

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ
ИМ. В.В. ВОЕВОДСКОГО СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

СЕЛЮТИНА ОЛЬГА ЮРЬЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА
ФИЗИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ
МЕМБРАН**

01.04.17 - химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

д. х. н. Поляков Н. Э.

НОВОСИБИРСК - 2017

Содержание

Содержание.....	2
Введение.....	5
Глава 1. Липидные мембраны и доставка лекарственных препаратов (обзор литературы)...	11
1.1. Структурно-функциональная организация клеточной мембраны.....	11
1.1.1. Состав и строение биологической мембраны.....	11
1.1.2. Искусственные бислойные мембраны.....	11
1.1.3. Механические свойства мембран.....	13
1.1.4. Транспорт через биологическую мембрану.....	14
1.2. Адресная доставка лекарственных препаратов.....	16
1.2.1. Комплексы “гость-хозяин”.....	16
1.2.2. Мицеллы.....	19
1.2.3. Липосомы.....	20
1.2.4. Ниосомы.....	22
1.3. Современные методы исследования взаимодействия лекарств с мембранами.....	23
1.3.1. Спектрофотометрия.....	24
1.3.2. Электронный парамагнитный резонанс.....	24
1.3.3. Рентгеновская дифракция.....	25
1.3.4. Ядерный магнитный резонанс.....	26
1.4. Глицирризиновая кислота: биологическая активность и перспективы для доставки лекарств.....	29
1.4.1. Противовирусная активность ГК.....	30
1.4.2. Противовоспалительная активность ГК.....	32
1.4.3. Гепатопротекторная активность ГК.....	33
1.4.4. Противораковая активность ГК.....	34

1.4.5. Комплексообразование ГК с лекарственными препаратами.....	35
1.4.6. Самоассоциация ГК и её применение для доставки лекарственных препаратов.....	37
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	40
2.1. Комплексы глицирризиновой кислоты с холестерином и продуктами его окисления.....	40
2.2. Эритроциты крови человека.....	40
2.3. Клетки K562.....	41
2.4. Однослойные липосомы.....	42
2.5. Измерение времени обмена через клеточную мембрану.....	42
2.6. Модель диффузии молекулы через клеточную мембрану.....	43
2.7. Измерение упругости клеток методом атомно-силовой микроскопии.....	44
2.8. Метод ЯМР с добавлением шифт-реагентов.....	45
2.9. Метод молекулярной динамики.....	46
2.9.1 Вычисление свободной энергии.....	46
Глава 3. Комплексообразование глицирризиновой кислоты с компонентами клеточной мембраны.....	48
3.1. Комплексообразование холестерина с глицирризиновой кислотой.....	48
3.2 Ассоциаты холестерина с глицирризиновой кислотой - система доставки лекарств.....	51
3.3 Комплексообразование ГК с продуктами окисления холестерина.....	52
3.4 Заключение к главе 3.....	55
Глава 4. Влияние глицирризиновой кислоты на проницаемость клеточных мембран.....	57
4.1 Влияние глицирризиновой кислоты на проницаемость мембран эритроцитов.....	57
4.2 Влияние глицирризиновой кислоты на проницаемость мембран клеток K562.....	58
4.3 Заключение к главе 4.....	63
Глава 5. Влияние глицирризиновой кислоты на свойства мембран эритроцитов.....	65
5.1 Влияние глицирризиновой кислоты на упругость мембран эритроцитов.....	65
5.2 Влияние глицирризиновой кислоты на структуру поверхности эритроцитов.....	66
5.3 Влияние глицирризиновой кислоты на осмотическую стойкость эритроцитов.....	68
5.4 Заключение к главе 5.....	71

Глава 6. Взаимодействие глицирризиновой кислоты с липидной мембраной.....	73
6.1 Влияние ГК на подвижность липидов в мембране эритроцитов.....	73
6.2 Изменение подвижности глицирризиновой кислоты.....	75
6.3 Липидные мембраны, содержащие РОРС и холестерин.....	77
6.4 Сравнение с другими комплексантами.....	85
6.5 Молекулярная динамика взаимодействия ГК с липидным бислоем.....	87
6.6 Заключение к главе 6.....	92
Основные результаты и выводы.....	94
Заключение.....	95
Благодарности.....	96
Список сокращений и условных обозначений.....	97
Список цитируемой литературы.....	98

Введение

Актуальность работы. Глицирризиновая кислота обладает широким спектром собственной биологической активности и способна образовывать комплексы включения со множеством лекарственных препаратов. [1-5] Это открывает широкие перспективы её применения для доставки лекарственных препаратов. Однако для создания средств доставки лекарств на основе глицирризиновой кислоты необходимо понимание механизма её взаимодействия с клеткой и возможных изменений свойств биологической мембраны. Клеточная мембрана формирует границу между внутри- и внеклеточным окружением, обеспечивает целостность клетки и несет барьерные функции, поэтому особенно важно понимание влияния средств доставки на функциональные свойства клеточных мембран: проницаемость, упругость, подвижность липидов, составляющих основу мембраны, а также на жизнеспособность клеток, взаимодействующих со средствами доставки.

В качестве модельных систем для исследования взаимодействия лекарств или средств их доставки используются липосомы - бислойные везикулы, составленные из фосфолипидов. Они являются адекватной моделью клеточной мембраны, имитирующей её барьерные функции и липидный состав. Липосомы, кроме того, сами широко применяются для доставки лекарственных препаратов, поэтому их взаимодействие с глицирризиновой кислотой интересно также с точки зрения создания многокомпонентных систем доставки липид/глицирризиновая кислота.

Особый интерес с точки зрения изменения таких свойств как упругость и проницаемость представляют также эритроциты, так как они являются основными клетками крови, определяющими её реологические параметры, такие как текучесть, и при этом являются достаточно удобным объектом для исследования. Упругость эритроцитов - это параметр, достойный отдельного внимания, так как он определяет время жизни этих клеток, обуславливая их способность проходить через тонкие капилляры. В настоящее время эритроциты рассматриваются также как контейнер для переноски лекарств, поэтому проникновение лекарственного препарата внутрь клетки и его накопление внутри также достойно внимания.

Ввиду наличия собственной противораковой активности глицирризиновой кислоты, интерес представляет также её воздействие на клетки опухолей, моделью которых могут являться клетки миелоидного лейкоза K562. Эти клетки являются удобным объектом для исследования и изучение их взаимодействия с глицирризиновой кислотой может расширить понимание как механизма собственной противораковой активности ГК, так и механизма возможного усиления

противораковой активности лекарственных препаратов в присутствии ГК.

