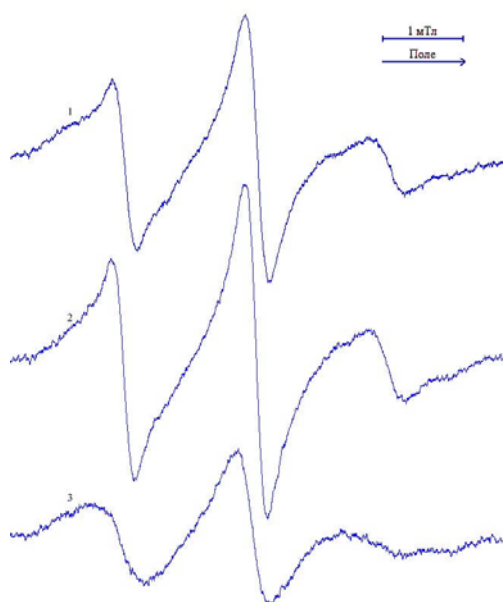


Рис. 5. Спектри ЕПР зонда 2 в еритроцитах при 25°С: 1 – через 5 хв після введення полосамеру 338 (10 %) у суспензію еритроцитів; 2 – через 30 хв після введення полосамеру 338 (10 %) у суспензію еритроцитів, 3 – через 60 хв після введення полосамеру 338 (10 %) у суспензію еритроцитів.

Таблиця 2. Значення величин часу кореляції τ , розраховані із спектрів ЕПР зонда 2 в мембранах еритроцитів шурів, у присутності фармацевтичних розчинників при температурі 25°C

Фармацевтичні розчинники	$\tau_{+1} \cdot 10^9, \text{с}$	$\tau_{-1} \cdot 10^9, \text{с}$	$\tau_{+/-1} \cdot 10^9, \text{с}$
Контроль	8,21	1,54	5,15
ПЕГ 6000 15 % 5 хв	7,89	1,63	4,97
ПЕГ 6000 15 % 30 хв	9,7	1,74	5,88
ПЕГ 6000 15 % 60 хв	9,04	1,7	4,7
ПЕГ 4000 15 % 5 хв	9,7	1,78	5,61
ПЕГ 4000 15 % 30 хв	6,94	1,46	4,52
ПЕГ 4000 15 % 60 хв	8,93	1,57	4,98
ПЕГ 1500 15 % 5 хв	7,1 (-14%)	1,32 (-14%)	3,52 (-32%)
ПЕГ 1500 15 % 30 хв	8,71 (+6%)	2,1 (+36%)	6,39 (+24%)
ПЕГ 1500 15 % 60 хв	7,82 (-5%)	1,77 (+15%)	5,05 (-2%)
Poloxamer 407 10 % 5 хв	4,34 (-47%)	0,82 (-46%)	1,61 (-69%)
Poloxamer 407 10 % 30 хв	3,87 (-53%)	0,84 (-45%)	1,6 (-69%)
Poloxamer 407 10 % 60 хв	4,1 (-50%)	0,89 (-42%)	1,72 (-66%)
Poloxamer 338 10 % 5 хв	3,37 (-59%)	0,84 (-45%)	2,24 (-57%)
Poloxamer 338 10 % 30 хв	3,2 (-61%)	0,87 (-43%)	2,03 (-61%)
Poloxamer 338 10 % 60 хв	3,82 (-53%)	0,95 (-38%)	2,16 (-58%)

* В табл. 2 для деяких розчинників приводяться величини ефектів зниження (-) і підвищення (+) в'язкості мембран еритроцитів (в %).

Таблиця 3. Значення величин часу кореляції τ , розраховані із спектрів ЕПР зонда 2 в мембранах еритроцитів людини, в присутності ПЕГ-1500 при температурі 25°C

Неводні розчинники	$\tau_{+1} \cdot 10^9, \text{с}$	$\tau_{+/-1} \cdot 10^9, \text{с}$
Контроль	1,80 ± 0,89	7,0 ± 4,20
ПЕГ-1500 (10%) 5 хв	1,77 ± 0,88	6,80 ± 4,10
ПЕГ-1500 (10%) 30 хв	1,56 ± 0,70*	6,70 ± 4,01
ПЕГ-1500 (10%) 60 хв	1,5 ± 0,85 (-16%)	6,0 ± 3,65*(-15%)

