

УДК 577.337.08:536.62:61

Федів В.І., док. фіз.-мат. наук, професор
Микитюк О.Ю., канд. фіз.-мат. наук, доцент
Олар О.І., канд. фіз.-мат. наук, доцент
Кульчинський В.В., канд. фіз.-мат. наук,
Бірюкова Т.В., канд. техн. наук, доцент
Микитюк О.П., канд. мед. наук, доцент

Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний університет»
Театральна площа, 2, Чернівці, 58002, Україна
e-mail: fediv.volodymyr@bsmu.edu.ua

РОЛЬ МІКРОКАЛОРИМЕТРИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У МЕДИЦИНІ І ФАРМАЦІЇ

Стаття присвячена огляду деяких практичних застосувань мікрокалориметричних методів дослідження для потреб медичної і фармацевтичної науки та практики. Основним регулятором хімічних процесів – процесів обміну речовин у біологічних системах – є закони термодинаміки. Кількісним вивченням енергетичних перетворень, що відбуваються в живих організмах, структурах і клітинах, чи природи та функції хімічних процесів, що лежать в основі цих перетворень, займається біологічна термодинаміка. Мікрокалориметрія є незамінним інструментом для визначення термодинамічних параметрів системи, що необхідно як при дослідженні структури біологічної системи, так і процесів, які відбуваються в системі. Дія ліків на біологічну систему та процеси створення нових лікарських засобів також характеризуються зміною термодинамічних показників. Бібл. 43.

Ключові слова: мікрокалориметрія, термодинаміка, фазові переходи, медицина, фармація

Вступ

Мікрокалориметри – це прилади для вимірювання невеликих кількостей тепла, що виникає в замкнутих об'ємах, які називають реакційними камерами. Мікрокалориметричні дослідження важливі в медицині і фармації, оскільки більшість фізико-хімічних і біологічних процесів супроводжуються тепловими ефектами, що дає можливість отримувати фундаментальну інформацію про характер перетворення енергії в системі. Мікрокалориметри використовуються для вивчення фазових переходів у твердому і рідкому станах, утворення комплексів, констант рівноваги, для дослідження взаємодій між твердими речовинами і газами та рідинами, вимірювання теплот гідратації, розчинення, адсорбції, ентальпії, теплоємності та теплопровідності. Важливою є також можливість вивчення термогенезу мікроорганізмів, процесів обміну речовин на різних рівнях організації живої системи та ін. [1].

Мікрокалориметри класифікують за тепловими умовами вимірювань і за взаємодією реакційної камери з зовнішнім середовищем [2].

Основна частина

Термодинаміка біологічних систем

Закони термодинаміки розроблялися протягом багатьох років як найфундаментальніші правила, які виконуються, коли в термодинамічній системі відбувається обмін енергією. Наслідки законів термодинаміки мають відношення майже до кожного аспекту наукового дослідження.

Для розуміння законів термодинаміки оперують такими поняттями, як теплова енергія, температура, теплопередача, термодинамічний процес [3]. Закони термодинаміки не враховують специфічний характер передачі тепла на атомному чи молекулярному рівні, а характеризують загальну енергію і теплові переходи в системі [4].

Живий організм – це енергетична система, де діють ті ж закони термодинаміки, що і в неживій природі. У біосистемах протікають різноманітні енергетичні процеси: дихання, фотосинтез, м'язове скорочення, транспорт речовин тощо. Процеси, які протікають у біосистемах, є незворотними (нерівноважними), тобто при переході системи з одного стану в інший, повернення у початковий стан є неможливим без додаткового притоку енергії ззовні. Дослідження біологічного процесу представляє розв'язування таких трьох завдань: передача енергії, яка залежить виключно від початкового та кінцевого стану системи; механізм залучених реакцій; швидкість цих реакцій.

Відповідно до першого закону термодинаміки різні види енергії можуть переходити з одного виду в інший, але при цих перетвореннях енергія не зникає і не з'являється з нічого. Виконання I закону термодинаміки для біологічних систем довели у 1780 р. Антуан Лавуазьє та П'єр Лаплас. Вони вимірювали кількість тепла (за швидкістю танення снігу) та вуглекислого газу, які виділялися морською свинкою в процесі її життєдіяльності, і порівнювали ці величини з тепловим ефектом реакцій спалювання до CO_2 продуктів споживання. Отримані результати свідчили про відсутність різниці між внутрішньою енергією продуктів споживання і теплом, яке виділялося. Це доводить, що живі організми не є незалежними постачальниками енергії, а лише здійснюють перетворення одних видів енергії в інші. Застосування першого закону термодинаміки до живих систем полягає в тому, що енергія, яка надходить у живі організми з їжею, розподіляється у процесі споживання на дві частини:

- виділяється в середовище у вигляді тепла та енергії, що міститься у продуктах життєдіяльності;
- відкладається в клітинному матеріалі.

Сума цих двох частин дорівнює внутрішній енергії їжі, що надходить до організму [5].

Перший закон термодинаміки біологічних систем вказує на те, що довільна біологічна система (клітина, людський організм та ін.) є відкритою термодинамічною системою. Цей закон встановлює кількісні співвідношення між кількістю тепла, роботою і зміною внутрішньої енергії термодинамічної системи, але не визначає напрямок термодинамічних процесів.

Енергетичний баланс організму вивчається методами прямої і непрямой калориметрії. У першому випадку людину поміщають в ізольовану камеру, в якій визначають кількість

теплоти, що випромінюється живим організмом при різних процесах нормальної фізіологічної діяльності. Непряма калориметрія заснована на розрахункових методах з використанням дихальних коефіцієнтів (співвідношення між об'ємом вуглекислого газу, що виділився і об'ємом кисню, що поглинувся; для вуглеводів він дорівнює 1.0, білків – 0.8, жирів – 0.7) і калоричного еквіваленту кисню (кількості теплоти, що виділяється при витраті 1 л кисню; для вуглеводів він дорівнює 21.2 кДж, білків – 20.09 кДж, жирів – 19.6 кДж).

Для опису теплових ефектів у біологічних системах найчастіше використовують ентальпію (показує загальний вміст тепла системи), оскільки всі процеси в клітинах відбуваються за постійного тиску:

$$\Delta H = \Delta U + p \Delta V,$$

тут $p \Delta V$ – «немеханічна» робота.

Ентальпія відображає здатність систем до виконання немеханічної роботи та вивільнення теплоти, а також кількість та типи хімічних зв'язків у реагентах та продуктах реакції. Ентальпія є функцією стану, тому неможливо визначити абсолютне значення ентальпії, проте зміна ентальпії пов'язана з термодинамічним процесом може бути виміряна точно. В ізохоричному процесі вся теплота, отримана системою, йде на зміну внутрішньої енергії, тобто $Q_V = \Delta U$. Тому зміна внутрішньої енергії в деякому процесі може бути виміряна при протіканні його в калориметрі при постійному об'ємі. В ізобарному процесі система витрачає тепло на виконання роботи, тому $Q_P = \Delta H$.

Достатня точність вимірювання енергетичного балансу досягається за умов, що організм не виконує механічної роботи і в ньому не нагромаджується біомаса. У такому разі енергетичні зміни ΔH у біологічній системі можна точно зареєструвати калориметром, якщо вимірювати виділену теплоту. Якщо значення $\Delta H > 0$, то теплота поглинається, а реакція називається ендотермічною. Якщо $\Delta H < 0$, то система виділяє теплоту, а реакція називається екзотермічною. Більшість метаболічних реакцій є екзотермічними.

Уся енергія, що надходить в організм, перетворюється в теплоту. Під час утворення АТФ лише частина енергії запасається, велика її частина розсіюється у вигляді тепла. Якщо енергія АТФ використовується функціональними системами організму, то велика частина цієї енергії також переходить у теплову. Частина енергії, що залишилася в клітинах, витрачається на виконувани ними функції, проте все одно перетворюється в теплоту. Наприклад, енергія, яка використовується м'язовими клітинами, витрачається на подолання сил в'язкого опору м'язів та інших тканин. В'язке переміщення спричиняє тертя, яке зумовлює утворення тепла, наприклад, витрати енергії, що передається серцем кров'яному потоку. Під час руху крові по судинах вся енергія перетворюється у тепло внаслідок тертя між шарами крові та між кров'ю і стінками судин. Отже, по суті вся енергія, яка була затрачена організмом, зрештою перетворюється в теплоту, за винятком випадку, коли м'язи виконують роботу із зовнішніми тілами [6].

Тривалий час вважалось, що самовільно протікають тільки процеси, які супроводжуються зменшенням енергії системи (екзотермічні). Однак, відомо багато самовільних ендотермічних процесів (наприклад, розчинення деяких солей, розкладання

вугільної кислоти й ін.), при яких теплота поглинається. При невисоких температурах самовільно протікають, в основному, екзотермічні реакції.