Комплексное исследование влияния средства доставки - глицирризиновой кислоты - на функциональные свойства клеточной мембраны (проницаемость, упругость, подвижность липидов, структура поверхности, осмотическая стойкость) возможно с помощью ряда физико-химических методов: атомно-силовая микроскопия, оптическая спектроскопия поглощения, молекулярная динамика, ядерный магнитный резонанс. Из перечисленных методов, метод ядерного магнитного резонанса обладает наиболее широкими возможностями для понимания процессов, происходящих как в живых, так и в модельных системах *in vitro* на молекулярном уровне. Он позволяет проводить эксперименты в жидкости, при физиологических условиях, в том числе с интактными клетками и получать при этом информацию о различных характеристиках систем: связывании молекулы-доставщика с компонентами клеточной мембраны, изменении проницаемости клеток, изменении подвижности компонент мембраны, происходящем в результате взаимодействия с молекулой-доставщиком. Однако именно комплексное применение различных физико-химических методов позволяет получить наиболее полную информацию о взаимодействии глицирризиновой кислоты с клеточной мембраной.

Целью работы является выявление влияния ГК на физические и функциональные свойства клеточной мембраны с помощью различных физико-химических методов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Обнаружение и исследование комплексов глицирризиновой кислоты с холестерином - компонентом клеточных мембран, ответственным за их текучесть - и с продуктами его окисления
2. Оценка времени ионного обмена через мембрану эритроцитов и клеток K562
3. Оценка проницаемости и характеристика транспорта ионов через мембрану клеток K562
4. Определение влияния глицирризиновой кислоты на осмотическую стойкость мембран эритроцитов
5. Исследование взаимодействия глицирризиновой кислоты с липидной мембраной на модели однослойных липосом и липидного бислоя

Научная новизна

Впервые исследовалось образование комплексов глицирризиновой кислоты с холестерином и продуктами его окисления.

Методом ЯМР измерены времена обмена формиат-ионов через мембрану эритроцитов и

клеток K562 в отсутствие и в присутствии глицирризиновой кислоты.

Установлена способность ГК встраиваться в липидные мембраны. Охарактеризовано влияние ГК на подвижность фосфолипидов в модельных мембранах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Обнаружена способность глицирризиновой кислоты к образованию стабильных ассоциатов с холестерином. Показано, что такие ассоциаты способны захватывать малые молекулы лекарственных препаратов. Данный факт имеет значение для моделирования транспорта лекарственных препаратов в составе супрамолекулярных комплексов со средствами доставки через клеточные мембраны.

Продемонстрировано, что ГК увеличивает проницаемость мембран эритроцитов и клеток миелоидного лейкоза для формиат-ионов. Установлено, что ГК способна встраиваться внутрь модельной липидной мембраны, снижая при этом подвижность её липидных компонент и приводя к образованию пор в модельной липидной мембране, проницаемых для ионов. Это объясняет увеличение проницаемости живых клеток в присутствии ГК. При этом показано, что воздействие ГК не способствует разрушению клеток эритроцитов посредством осмотического гемолиза.

Все полученные результаты имеют практическое значение с точки зрения применения ГК в качестве агента для доставки лекарственных препаратов через клеточные мембраны и способствуют пониманию механизмов усиления биодоступности лекарственных препаратов в составе супрамолекулярных комплексов с ГК.

Положения выносимые на защиту

1. ГК образует супрамолекулярные комплексы с холестерином.
2. ГК повышает проницаемость мембран эритроцитов и клеток миелоидного лейкоза K562 для формиат-ионов
3. ГК снижает модуль упругости мембран эритроцитов
4. ГК способна встраиваться в липидную мембрану, снижая подвижность липидных компонент и приводя к образованию пор при совместном действии с холестерином
5. ГК снижает степень осмотического гемолиза эритроцитов

Апробация работы

Основные результаты были представлены в виде устных и стендовых докладов на 15

российских и международных конференциях: 3rd International Summer School "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology" (Львов, 2010), XLIX Международная научная студенческая конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011), International Conference «Current Topics in Organic Chemistry» (Новосибирск, 2011), XIV Международная научная молодежная школа «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его применений» (Казань, 2011), XXIII Симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2011), X Международная школа молодых ученых «Синтез, структура и динамика молекулярных систем» (республика Марий Эл, 2012), VIII International Voevodsky Conference (Новосибирск, 2012), XXIV Всероссийская конференция «Современная химическая физика» (Туапсе, 2012), 1-ой всероссийской конференции по медицинской химии (Москва, 2013), III School for young scientists "Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics" (Новосибирск, 2014), 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry (Novosibirsk, 2015), 2016 Mogan Mountain International Conference on Green Pharmaceuticals (Deqing, China, 2016), International Conference Recent Advances in Health and Medical Sciences (7th RAHMS, Paphos, Cyprus, 2016), XXVIII Симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2016), IV Молодежная школа с международным участием «Магнитный резонанс и магнитные явления в химической и биологической физике» (Новосибирск, 2016)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 статей в журналах в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук, и в изданиях, индексируемых в базе данных Web of Science:

1. Gluschenko (Selyutina), O. Yu. NMR Relaxation Study of Cholesterol Binding with Plant Metabolites / O. Yu. Gluschenko (Selyutina), N. E. Polyakov, T. V. Leshina // Applied Magnetic Resonance - 2011. - Vol. 41. P. 283-294.
2. Gluschenko (Selyutina), O. Yu. NMR study of cholesterol complexes with glycyrrhizic acid / O. Yu. Gluschenko (Selyutina), N. E. Polyakov, T. V. Leshina // Magnetic Resonance in Solids - 2011. - Vol. 13. P. 5-9.
3. Selyutina, O. Yu. Influence of glycyrrhizin on permeability and elasticity of cell membrane: perspectives for drugs delivery / O. Yu. Selyutina, N. E. Polyakov, D. V. Korneev, B. N. Zaitsev // Drug delivery - 2016. - Vol. 23. - P. 848-855.
4. Селютина, О. Ю. Исследование влияния глицирризиновой кислоты на гемолиз эритроцитов