Вище зазначалося, що час кореляції $\tau_{+/-1}$ ліпофільних зондів 1 і 2 в ліпідах мембран еритроцитів більш чутливий до змін у структурі мембран, ніж час кореляції, розрахований за іншими формулами, про що свідчать дані табл. 2. Введення ПЕГ-1500 у суспензію еритроцитів відразу призводить до досить великого підвищення плинності мембран (ефект 32%) внаслідок порушення білково-ліпідних взаємодій і руйнування всієї рідиннокристалової структури поверхні мембран еритроцитів. Та через 30 хв внаслідок повільної дегідратації, стиснення клітини і багатоточкової взаємодії полімерного ланцюжка ПЕГ-1500 із компонентами мембрани спостерігається іммобілізація мембрани з наступним виходом практично на вихідну мікров'язкість мембран. Таке коливання мікров'язкості мембран еритроцитів спостерігалось навіть для проникаючих усередину клітин ПЕГ. Введення ПЕГ-1500 у суспензію еритроцитів людини демонструє поступове і планомірне збільшення плинності мембран еритроцитів людини – фази зниження плинності мембрани не спостерігається.

Якщо врахувати, що фаза зниження плинності мембран під дією ПЕГ в основному пов'язана з дегідратацією, багатоточковим зв'язуванням ланцюжка полімеру ПЕГ-1500 з елементами мембрани і утворенням міцного комплексу з мембраною, то склад

інгредієнтів поверхні мембран еритроцитів людини дещо відрізняється від такого у щура. На це вказують наші порівняльні результати впливу фармацевтичних допоміжних речовин на мембрани еритроцитів людини і щура [27].

Введення ПЕГ-4000 у суспензію еритроцитів щура (табл. 2) впродовж усього експерименту супроводжувалося іноді частковим гемолізом, іноді несподіваними результатами – у нашому випадку (див. табл. 2) швидким підвищенням мікров'язкості мембран, замість зниження і подальшого зниженням в'язкості мембран еритроцитів. Можливо, при цій молекулярній масі у макромолекули ПЕГ-4000 формується інша конформація полімеру і виникають нові аспекти впливу на плинність мембран клітини. У роботі [9] для відновлення розчавленого і роздробленого сідничного нерва щурів використовували ПЕГ з молекулярною масою 3350, а в роботі [10] – ПЕГ-2000. Причому ці полімери безпосередньо вводили в щілину трубки нейрона з роздрібненого тканиною аксона в 50% концентрації, де фосфоліпіди були захищені від значного зменшення свого обсягу в процесі дегідратації постійним розміром нейротрубки. У цьому контексті фактор дегідратації, що протистоїть збільшенню плинності ліпідів, нівелювався і при безпосередній взаємодії 50% концентрації ПЕГ міг реалізуватися стрибок збільшення плинності ліпідів аксону – плавлення ліпідів.

Незважаючи на те що у ПЕГ-6000 молекулярна маса помітно вища, частковий гемоліз, часткова коагуляція і повне порушення цілісності еритроцитів (зникнення сигналу ЕПР) відбувалося саме з ПЕГ-4000 (див. нижче). При введенні ПЕГ-6000 в еритроцити з'являлися хвилеподібні збільшення і зменшення плинності мембран, які свідчать про тривалість процесів, що призводять до зміни мікров'язкості мембран клітин внаслідок переплетіння полімерного ланцюжка ПЕГ з компонентами поверхні мембран еритроцитів. Для з'ясування механізмів і умов плавлення ліпідів мембран клітин у роботі вивчали вплив сополімерів етиленгліколю та пропіленгліколю з різною структурою і молекулярною масою. Ці дані наведені в табл. 2 і показують найсильніший стрибок плинності ліпідів мембран еритроцитів відразу ж при введенні поллоксамерів 407 або 388 в еритроцити щура. Плинність ліпідів мембран у присутності у суспензії еритроцитів поллоксамеру 407 (10%) зростає майже на 70%, а поллоксамеру 388 – на 60 %. Таким чином, ці величини для клітин еритроцитів являються критичними, тому що паралельні досліди з оцінки цілісності мембран за допомогою зонду 3 фіксують порушення цілісності мембран у 10 – 13 % суспензії еритроцитів (можливо у старих клітинах). Крім цього, спостерігається частковий гемоліз і часткова коагуляція. Мабуть це і є плавлення ліпідів мембран клітин. Однак дуже чутливий тест за допомогою спінового зонда 3 демонструє збереження цілісності мембран еритроцитів у 88 – 90 % клітин. Слід зазначити, що спектри ЕПР зонда 2 у мембрані еритроцитів свідчать про те, що в присутності поллоксамерів мембрани всіх клітин мають однакову високу плинність, а максимальна плинність мембран настає, як правило, після 30 хв інкубації поллоксамеру з клітинами, а потім трохи падає. Дані табл. 2 показують великий діапазон зміни плинності мембран, що пов'язано з фізіологічною функцією еритроцитів – доставляти кисень до всіх тканин і органів, проникати в дуже дрібні капіляри, сильно змінюючи форму клітини і витягаючись буквально в ниточку.