При хімічних реакціях під дією того ж принципу атоми прагнуть з'єднатися в такі молекули, утворення яких призводить до виділення енергії (реакція сполучення). Але більш ймовірними є ті реакції, внаслідок яких зростає число часток (реакції розкладання). Таким чином, самовільні процеси, що відбуваються без зміни енергетичного стану, відбуваються тільки в напрямку, при якому безпорядок у системі зростає й вона переходить у більш ймовірний стан.

Серед термодинамічних функцій, що характеризують енергетичний стан біологічного об'єкта, важливе місце належить ентропії. Ентропія характеризує витрати енергії зазвичай у вигляді тепла при незворотних процесах. Таким чином, ентропія відображає ту частину енергії системи, яка розсіялася, деградувала в тепловій формі і не може вже бути використана для здійснення роботи при сталій температурі. При зворотних процесах зміна ентропії дорівнює нулю ($\Delta S = 0$), а при незворотних вона позитивна ($\Delta S > 0$). Тому, чим меншими в системі є градієнти енергії і чим більше у ній розсіяної у вигляді тепла деградованої енергії, тим більшою є її ентропія.

На впорядкування системи витрачається енергія, тому впорядкована система має певний запас енергії і може виконувати роботу. Цей запас енергії буде неминуче витрачатися внаслідок недостатньої ізоляції системи від навколишнього середовища.

Згідно з формулою Больцмана-Планка ентропія системи пов'язана з ймовірністю:

$$S = k \cdot \ln W,$$

де S – ентропія, k – постійна Больцмана, W – термодинамічна ймовірність.

Якщо штучно створити замкнуту ізольовану систему з дуже малою ймовірною структурою і залишити її саму на себе, то вона буде еволюціонувати до більш ймовірної структури. Тому робимо висновок, що ймовірність має природну тенденцію до зростання, як і ентропія. Ентропію можна інтерпретувати як міру безпорядку у фізичній системі або як міру нестачі інформації щодо структури системи. Оскільки інформація може бути отримана лише внаслідок витрат енергії, тому будь-який дослід, що дає інформацію про фізичну систему або довільні фізичні виміри параметрів системи можуть бути виконані в результаті збільшення ентропії системи чи її оточення. Причому середнє збільшення ентропії згідно з другим законом термодинаміки завжди більше ніж отримувана інформація [7].

Ентропія має позитивні значення, пов'язані зі збільшенням невпорядкованості і, навпаки. Зокрема, вивільнення структурованих молекул води, що оточують зв'язуючі поверхні, зазвичай, вважається джерелом позитивної ентропії внаслідок посилення невпорядкованості системи. І, навпаки, збільшення впорядкованості системи через, наприклад, введення конформаційних обмежень у комплексі зв'язування відображається негативними значеннями ентропії [8].

Практична відсутність оборотних процесів у біологічних системах обумовлює той факт, що усі процеси, які в них відбуваються, супроводжуються збільшенням ентропії. Отже, в біосистемах не вся вільна енергія, що витрачається при певному процесі, переходить у корисну роботу. Частина її розсіюється у вигляді тепла. Відношення кількості виконаної роботи до кількості витраченої на неї вільної енергії називається коефіцієнтом корисної дії (ККД) біологічного процесу. Так, м'язове скорочення здійснюється з

ККД $\sim 30\%$, гліколіз $\sim 36\%$. Зустрічаються, проте, і такі процеси, які близькі до зворотних, тобто ККД яких є високим. Наприклад, свічення деяких тропічних комах має ККД 98-99 %, розряд електричних риб – 98 %. Причина такого високоефективного використання вільної енергії поки що не зовсім зрозуміла. Таким чином, чим суттєвішим є збільшення ентропії при даному процесі, тим ймовірнішою є незворотність цього процесу.

Живі організми зберігають низький рівень ентропії в часі, тому що вони отримують енергію з оточуючого середовища у вигляді їжі. Ця енергія вивільнюється при окисненні речовин, що супроводжується споживанням кисню і виділенням вуглекислого газу.

Другий закон термодинаміки має на увазі принцип, що загальна ентропія повинна постійно зростати. Хоча термодинаміка самотійно не описує процеси як функції часу, другий закон термодинаміки визначає напрямок в якому значення загальної ентропії зростає.

Виникає питання, чи може самовільний процес бути зворотним? Другий закон термодинаміки відповідає, що це можливо шляхом створення еквівалентної або ще більшої неупорядкованості десь в іншому місці. Наочним прикладом є фотосинтез. Двоокис вуглецю, вода й інші поживні речовини поглинаються рослинами, і за їх рахунок синтезуються складні молекули вуглеводів. Цей процес супроводжується зниженням ентропії. Фотосинтез без сонячного світла неможливий. Тому зменшення ентропії при синтезі вуглеводів у рослинах компенсується зростанням ентропії на Сонці. Багато інших важливих біохімічних процесів також здійснюються зі зменшенням ентропії – утворення біополімерів (білків, нуклеїнових кислот і ін.), активний транспорт іонів через клітинні мембрани й т.п. Але живий організм – відкрита система, а в ній ентропія може зростати, залишатися незмінною або зменшуватися залежно від кількості ентропії, утвореної всередині системи, її притоку ззовні або відтоку в зовнішнє середовище. Наш Всесвіт теж не є ізольованою системою і тому йому «теплова смерть» – стан максимальної ентропії – не загрожує.

Ентропія – рушійна сила для розгортання білків. Природний стан білка характеризується низьким значенням ентропії, тому що його конформація сильно обмежена. З іншої сторони, розгорнута форма може існувати в багатьох різних конформаціях, навіть якщо кожна амінокислота приймає тільки три положення, поліпептидний ланцюг із 100 амінокислот може прийняти 3^{100} або 10^{47} різних конформацій. Оскільки результат реакції розгортання білка може перебувати у великій кількості еквівалентних станів у порівнянні з природним станом, ентропія зростає впродовж реакції розгортання. При згортанні білка втрата ентропії повинна бути збалансована вкладом ентальпії у вільну енергію, яка сприяє згортанню. Значні нековалентні сили водневих зв'язків та інших фізичних взаємодій компенсують невелику ентропію. Зміни ентропії розчинника – води – відіграють важливу роль у компенсації втрати конформаційної ентропії. В природньому стані, багато неполярних залишків амінокислот, які упаковані в білок, секвеструються (відділяються) подалі від води. В розгорнутій формі ці залишки оброблені молекулами води, які вибудовуються навколо неполярних залишків у кліткоподібні структури. Реорганізація мережі водневих зв'язків відбувається так, що кількість водневих зв'язків зберігається. Це впорядкування молекул води знижує її ентропію. Коли білок згортається, ці молекули води вивільняються, а неполярні залишки відділяються від води. Результуюче відновлення ентропії через воду, є домінуючою силою

у згортанні протеїну, і цей ефект, у загальному, відомий як гідрофобний ефект. Тому розчинник має значний вплив на біологічні реакції.

Ентропія відіграє важливу роль у ферментативному каталізі. Зазвичай, реакції в розчині є повільними через ентропійну вартість приведення реагентів та каталізатора разом. Дві і більше молекул об'єднані разом в одну передбачають значну втрату в ентропії. З іншого боку, коли ензими зв'язуються з субстратом, енергія зв'язку, що виділяється, використовується для компенсації втрат в ентропії, які спричиняються формуванням комплексів ензим-субстрат, що знаходяться в стані низької ймовірності, оскільки ензим-каталітичні групи дуже точно орієнтуються. Це відбувається за рахунок зростання константи дисоціації комплексів ензим-субстрат. Невеликі втрати ентропії відбуваються впродовж етапів хімічної реакції, тому що каталітичні групи вже належним чином орієнтовані в комплексах ензим-субстрат, і тому їх ефективна концентрація є дуже високою у порівнянні з відповідними біохімічними реакціями, що відбуваються вільно у розчині [9].

Відповідно до другого закону термодинаміки, спонтанні хімічні реакції, які в біологічних процесах типово відбуваються при постійній температурі та тиску, завжди супроводжуються зменшенням вільної енергії. Вільна енергія – енергія що витрачається на виконання корисної роботи. Всі реакції відбуваються в напрямку стану рівноваги (де більше не відбувається зменшення вільної енергії).

Стійкість будь-якої ізольованої системи визначається співвідношенням ентальпійного й ентропійного факторів. Перший характеризує прагнення системи до впорядкування, тому що цей процес супроводжується зменшенням внутрішньої енергії, другий — показує тенденцію до розупорядкованості, оскільки такий стан найбільш ймовірний. Так, якщо в процесі $\Delta S = 0$ – ступінь безпорядку не змінюється, то процес іде у бік зменшення ентальпії, тобто $\Delta H < 0$. Якщо ж у процесі не відбувається енергетичних змін ($\Delta H = 0$), то процес іде у бік збільшення ентропії, тобто $\Delta S > 0$.

Як критерій самовільності в неізольованих системах була введена нова функція стану, що враховує обидва ці фактори. Ця функція стану для ізобарних процесів називається енергією Гіббса або ізобарно-ізотермічним потенціалом G :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

Для ізохорних процесів вводиться аналогічна енергія Гельмгольца або ізохорно-ізотермічний потенціал F :

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S.$$

При постійній температурі й тиску самовільно можуть протікати тільки ті процеси для яких зміна енергії Гіббса (або Гельмгольца) негативна [8].