- и свойства клеточных мембран / О. Ю. Селютина, Н. Э. Поляков, Д. В. Корнеев, Б. Н. Зайцев // Известия РАН, серия химическая - 2014. - Т. 5. - С. 1201-1204.
5. Зеликман, М.В. Структура димеров глицирризиновой кислоты в воде и их комплексов с холестерином. Молекулярно-динамическое моделирование / М. В. Зеликман, А. В. Ким, Н. Н. Медведев, О. Ю. Селютина, Н. Э. Поляков // Журнал структурной химии - 2015. - Т. 56. - С. 67-76
 6. Селютина, О. Ю. Исследование мембраномодифицирующей активности глицирризиновой кислоты / О. Ю. Селютина, И. Е. Апанасенко, Н. Э. Поляков // Известия РАН, серия химическая - 2015. - №7. - С. 1555-1559.
 7. Selyutina, O. Yu. Spectroscopic and molecular dynamics characterization of glycyrrhizin membrane-modifying activity / O.Yu. Selyutina, I.E. Apanasenko, A.V. Kim, E.A. Shelepova, S.S. Khalikov, N.E. Polyakov // Colloids Surf., B - 2016. - Vol. 147. - P. 459-466.
 8. Селютина, О. Ю. Влияние природных полисахаридов и олигосахаридов на проницаемость клеточных мембран / О. Ю. Селютина, И. Е. Апанасенко, А. Г. Шилов, С. С. Халиков, Н. Э. Поляков // Известия РАН, серия химическая - 2017. - №1. - С. 129-135.
 9. Apanasenko, I. E. Solubilization and stabilization of macular carotenoids by water soluble oligosaccharides and polysaccharides / I. E. Apanasenko, O. Yu. Selyutina, N. E. Polyakov, L. P. Suntsova, E. S. Meteleva, A. V. Dushkin, P. Vachali, P. S. Bernstein // Archives of Biochemistry and Biophysics - 2015. - Vol. 572. - P. 58-65.

Личный вклад автора

Автор участвовал в получении образцов эритроцитов. Образцы клеток K562 были предоставлены сотрудником Лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ИЦиГ СО РАН Шиловым А. Г.

Совместно с сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Зайцевым Б. Н. и Корнеевым Д. В. были проведены эксперименты по исследованию модуля упругости и структуры поверхности эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии. Обработка и анализ результатов этих экспериментов были проведены автором самостоятельно.

Подготовка образцов для ЯМР экспериментов, экспериментальные ЯМР измерения были проведены автором лично.

Компьютерные симуляции методом молекулярной динамики были проведены сотрудниками лаборатории молекулярной динамики и структуры А. В. Ким и Шелеповой Е. А. Автор принимал участие в постановке задачи для симуляций и в анализе и интерпретации

результатов.

Постановка задачи, обсуждение результатов полученных в ходе всей работы были произведены совместно с научным руководителем, д. х. н. Поляковым Н. Э.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения и списка литературы, включающего 149 наименований. Работа содержит 110 страниц машинописного текста, в том числе 42 рисунка и 4 таблицы.

Глава 1. Липидные мембраны и доставка лекарственных препаратов (обзор литературы)

1.1. Структурно-функциональная организация клеточной мембраны

1.1.1. Состав и строение биологической мембраны

Биологическая мембрана формирует границу между внутриклеточным пространством и внеклеточным окружением. Она имеет толщину в несколько молекулярных слоев (~5-10 нм) и образуют единую систему канальцев, складок и замкнутых полостей. Биологические мембраны состоят в основном из белков, липидов и углеводов. Белки и липиды составляют основную часть сухой массы мембран. Доля углеводов обычно составляет 10-15%, причем они находятся в основном в связанном состоянии: гликопротеины или гликолипиды. Содержание липидов в мембранах разного происхождения может составлять 25-75% по массе. [6,7]

Совокупность результатов, полученных различными физико-химическими методами исследования, составила основу жидкостно-мозаичной модели строения биологических мембран. Согласно современным представлениям, структурную основу мембраны образует фосфолипидный бислой, инкрустированный различными белками. В зависимости от степени гидрофобности и локализации гидрофобных аминокислотных остатков в полипептидной цепи белки могут быть частично или полностью погружены в липидный слой, либо пронизывать его насквозь. Наиболее слабо связаны с мембраной периферические белки, наиболее сильно погружены в неё - интегральные. В нормальных физиологических условиях липиды находятся в жидком агрегатном состоянии. Таким образом, липидная мембрана представляет собой жидкий слой, по которому плавают белковые «айсберги». Липидный состав мембран может отличаться в зависимости от типа клеток, однако для большинства биологических мембран фосфатидилхолины составляют основную долю: от 18 до 50% от массы всех липидов. Важную роль играет также холестерин, доля которого составляет 5-20% от массы всех липидов.[6,7]

1.1.2. Искусственные бислойные мембраны

Сочетание гидрофильных и гидрофобных свойств мембранообразующих липидов позволяет им образовывать многообразные устойчивые структуры при агрегации в водных средах.

В смеси фосфолипидов с водой термодинамически выгодно, чтобы полярные головы были погружены в воду, а их неполярные хвосты обращены вовнутрь. Такое расположение амфифильных молекул соответствует наименьшему значению энергии Гиббса по сравнению с другими возможными расположениями. Возникающие смеси не представляют собой истинных растворов, а образуют упорядоченные фазы с периодической структурой. В зависимости от количества присутствующей в системе воды эти фазы переходят друг в друга. Из всего разнообразия зарегистрированных фаз наибольший интерес с биологической точки зрения представляют однопространственная ламеллярная и двухпространственная цилиндрическая. Повышенный интерес к небислойным структурам связан со способностью этих структур формировать сквозные поры, резко увеличивающие проницаемость мембран для воды и растворенных веществ. Существенным является то, что молекулы фосфолипидов имеют два хвоста. Такая молекула в пространстве имеет форму, близкую к цилиндру. Присутствие молекул с одним хвостом, имеющих в пространстве форму, близкую к конусу, приводит к образованию поры в бислойной мембране (Рис. 1.1) [6].

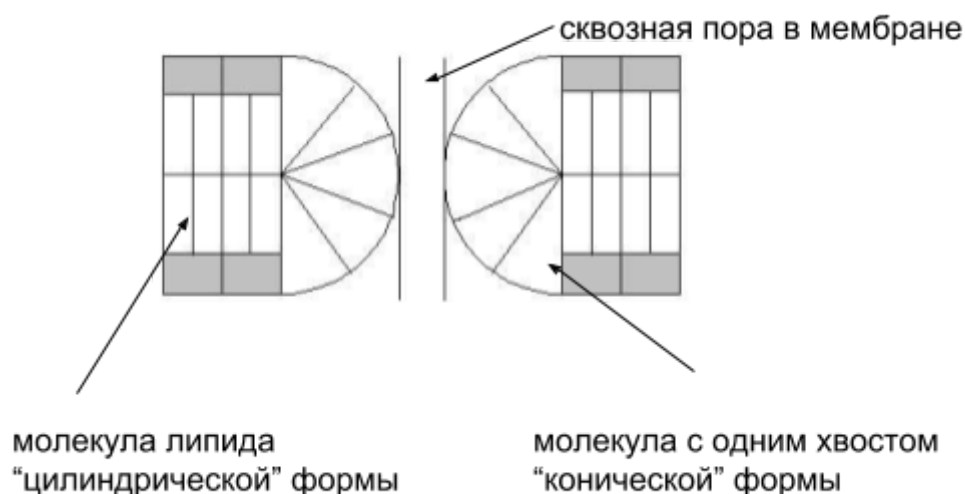


Рис. 1.1. Схематическое изображение липидного бислоя и образование поры в нем.