Слід зазначити, що в табл. 3 представлені значення часу кореляції водорозчинного зонда 3 у внутрішньоклітинному середовищі (цитозоль) клітин еритроцитів, що пропорційні мікров'язкості цитозолю. Мікров'язкість цитозолю в середньому на порядок нижча, ніж мікров'язкість ліпідів мембран еритроцитів, тому що в цитоплазмі знаходяться в основному водорозчинні макромолекули гемоглобіну. Обертальна рухливість зонда 3 в цитоплазмі чутлива до процесів дегідратації (стиснення клітини) і набухання (збільшення обсягу цитозоля). Введення поллоксамеру 338 в еритроцити призводить до поступової повільної дегідратації клітин впродовж години, причому значення τ_{+1} через 1 год інкубації

стають від'ємними, що пов'язано з анізотропією обертальної рухливості зонду в цитоплазмі (і, з досвіду, передую порушенню цілісності клітин). Введення ПЕГ-1500 в еритроцити відразу призводить до стійкого в часі зменшення мікров'язкості цитозолу еритроцитів, що пов'язано з набуханням клітин. Введення в суспензію еритроцитів ПЕГ-4000 відразу призводить до зменшення мікров'язкості цитозолу. Потім настає фаза дегідратації клітини (підвищення в'язкості цитозолу до норми), і врешті решт цілісність мембран повністю порушується – спектр ЕПР зникає. І знову перед руйнуванням клітини τ_{+1} набуває від'ємного значення. Введення ПЕГ-6000 в еритроцити призводить спочатку до набухання клітини, потім до стиснення клітини, і нарешті знову до набрякання еритроцитів.

Таблиця 4. Значення величин часу кореляції, розраховані зі спектрів ЕПР зонда 3 у внутрішньоклітинній рідині еритроцитів щурів, у присутності фармацевтичних розчинників при температурі 25°C

Фармацевтичні розчинники	$\tau_{+1} \cdot 10^{10}$, с	$\tau_{-1} \cdot 10^{10}$, с	$\tau_{+1} \cdot 10^{10}$, с
Контроль	4,2	0,85	2,2
ПЕГ 6000 15% 5 хв	5,2	0,7	1,5
ПЕГ 6000 15% 30 хв	2,8	0,9	2,11
ПЕГ 6000 15% 60 хв	2,7	0,7	1,9
ПЕГ 4000 15% 5 хв	2,5	0,6	1,4
ПЕГ 4000 15% 30 хв	-0,9	1,0	2,2
ПЕГ 4000 15% 60 хв	-	-	-
ПЕГ 1500 15% 5 хв	5,0	0,7	1,6
ПЕГ 1500 15% 60 хв	4,5	0,7	1,6
Poloxamer 338 10% 5 хв	1,8	0,5	1,1
Poloxamer 338 10% 30 хв	2,4	0,6	1,2
Poloxamer 338 10% 60 хв	-0,2	0,6	1,5
ГГ 15% 5 хв	-4,8	1,0	2,6
ГГ 15% 30 хв	-5,9	0,2	0,5
ГГ 15% 60 хв	-	-	-
N-MP 7,5% 5 хв	-3,6	0,7	1,7
N-MP 7,5% 30 хв	-	-	-
N-MP 7,5% 60 хв	-	-	-