Втрачена вільна енергія з'являється як теплота (ентальпія) або збільшення ентропії. Таким чином, спонтанні хімічні реакції від яких залежить життя, можуть відбуватися із споживанням тепла, але тільки ціною збільшення вільної енергії. Наприклад, розгортання білка споживає велику кількість тепла і є прикладом реакції, яка спричинена зростанням ентропії. З визначення ентропії, коли розглядаємо біологічний процес при постійній температурі, зміна ентропії рівна наданому теплу поділеному на температуру. Оскільки за реакцію розгортання білка тепло, що подається є позитивне, тому що воно споживається, зміни ентропії завжди позитивні.

Фармацевтичні матеріали, кристалічні та аморфні, поглинають воду з атмосфери, що впливає на критичні фактори розробки лікарських засобів, такі як виділення кристалічної форми лікарської речовини, сумісність з допоміжними речовинами, підбір лікарської форми, упаковка та термін зберігання. З метою удосконалення знань про фармацевтичні матеріали і можливістю обійти потенційні проблеми шляхом вивчення термодинаміки взаємодії твердих речовин з сорбованою водою було проведено дослідження [10].

При дослідженні підвищення біодоступності ефективного лікувального та профілактичного засобу ловастатину, який блокує початкові стадії синтезу холестерину, систематично визначалися поряд з іншим характеристиками термодинамічні параметри (ΔG , ΔH , ΔS), що характеризували процес розчинності ловастатину у водному розчині аргініну. Отримані дані в кінцевому рахунку дадуть можливість розробити бажані високорозчинні, ефективніші та безпечніші препарати ловастатину [11].

В огляді [12] розглядається роль термодинаміки в алостеричних механізмах, тобто при зміні поведінки в одній частині молекули внаслідок зміни, що відбулася в іншій її частині. Конформаційні зміни супроводжуються значним ростом ентропії. Вплив точкових мутацій на термодинамічні параметри зв'язування та функціонування може виявити енергетичне сполучення сусідніх (і віддалених) амінокислотних залишків при активації.

Визначення того, чи є взаємодія конкретного ліганду-рецептора в рівновазі ентальпійно чи ентропійно стабілізованою, може бути досягнуто за допомогою термодинамічного аналізу. Дослідження показують, що стабілізація ентальпії зазвичай пов'язана з утворенням нових зв'язків (наприклад, водневих зв'язків та взаємодій Ван-дер-Ваальса) у матриці ліганд-рецептор-мембрана, тоді як стабілізація ентропії, зазвичай, характеризується зміщенням впорядкованих молекул води, пов'язаних з утворенням нових гідрофобних взаємодій [13].

Енергетичний обмін у живих системах організований так, що в ньому паралельно йдуть можливі з термодинамічної точки зору реакції (наприклад, розпад вуглеводів до води й вуглекислого газу) і неможливі (біосинтез складних молекул, активний транспорт через клітинні мембрани й т.ін.). Це досягається за рахунок енергетичного спряження, переходу процесу в багатостадійний режим і функціонуванням мультиферментних систем. Механізм енергетичного спряження має місце коли можлива з погляду ентропійного критерію реакція поєднується з реакцією, термодинамічно неможливою, і дає для неї енергію. При цьому вільна енергія першої повинна перевищувати споживану енергію другої. Реакції, що спрягаються, повинні мати спільний компонент – фактор, що з'єднує, яким звичайно є фосфат-іон. Переведення біохімічного процесу в багатостадійний режим дозволяє живому організму легко регулювати синтез тих або інших речовин у необхідних кількостях. Це пояснюється тим, що різниця вільних енергій початкового й кінцевого стану для кожної з окремих стадій звичайно невелика, а тому ймовірність досягнення рівноваги для неї більше, ніж для процесу в цілому. Багатостадійність проходження хімічних перетворень у живих системах забезпечується функціонуванням мультиферментних систем, що працюють за принципом молекулярного конвеєру – продукт однієї ферментативної реакції служить субстратом для наступного перетворення.

У живих організмах найбільш поширеним спряженим процесом є активний транспорт, тобто перенос речовини з ділянки меншої її концентрації в ділянку з більшою концентрацією. Такий процес самовільно не може відбуватися, тому що супроводжується збільшенням ступеня впорядкованості системи, тобто зменшенням ентропії. Тому активний

транспорт відбувається тільки у випадку спряження з іншим процесом – джерелом енергії. У процесі спряження частина енергії перетворюється в тепло. ККД перетворення енергії в спряжених процесах для біологічних систем – 0.8-0.9.

У роботі [14] застосовується методологія лінійної незворотної термодинаміки для вивчення загальних систем у нерівноважних станах, в яких враховується як внутрішній, так і зовнішній внесок у приріст ентропії з метою аналізу ефективності двох спряжених процесів. Результати показують, що існують критерії оптимізації, які можна використовувати спеціально для біологічних систем, де оптимальна конструкція біологічних параметрів, створених природою в умовах максимальної ефективної потужності, призводить до більш ефективних інструментів, ніж ті, що створені в умовах максимальної потужності чи в кращих екологічних умовах.

Вивчення стану живого організму, як відкритої термодинамічної системи, лежить в основі методу калориметрії (лат. calor – тепло + греч. metreo – міряти, вимірювати) – вимірювання кількості тепла, яке виділяється під час різних фізичних, хімічних чи біологічних процесів. Калориметрія біологічних і біохімічних процесів (біокалориметрія) дозволяє кількісно характеризувати енергетичні і теплові ефекти окремих біохімічних реакцій, діяльність клітинних органел і клітин, тканин і органів, організму в цілому. При калориметричних дослідженнях вимірюються величини теплових потоків від живого об'єкта в навколишнє середовище і розраховується кількість виробленого тепла та теплоємність організму; вимір теплоємності знаходять на підставі даних про масу, теплоємність і зміну температури об'єкта.

Безпосереднє виявлення невеликих теплових змін, що супроводжують біологічні реакції, забезпечує універсальний метод виявлення молекулярних взаємодій та представляє значну перевагу перед біохімічними аналізами, що вимагають конкретної розробки та оптимізації для кожної досліджуваної цілі. Калориметрія має також ту перевагу, що проводиться в рідкому стані речовини і не потребує необхідності хімічної модифікації, маркування або іммобілізації.

Мікрокалориметричні методи у медицині, біології та фармації

Принцип калориметрії базується на твердженні про те, що у всіх хімічних реакціях відбуваються зміни енергії, які зазвичай супроводжуються виділенням тепла (екзотермічні) або його поглинанням (ендотермічні). Мікрокалориметрія є високочутливим методом, що виявляє навіть найнезначніші зміни температури в зразках малого об'єму, що дає можливість застосовувати її при розробці біоматеріалів.

Мікрокалориметрія використовується для вивчення реакцій, в яких беруть участь біомолекули, включаючи взаємодії молекул і конформаційні зміни, наприклад згортання білка. Галузі застосування варіюють від підтвердження цільового зв'язування при розробці низькомолекулярних лікарських препаратів до розробки стабільних біотерапевтичних препаратів.

Розглянемо методи мікрокалориметрії, які знайшли широке застосування в медико-біологічних та фармацевтичних дослідженнях.

1. Ізотермічна мікрокалориметрія

Ізотермічна мікрокалориметрія (ІМК) – це лабораторний метод моніторингу в реальному часі та динамічного аналізу хімічних, фізичних та біологічних процесів. Впродовж годин або днів ІМК визначає початок, швидкість, ступінь та енергію цих

процесів для зразків у малих ампулах (наприклад, 3-20 мл) при постійній заданій температурі (в діапазоні 15 °С – 150 °С).

ІМК здійснює цей динамічний аналіз шляхом вимірювання та запису в порівнянні з минулим часом швидкості теплового потоку (мкДж/сек = мкВт) до ампули зі зразком або від неї, а також сукупною кількістю спожитої чи виробленої кількості тепла.

ІМК є потужним і універсальним аналітичним інструментом з наступних тісно пов'язаних причин:

- всі хімічні та фізичні процеси є або екзотермічними, або ендотермічними - виробляють або споживають тепло;
- швидкість теплового потоку пропорційна до швидкості процесу, що відбувається;
- ІМК чутливий для виявлення та спостереження за дуже повільними процесами у кількох грамах матеріалу або процесами, які генерують незначну кількість тепла (наприклад, метаболізм кількох тисяч живих клітин);
- інструменти ІМК, як правило, мають широкий динамічний діапазон – одним і тим же приладом можна виміряти теплові потоки від приблизно 1 мкВт і аж до 50 000 мкВт.

Метод ІМК вивчення швидкості процесів широко застосовується на практиці, забезпечує постійні дані в режимі реального часу та є чутливим. Вимірювання проводяться досить просто, не потребують нагляду та флуоресцентних чи радіоактивних маркерів.

