



УДК 57.011:577.352:615.01

© 2012

**А. М. Ляхов, В. В. Ковалишин, В. В. Прокопенко**

**Изменения физико-химических параметров  
фосфолипидных монослоев под действием  
физиологически активных веществ как подход  
к прогнозированию проницаемости биологических  
мембран**

*(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)*

*Изучено влияние физиологически активных веществ на физико-химические свойства лэнгмюровских монослойных пленок из дистеароилфосфатидилхолина. Показано, что такие свойства могут быть использованы для прогнозирования проницаемости препаратов через гематоэнцефалический барьер и кожу. Количественные значения физико-химических параметров взаимодействия физиологически активных веществ с монослойными пленками могут быть использованы для построения более точных расчетных моделей ADMET свойств соединений.*

В настоящее время при создании новых лекарственных препаратов исследователи уже на начальных этапах работы прогнозируют целый ряд ADMET свойств — адсорбцию, распределение, метаболизм, выделение и токсичность веществ. Соединения, не соответствующие определенным критериям, имеют мало шансов стать перспективными лекарственными средствами. Прогнозировать ADMET свойства соединений по их структуре без проведения прямых экспериментов дают возможность расчетные методы.

Вместе с тем сопоставление расчетных значений с данными экспериментов свидетельствует о том, что прогнозируемые величины не всегда соответствуют экспериментальным, а иногда и весьма далеки от них [1–3]. В ряде работ показано, что прогноз можно улучшить, если в качестве дескрипторов для расчета использовать экспериментально полученные физико-химические параметры этих соединений [2, 4]. Такими параметрами могут быть данные о взаимодействии препаратов с модельными липидными мембранами [5].

Одним из важнейших ADMET свойств является проницаемость веществ через разные типы биомембран: гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), кожу и др. [4]. Именно проницаемость препарата через разные типы биомембран определяет его биодоступность [4], что имеет принципиальное значение при разработке нового лекарства.

В настоящей работе приведены результаты изучения физико-химических характеристик взаимодействия физиологически активных веществ (ФАВ) с лэнгмюровскими монослойными мембранами из дистеароилфосфатидилхолина. Рассмотрена возможность использования полученных данных для прогноза проницаемости препаратов через биологические мембраны — ГЭБ и кожу.

**Материалы и методы.** Исследованы свойства модуляторов сигнальных систем клетки (“Sigma”, “Serva” и “Aldrich”, США): агониста  $A_1$ -аденозиновых рецепторов теофиллина, активатора  $\beta$ -адренорецепторов изадрина, неселективного антагониста  $\beta$ -адренорецепторов пропранолола и  $H_1$ -гистаминоблокатора димедрола. В исследованиях использовались дистеароилфосфатидилхолин (ДСФХ), *трис*-HCl и хлороформ (“Sigma”, США) без дополнительной очистки.

*Изотерма сжатия лэнгмюровских монослоев.* Исследования проводили на лэнгмюровской ванне “Mini Trough” фирмы “Jouze Loebel Automation” (Великобритания) с объемом 120 мл. В качестве субфазы использовали 5 мМ буферный раствор *трис*-HCl, pH 7,4, в котором растворены ФАВ в концентрации  $10^{-4}$  М. На поверхность субфазы наносили раствор ДСФХ в хлороформе (2 мг липида на 1 мл растворителя). После формирования монослоя (5 мин) проводили сжатие монослоя с помощью подвижного тefлонового барьера. Обработка изотерм сжатия базировалась на результатах исследований Si-Shen Feng и соавт. [6], рассчитывались изменения свободной энергии поверхности раздела субфаза–воздух, возникающие при появлении липида ( $\Delta G$ ), энергетические коэффициенты, характеризующие взаимодействия субфаза–субфаза, субфаза–липид и липид–липид ( $H_{11}$ ,  $H_{12}$  и  $H_{22}$  соответственно), и площадь, занимаемая одной молекулой липида в монослое при нулевом поверхностном давлении ( $S_0$ , Å на одну молекулу).