Для з'ясування причин пошкодження цілісності мембран еритроцитів в присутності ПЕГ у роботі застосували дані про вплив на мембрани цитотоксичних гексиленгліколю (ГГ) і N-MP (метилпіролідону), які також представлені в табл. 4. Руйнуванню клітин (зникненню спектрів ЕПР) під дією гексиленгліколю передувало різке зниження мікров'язкості цитозолу еритроцитів (у 5 разів), а також поява негативних значень τ_{+1} , що зруйнувало клітину при набуханні. Для N-MP перед розривом мембран і зникненням спектрів ЕПР також виникають від'ємні значення τ_{+1} і спостерігається падіння мікров'язкості мембран. Можливо, у нашому випадку, руйнуванню мембрани еритроцитів передують значні спотворення обсягу цитозоля еритроцитів (зміна анізотропії обертання зонда 3 всередині клітин, зміна поверхневого натягу мембран) плюс різке набухання клітин (потоншення мембран), що призводить до розриву мембран еритроцитів.

Висновки

На основі низки зарубіжних публікацій проведено ретельний аналіз причин плавлення і ПЕГ-злиття роздроблених і розчавлених кінців аксона сідничного нерва щура під безпосереднім впливом ПЕГ-2000 і ПЕГ-3350 з подальшим поступовим відновленням рухливості задніх кінцівок щура. Необхідною умовою плавлення фосфоліпідів аксонів є різке зростання плинності фосфоліпідів при безпосередній взаємодії 50% розчину ПЕГ з фосфоліпідами в нейронній трубці. Для вивчення механізмів та умов різкого зростання плинності (плавлення) фосфоліпідів мембран клітин у роботі за допомогою методу спінових зондів досліджували вплив ряду високомолекулярних ПЕГ на плинність фосфоліпідів мембран еритроцитів людини і щура. Показано, що введення ПЕГ у суспензію еритроцитів супроводжується двома різноспрямованими за дією на плинність ліпідів мембран процесами – збільшення плинності ліпідів внаслідок ослаблення (порушення) білково-ліпідних та фосфоліпідних взаємодій і зниження плинності ліпідів в результаті дегідратації і стиснення клітин еритроцитів. Введення 15% ПЕГ-1500 в еритроцити людини показало планомірне збільшення плинності ліпідів мембран еритроцитів впродовж години (величина ефекту 15–16%). Введення 15% ПЕГ-1500 в еритроцити щура відразу приводило до збільшення плинності ліпідів мембран більш ніж на 30%, проте у подальшому плинність ліпідів зніжувалась внаслідок дегідратації і стиснення клітини. Для всіх високомолекулярних ПЕГ розвитку процесу збільшення плинності ліпідів мембран еритроцитів перешкоджав процес дегідратації клітини. В аналогічних зарубіжних експериментах стадія дегідратації (стиснення обсягу мембрани з фосфоліпідами) знівелювана нейронною трубкою, що обмежує зміну обсягу, в якій знаходяться фосфоліпіди з ПЕГ, а 50 % розчин ПЕГ має можливість безпосередньо різко збільшити плинність ліпідів, що звільнилися від гідрофобних взаємодій в мембрані.

Залучення до експерименту полуксамерів, що містять етиленглікольні та пропіленглікольні ланки, показало механізми справжнього плавлення мембран з максимальним збільшенням плинності ліпідів (ефект 70 %), що межує з частковим гемолізом і коагуляцією клітин. Плавлення фосфоліпідів мембран еритроцитів під дією полуксамерів 407 і 338 показало, що справжньою причиною плавлення виступають гідрофобні метиленові групи ПЕГ або ланки пропіленгліколю полуксамерів, що руйнують структуру мембран клітин з усіх напрямків.

Література

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. *Криобиология*. // К.: Наук. Думка. – 1994. – 432 с.
2. Ivanov L.V., Gavrilova I.I., Moiseyev V.A. Investigation of the membrane integrity of human erythrocytes at low temperatures using spin probes // *Cryo-Lettes*. – 1981. – Vol. 2. – P. 197–200.
3. Heber U.W. Freezing injury is relation to loss of enzyme activities and protection against freezing // *Cryobiology*. – 1968. – Vol. 5. – P. 188–201.
4. Nardid O.A., Dyubko T.S., Soloviova A.S et. al. Influence of some polyols on erythrocyte cytoskeleton proteins // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 1998. – Vol. 3, № 2. – P. 187–188.
5. Нардид О.А., Цымбал Л.В., Гулевский А.К. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов // *Физико-химические процессы в криобиологических системах: Сб. статей*. – Харьков. – 1991. – С. 102–106.
6. Murakami T., Fan J., Yudasaka M., Iijima S., Shiba K. Solubilization of single-wall carbon nanohorns using a PEGdoxorubicin conjugate // *Molecular Pharmaceutics*. – 2006, V.3, P.407–414.