Плоские ламеллярные структуры при энергичном встряхивании склонны образовывать замкнутые сферические частицы. При простых механических воздействиях образуются в основном многослойные частицы — мультиламеллярные липосомы диаметром в несколько микрометров. Такие липосомы осмотически активны: они изменяются в объеме при изменении осмотических свойств внешней среды. Более энергичное воздействие (например, с помощью ультразвукового излучения) вызывает образование моноламеллярных везикул диаметром 20-40 нм. Такие липосомы являются распространенным модельным объектом для исследований

биологического и медико-биологического характера, однако, малый объем внутренней области и осмотическая неактивность несколько сужает круг этих исследований.[6]

1.1.3. Механические свойства мембран

Существуют несколько типов молекулярных движений липидов в бислойной мембране. Легче всего молекулы липидов совершают вращательные движения вокруг своей длинной оси. Время корреляции вращательного движения τ_c спин-меченных фосфолипидов, стероидов и жирных кислот в мембранах, находящихся в жидком агрегатном состоянии, составляет $\sim 10^{-9}$ с.[6]

Диффузионное движение молекул липидов вдоль слоя также происходит довольно быстро. Коэффициент латеральной диффузии D для спин-меченных и флуоресцентных фосфолипидных зондов составляет $\sim 10^{-7} - 10^{-8}$ см²/с. Скорость латеральной диффузии сильно зависит от липидного состава мембран и температуры. Холестерин, добавленный к яичному лецитину, способен существенно снизить скорость латеральной диффузии.[6]

Третий тип движения липидов в бислое — это трансбислойное движение (флип-флоп переход). Это самый медленный тип движения вследствие высокого энергетического барьера, образованного гидрофобной областью, для пересечения полярной головкой липида. В модельных мембранах время флип-флоп перехода половины молекул-меток из одного полуслоя в другой оценивается примерно в 10-20 ч и более. В природных мембранах этот процесс может происходить значительно быстрее, в мембранах эритроцитов это время составляет 20-30 мин. Отмечено, что при добавлении к мембранам клиновидных молекул (с одним гидрофобным хвостом), вызывающих искривление слоя, скорость флип-флоп переходов резко возрастает.[6]

Важной механической характеристикой биологической мембраны является также её упругость. Под упругостью понимается способность изменять свое натяжение при растяжении/сжатии. [6] Термодинамически обратимым процесс деформации мембран можно считать лишь в случае малых отклонений и низких скоростях деформации. В данных условиях, при постоянной температуре упругая потенциальная энергия мембран совпадает с энергией Гельмгольца:

$$F = U - TS$$

Тогда упругий потенциал F при постоянной температуре равен:

$$(dF)_T = dU - TdS = dW,$$

где W - работа, совершенная над системой. Допуская, что клеточная мембрана изотропна вдоль поверхности, плотность потенциальной энергии можно представить в виде функции двух

независимых переменных, характеризующих два типа деформации: относительного изменения площади поверхности α за счет изотропного растяжения/сжатия и параметра β , характеризующего растяжение/сдвиг поверхности при постоянной площади. Тогда упругий потенциал представляется следующим образом [6]:

$$(dF)_T = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha}\right)_{\beta, T} d\alpha + \left(\frac{\partial F}{\partial \beta}\right)_{\alpha, T} d\beta.$$

В мембранах изотропное растяжение или сжатие происходит относительно равновесного состояния. Это начальное изотропное натяжение можно определить так [6]:

$$\underline{T}_0 = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha}\right)_{\beta, T} |_{\alpha=0}.$$

Связь изменения изотропного натяжения с малыми относительными изменениями площади задается модулем Юнга:

$$E_{\parallel} = \left(\frac{\partial T}{\partial \alpha}\right)_{\beta, T} |_{\alpha=0} = \left(\frac{\partial^2 F}{\partial \alpha^2}\right)_{\beta, T} |_{\alpha=0}.$$

При деформационном напряжении с сохранением площади сопротивление деформации характеризуется поверхностным модулем упругости мембран при сдвиге [6]:

$$\mu = \left(\frac{\partial F}{\partial \beta}\right)_{\alpha, T}.$$

Поскольку клетка является сложной биологической системой, чувствительной к внешним воздействиям, измерение её упругости является сложной экспериментальной задачей. В литературе имеются противоречивые данные о величине модуля Юнга мембран эритроцитов: от 1,4-1,7 кПа. [8] до 11,7 кПа [9]. Такие различия могут быть вызваны различиями в условиях проведения экспериментов. Так, при измерении модуля упругости методом атомно-силовой микроскопии на подложке происходит “растекание” клетки по подложке, сопровождающееся небольшими деформациями, которые могут влиять на измеряемое итоговое значение модуля упругости. [10] Кроме того, значение модуля Юнга может отличаться при измерении в центре клетки и на её краях, ввиду неоднородности толщины поверхности клетки эритроцита. [11] При этом примерно треть величины модуля упругости эритроцита является вкладом липидного бислоя, и две трети - вкладом спектриновой сетки [6].

1.1.4. Транспорт через биологическую мембрану

Транспорт различных веществ через биологическую мембрану — необходимое условие нормального функционирования клетки. Через трансмембранный перенос осуществляются многие процессы, связанные с метаболизмом клетки, образованием биопотенциалов, генерацией нервного импульса и многие другие. Нарушение транспорта веществ через мембраны приводит к различным патологиям, лечение которых часто связано с проникновением лекарств через

клеточные мембраны. Эффективность лекарства в значительной мере зависит от проницаемости для него мембраны.

Выделяют несколько типов переноса вещества через мембрану:

1) Пассивный транспорт

Пассивный транспорт - перенос вещества по градиенту концентрации, не требующий затрат энергии. Прохождение многих незаряженных соединений через мембрану подчиняется законам диффузии и описывается законом Фика [6]:

$$J = -D \frac{dc}{dx},$$

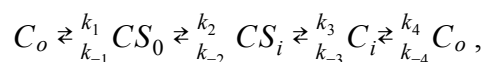
где J - поток вещества в направлении оси x , D - коэффициент диффузии, c - концентрация вещества. Коэффициент диффузии определяется размером и формой молекул. Для малых молекул в воде $D \sim 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$. [6]

Исследования диффузии веществ через биологические мембраны демонстрируют связь между проникающей способностью веществ и их растворимостью в липидах. В связи с этим долгое время считалось, что через мембрану проникают только липофильные молекулы. Однако и другие малые молекулы способны проникать через поры в мембране. [6]

2) Облегченная диффузия

Под облегченной диффузией понимается пассивный транспорт с участием переносчиков. Его отличает высокая специфичность, наличие насыщения - скорость транспорта увеличивается лишь до некоторой предельной величины, а также чувствительность к низким концентрациям ингибиторов, взаимодействующих с переносчиками. [6]

Механизм транспорта с участием переносчика можно описать следующей кинетической схемой [6]:



где C и S - молекулы переносчика и субстрата, а индексы o и i соответствуют наружной и внутренней концентрации, соответственно.