Однак існують застереження, які необхідно пам'ятати при використанні ІМК:

- якщо використовуються ампули, приготівлені ззовні, потрібно приблизно 40 хвилин для повільного введення ампули в прилад без істотного порушення заданої температури у вимірювальному модулі. При цьому, довільні процеси, що відбуваються впродовж цього часу, не контролюються.

- ІМК реєструє сукупний чистий тепловий потік, вироблений або спожитий усіма процесами, що відбуваються в ампулі. Тому, щоб бути впевненим, який процес або процеси виробляють вимірюваний тепловий потік, слід бути дуже обережним, як в експериментальній конструкції, так і при первісному використанні відповідних хімічних, фізичних та біологічних аналізів.

Вважається, що можливе застосування ІМК обмежене лише уявою людини, яка вирішує використовувати її як аналітичний інструмент та фізичними обмеженнями методу. Крім описаних вище основних застережень, обмеження включають ще розмір зразка та ампули, а також температури, за яких можна проводити вимірювання. ІМК, як правило, найкраще підходить для оцінки процесів, що відбуваються впродовж годин або днів. Далі основну увагу зосередимо на застосуванні ІМК у медицині, біології та у фармації, висвітлених у недавніх публікаціях.

Для опису досліджень кількісного вимірювання швидкості, з якою виробляється або споживається тепло цілісними малими організмами, тканинними зразками або клітинами (включаючи мікробні) в культурі, використовується термін метаболізм. Метаболізм може бути корисним як діагностичний інструмент, особливо для ідентифікації природи зразка за його тепловим потоком при заданих умовах, або для визначення обмінних процесів.

Для визначення метаболізму за допомогою ІМК повинно бути достатньо клітин, тканин або організмів, які були присутніми спочатку (або додалися пізніше, якщо відбувається реплікація під час вимірювань ІМК), щоб генерувати сигнал теплового потоку вище заданої межі виявлення приладу.

У роботі [15] описано зв'язок швидкості обміну речовин з масою об'єкта і як він масштабується у всьому діапазоні від молекул і мітохондрій до клітин. Автори відзначають, що хоча швидкість метаболізму даного типу клітин ссавців *in vivo* значно знижується із збільшенням розміру (маси) тварин, розмір тварини-донора не впливає на швидкість метаболізму клітини при культивуванні в пробірці. Розширення теоретичних та емпіричних аналізів масштабування до суборганізмів рівнів потенційно може мати важливе значення для клітинної структури та її функцій, а також для метаболічної основи старіння.

Клітини ссавців у культурі мають швидкість обміну речовин приблизно 30×10^{-12} Вт/клітину. Інструменти ІМК мають чутливість не менше 1×10^{-6} Вт (тобто 1 мкВт). Тому практично виявляється метаболічна теплота приблизно 33000 клітин. Виходячи з цієї чутливості, ІМК використовували для проведення великої кількості піонерських досліджень метаболізму культивованих клітин ссавців у 1970-1980-х роках у Швеції. Відомі дослідження ІМК теплового потоку від культивованих еритроцитів людини, тромбоцитів, лімфоцитів, клітин лімфоми, гранулоцитів, адипоцитів тощо, скелетних м'язів і тканин міокарда. Дослідження проводилися для визначення можливості використання ІМК як методу клінічної діагностики та встановлення метаболічних відмінностей між клітинами здорових людей та осіб із різними захворюваннями чи проблемами зі здоров'ям [16].

ІМК був застосований для оцінки антиген-індукованої проліферації лімфоцитів [17] та виявив аспекти проліферації, які не спостерігалися при звичайному методі аналізу безперервного радіоактивного маркера. ІМК також використовували в галузі тканинної інженерії. Дослідження [18] продемонструвало, що ІМК можна використати для вимірювання швидкості росту (тобто проліферації) в культурі хондроцитів людини, заготовлених для тканинної інженерії.

ІМК застосовується у токсикології при потребі спостереження метаболізму культивованих клітин у режимі реального часу та кількісного оцінювання швидкості метаболічного спаду як функції концентрації можливо токсичного агента. У дослідженні матеріалів щодо імплантатів [19] як швидко зростаюча культура грибків, так і культура хондроцитів людини піддавалися впливу частинок (діаметром <50 мкм) гідроксиапатиту кальцію та біоактивних частинок силікатного скла, що містять кальцій. Частинки скла уповільнювали або зменшували ріст грибків як функцію підвищення концентрації частинок. Частинки гідроксиапатиту мали набагато менший ефект і ніколи не зменшували повністю ріст грибків при однакових концентраціях. Вплив обох типів частинок на ріст хондроцитів був мінімальним при використанні однакових концентрацій. Автори дійшли висновку, що цитотоксичність твердих частинок, таких як біоактивне скло та частинки гідроксиапатиту, можна оцінити за допомогою методу мікрокалориметрії. Це сучасний метод дослідження *in vitro* біосумісності та цитотоксичності біоматеріалів, який може бути використаний поряд із звичайними аналізами.

У 1980-х роках з'явилися публікації, що свідчили про використання ІМК у мікробіології. Хоча деякі мікробіологічні дослідження ІМС були спрямовані на віруси [20] та грибки [21], найбільше досліджень стосувалося бактерій. У роботі [22] розглядаються методи застосування ІМК у медичній та екологічній мікробіології. У статті повідомляється наскільки точними є дані про тепловий потік та коливання метаболічної активності мікроорганізмів та швидкості реплікації у даному середовищі.

У роботі [23] висвітлено використання мікрокалориметричного методу для оцінки метаболізму кишкової палички (*E. Coli*) та золотистого стафілокока (*S. aureus*). Вимірювання проводилися в герметичних 24-мл скляних ампулах у діапазоні температур від 5 °C до 90 °C. Похибка вимірювань температури становила ± 0.02 °C. Межа виявлення оцінювалася 2 мкВт, а основна стабільність становила 2×10^6 мкВт впродовж 24 годин. Реєструючи тепловіддачу в режимі реального часу оцінювали метаболічну активність бактерій та досліджували вплив екстрактів. За допомогою кінетичної та термодинамічної інформації з мікрокалориметричного методу було отримано ряд важливих кінетичних параметрів: константу швидкості росту, час досягнення максимуму, коефіцієнт інгібування та коефіцієнт гальмування. Константа швидкості росту кишкової палички показала незначні зміни зі збільшенням концентрації алкалоїдів *Aconitum*. Однак константа швидкості росту *S. aureus* зростала, а потім зменшувалася в міру збільшення концентрації алкалоїдів *Aconitum*. Це вказувало на те, що лікування алкалоїдом *Aconitum* уповільнювало ріст і метаболізм *S. aureus*. На основі вивчення впливу різних концентрацій алкалоїдів *Aconitum* на ріст *E. coli* та *S. aureus* був зроблений висновок, що алкалоїди *Aconitum* не впливають на ріст кишкової палички, але потенційно гальмують дію *S. aureus*.

Сучасні ізотермічні мікрокалориметри (ІМК) здатні виявляти метаболічне тепло бактерій із точністю, достатньою для розпізнавання навіть мінімального бактеріального зараження води, продуктів харчування та медичних зразків. Методи ІМК перевершують звичайні методи виявлення за часом виявлення, надійністю та технічними зусиллями. У роботі [24] спостерігалася лінійна залежність між калориметричним часом виявлення та початковими концентраціями бактерій. Це можна використати для кількісної оцінки бактеріального зараження. Дослідження щодо співвідношення між рівнем наповнення (у мм) калориметричної ємності та питомим максимальним тепловим потоком (у мВт·г⁻¹) проілюстрували два абсолютно різні результати для рідких і твердих середовищ. Час виявлення присутності бактерій методом ІМК залежить від початкової кількості наявних бактерій, чутливості інструменту та рівня теплового потоку вище вихідного рівня, який вибрано як показник росту бактерій. Загалом, бактерії мають розмір приблизно 1/10 розміру клітин ссавців і виробляють, можливо, тільки 1/10 метаболічного тепла клітини. Однак деякі бактерії ростуть швидше, ніж клітини ссавців, часто їх кількість збільшується за лічені хвилини. Тому невелика початкова кількість бактерій у культурі, яка спочатку не виявляється ІМК швидко дає кількість, яку можна виявити. Наприклад, 100 бактерій, що подвоюються кожні 20 хвилин, менше ніж за 4 години дадуть більше тепла ніж 330 000 бактерій, і тепловий потік буде визначатися ІМК. Отже, ІМК можна використовувати для легкого, швидкого виявлення бактерій, зокрема для виявлення мікобактерій туберкульозу [25]. З допомогою ІМК вимірюється метаболічна еволюція тепла мікобактерій під час клітинної проліферації і розглядається як можлива альтернатива звичайним діагностичним засобам.