*Изменения поверхностного давления во времени (ИПДВ)* измеряли на сформированном монослое из ДСФХ, сжатом до поверхностного давления 20 мН/м, при котором фосфолипиды находятся в гелеобразном состоянии, наиболее близком к состоянию реальных мембран [7]. Также изучено ИПДВ при начальном давлении 15 и 25 мН/м. После формирования монослоя в субфазу под поверхность пленки шприцем вводили 1 мл 1 мМ раствора ФАВ, субфазу перемешивали и регистрировали зависимость изменения поверхностного давления от времени.

*Расчетные методы.* Расчеты ADMET свойств проводили с использованием пакета программ ALOGPS 2.1 <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>.

*Липофильность.* Липофильность является важным параметром, который может использоваться для изучения распределения лекарственных препаратов и их взаимодействия с клеткой. Такие процессы, как поглощение, проникновение в клетку и выделение, могут быть спрогнозированы исходя из липофильности препаратов. Чем больше липофильность, тем лучше препарат будет растворяться в липидной фазе и тем больше вероятность проникновения его в клетку [8]. Для характеристики липофильности часто используют коэффициент распределения концентраций препаратов между органическим растворителем (n-октанол) и водой, представляемый в виде десятичного логарифма  $\log P_{OW}$ . С достаточной обоснованностью можно говорить о корреляции между липофильностью вещества и его способностью взаимодействовать с биомембранами. В работах С. Hansh et al. было показано, что вещества со слишком малыми или слишком большими значениями  $\log P_{OW}$  будут проявлять слабую активность по отношению к мембранам, поскольку липофобные препараты не смогут проникать в липидные мембраны, липофильные же вещества будут захватываться мембранами и жировой тканью [8]. Таким образом, на основании значения

$\log P_{OW}$  можно сделать вывод о степени взаимодействия ФАВ с липидной компонентой мембран: накопление вещества в органической фазе ( $\log P_{OW} > 0$ ) свидетельствует о способности препарата взаимодействовать с липидами.

В последнее время параметр  $\log P_{OW}$  все чаще определяют расчетными методами. Сравнительный обзор методов расчета  $\log P_{OW}$  приведен в работе [3]. Расчетные и экспериментальные значения  $\log P_{OW}$  исследованных веществ сведены в табл. 1. Как можно видеть, расхождения между данными, полученными разными расчетными методами, значительны. Так, если исходить из данных о липофильности изадрина, полученных с помощью методов ALOGPs и XLOGP3, можно сделать вывод, что препарат не будет проявлять мембранотропной активности. Однако это противоречит данным, полученным с помощью других расчетных методов, а также результатам экспериментов.

Очевидно также, что сама по себе липофильность препаратов, выраженная через  $\log P_{OW}$ , не может служить для количественной оценки мембранотропности ФАВ. Например, действие теофиллина ( $\log P_{OW} -0,02$ ) приводило к почти сопоставимому с пропранололом ( $\log P_{OW} 3,48$ ) изменению поверхностного давления во времени. В то же время изадрин ( $\log P_{OW} 0,55$ ) оказывает значительно более сильное влияние на параметры модельных мембран, чем пропранолол и димедрол ( $\log P_{OW} 3,27$ ).

**Изменения поверхностного давления во времени.** Мембранотропная активность вещества может быть изучена при непосредственном взаимодействии препаратов с модельными фосфолипидными мембранами. В основе одного из методов изучения таких взаимодействий лежит изменение поверхностного давления липидного монослоя во времени (ИПДВ) под влиянием препаратов [9]. Метод позволяет изучать динамику встраивания молекул препарата в монослой, что дает возможность оценить проницаемость мембран молекулами препарата. Чем больше ИПДВ, тем активнее молекулы препарата взаимодействуют с липидной пленкой.