Данная кинетическая схема описывается уравнениями аналогичными уравнениям для ферментативной кинетики, а начальная скорость переноса вещества описывается выражением, аналогичным уравнению Михаэлиса-Ментен. [6]

При очень низкой концентрации субстрата зависимость начальной скорости переноса вещества от концентрации субстрата носит линейный характер, как для случая простой диффузии. В реальных системах общий поток через мембрану обычно имеет компонент, обусловленный простой диффузией (Рис. 1.2). [6]

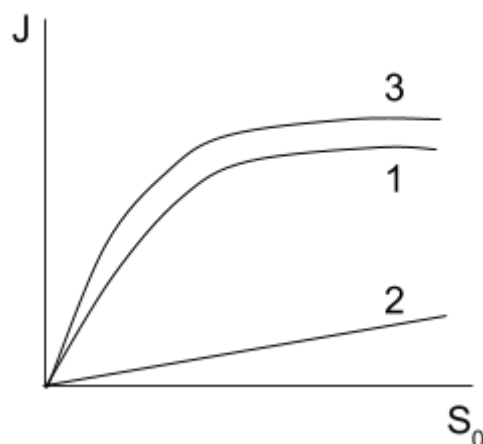


Рис. 1.2. Зависимость начальной скорости переноса вещества J от концентрации в наружной среде S_0 . 1- транспорт с участием переносчика, 2 - простая диффузия, 3 - суммарная скорость переноса.

3) Активный транспорт

Активный транспорт - перенос вещества белками-переносчиками (белками-насосами) с затратами энергии. Градиент концентрации Na, K и Ca между вне- и внутриклеточной средой необходим для поддержания потенциала покоя и электрической возбудимости нервных и мышечных клеток. Распределение Na значительно отличается от равновесного, так как пассивные потоки по градиенту концентрации и в направлении электрического поля направлены внутрь клетки. Поэтому для поддержания низкого неравновесного уровня концентрации Na^+ в клетке необходим механизм активного выведения в среду. Такие системы активного транспорта переносят ионы против градиента электрохимического потенциала за счет энергии АТФ (Na^+ -насос плазматических мембран, Ca^{2+} -насос мембран саркоплазматического ретикулума) или энергии окислительно-восстановительных реакций (H^+ -насос митохондрий, хлоропластов и других энергосопрягающих мембран). Активный транспорт Na^+ в нервных клетках осуществляется Na^+ , K^+ -АТФазой, локализованной в плазматических мембранах, транспорт Ca^{2+} - Mg^{2+} -зависимой Ca^{2+} -АТФазой, локализованной в мембранах саркоплазматической сети. [6, 7].

1.2. Адресная доставка лекарственных препаратов

1.2.1. Комплексы “гость-хозяин”

Концепция комплементарности молекул хозяина и гостя была предложена тремя химиками: Чарльзом Петерсоном, Дональдом Крамом и Жан-Мари Леном, получившими

Нобелевскую премию в 1987 года за свои открытия. Молекулы-хозяева чаще всего имеют некоторое внутреннее пространство (так называемую “полость”), в которую другая молекула, молекула-гость, может встраиваться. Молекула-хозяин, таким образом, является неким искусственным рецептором. Молекула-гость является аналогом субстрата, ингибитора или кофактора. Молекула-гость образует комплексы с молекулой-хозяином с комплементарными стерео-электронными свойствами. Молекулы связываются между собой посредством нековалентных межмолекулярных взаимодействий (сила Ван-дер-Ваальса, водородная связь, гидрофобное взаимодействие). Полученный в результате супрамолекулярный комплекс включения может легко диссоциировать при физиологических условиях. [12]

Яркими примерами молекул-хозяев в доставке лекарственных препаратов являются циклодекстрины. Циклодекстрины (ЦД) - молекулы имеющие тороидную форму с гидрофобной внутренней полостью и гидрофильной внешней поверхностью (Рис. 1.3). Они способны образовывать комплексы включения со множеством молекул-гостей. Химически они представляют собой циклические олигосахариды, содержащие по крайней мере 6 D-(+) звеньев глюкопиранозы, соединенных α -(1, 4)

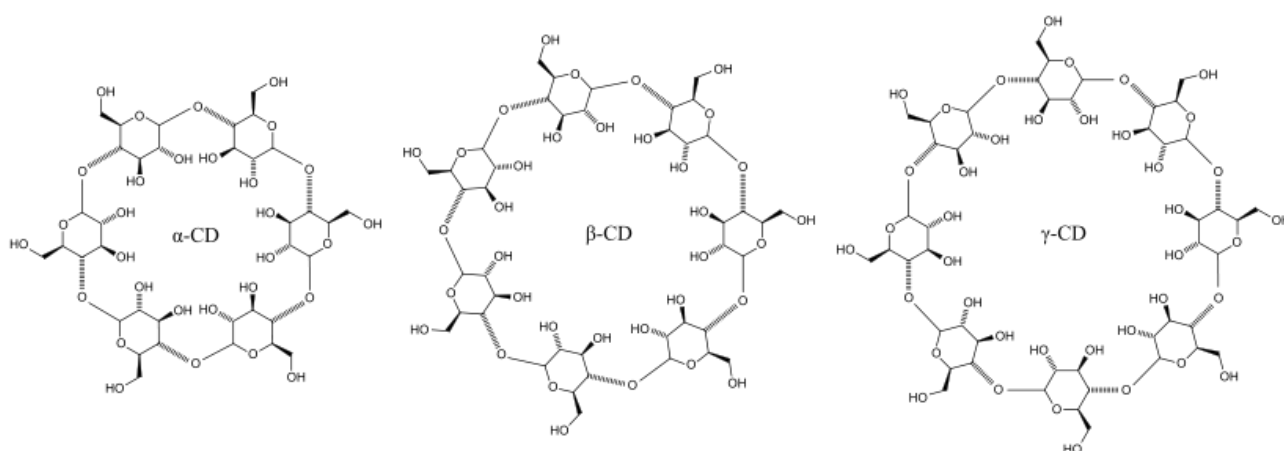


Рис. 1.3. Структурные формулы трех основных циклодекстринов

гликозидными связями. Синтезированы циклодекстрины с различным количеством глюкозных звеньев, отличающихся, соответственно, диаметром внутренней полости. Размер полости α -ЦД (6 глюкозных звеньев), является неподходящим для многих лекарств, а γ -ЦД являются слишком дорогостоящими. Был синтезирован также δ -ЦД (цакломальтоноза, 9 глюкозных звеньев). В общем случае, δ -ЦД демонстрирует более низкую способность к комплексообразованию, чем остальные ЦД, однако для лекарств подобных дигитоксину и спиронолактону δ -ЦД показал больший эффект повышения растворимости, чем α -ЦД, хотя и меньший, чем β - и γ -ЦД. β -ЦД