Біоплівка золотистого стафілокока відіграє головну роль при асоційованих із імплантатами інфекціях. Чутливість біоплівки *S. aureus* до даптоміцину, фосфоміцину, ванкоміцину, триметоприму/сульфаметоксазолу, лінезоліду та рифампіцину була досліджена ізотермічною мікрокалориметрією [26]. Крім того, було також проаналізовано постійний статус клітин, виділених із біоплівки *S. aureus* після лікування ванкоміцином. Біоплівка *S. aureus* була стійкою до всіх випробуваних антибіотиків за винятком даптоміцину. Поетапне лікування ванкоміцином для знищення всіх метаболічно активних

клітин та даптоміцином для знищення персистуючих клітин знищило всю популяцію бактерій. Ці результати підтримують використання в клінічній практиці терапевтичної схеми, заснованої на застосуванні двох антибіотиків для знищення персистуючих клітин та викорінення біоплівки *S. aureus*. ІМК є відповідною методикою для характеристики в режимі реального часу реверсії від стійких до метаболічно активних клітин.

Candida auris виникла в усьому світі як полірезистентний грибовий збудник. За допомогою ІМК порівнювали профілі виробництва тепла штамів *C. auris* та інших *Candida* spp. та оцінювали їх протигрибкову сприйнятливість [27]. *C. auris* демонструвала своєрідний профіль виробництва тепла, який відрізняв її від інших видів. Термогенні параметри *C. auris* пропонують повільніші темпи росту порівняно з *C. lusitaniae* та інший чіткий тепловий профіль порівняно з складними штамами видів *C. haemulonii*. Встановлено, що лікування на основі амфотерицину В - потенційний терапевтичний варіант для інфекції *C. auris*.

ІМК для термічно життєздатних мікроорганізмів у чистих культурах та стабілізованих рецептурах досліджувалася у роботі [28]. Кількісне визначення життєздатних мікроорганізмів є важливим кроком у мікробіологічних дослідженнях, а також у формуванні мікробних продуктів для розробки продуктів біологічного контролю або пробіотиків. Методи термічного підрахунку життєздатності - це нові та ефективні методи для швидкого кількісного визначення розбіжних видів бактерій та грибків і підвищення швидкості, чутливості та точності рутинних підрахунків життєздатності чистих культур та контрольованих мікробіомів, таких як покриття рослинного насіння.

Незважаючи на значний прогрес у діагностичних та терапевтичних підходах, грибові інфекції спричинені *C. albicans*, продовжують залишатися серйозною проблемою у відділеннях інтенсивної терапії у всьому світі. Економічна вартість грибових інфекцій крові та пов'язана з ними смертність, особливо у виснажених хворих, залишається високою. *C. albicans* – дуже адаптований мікроорганізм, здатний розвивати резистентність після тривалого впливу протигрибкових препаратів. Формування біоплівки, що зменшує доступність протигрибкового препарату, виділення спонтанних мутацій, що підвищують експресію або знижують сприйнятливість мішені, змінені хромосомні порушення, надекспресія відходів від декількох препаратів та здатність уникати імунного захисту організму – це деякі фактори, які можуть сприяти протигрибковій толерантності та стійкості. Знання механізмів протигрибкової резистентності може дозволити розробити альтернативні терапевтичні варіанти з метою модулювання або повернення резистентності. Огляд [29] зосереджений на чинниках, що беруть участь у протигрибковій резистентності та толерантності у пацієнтів із *C. albicans* інфекціями крові.

У дослідженні [30] вивчали дію флуконазолу, каспофунгіну, анідулафунгіну та амфотерицину В проти видів *Candida* у планктонній формі та біоплівках, використовуючи ІМК, що вимірює зростання виробництва тепла. Був використаний ізотермічний мікрокалориметр, оснащений 48 калориметрами та порогом чутливості 0,2 мкВт. Тепловий потік фіксували впродовж 48 год. Дослідження продемонструвало потенціал мікрокалориметрії для тестування протигрибкової чутливості в режимі реального часу та оцінки протигрибкової активності проти планктонної плівки та біоплівки *Candida*.

Зловживання антибіотиками спричинило підвищення бактеріальної стійкості, що суттєво обмежує застосування антибіотиків для лікування бактеріальних інфекцій. Тому виникла необхідність розробляти нові антибактеріальні препарати. Робота [31] дає уявлення

про вплив традиційної китайської медицини на стійкі до ліків бактерії. Дракотомелон дао - традиційний лікарський матеріал, отриманий з Anacardiaceae з багаторічною історією лікування різних інфекційних захворювань, таких як декубітус та шкірні виразки. Останні дослідження показали, що різні екстракти з листя Д. дао, що містить флавоноїди та фенольні кислоти, виявляють потужну антибактеріальну дію. У цьому дослідженні вивчалися комбіновані протирезистентні до бактерій дії цих активних інгредієнтів. На зразках з листя Д. дао *in vitro* проводили мікрокалориметричні вимірювання та аналіз основних компонентів. Результати показали, що всі шість зразків мали помітну антибактеріальну активність, тому препарат з листя Д. дао може бути використаний як потенційний антимікробний ресурс при лікуванні інфекційних захворювань.

За допомогою додатково оснащеного ІМК, що зробило його особливо цінним для біомедичних та фармацевтичних застосувань, було виявлено зростання *P. mirabilis* у середовищі відвару *Lugia* між 2 та 9 год. дослідження. Культура виділила 2.1 Дж з максимальною тепловою потужністю 76 мкВт. Швидкість росту, обчислена за допомогою калориметричних та спектрофотометричних даних, становила відповідно 0.60 та 0.57 год⁻¹. Зібрані додаткові відомості про протеазну діяльність *P. mirabilis*, що відповідає останньому піку виробництва тепла. Також відстежували ріст мікротканин пухлини, які виявляють максимальну теплову потужність 2.1 мкВт, що відповідає збільшенню діаметра мікротканини приблизно від 100 до 428 мкм. Це відкрило нові напрямки досліджень у онкології, діагностиці та розробці нових протипухлинних препаратів. Для паразитичних червів методика дозволяє оцінити виживання паразитів, використовуючи рухову та метаболічну діяльність навіть однієї особини [32].

2. Ізотермічна титруюча калориметрія

Ізотермічна титруюча калориметрія (ІТК) є однією з найпотужніших методик отримання точної інформації про енергетику біомолекул, що зв'язуються з іншими біологічними макромолекулами. ІТК – термодинамічна техніка, що прямо вимірює вивільнення або поглинання тепла в міжмолекулярних взаємодіях, таких як взаємодія ліганд-протеїн, протеїн-протеїн [8]. Експеримент ІТК складається з калориметричного титрування конкретного об'єму одного з реагентів, зазвичай макромолекули, з контрольованою кількістю іншого реагента, зазвичай ліганди, при постійній температурі та тиску. Таким чином, вимірювана теплота впродовж титрування відповідає ентальпії таких взаємодій [10]. Цей відносно простий експеримент дозволяє здійснювати повну і точну термодинамічну характеристику події зв'язування (константа зв'язування, зміна ентальпії, стехіометрія реакції, зміна теплоємності процесу), що є важливими для розуміння та оптимізації молекулярних взаємодій [33].

Більшість біологічних явищ впливають на міжмолекулярне розпізнавання та взаємодію. Вона є основним інструментом розробки і вивчення лікарських препаратів і регулювання взаємодії білків.

За останні тридцять років ІТК стала потужним інструментом для вивчення великої кількості різноманітних молекулярних взаємодій. Ця методика здатна забезпечити повний термодинамічний профіль процесу взаємодії в одному експерименті, маючи ряд переваг порівняно з іншими порівнянними методами, такими як менша кількість зразка або відсутність необхідності хімічної модифікації чи маркування. Отже, не дивно, що ІТК застосовується для вивчення різноманітних типів взаємодій природних продуктів, щоб отримати нові уявлення про ключові молекулярні чинники, що мають на увазі в процесі

комплексоутворення цього типу сполук. У оглядовій статті [34] описується методика ІТК та розглядаються деякі застосування ІТК для вивчення взаємодій білок-ліганд, взаємодії білок-білок, самоасоціації та процеси розробки ліків. Обговорюється застосування ІТК для визначення кінетичних параметрів реакцій, каталізованих ферментами, а також термодинамічних параметрів. Огляд [35] підтверджує застосування ІТК як потужного інструменту для дослідження взаємодії природних продуктів з білками, нуклеїновими кислотами, олігосахаридами та іншими типами рецепторів.

Ентальпія і ентропія зв'язування при створенні комплексів, які забезпечують вивільнення лікувальних речовин досліджувалася в роботі [36] методом ІТК. Отримана інформація дуже важлива для розробників ліків, оскільки попереджає про врахування особливостей поведінки лікарських засобів у різних середовищах.

Калориметрія ізотермічного титрування - інструмент, здатний визначати термодинамічні, а також кінетичні параметри, пов'язані з розпізнаванням білка-ліганду та відіграє важливу роль у розробці ліків. Подальші зусилля щодо вивчення характеристики зв'язування білок-ліганд на основі ІТК з великою кількістю термодинамічних та кінетичних даних призведе до нових відкриттів, які розширять нашу здатність розуміти весь спектр розпізнавання білка-ліганду та лікувального засобу та належним чином використовувати ці результати для медичних застосувань [37].