7. *Matsumura S., Ajima K., Yudasaka M., Iijima S. and Shiba K.* Dispersion of Cisplatin-Loaded Carbon Nanohorns with a Conjugate Comprised of an Artificial Peptide Aptamer and Polyethylene Glycol // *Molecular Pharmaceutics*. – 2007, V.4 N 5, – P.723–729.
8. *Никитин И.Г., Байкова И.Е., Гогова Л.М.* Клиническая фармакология. Пегилированные лекарственные препараты: современное состояние проблемы и перспективы, Кафедра госпитальной терапии № 2 Лечебного факультета РГМУ // *Лечебное дело* 4. – 2005. – С.18–24.
9. *Shuai Ren, Ze Han Liu, Qiong Wu, Kuang Fu, Jun Wu, Li Ting Hou, Ming Li, Xin Zhao, Qing Miao, Yun Long Zhao, Sheng Yu Wang, Yan Xue, Zhen Xue, Ya Shan Guo, Sergio Canavero, Xiao Ping Ren.* Polyethylene glycol-induced motor recovery after total spinal transection in rats // *CNS Neurosci Ther.* V. 23 N 8. – P. 680–685.
10. *Britt J.M., Kane J.R., Spaeth C.S., Zuzek A., Robinson G.L., Gbanaglo M.Y., Estler C.J., Boydston E.A., Schallert T., Bittner G.D.J.* Polyethylene Glycol Rapidly Restores Axonal Integrity and Improves the Rate of Motor Behavior Recovery After Sciatic Nerve Crush Injury // *J Neurophysiol.* – 2010. V. 104. N 2. – P.695–703.
11. *Borgens R.B, Bohnert D.* Rapid recovery from spinal cord injury after subcutaneously administered polyethylene glycol // *J Neurosci Res.:* – 2001. V. 66, N 6. – P. 1179–1186.
12. *Ahkong Q.F., Desmazes J.P., Georgescauld D., Lucy J.A.* Movements of fluorescent probes in the mechanism of cell fusion induced by poly(ethylene glycol) // *J Cell Sci.* – 1987. V.88. N 3. – P. 389–398.
13. *Bittner G.D., Ballinger M.L., Raymond M.A.* Reconnection of severed nerve axons with polyethylene glycol // *Brain Res* – 1986 V.367. – P. 351–355.
14. *Иванов Л.В., Ляпунов Н.А., Цымбал Л.В. и др.* Влияние состава двухкомпонентных растворителей на биологические мембраны // *Хим.-фармац. ж.* – 1986. N 12. – С. 1437–1443.
15. *Иванов Л.В., Орлова И.Н.* Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойств и пути введения лекарственных препаратов // В сб. "Технология и стандартизация лекарств". – Харьков. – 2000. –Т. 2. – С. 558–615.
16. *Иванов Л.В.* Изучение взаимодействия некоторых гидрофильных неводных растворителей с биомембранами различных клеток методами спиновых и флуоресцентных зондов // *Фармаком.* – 1999. – Т. 2. – С. 45–47.
17. *Иванов Л.В.* Изучение механизмов дегидратации клеток эритроцитов под действием гидрофильных неводных растворителей // *Фармаком.* – 1998. – Т. 5 – С. 43–47.
18. *Иванов Л.В., Георгиевский В.П.* Изучение механизмов влияния вспомогательных веществ на биодоступность // *Материалы I Международной научно-практической конференции "Создание, производство, стандартизация, фармакоэкономика лекарственных средств и биологических добавок"*, Тернополь. – 2004. – 19 с.
19. *Лихтенштейн Г.И.* Метод спиновых меток в молекулярной биологии. // М.: Наука. –1974. – С. 12–24.
20. *Берлинера Л.* Метод спиновых меток. Теория и применения // Москва: Мир. – 1979. – 639 с.
21. *Иванов Л.В., Картель Н.Т.* Оценка микровязкости клеточных мембран различной природы методом спиновых зондов // *Доповіді НАН України.* –2012. – Т. 5. – С.139–145.
22. *Иванов Л.В., Картель Н.Т.* Характеризация реологических свойств поверхности нанобиообъектов методом спиновых зондов // *Поверхность.* – 2012.- Вып. 4 № 19. – С. 334–348.
23. *Розанцев Э.Г.* Свободные иминоксильные радикалы. // Москва: Химия. – 1970. – 216 с.