широко используется в фармацевтике на ранних стадиях, благодаря своей доступности и размеру полости, подходящему для большинства лекарственных молекул. Однако его низкая растворимость в воде и нейротоксичность ограничивают его применение, особенно при парентеральном введении. Снижение парентеральной токсичности и повышение растворимости циклодекстринов достигается путем их химической модификации. [13]

Циклодекстрины существенно улучшают растворимость слаборастворимых молекул лекарства, выполняя роль гидрофильного переносчика для гидрофобных лекарств. Константа стабильности для комплексов лекарство/ЦД лежит в диапазоне от 0 до 100000 M^{-1} . [14] Наилучшие показатели улучшения растворимости демонстрируют метилированные циклодекстрины. [15, 16] Также циклодекстрины улучшают проницаемость нерастворимых гидрофобных лекарств, делая лекарство более доступным на поверхности биологического барьера, такого как кожа, слизистая оболочка или роговица глаза, откуда оно проникает в мембрану без разрушения липидных слоев барьера. В данном случае важно использовать ровно такую концентрацию ЦД, чтобы солюбилизировать лекарство в водной среде, так как превышение концентрации может снизить доступность лекарства. [15-18] Так, при низких концентрациях ЦД, когда гидрокортизон находился в суспензии, повышение концентрации ЦД увеличивало поток гидрокортизона через мембрану. При высоких же концентрациях ЦД, когда гидрокортизон находился в растворе, повышение концентрации ЦД уменьшало поток гидрокортизона через мембрану. [13] Также обнаружено, что добавление полимеров может ещё больше усилить проникновение лекарств из водного раствора ЦД. Карбоксиметил целлюлоза (КМЦ) усиливает биодоступность трихлорана из зубных паст содержащих β -ЦД посредством образования комплекса трихлоран/ЦД/КМЦ. [19]

В случае водорастворимых лекарственных препаратов ЦД увеличивает проницаемость посредством прямого воздействия на мембраны клеток слизистой оболочки и усиливают абсорбцию лекарства и его биодоступность. [15, 21] Солюбилизация специфических мембранных липидов эритроцитов человека посредством комплексообразования с ЦД и их способность вызывать нарушение целостности мембран оказывает влияние на абсорбцию лекарств и их токсичность. В ряде работ установлено, что ЦД, благодаря их способности извлекать холестерин из клеточных мембран, может увеличивать текучесть мембран и вызывать лизис клеток. С другой стороны, извлечение циклодекстринами фосфолипидов, особенно фосфатидилхолина и сфингомиелина, из внешнего полуслоя мембраны вызывает нестабильность бислоя. Удаление фосфолипидов может также вносить вклад в формирование стоматоцитов путем внутреннего искривления мембран. ЦД индуцирует лизис искусственных мембран, состоящих из лецитина и

холестерина посредством схожих процессов. Детергент вначале встраивается в мембрану, затем извлекает её компоненты в мицеллы и вызывает лизис. В отличие от детергентов, ЦД растворяет мембранные компоненты без проникновения внутрь бислоя, таким образом деструктивные эффекты ЦД могут быть более мягкими и обратимыми. В присутствии ЦД новые липид-содержащие компартменты с извлеченными из мембраны компонентами находятся в равновесии с клеточной поверхностью, и липиды могут обратимо переходить из мембраны в комплекс и обратно. [21]

1.2.2. Мицеллы

Мицеллы - это самоорганизованные наноразмерные коллоидные частицы с гидрофобным ядром и гидрофильной оболочкой. Если амфифильная молекула имеет форму, близкую к “конусу” (большая полярная голова и короткий гидрофобный “хвост”), то в водной среде такие молекулы будут самособираться в мицеллы, схематическое изображение которых приведено на Рис. 1.4. [22, 23] Такая структура делает мицеллы подходящими переносчиками для слабо растворимых в воде лекарственных соединений, которые составляют примерно 25% применяемых коммерчески доступных и около 50% потенциально эффективных препаратов. [24] Использование мицелл позволяет не только повысить растворимость лекарственного соединения, но и за счет регулируемого размера мицелл повысить проницаемость лекарства в специфические ткани, в частности, в ткани опухоли или воспаления. Более того, при модификации мицелл функциональными молекулами можно достигнуть специфичности к определенным типам клеток.

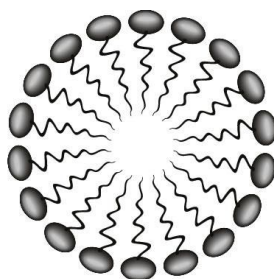


Рис. 1.4. Схематическое изображение мицеллы

Мицеллы можно разделить на две группы, в соответствии с их молекулярными весами: сурфактанты с низким молекулярным весом и полимерные мицеллы. [25] В настоящее время для доставки лекарственных препаратов предпочтение отдается полимерным мицеллам. Это обусловлено несколькими факторами. Во-первых, критическая концентрация мицеллообразования

полимерных мицелл значительно ниже, что делает их более стабильными при разбавлении. [25] Во-вторых, их гидрофобное ядро может быть приспособлено для размещения различных лекарств в достаточных количествах. [26] В-третьих, наличие высоко гидратированной внешней оболочки с высоким молекулярным весом может обеспечивать защиту от захвата фагоцитами. [25]

В качестве примера полимерных мицелл, применяемых для доставки лекарственных препаратов, хотелось бы рассмотреть мицеллы на основе полисахаридов. Различные способы функционализации по полисахаридному остову облегчают прикрепление гидрофобного остатка, который необходим для инициации самосборки в мицеллу. Преимуществами мицелл на основе полисахаридов для доставки лекарственных препаратов являются:

- 1) Биоразлагаемость и биосовместимость. По сравнению со многими синтетическими полимерами, полисахариды имеют достаточно низкий уровень токсичности, или же являются нетоксичными [27-30] Кроме того, благодаря присутствию в организме в естественных условиях, большинство полисахаридов подвержены деградации посредством различных ферментов. В ходе ферментативных реакций полисахариды разбиваются на мономеры и олигомеры, которые используются для нужд клеток организма. [31]
- 2) Простота модификации. Полисахариды очень легко поддаются модификации. К примеру, полисахариды на основе глюкозы, такие как амилоза, амилопектин, гликоген и целлюлоза могут быть модифицированы по свободным гидроксильным группам. [32] Также широко изучены возможности модификации хитозана. [33-35]
- 3) Собственная биологическая активность. Многие полисахариды проявляют собственную биологическую активность, в частности, повышенную адгезию к слизистой оболочке, противомикробные и противовоспалительные свойства. [24] Адгезия к слизистой оболочке открывает перспективы их применения для доставки лекарств в пищеварительный тракт, а противомикробные и противовоспалительные свойства полисахаридов могут служить дополнением к терапевтическому действию доставляемых лекарственных молекул.