3. Диференціальна скануюча калориметрія

Диференціальна скануюча калориметрія (ДСК) є термоаналітичною методикою, при якій різниця у кількості теплоти, необхідної для підвищення температури зразка та еталону, вимірюється як функція температури. І зразки, і еталон підтримуються при майже однаковій температурі впродовж всього експерименту. Як правило, температурна програма для аналізу ДСК розроблена таким чином, що температура утримувача зразка лінійно збільшується як функція часу. Контрольний зразок повинен мати чітко визначену теплоємність у діапазоні температур, що підлягають скануванню.

В основі ДСК лежить принцип, який полягає в тому, що при фізичній трансформації зразка такої як фазові переходи, до нього буде надходити більше або менше тепла, ніж еталонного, щоб підтримувати обидва зразки при одній і тій же температурі. Менша чи більша кількість теплоти надходитиме до зразка, залежатиме від того, є процес екзотермічним чи ендотермічним. Наприклад, якщо твердий зразок розплавити до рідкого стану, йому буде потрібно більше тепла, що надходить до зразка, щоб підвищити його температуру з тією ж швидкістю, що і у еталону. Це пов'язано з поглинанням тепла зразком, оскільки він переживає ендотермічний фазовий перехід від твердого до рідкого стану. Якщо зразок піддається екзотермічним процесам (таким як кристалізація), для підвищення температури зразка потрібно менше тепла. Контролюючи різницю теплового потоку між зразком і еталоном, ДСК здатна вимірювати кількість теплоти, що поглинається або виділяється під час таких переходів. ДСК може також використовуватися для спостереження за тоншими фізичними змінами, такими як склування.

Результатом експерименту ДСК є крива теплового потоку залежно від температури або від часу. Ця крива може бути використана для обчислення ентальпії переходів:

$$\Delta H = K S,$$

де ΔH – ентальпія переходу, K – калориметрична константа, а S – площа під кривою. Калориметрична константа змінюється залежно від приладу, тому її визначають, використовуючи зразки з відомими ентальпіями переходу.

ДСК може бути використана для термодинамічного аналізу білків, а саме дозволяє виявити важливу інформацію про глобальну структуру білків та взаємодію між білками і лігандами. Зокрема, мутації знижують стійкість білків, тоді як зв'язування ліганду зазвичай підвищує стабільність білка [38]. За допомогою ДСК стабільність можна виміряти отриманням значення вільної енергії Гіббса при будь-якій заданій температурі. Це дозволяє дослідникам порівнювати вільну енергію розгортання між білком без ліганду та комплексом білка-ліганду, або між білками дикого типу та мутантами. ДСК також може бути використана при вивченні взаємодії між білками і ліпідами, нуклеотидами, між ліками і ліпідами [39].

ДСК забезпечує повний термодинамічний профіль для розгортання енергії системи. Визначення енергії зв'язування опісля визначається з урахуванням розгортання енергії біомолекул у присутності та відсутності зв'язуючого компоненту. Метод ДСК широко застосовується у фармацевтичній промисловості для визначення параметрів обробки лікарських засобів. Тому, якщо лікарський засіб необхідно доставити в аморфній формі, рекомендовано обробляти препарат при температурі нижче температури кристалізації.

Методом ДСК досліджували розчинність гемфіброзилу – препарату, що знижує рівень холестерину і погано розчиняється у воді. Випробовували розчинники, що використовуються у фармації: воду, метанол, етанол, ізопропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, етиленгліколь, пропіленгліколь, поліетиленгліколь-400, етилацетат, диметилсульфоксид і транскутол у діапазоні температур від 298.2 К до 318.2 К при атмосферному тиску $P = 0.1$ МПа. Встановлено, що максимальна розчинність характерна для транскутолу, мінімальна для води. Термодинамічний аналіз на експериментальних розчинах, показав ендотермічне та ентропійне розчинення гемфіброзилу у кожному фармацевтично використаному розчиннику [40].

Мікро ДСК здатна здійснювати як ізотермічні, так і неізотермічні калориметричні дослідження. Через збільшення розміру комірки та вимог до чутливості швидкість сканування, як правило, невелика (до приблизно $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$). Діапазони температур приблизно від -40°C до $100\text{--}200^{\circ}\text{C}$. Прилад дозволяє контролювати дуже повільну швидкість сканування, наприклад $0.001^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Мікро ДСК у поєднанні з дифракцією рентгенівського випромінювання використовується також для вивчення фазових переходів у біологічних зразках, деградації медичних препаратів, дослідження антивірусних препаратів, для визначення їх термодинамічно стабільних форм [41 – 43].

Висновки

Аналіз практичного застосування ізотермічної калориметрії, ізотермічної титруючої калориметрії і диференціальної скануючої калориметрії у біології, медицині і фармації показує, що дані методики знайшли широке застосування для визначення термодинамічних параметрів системи, зокрема вільної енергії Гіббса, ентальпії, ентропії, які є важливими для розуміння та оптимізації молекулярних взаємодій, фазових переходів у твердому і рідкому стані, вивчення процесів розчинності та кристалізації, що важливо для кращого використання фармацевтичних засобів. Методи мікрокалориметрії застосовуються для вивчення процесів обміну речовин, у тканинній інженерії та токсикології і для практичних потреб мікробіології: дослідження вірусів, бактерій, грибків, головною метою є усунення їх

резистентності до дії медичних препаратів. Результати мікрокалориметричних досліджень використовуються для створення нових лікарських засобів, в тому числі і для протипухлинної терапії.

Література

1. Анатичук Л. И. Термoelementы и термоэлектрические устройства: Справочник. Киев: Наукова думка, 1979. 768 с.
2. Анатичук Л.И., Лусте О.Я. Микрокалориметрия. Л.: Вища школа, 1981. 160 с.
3. Zimmerman J., A. "Laws of Thermodynamics" Feb. 11, 2020. ThoughtCo: веб-сайт. URL: thoughtco.com/laws-of-thermodynamics-p3-2699420 (дата звернення: 29.03. 2020).
4. Application of Thermodynamics to Biological and Materials Science/ Ed. by T. Mizutani. Published by InTech. 2011. 640 p.
5. Григор'єва Л. І., Томілін Ю. А. Основи біофізики і біомеханіки [Текст]: навч. посіб. Миколаїв: ЧДУ ім. Петра Могили, 2011. 297 с.
6. Антонюк В.С., Бондаренко М.О., Ващенко В.А., Канашевич Г.В., Тимчук Г.С., Яценко І.В. Біофізика і біомеханіка: підручник. К.: НТУУ «КПІ», 2012. 344с.
7. Анатичук Л.І., Лусте О.Я., Кобилянський Р.Р. Інформаційно-енергетична теорія термоелектричних сенсорів температури і теплового потоку медичного призначення. *Термоелектрика*. 2017. № 3. С. 5-20
8. Garbett N. C., Chaires J. B. Thermodynamic Studies for Drug Design and Screening. *Expert Opin Drug Discov.* 2012. 7(4). P. 299–314.
9. J. Udgaonkar Entropy in biology, *Resonance*. 2001.6(9). P.61-66.
10. M. Sacchetti Thermodynamics of Water–Solid Interactions in Crystalline and Amorphous Pharmaceutical Materials. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014. 103(9). P. 2772-2783.
11. N.F. Zolkiflee., Meor Mohd Affandi M.M.R, Majeed A.B.A. Thermodynamics and solute-solvent interactions of lovastatin in an aqueous arginine solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. 141(1). 105111.
12. Maksay G. Allostery in pharmacology: thermodynamics, evolution and design. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011. 106(3). P. 463-73.
13. Mitra S. P. Drug-Receptor Interaction: Pharmacology, Binding and Thermodynamics – A Review. *Journal of Surface Science and Technology*. 2009. 25(3-4). P.103-152.
14. Chimal J. C., Sanchez N., Ramírez P.R. Thermodynamic Optimality criteria for biological systems in linear irreversible thermodynamics. *J. Phys.* 2017. *Conf. Ser.* 792. 012082.
15. West G.B. Woodruff W.H. Brown J.H. Allometric scaling of metabolic rate from molecules and mitochondria to cells and mammals. *PNAS*. 2002. 99. P. 2473–2478.
16. Monti M. Application of microcalorimetry to the study of living cells in the medical field. *Thermochimica Acta*. 1990. 172. P. 53–60.
17. Murigande C., Regenass S., Wirz D., Daniels A.U., Tyndall A..A Comparison Between (3H)-thymidine Incorporation and Isothermal Microcalorimetry for the Assessment of Antigen-induced Lymphocyte Proliferation. *Immunological Investigations*. 2009. 38 (1). p. 67–75.
18. Santoro R., Braissant O., Müller B., Wirz D., Daniels A.U., Martin I., Wendt D. Real-time measurements of human chondrocyte heat production during in vitro proliferation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011. 108 (12). p. 3019–3024.