24. *Нардид О.А., Черкашина Я.О., Иванов Л.В., Нардид Э.О., Ляпунов А.Н., Мамонтов В.В.* Влияние пропиленгликоля и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500 на микровязкость мембран эритроцитов // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 35–44.
25. *Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Картель Н.Т., Нардид О.А., Окотруб А.В., Кирилук И.А., Черкашина Я.О.* Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови // Поверхность. – 2014. – Вып. 6 № 21. – С. 292–304.
26. *Иванов Л.В., Моисеев В.А., Гаврилова и др.* Способ определения степени деструкции клеток // А. с. СССР 1049808. Опубл. 23.06.1983, Бюл. № 39.
27. *Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Картель Н.Т. и др.* Сравнительное изучение влияния ряда фармацевтических вспомогательных веществ на микровязкость мембран эритроцитов крови человека и крыс методом спиновых зондов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – Т. 47. – №1. – С. 72–78.
28. *Иванов Л.В., Картель Н.Т., Ляпунов А.Н. та інші.* Вивчення механізмів цитотоксичності низки гідрофільних полуксамерів методом спинових зондів // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – Т. 45. – № 4–5. – С. 46–58.

References

1. Belous A.M., Grishchenko V.I. Cryobiology. // *K. Science. Dumka*. 1994: 432. [in Russian].
2. Ivanov L.V., Gavrilova I.I., Moiseyev V.A. Investigation of the membrane integrity of human erythrocytes at low temperatures using spin probes // *Cryo-Lettes*. 1981. **2**: 197.
3. Heber U.W. Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing // *Cryobiology*. 1968. **5**: 188.
4. Nardid O.A., Dyubko T.S., Soloviova A.S et. al. Influence of some polyols on erythrocyte cytoskeleton proteins // *Cellular & Molecular Biology Letters*. 1998. **3**(2): 187.
5. Nardid O.A., Tsymbal L.V., Gulevsky A.K. Influence of cryoprotectants on protein-lipid interactions in erythrocyte membranes // *Physical and chemical processes in cryobiological systems: Coll. articles. - Kharkov*. 1991: 102. [in Russian].
6. Murakami T., Fan J., Yudasaka M., Iijima S., Shiba K. Solubilization of single-wall carbon nanohorns using a PEGdoxorubicin conjugate // *Molecular Pharmaceutics*. 2006. **3**: 407.
7. Matsumura S., Ajima K., Yudasaka M., Iijima S. and Shiba K. Dispersion of Cisplatin-Loaded Carbon Nanohorns with a Conjugate Comprised of an Artificial Peptide Aptamer and Polyethylene Glycol // *Molecular Pharmaceutics*. 2007. **4**(5): 723.
8. Nikitin I.G., Baikova I.E., Gogova L.M. Clinical pharmacology. Pegylated Drugs: Current State of the Problem and Prospects, Department of Hospital Therapy No. 2 of the Medical Faculty, Russian State Medical University // *Medicine* 4. 2005: 18. [in Russian].
9. Shuai Ren, Ze Han Liu, Qiong Wu, Kuang Fu, Jun Wu, Li Ting Hou, Ming Li, Xin Zhao, Qing Miao, Yun Long Zhao, Sheng Yu Wang, Yan Xue, Zhen Xue, Ya Shan Guo, Sergio Canavero, Xiao Ping Ren. Polyethylene glycol-induced motor recovery after total spinal transection in rats // *CNS Neurosci Ther*. 2017. **23**(8): 680
10. Britt J.M., Kane J.R., Spaeth C.S., Zuzek A., Robinson G.L., Gbanaglo M.Y., Estler C.J., Boydston E.A., Schallert T., Bittner G.D.J. Polyethylene Glycol Rapidly Restores Axonal Integrity and Improves the Rate of Motor Behavior Recovery After Sciatic Nerve Crush Injury // *J Neurophysiol*. 2010. **104**(2): 695.
11. Borgens R.B, Bohnert D. Rapid recovery from spinal cord injury after subcutaneously administered polyethylene glycol // *J Neurosci Res*. 2001. **66**(6): 1179.