1.2.3. Липосомы

Липосомы - это коллоидные структуры диаметром примерно от 0,05 до 5,0 мкм, которые самособираются при помещении липидов в водную среду. [36] В зависимости от способа приготовления, липиды могут самоорганизовываться в однослойные или многослойные везикулы (Рис. 1.5). Благодаря наличию внутреннего пространства везикулы, наполненного водой, и

внутренней, гидрофобной, части бислоя, как гидрофильные, так и липофильные лекарственные молекулы могут переноситься липосомами.

Липосомы могут использоваться, в частности, для доставки лекарственных препаратов, которые проникают внутрь клетки в ходе пиноцитоза, таких как N-(фосфоацетил)-L-аспартат (PALA). Однако, пиноцитоз в данном случае показывает низкую эффективность. В то же время при использовании липосом можно достичь гораздо большей концентрации лекарственного соединения внутри везикулы, чем в растворе для свободного лекарства, так что в ходе пиноцитоза гораздо большая доза лекарственного препарата пройдет внутрь клетки. [37]

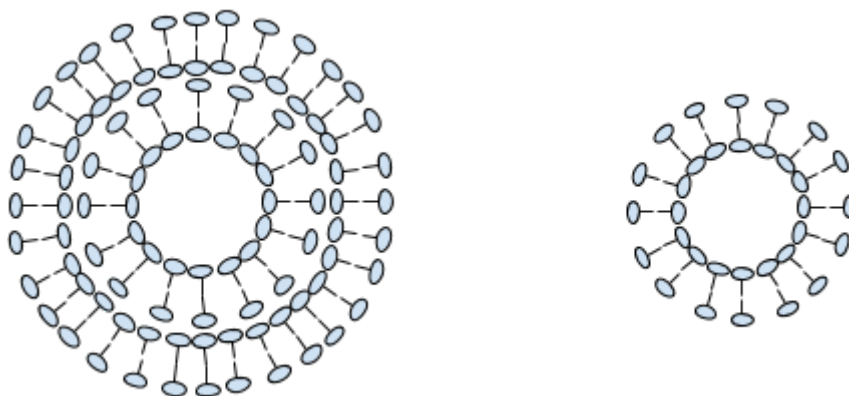


Рис. 1.5. Схематическое изображение многослойных (слева) и однослойных (справа) липосом

Известно также, что липосомы плохо проникают в такие ткани, как ткани сердца, почек, пищеварительного тракта. Это имеет большое значение при доставке противораковых препаратов, которые могут быть высокотоксичны по отношению к здоровым клеткам. Использование липосом может привести к изменению распределения лекарств в различных тканях. К примеру, в свободном виде амфотерицин В и доксорубин обладают сильной нейротоксичностью и кардиотоксичностью. Использование данных препаратов в липосомальных формах приводит к существенному снижению токсичности без снижения терапевтической эффективности. [37] Также известно, что некоторые клетки, такие как клетки Купфера в печени и макрофаги ретикулоэндотелиальной системы склонны к фагоцитозу инородных микрочастиц, таких как липосомы. Благодаря этому липосомальные формы введения иммуномодуляторов с успехом применяются для доставки лекарств в ретикулоэндотелиальную систему. [38] Кроме того, изменяя заряд липосомальной мембраны или добавляя специфические белки, антитела или иммуноглобулин, можно достигнуть более высокой специфичности липосом к различным типам клеток и применять их для адресной доставки лекарственных препаратов. [39, 40]

Однако использование липосом в качестве средств доставки имеет ряд недостатков. Первым из них является стоимость. Здесь следует принимать во внимание как стоимость непосредственно липидных компонентов и сайт-специфичных агентов, так и стоимость создания липосом необходимого состава, размера, поверхностного заряда и т. д. Следующей проблемой является стерилизация липосом. Липосомы очень чувствительны к изменению температуры и к облучению различного вида. Химическая стерилизация также невозможна, так как может существенно повлиять на стабильность липосом. Основным методом создания стерильных липосом является фильтрование через фильтр с размером ячейки 0,22 мкм после приготовления. Этот метод подходит только для липосом с диаметром менее 0,2 мкм и не удаляет вирусы. [37]

Другим ограничением в применении липосом является относительно короткое время жизни и низкая стабильность. [40] Для фармацевтического продукта, вышедшего на рынок, необходимым требованием является стабильность в течение по крайней мере в течение полутора-двух лет. Для липосом это достаточно сложно, при условии что они остаются в суспензионной форме, поэтому для их сохранения применяется заморозка. На время жизни липосом оказывают влияние два фактора: химическая и физическая деградация. Химическая деградация обусловлена окислением и гидролизом. Для защиты от химической деградации при приготовлении липосом необходимо использовать компоненты высокого качества, работать в инертной атмосфере, а также избегать методов, предполагающих высокие температуры. Также возможно применение антиоксидантов. [41]. Физическая деградация является последствием заморозки липосом, и для её избежания необходимо использовать криопротекторы, чтобы продукт оставался стабильным после разморозки. [37]

1.2.4. Ниосомы

Ниосомы - это современная система доставки лекарств, в которой лекарство инкапсулировано в везикулу. Везикула образована из бислоя неионогенных (non-ionic) поверхностно активных соединений, от которых и происходит название "ниосома". Размеры ниосом лежат в наноразмерной шкале. Хотя структурно они очень похожи на липосомы, они имеют ряд преимуществ. Ниосомы широко используются в трансдермальной доставке лекарств, а также в адресной доставке. [42]

Структурно ниосомы схожи с липосомами - они также имеют вид бислоидной везикулы. Однако в случае ниосом бислоид составлен из неионогенных поверхностно-активных агентов, в то время как липосомы составлены из фосфолипидов. Большинство поверхностно-активных соединений при помещении в воду образуют мицеллярные структуры, однако некоторые

способны формировать везикулы-ниосомы. Ниосомы могут быть как однослойными, так и многослойными, в зависимости от метода приготовления. Ниосомы состоят из бислоя сурфактанта, в котором гидрофильные концы находятся снаружи и внутри везикулы, в то время как гидрофобные концы развернуты друг к другу внутри бислоя. Таким образом, везикулы, подобно липосомам, удерживают гидрофильные лекарственные молекулы во внутреннем пространстве, в то время как гидрофобные лекарства встраиваются внутрь бислоя.