Результаты определения ИПДВ под действием препаратов приведены в табл. 2. Характер ИПДВ монослоя в присутствии ФАВ зависит от наличия функциональных групп в молекулах препаратов, гидрофобных и гидрофильных участков, заряженных групп атомов, конденсированных структур [9, 10]. Под действием пропранолола поверхностное давление увеличивалось на 2,6 мН/м, тогда как под действием димедрола, не содержащего гидроксильной группы, — на 3,3 мН/м. Можно предположить, что пропранолол и димедрол будут ориентироваться плоскопараллельно относительно границы раздела вода–липид своими нафталиновой и дифенильной структурами. Наличие гидроксильных групп в бензольном ядре молекулы изадрина приводит к увеличению ИПДВ до 7,0 мН/м, что свидетельствует о значительной роли этих групп во взаимодействии с монослоем. Слабое ИПДВ под действием

Таблица 1. Липофильность ( $\log P_{OW}$ ), рассчитанная разными программами

Метод расчета	Теофиллин	Изадрин	Димедрол	Пропранолол
ALOGPs	-0,24	-0,27	3,44	3,03
AC logP	-0,09	1,09	3,10	2,81
ALOGP	-0,58	1,05	3,38	2,54
MLOGP	0,00	0,85	3,26	2,53
KOWWIN	-0,39	0,21	3,11	2,60
XLOGP2	-0,48	1,43	3,16	3,03
XLOGP3	-0,02	-0,57	3,27	2,98
Эксперимент	-0,02 [3]	0,89 [8]	3,27 [3]	3,48 [3]

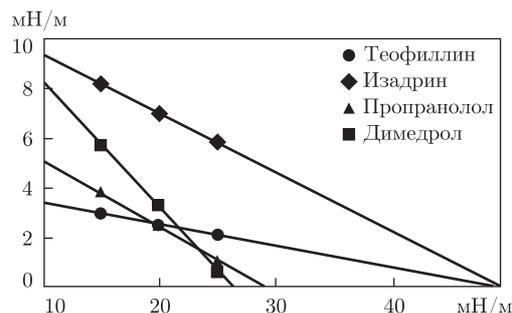


Рис. 1. Определение критического поверхностного давления путем экстраполяции зависимости “ИПДВ” — “начальное поверхностное давление” до нулевого значения начального поверхностного давления

теофиллина (ИПДВ 2,5 мН/м) указывает на незначительное взаимодействие с фосфолипидами, что может быть связано с полярностью молекул ФАВ. По всей видимости, молекула теофиллина ориентируется так, чтобы контакт атомов азота его молекулы с фосфохолиновыми остатками был минимальным.

Таким образом, полученные значения ИПДВ препаратов могут быть успешно использованы для предварительной оценки мембранотропной активности веществ и характера взаимодействия ФАВ с мембраной.

**Использование критического поверхностного давления для прогноза проницаемости через гематоэнцефалический барьер.** Одной из важных характеристик потенциальных лекарственных препаратов является их проницаемость через биомембраны, среди которых существенное значение имеет проницаемость через ГЭБ. Изучение ИПДВ препаратов позволяет смоделировать проницаемость ФАВ через ГЭБ [12, 13]. Сущность метода заключается в определении критического поверхностного давления ( $\pi_{cr}$ ) путем экстраполяции зависимости “начальное поверхностное давление” ( $\pi_i$ ) — “поверхностное давление насыщения” ( $\pi_s$ ) до нулевого значения  $\pi_i$  (рис. 1). Вещества, обладающие способностью проникать через ГЭБ, характеризуются значениями  $\pi_{cr}$  в диапазоне 23–30 мН/м; ФАВ, критическое давление которых превышает 40 мН/м, не способны проникать через ГЭБ [13].