12. Ahkong Q.F., Desmazes J.P., Georgescauld D., Lucy J.A. Movements of fluorescent probes in the mechanism of cell fusion induced by poly(ethylene glycol) // *J Cell Sci.* 1987. **88**(3): 389.
13. Bittner G.D., Ballinger M.L., Raymond M.A. Reconnection of severed nerve axons with polyethylene glycol // *Brain Res.* 1986 **367**: 351.
14. Ivanov L.V., Lyapunov N.A., Tsymbal L.V. et al., Effect of the Composition of Two-Component Solvents on Biological Membranes // *Chem. Pharmaceut. J.* 1986. **12**: 1437. [in Russian].
15. Ivanov L.V., Orlova I.N. Biopharmaceutical studies aimed at optimizing the composition, properties and route of administration of drugs // *In coll. "Technology and standardization of drugs."* - Kharkov. 2000. **2**: 558. [in Russian].
16. Ivanov L.V. Study of the interaction of some hydrophilic non-aqueous solvents with biomembranes of various cells using spin and fluorescent probes // *Farmakom.* 1999. **2**: 45. [in Russian].
17. Ivanov L.V. Study of the mechanisms of dehydration of erythrocyte cells under the action of hydrophilic non-aqueous solvents // *Farmakom.* 1998. **5**: 43. [in Russian].
18. Ivanov L.V., Georgievsky V.P. Study of the mechanisms of influence of excipients on bioavailability // *Proceedings of the I International Scientific and Practical Conference "Creation, production, standardization, pharmacoeconomics of drugs and biological additives"*, Ternopil. 2004: 19. [in Russian].
19. Liechtenstein G.I. The method of spin labels in molecular biology // *M.: Science.* 1974: 12. [in Russian].
20. Berlera L. Method of spin labels. Theory and Applications // *Moscow: World.* 1979: 639. [in Russian].
21. Ivanov L.V., Cartel N.T. Evaluation of microviscosity of cell membranes of various nature by the method of spin probes // *Supplements of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2012. **5**: 139. [in Russian].
22. Ivanov L.V., Cartel N.T. Characterization of the rheological properties of the surface of nanobio objects by the method of spin probes // *Surface.* 2012. **4**(19):C. 334. [in Russian].
23. Rozantsev E.G. Free iminoxyl radicals // *Moscow: Chemistry.* 1970: 216. [in Russian].
24. Nardid OA, Cherkashina Ya.O., Ivanov L.V., Nardid E.O., Lyapunov A.N., Mamontov V.V. Effect of propylene glycol and polyethylene glycol with a molecular weight of 1500 on the microviscosity of erythrocyte membranes // *Problems of cryobiology and cryomedicine.* 2016. **26**(1): 35. [in Russian].
25. Ivanov L.V., Lyapunov A.N., Cartel N.T., Nardid O.A., Okotrub A.V., Kirilyuk I.A., Cherkashina Ya.O. Delivery of lipophilic spin probes with carbon nanotubes to erythrocytes and blood plasma // *Surface.* 2014. **6**(21): 292. [in Russian].
26. Ivanov, LV, Moiseev, VA, Gavrilova, et al. Method for determining the degree of cell destruction // *A. p. USSR 1049808. Publ. 06/23/1983, Byul. N. 39.* [in Russian].
27. Ivanov L.V., Lyapunov A.N., Cartel N.T. et al. Comparative study of the effect of a number of pharmaceutical excipients on the microviscosity of the erythrocyte membranes of human and rat blood by the method of spin probes // *Pharmacology and licoric toxicology.* 2016. **47**(1): 72. [in Russian].
28. Ivanov LV, Kartel N.T., Lyapunov AN and other. Study of mechanisms of cytotoxicity of a number of hydrophilic poloxamers by spin probe // *Pharmacology and drug toxicology.* 2015. **45**(4–5): 46. [in Ukrainian].