19. Doostmohammadi A., Monshi A., Fathi M.H., Karbasi S., Braissant O., Daniels A.U. Direct cytotoxicity evaluation of 63S bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using yeast model and human chondrocyte cells by microcalorimetry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011. 22 (10). P. 2293–2300.
20. Heng Z., Congyi Z., Cunxin W., Jibin W., Chaojiang G., Jie L., Yuwen L. Microcalorimetric study of virus infection; The effects of hyperthermia and 1b recombinant homo interferon on the infection process of BHK-21 cells by foot and mouth disease virus. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2005. 79 (1). P. 45–50.
21. Antoce O-A., Antocie V., Takahashi K., Pomohaci N., Namolosanu I. Calorimetric determination of the inhibitory effect of C1-C4 n-alcohols on growth of some yeast species. *Thermochimica Acta*. 1997. 297 (1–2). P. 33–42.
22. Braissant O., Wirz D., Gopfert B., Daniels A. U. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010. 303 (1). P. 1–8.
23. Shi Y., Liu L., Shao W., Wei T., Lin G. Microcalorimetry studies of the antimicrobial actions of Aconitum alkaloids *J. Zhejiang Univ Sci B*. 2015. 16(8). P. 690–695.
24. Fricke C., Harms H., Maskow T. Rapid Calorimetric Detection of Bacterial Contamination: Influence of the Cultivation Technique. *Front Microbiol.* 2019. 10. P. 2530.
25. Braissant O., Theron G., Friedrich S.O., Diacon A.H., Bonkat G. Comparison of isothermal microcalorimetry and BACTEC MGIT960 for the detection of the metabolic activity of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples. *J Appl Microbiol.* 2020. doi:10.1111/jam.14549.
26. Butini M., Abbandonato G., Di_rienzo C., Trampuz A., Di_luca M. Isothermal microcalorimetry detects the presence of persister cells in a Staphylococcus aureus biofilm after vancomycin treatment. *Front. Microbiol.* 2019. Feb. 25; 10. 32 p.
27. Di Luca M., Koliszak A., Karbysheva S., A. Chowdhary, Meis J. F., Trampuz A. Thermogenic Characterization and Antifungal Susceptibility of Candida auris by Microcalorimetry. *J. Fungi* 2019. 5(4). 103. 14 p.
28. Nykyri J., Herrmann A.M., Håkansson S. Isothermal microcalorimetry for thermal viable count of microorganisms in pure cultures and stabilized formulations. *BMC Microbiol.* 2019. 19:65. 10 p.
29. Costa-de-Oliveira S., Rodrigues A.G. Candida albicans Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms*. 2020, 8(2), 154.
30. Maiolo E. M., Tabin U. F., Borens O., Trampuz A. Activities of Fluconazole, Caspofungin, Anidulafungin, and Amphotericin B on Planktonic and Biofilm Candida Species Determined by Microcalorimetry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014, 58(5). P. 2709–2717.
31. Xu Z., Li H., Qin X., Wang T., Hao J., Zhao J., Wang J., Wang R., Wang D., Wei S., Cai H., Zhao Y. Antibacterial evaluation of plants extracts against ampicillin-resistant Escherichia coli (E. coli) by microcalorimetry and principal component analysis. *AMB Expr.* 2019. 9:101. 10 p.
32. Braissant O., Keiser J., Meister I., Bachmann A., Wirz D., Göpfert B., Bonkat G., Wadsö I. Isothermal microcalorimetry accurately detects bacteria, tumorous microtissues, and parasitic worms in a label-free well-plate assay. *Biotechnol J*. 2015. 10(3). P. 460–468.

33. Applications of Calorimetry in a Wide Context – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry / Ed. by Amal Ali Elkordy. Published by InTech. 2013. веб-сайт. URL: <https://www.intechopen.com/books/applications-of-calorimetry-in-a-wide-context-differential-scanning-calorimetry-isothermal-titration-calorimetry-and-microcalorimetry> (дата звернення: 29.03. 2020)
34. Atria M.S., Sabouryb A.A., Ahmad F. Biological Applications of Isothermal Titration Calorimetry. *Phys. Chem. Res.*, 2015. 3(4). P. 319-330.
35. Callies O., Hernández Daranas A. Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions. *Nat. Prod. Rep.*. 2016. 33. P. 881-904.
36. Totea A-M., Sabin J., Dorin I., Hemming K., Laity P., Conway B., Waters L., Asare-Addo K.. Thermodynamics of clay – Drug complex dispersions: Isothermal titration calorimetry and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2019. 33 p.
37. Su H., Xu Y. Application of ITC-Based Characterization of Thermodynamic and Kinetic Association of Ligands With Proteins in Drug Design. *Front. Pharmacol.*, 2018. 9. P.1133.
38. Schön A, Brown R.K., Hutchins B.M., Freire E. Ligand binding analysis and screening by chemical denaturation shift *Analytical Biochemistry*. 2013. 443 (1). P. 52–7.
39. Chiu M.H., Prenner E.J. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2011. 3 (1). P. 39–59.
40. Kalam M.A., Alshehri S., Alshamsan A., Alkholief M., Ali R., Shakeel F. Solubility measurement, Hansen solubility parameters and solution thermodynamics of gemfibrozil in different pharmaceutically used solvents. *Drug Dev Ind Pharm*. 2019. 45(8). P. 1258-1264.
41. Lohner K., Prenner E. J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2000. 1462 (1–2). P. 141-56.
42. Pang Y., Buanz A., Telford R., Magdysyuk O. V., Gaisforda S., Williamsa Ga. R. A simultaneous X-ray diffraction–differential scanning calorimetry study into the phase transitions of mefenamic acid, *Journal of Applied Crystallography*. 2019. 52(6). p. 1264-1270.
43. Roque-Flores R.L., Matos J.R. Simultaneous measurements of X-ray diffraction–differential scanning calorimetry. *J Therm Anal Calorim*. 2019. 137. p. 1347–1358.

Надійшла до редакції 29.01.2020

Федів В.І., док. физ.-мат. наук, профессор
Микитюк О.Ю., канд. физ.-мат. наук, доцент
Олар Е.И., канд. физ.-мат. наук, доцент
Кульчинский В.В., канд. физ.-мат. наук,
Бірюкова Т.В., канд. техн. наук, доцент
Микитюк О.П., канд. мед. наук, доцент

Высшее государственное учебное заведение Украины
«Буковинский государственный медицинский университет»
Театральная площадь, 2, Черновцы, 58002, Украина
e-mail: fediv.volodymyr@bsmu.edu.ua

РОЛЬ МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ

Статья посвящена обзору некоторых практических применений микрокалориметричных методов исследования для нужд медицинской и фармацевтической науки и практики. Основным регулятором химических процессов - процессов обмена веществ в биологических системах - есть законы термодинамики. Количественным изучением энергетических преобразований, происходящих в живых организмах, структурах и клетках, или природы и функции химических процессов, лежащих в основе этих преобразований, занимается биологическая термодинамика. Микрокалориметрия является незаменимым инструментом для определения термодинамических параметров системы, что необходимо как при исследовании структуры биологической системы, так и процессов, которые происходят в системе. Действие лекарств на биологическую систему и процессы создания новых лекарственных средств также характеризуются изменением термодинамических показателей. Библ. 43.

Ключевые слова: микрокалориметрия, термодинамика, фазовые переходы, медицина, фармация

V.I. Fediv, Doc.r phys.-math. sciences, professor
O.Yu. Mykytiuk, Cand. phys.-math. sciences, Assoc. Professor
O.I. Olar, Cand. phys.-math. sciences, Assoc. Professor
V. V. Kulchynskyj, Cand. phys.-math. sciences, Assist. Professor
T.V. Biryukova, Cand. techn. sciences, Assoc. Professor
O.P. Mykytiuk, Cand.med. sciences, assoc. professor

Higher state educational establishment of Ukraine
"Bukovinian State Medical University"
Teatralnaya Square, 2 , Chernivtsi, 58002, Ukraine
e-mail: fediv.volodymyr@bsmu.edu.ua

The article is devoted to an overview of some practical applications of microcalorimetric research methods for medical and pharmaceutical science and practice. Laws of thermodynamics are the main regulator of chemical processes and processes of metabolism in biological systems. The quantitative study of the energy transformations occurring in living organisms, structures, and cells, or the nature and function of the chemical processes underlying these transformations, deals with biological thermodynamics. Microcalorimetry is an indispensable tool for determining the thermodynamic parameters of a system, which is necessary for studying of the structure of the biological system and the processes that occur in the system. The effect of drugs on the biological system and the processes of new drugs creating are also characterized by changes in thermodynamic parameters. Bibl. 43.