Анализ результатов определения критического давления изученных препаратов (см. табл. 2) свидетельствует о том, что димедрол и пропранолол должны хорошо проходить через ГЭБ. Благодаря значительной липофильности эти препараты будут проникать в мембраны и переноситься через мембрану путем диффузии. Теофиллин и изадрин, не проникая через ГЭБ, могут взаимодействовать с мембранами в основном посредством действия на

Таблица 2. Изменения поверхностного давления во времени и критическое поверхностное давление препаратов

Препарат	ИПДВ, 15 мН/м	ИПДВ, 20 мН/м	ИПДВ, 25 мН/м	$\pi_{cr}$ , мН/м	C. brain/C. blood [11]
Теофиллин	3,0	2,5	2,1	48,2	0,28
Изадрин	8,2	7,0	5,8	49,2	0,65
Димедрол	5,7	3,3	0,6	26,3*	1,61**
Пропранолол	3,7	2,6	1,0	29,0*	1,25**

\* Критическое давление ФАВ меньше 30 мН/м, что указывает на способность препарата проникать через ГЭБ.

\*\* Концентрация ФАВ в мозговом веществе выше, чем в крови, что свидетельствует о проникновении препарата через ГЭБ.

рецепторы. Полученные результаты хорошо согласуются с расчетными данными о проницаемости ГЭБ (см. табл. 2), в соответствии с которыми ФАВ, способные к проникновению через ГЭБ, характеризуются значениями коэффициента распределения больше 1, т. е. препарат накапливается преимущественно в мозговом веществе [11, 12].

Таким образом, совместное применение методов расчета ИПДВ и критического поверхностного давления позволяет оценить встраивание молекул ФАВ в структуру мембран и проницаемость препаратов через ГЭБ. При этом липофильность соединений может дать дополнительную информацию о способности веществ проникать через мембраны.

**Изотерма сжатия лэнгмюровских монослоев.** Еще одним подходом, использованным в нашей работе, было изучение влияния ФАВ на термодинамические и структурные параметры монослойных пленок Лэнгмюра из ДСФХ в условиях их формирования и равномерного сжатия от газообразной фазы до твердотельного состояния (табл. 3).

Изменение площади, приходящейся на одну молекулу липида ( $S_0$ ), свидетельствует о встраивании молекул ФАВ между молекулами липидов или влиянии на размеры гидратной оболочки фосфолипидов [14]. Для изученных препаратов существенное изменение  $S_0$  выявлено для изадрина. Под действием изадрина так же существенно усиливалось взаимодействие между молекулами воды и липида, а также между молекулами липида, что может указывать на компактизацию структуры гидратной оболочки молекул фосфолипидов под действием препарата и на встраивание молекул препарата в монослойную пленку [14]. Слабое влияние димедрола и пропранолола на параметры монослойных пленок может служить подтверждением плоскопараллельной, по отношению к фосфохолиновым остаткам, ориентации молекул препаратов.

Таким образом, результаты изучения влияния молекул ФАВ на структуру липидных монослоев позволяют оценить взаимодействие молекул препаратов с молекулами фосфолипидов. В частности, площадь на одну молекулу липида в поверхности и изменения свободной энергии поверхности липидной пленки под влиянием ФАВ дают количественные характеристики взаимодействия препаратов с мембраной, которые могут быть применены для прогнозирования проницаемости мембран с использованием расчетных компьютерных методов.

**Использование коэффициента эластичности для прогноза проницаемости через кожу.** Фосфолипидные монослои широко используются для изучения пассивной диффузии ФАВ через мембраны. Изотермы сжатия лэнгмюровских монослоев могут быть охарактеризованы коэффициентом эластичности  $K$ , который коррелирует с проницаемостью через кожу [15]:

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

Таблица 3. Влияние ФАВ на термодинамические и структурные характеристики монослойных пленок из дистеароилфосфатидилхолина