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕЙ БОЛЬШОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ И НЕСКОЛЬКИХ ПОЛОКСАМЕРОВ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ И ТЕКУЧЕСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ СПИНОВОГО ЗОНДА

Л.В. Иванов¹, А.В. Щербак², М.Т. Каргель¹

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

²Харьковская зооветеринарная академия, ул. Академическая 1, пгт. Малая Даниловка, Дергачевский район, Харьковская обл., 62341, Украина, info@hdzva.edu.ua

Методом спиновых зондов изучены механизмы влияния полиэтиленгликолей (ПЭГ) на текучесть липидов мембран эритроцитов, возможного плавления липидов мембран и нарушения целостности мембран эритроцитов со временем. Введение 15 % ПЭГ-1500 в эритроциты человека и крысы показало увеличение текучести липидов мембран эритроцитов на 16 или 30 %, но затем текучесть мембран уменьшалась в результате дегидратации и сжатия клетки. Введение гидрофильных полуксамер 407 и 338 в эритроциты приводило к плавлению липидов мембран (эффект увеличения текучести мембран 50 - 70%), но целостность большинства клеток сохранялась. Перед разрушением мембран вязкость цитозоля резко падала и наблюдалась анизотропия спектров ЭПР, связанная с существенными изменениями в структуре цитозоля эритроцитов. Привлечение к эксперименту полуксамеров, содержащих этиленгликольные и пропиленгликольные звенья, показало механизмы истинного плавления мембран с максимальным увеличением текучести липидов (эффект 70 %), граничащей с частичным гемолизом и коагуляцией клеток. Плавления фосфолипидов мембран эритроцитов под действием полуксамеров 407 и 338 продемонстрировало, что настоящей причиной плавления служат гидрофобные метиленовые группы ПЭГ или звенья пропиленгликоля полуксамеров, разрушающих структуру мембран клеток по всем направлениям.

Ключевые слова: текучесть липидов, плавление, мембраны эритроцитов, аксон седалищного нерва, полиэтиленгликоль, метод спиновых зондов, дегидратация клеток, целостность эритроцитов.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF POLYETHYLENE GLYCOLS OF THE GREAT MOLECULAR MASS AND A NINE POLYCASSAMERS ON THE COMPATIBILITY AND MOLECULARITY OF ERYTHROCYTE MEMBRANES BY THE SPIN ZONE METHOD

L.V. Ivanov¹, O.V. Scherbak², MT Kartel¹

¹*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, 17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, e-mail: nikar@kartel.kiev.ua;*

²*Kharkov Veterinary Academy, 1 Academic Str., smt. Malaya Danilovka, Dergachevsky district, Kharkiv region, 62341, Ukraine, info@hdzva.edu.ua*

Spin-probe methods studied the mechanisms of influence of polyethyleneglycols (PEG) on the fluidity of lipid membranes of erythrocytes, the mechanisms of possible membrane lipid membrane and mechanisms of violation of the integrity of membranes of red blood cells over time. The administration of 15% PEG-1500 in human erythrocytes and rats showed increased fluidity of membranes of erythrocytes by 16 or 30 %, but then membrane fluidity decreased due to dehydration and cell compression. The introduction of hydrophilic poloxamer 407 and 338 into erythrocytes led to the melting of lipid membranes (the effect of increasing the fluidity of membranes 50-70 %), but the integrity of most cells remained. Before the destruction of the membranes, the viscosity of the cytosol decreased sharply and anisotropy of the EPR spectra was observed, which was associated with significant changes in the structure of the red cell cytosol. Involving the experiment, poloxamers containing ethylene glycol and propylene glycol, showed the mechanisms of genuine melting of membranes with a maximum increase in lipidity (70 % effect), which is bounded by partial hemolysis and cell coagulation. Melting of phospholipids of membranes of erythrocytes under the action of poloxamers 407 and 338 showed that the real reason for melting are hydrophobic methylene groups of PEG or propylene glycol poloxamers, which destroy the structure of cell membranes from all directions.

Key words: *lipid fluidity, melting, erythrocyte membrane, axillary proximal nerve, polyethyleneglycols, spin probe method, cell dehydration, erythrocyte integrity.*