Keywords: microcalorimetry, thermodynamics, phase transitions, medicine, pharmacy

References

1. Anatychuk L.I. (1979). Termoelementy i termoelektricheskiye ustroystva [*Thermoelements and thermoelectric devices*]. Kyiv: Naukova dumka [in Russian].
2. Anatychuk L.I., Luste O.J. (1981). Mikrokakorimetriia [*Microcalorimetry*]. Lviv, Vyshcha shkola [in Russian].
3. Zimmerman J., A. (2020) "Laws of Thermodynamics." *ThoughtCo*, [thoughtco.com/laws-of-thermodynamics-p3-2699420](https://www.thoughtco.com/laws-of-thermodynamics-p3-2699420).
4. Application of Thermodynamics to Biological and Materials Science (2011) Ed. by T. Mizutani. Published by InTech.
5. Hryhorieva L. I., Tomilin Yu. A. (2011) Osnovy biofizyky i biomekhaniky [*Fundamentals of biophysics and biomechanics*]. Mykolaiv: ChDU im. Petra Mohyly [in Ukrainian].
6. Antoniuk V.S., Bondarenko M.O., Vashchenko V.A., Kanashevych H.V., Tymchuk H.S., Yatsenko I.V. (2012) Biofizyka i biomekhanika: pidruchnyk [*Biophysics and biomechanics*]. Kyiv: NTUU «KPI» [in Ukrainian].
7. Anatychuk L.I., Kobylanskyi R.R., Konstantynovich I.A. (2017) Informatsiino-enerhetychna teoriia termoelektrychnykh sensoriv temperatury i teplovoho potoku medychnoho pryznachennia [Information-energy theory of medical purpose thermoelectric temperature and heat flux sensors] *Termoelektryka – J.Thermoelectricity*. 3: 5-20 [in Ukrainian].
8. Garbett N. C., Chaires J. B. (2012) Thermodynamic Studies for Drug Design and Screening. *Expert Opin Drug Discov.*, 7(4): 299–314.
9. Udgaonkar J. (2001) Entropy in biology, *Resonance*, 6(9): 61-66.
10. Sacchetti M. (2014) Thermodynamics of Water–Solid Interactions in Crystalline and Amorphous Pharmaceutical Materials. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(9): 2772-2783.
11. Zolkiflee N.F., Meor Mohd Affandi M.M.R, Majeed A.B.A. (2020) Thermodynamics and solute-solvent interactions of lovastatin in an aqueous arginine solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 141(1): 105111.
12. Maksay G. (2011) Allostery in pharmacology: thermodynamics, evolution and design. *Prog Biophys Mol Biol.*, 106(3): 463-73.

13. Mitra S. P. (2009) Drug-Receptor Interaction: Pharmacology, Binding and Thermodynamics – A Review. *Journal of Surface Science and Technology*, 25(3-4):103-152.
14. Chimal J. C., Sanchez N., Ramirez P.R. (2017) Thermodynamic Optimality criteria for biological systems in linear irreversible thermodynamics. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 792: 012082.
15. West G.B. Woodruff W.H. Brown J.H. (2002) Allometric scaling of metabolic rate from molecules and mitochondria to cells and mammals. *PNAS*, 99: 2473–2478.
16. Monti M. (1990) Application of microcalorimetry to the study of living cells in the medical field. *Thermochimica Acta*, 172: 53–60.
17. Murigande C., Regenass S., Wirz D., Daniels A.U., Tyndall A. (2009). A Comparison Between (3H)-thymidine Incorporation and Isothermal Microcalorimetry for the Assessment of Antigen-induced Lymphocyte Proliferation. *Immunological Investigations*, 38 (1): 67–75.
18. Santoro R., Braissant O., Müller B., Wirz D., Daniels A.U., Martin I., Wendt D. (2011) Real-time measurements of human chondrocyte heat production during in vitro proliferation. *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (12): 3019–3024.
19. Doostmohammadi A., Monshi A., Fathi M.H., Karbasi S., Braissant O., Daniels A.U. (2011) Direct cytotoxicity evaluation of 63S bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using yeast model and human chondrocyte cells by microcalorimetry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22 (10): 2293–2300.
20. Heng Z., Congyi Z., Cunxin W., Jibin W., Chaojiang G., Jie L., Yuwen L. (2005) Microcalorimetric study of virus infection; The effects of hyperthermia and 1b recombinant homo interferon on the infection process of BHK-21 cells by foot and mouth disease virus. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 79 (1): 45–50..
21. Antoce O-A., Antocie V., Takahashi K., Pomohaci N., Namolosanu I. (1997) Calorimetric determination of the inhibitory effect of C1-C4 n-alcohols on growth of some yeast species". *Thermochimica Acta*, 297 (1–2): 33–42.
22. Braissant O., Wirz D., Gopfert B., Daniels A. U. (2010) Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol. Lett*, 303 (1): 1–8.
23. Shi Y., Liu L., Shao W., Wei T., Lin G. (2015) Microcalorimetry studies of the antimicrobial actions of Aconitum alkaloids *J. Zhejiang Univ Sci B.*, 16(8): 690–695.
24. Fricke C., Harms H., Maskow T. (2019) Rapid Calorimetric Detection of Bacterial Contamination: Influence of the Cultivation Technique. *Front Microbiol.*, 10: 2530.
25. Braissant O., Theron G., Friedrich S.O., Diacon A.H., Bonkat G. (2020) Comparison of isothermal microcalorimetry and BACTEC MGIT960 for the detection of the metabolic activity of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples. *J Appl Microbiol.* doi:10.1111/jam.14549.
26. Butini M., Abbandonato G., Di Rienzo C., Trampuz A., Di_luca M. (2019) Isothermal microcalorimetry detects the presence of persister cells in a Staphylococcus aureus biofilm after vancomycin treatment. *Front. Microbiol.* 10: 332.
27. Di Luca M., Koliszak A., Karbysheva S., A. Chowdhary, Meis J. F., Trampuz A. (2019) Thermogenic Characterization and Antifungal Susceptibility of Candida auris by Microcalorimetry. *J. Fungi.* 5(4):103.
28. Nykyri J., Herrmann A.M., Håkansson S. (2019) Isothermal microcalorimetry for thermal viable count of microorganisms in pure cultures and stabilized formulations. *BMC Microbiol.* 19:65. 10 p.
29. Costa-de-Oliveira S., Rodrigues A.G. (2020) Candida albicans Antifungal Resistance and

- Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms.*, 8(2), 154.
30. Maiolo E. M., Tabin U. F., Borens O., Trampuz A. (2014) Activities of Fluconazole, Caspofungin, Anidulafungin, and Amphotericin B on Planktonic and Biofilm Candida Species Determined by Microcalorimetry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5):2709–2717.
31. Xu Z., Li H., Qin X., Wang T., Hao J., Zhao J., Wang J., Wang R., Wang D., Wei S., Cai H., Zhao Y. (2019) Antibacterial evaluation of plants extracts against ampicillin-resistant Escherichia coli (E. coli) by microcalorimetry and principal component analysis. *AMB Expr.*, 9:101.
32. Braissant O., Keiser J., Meister I., Bachmann A., Wirz D., Göpfert B., Bonkat G., Wadsö I. (2015) Isothermal microcalorimetry accurately detects bacteria, tumorous microtissues, and parasitic worms in a label-free well-plate assay. *Biotechnol J.*, 10(3):460–468.
33. Applications of Calorimetry in a Wide Context – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry (2013). Ed. by Amal Ali Elkordy. InTech.
34. Atria M.S., Saboury A.A., Ahmad F. (2015) Biological Applications of Isothermal Titration Calorimetry. *Phys. Chem. Res.*, 3(4): 319-330.
35. Callies O., Hernández Daranas A. (2016) Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions. *Nat. Prod. Rep.*, 33: 881-904.
36. Totea A-M., Sabin J., Dorin I., Hemming K., Laity P., Conway B., Waters L., Asare-Addo K. (2019). Thermodynamics of clay – Drug complex dispersions: Isothermal titration calorimetry and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.12.001>
37. Su H., Xu Y. (2018) Application of ITC-Based Characterization of Thermodynamic and Kinetic Association of Ligands With Proteins in Drug Design. *Front. Pharmacol.*, 9:1133.
38. Schön A., Brown R.K., Hutchins B.M., Freire E. (2013) Ligand binding analysis and screening by chemical denaturation shift *Analytical Biochemistry*, 443 (1): 52–7.
39. Chiu M.H., Prenner E.J. (2011) Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 3 (1): 39–59.
40. Kalam M.A., Alshehri S., Alshamsan A., Alkholief M., Ali R., Shakeel F. (2019) Solubility measurement, Hansen solubility parameters and solution thermodynamics of gemfibrozil in different pharmaceutically used solvents. *Drug Dev Ind Pharm.*, 45(8):1258-1264.
41. Lohner K., Prenner E. J. (2000) Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1462 (1–2):141-56.
42. Pang Y., Buanz A., Telford R., Magdysyuk O. V., Gaisforda S., Williamsa Ga. R. (2019) A simultaneous X-ray diffraction–differential scanning calorimetry study into the phase transitions of mefenamic acid, *Journal of Applied Crystallography.*, 52(6): 1264-1270.
43. Roque-Flores R.L., Matos J.R. (2019) Simultaneous measurements of X-ray diffraction–differential scanning calorimetry. *J Therm Anal Calorim.*, 137:1347–1358.

Submitted 29.01.2020