Препарат	$S_0$ , Å <sup>2</sup> /молекула	$H_{11}$ , кал/моль	$H_{12}$ , кал/моль	$H_{22}$ , кал/моль	$\Delta G$ , кал/моль
Буфер ( <i>трис</i> -HCl, pH 7,4)	64 ± 1	44 ± 4	-50 ± 1	-399 ± 13	-25 ± 1
Теofilлин, 10 <sup>-4</sup> М	66 ± 2	42 ± 3	-52 ± 4	-412 ± 9	-30 ± 2*
Изадрин, 10 <sup>-4</sup> М	70 ± 1*	37 ± 3	-72 ± 2*	-477 ± 3*	-40 ± 2*
Димедрол, 10 <sup>-4</sup> М	66 ± 2	32 ± 5	-61 ± 3*	-427 ± 21	-33 ± 3*
Пропранолол, 10 <sup>-4</sup> М	65 ± 3	38 ± 4	-63 ± 5*	-448 ± 10*	-31 ± 6

\* Достоверно ( $p < 0,05$ ) отличается от значения для буферного раствора.

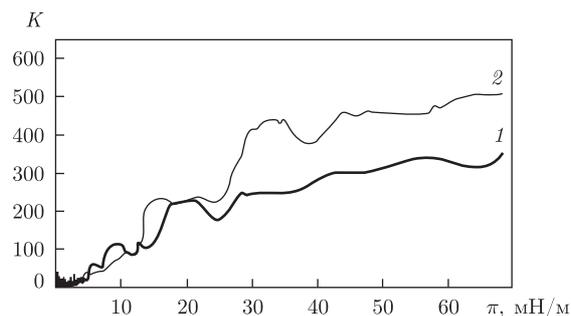


Рис. 2. Зависимость величины коэффициента эластичности от поверхностного давления для димедрола. 1 — контроль, субфаза без ФАВ; 2 — димедрол

где  $A_{\pi}$  — площадь монослойной пленки при поверхностном давлении  $\pi$ ,  $\text{\AA}^2$  на молекулу;  $\pi$  — поверхностное давление, мН/м.

Чем меньше значение  $K$ , тем выше эластичность монослоя и тем более вероятно проникновение (диффузия) ФАВ в мембрану [15]. Увеличение значения  $K$ , по сравнению с величиной коэффициента эластичности монослоя без ФАВ, будет свидетельствовать о проникновении препарата через кожу [15].

Под влиянием димедрола величина коэффициента эластичности увеличивается по сравнению с контролем (рис. 2), из чего можно сделать вывод о том, что димедрол способен проникать через кожу. Это хорошо согласуется с расчетными данными о кожной проницаемости [15], по которым величина коэффициента, характеризующего проницаемость кожи для димедрола, наивысшая:  $\log Kp = -2,15061$  см/ч.

Таким образом, на основании анализа липофильности веществ и взаимодействия ФАВ с монослойными липидными пленками можно охарактеризовать мембранотропность препаратов и проницаемость ФАВ через мембраны, в частности через ГЭБ и кожу.

Результаты изучения взаимодействия ФАВ с монослойными пленками показывают, что димедрол и пропранолол могут проникать через ГЭБ в мозговое вещество, а изадрин и теофиллин не способны к проникновению через ГЭБ. Полученные данные дают возможность сделать прогноз проницаемости кожи препаратами: димедрол будет способен к такой проницаемости, для остальных веществ проникновение через кожу происходить не будет. Таким образом, на основании липофильности веществ и анализа взаимодействия ФАВ с монослойными липидными пленками можно охарактеризовать проницаемость ФАВ через мембраны, например через ГЭБ и кожу.

Количественные значения физико-химических параметров взаимодействия ФАВ с лэнгмюровскими монослоями могут быть использованы для построения более точных расчетных моделей ADMET свойств соединений.

1. *El Tayar N., Tsai R. S., Testa B. et al.* Partition of solutes in different solvent systems: the contribution of hydrogen bonding, capacity and polarity // *J. Pharm. Sci.* – 1991. – **80**. – P. 590–598 & 744–749.
2. *Cheng T., Zhao Y., Li X. et al.* Computation of Octanol-Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge // *J. Chem. Inf. Model.* – 2007. – **47**. – P. 2140–2148.
3. *Mannhold R., Poda G., Ostermann C., Tetko I.* Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of Log P Methods on More Than 96, 000 Compounds // *J. Pharm. Sci.* – 2009. – **98**, No 3. – P. 861–893.
4. *van de Waterbeemd H. L., Artursson P.* Drug Bioavailability. – Weinheim: Wiley-VCH, 2003. – P. 1–6.
5. *Avdeef A., Box K. J., Comer J. E. A. et al.* pH-Metric logPOW 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs // *Pharm. Res.* – 1998. – **15**, No 2. – P. 209–215.

6. Feng Si-Shen, Brockman L. H., Mac-Donald R. C. On osmotic-type equations of state for liquid-expanded monolayers of lipids at the air-water interface // *Langmuir*. – 1994. – **10**. – P. 3188–3194.
7. Ganellin C. R., Brown T. H., Griffith R. et al. Uses of partition coefficients by brain penetration applied to the design of H<sub>2</sub>-receptor histamine antagonists // *QSAR. Rational Approaches to the Design of Bioactive Compounds* / Eds. C. Silipo, A. Vittoria. – Amsterdam: Elsevier. – 1991. – P. 103–110.
8. Leo A., Hansch C., Elkins I. Partition coefficients and their uses // *Chem. Rev.* – 1971. – **71**. – P. 525–616.
9. Casal H. L., Mantsch H. H. Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy // *Rev. Biomembranes*. – 1984. – **779**, No 4. – P. 381–401.
10. Blume A. A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers // *Biochim. et Biophys. Acta. Biomembranes*. – 1979. – **557**, No 1. – P. 32–44.
11. Ajay, Bemis G. W., Murcko M. A. Designing Libraries with CNS Activity // *J. Med. Chem.* – 1999. – **42**. – P. 4942–4951.
12. Singh S., Singh J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and ionophoresis: a review // *Med. Res. Rev.* – 1993. – **13**. – P. 569–621.
13. Yongjun W., Jin S., Hongzhuo L., Zhonggui H. Rapidly profiling blood-brain barrier penetration with liposome EKC // *Electrophoresis*. – 2007. – **28**, No 14. – P. 2391–2395.
14. Lukacova V., Peng M., Fanucci G. et al. Drug-Membrane Interactions Studied in Phospholipid Monolayers Adsorbed on Nonporous Alkylated Microspheres // *J. Biomol. Screen.* – 2007. – **12**. – P. 186–202.
15. El Maghraby G. M. M., Williams A. C., Barry B. W. Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes // *Int. J. Pharm.* – 2004. – **276**, No 1–2. – P. 143–161.

*Институт биоорганической химии  
и нефтехимии НАН Украины, Киев*

*Поступило в редакцию 06.12.2011*

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

### **Зміни фізико-хімічних параметрів фосфоліпідних моношарів під дією фізіологічно активних речовин як підхід до прогнозування проникності біологічних мембран**

*Вивчено вплив фізіологічно активних речовин на фізико-хімічні властивості лангмюрівських моношарових плівок з дистеароїлфосфатидилхоліну. Показано, що такі властивості можуть бути застосовані для прогнозування проникності препаратів через гематоенцефалічний бар'єр та шкіру. Кількісні значення фізико-хімічних параметрів взаємодії фізіологічно активних речовин з моношаровими плівками можуть бути використані для побудови більш точних розрахункових моделей ADMET властивостей сполук.*

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

### **Changes in physico-chemical parameters of the phospholipid monolayers under the influence of physiologically active substances as an approach to the prediction of the permeability of biological membranes**

*The effect of drugs on physicochemical properties of the Langmuir monolayer films made of distearoylphosphatidylcholine is studied. It is shown that these properties can be used to predict the permeability of drugs through the blood-brain barrier and skin. The quantitative values of physico-chemical monolayer film parameters can be used to build more accurate computer models of ADMET properties of drugs.*