Преимущества ниосом:

- 1) Везикулы находятся в суспензии на водной основе. Это обеспечивает гораздо большую гибкость по сравнению с масляными суспензиями.
- 2) Благодаря наличию гидрофобной и гидрофильной областей, ниосомы могут вмещать лекарственные молекулы с различной растворимостью
- 3) Изменяя состав везикул, размер, количество слоев, объем, поверхностный заряд и концентрацию, можно задавать характеристики везикул.
- 4) Везикулы могут выступать в качестве “депо”, выпуская лекарство контролируемым образом.
- 5) Они могут снижать токсичность благодаря своей неионогенной природе.

1.3. Современные методы исследования взаимодействия лекарств с мембранами

Многие лекарственные молекулы имеют внутриклеточные мишени, поэтому должны пройти через один или несколько фосфолипидных бислоев, чтобы достигнуть места назначения и оказать фармакологический эффект. Это делает неизбежным возникновение взаимодействия лекарства с мембраной. Исследования, проведенные на клеточных культурах и *in vivo*, показывают, что данное взаимодействие играет важную роль для таких фармакокинетических свойств лекарства, как его транспорт, распределение в тканях и накопление, что, в свою очередь, оказывает огромное влияние на эффективность лекарственного препарата. Таким образом, понимание вклада этих взаимодействий в фармакокинетические свойства лекарства критично для разработки новых препаратов. Несмотря на структурную сложность биомембран и даже на то, что точные пропорции мембранных компонентов меняются с типом мембраны, химической основой структуры мембраны является липидный бислой, в который включены молекулы белков. Исследование модельных мембран, содержащих всего несколько компонентов, обеспечивает понимание свойств гораздо более сложных биологических мембран. Поэтому различные лекарства (антибиотики, антигипертензивные лекарства, противогрибковые препараты, противораковые агенты) широко исследуются именно с точки зрения взаимодействия с липидами. [43] Существует

ряд общепринятых моделей мембранных структур на основе липидов, которые широко применяются для исследования механизмов действия лекарств: это липосомы, мицеллы, липидные бислои, а также клеточные линии.

1.3.1. Спектрофотометрия

Однослойные липосомы, благодаря своей бислойной структуре, являются одним из самых популярных модельных объектов для исследования взаимодействия лекарств с мембранами, и в частности, для изучения эффективности лекарств. В общем случае, эффективность лекарства определяется посредством вычисления доли лекарства, которая прошла через мембрану в биологическую систему (коэффициент распределения). Обычно для измерения этой величины используются изотропные двухфазные системы растворителей, к примеру, октанол/вода. Однако множество исследований показали, что модель липосом является более адекватной, так как лучше имитирует как гидрофобную часть, так и внешнюю полярную и отрицательно заряженную поверхность природных мембран. В частности, в работе [44] доля лекарства, прошедшего внутрь липосом, измерялась методом УФ-спектрофотометрии посредством вычисления первой и второй производной от спектра поглощения для повышения точности определения максимумов поглощения и устранения вклада от рассеяния света на липидных везикулах. Авторами установлено, что рифампицин и дибукаин, которые ионизируются при физиологическом значении pH, имеют различные коэффициенты распределения для системы вода-DMPG (анионные липосомы) и вода-DMPC (цвиттер-ионные липосомы), в то время как нейтральные лекарственные молекулы демонстрируют одинаковые коэффициенты для обеих систем. Это различие вызвано электростатическим взаимодействием между полярными группами липидов и ионизированными лекарствами, т. е. катион дибукаина взаимодействует с анионной группой головы DMPG. Это подтверждает, что липосомы являются более корректной моделью для изучения проникновения лекарств, чем система октанол/вода, так как лучше имитируют заряженную поверхность клеточной мембраны.

1.3.2. Электронный парамагнитный резонанс

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) - это мощный инструмент для исследования свойств мембраны, а также взаимодействия лекарства с мембраной. Он особенно информативен для определения степени упорядоченности мембраны и локализации молекулы лекарства в мембране. Преимуществом метода ЭПР является высокая чувствительность, позволяющая изучать различные эффекты на молекулярном уровне. Для этого используются спиновые метки. Обычно это молекулы, содержащие нитроксильный фрагмент с неспаренным электроном, локализованным

на атомах азота и кислорода. Такая метка специфическим образом встраивается в липидную часть биологической мембраны, и с ее помощью можно изучать свойства различных областей мембраны.

В частности, ЭПР использовался для изучения влияния анестетиков на структуру и функцию мембраны. [45-47] Обнаружено, к примеру, что степень упорядоченности мембраны мембраны изменяется как функция от концентрации анестетика. Точный механизм действия анестетиков в организме пока неизвестен, однако предполагается, что не прямое воздействие анестетиков на конформацию белка является результатом изменений в фосфолипидной мембране. [46]

Вопрос прямого и непрямого взаимодействия лекарств с белками нервной системы через изменения в мембране также исследовался методами ЭПР спектроскопии. Использовались два типа спиновых меток: жирные кислоты для мечения липидов и малеимид для мечения белков нервной системы лягушки. В качестве анестетиков использовались халотан (как общий анестетик), прокаин, лидокаин и тетракаин (как местные анестетики). Последние взаимодействуют напрямую с головами липидов, но могут также встраиваться в гидрофобную область. Авторы заключают, что эффект анестетиков переходит на спин-меченые мембранные белки через сильное взаимодействие липида с белком. [48] Помимо этого, методы ЭПР широко применяются для исследования взаимодействия различных белков с клеточной мембраной. [49]

Методы ЭПР также применяются для исследования возможностей доставки лекарственных препаратов. В частности, изучалось взаимодействие антидепрессанта кломипрамина с мембраной рогового слоя. Установлено, что воздействие кломипрамина приводит к повышению текучести мембран клеток рогового слоя. Это означает, что кломипрамин может проникать в мембраны этих клеток, что означает имеет большое значение для трансдермальной доставки. [50]

1.3.3. Рентгеновская дифракция

Рентгеновская дифракция, зачастую в комбинации с ДСК и ЯМР - ещё один метод для изучения взаимодействия лекарств с мембраной. Он особенно полезен для получения информации о локализации молекулы лекарства и фазовых изменениях мембраны. Отличительной особенностью методов рентгеновской дифракции является высокая точность. Наиболее интересную информацию можно получить при сравнении профилей электронной плотности мембраны в отсутствие и в присутствии лекарства. Наблюдаемые различия дают информацию о локализации лекарства внутри бислоя, а также об изменениях в мембране, вызванных действием лекарства. Примером применения данного метода является исследование локализации каннабиноидов в модельных мембранах DMPC. Профили электронной плотности липидного

бислоя в отсутствие и в присутствии каннабиноидов вычислялись посредством фурье-преобразования. Вычисление разности этих профилей позволило определить, что длинная ось трициклической системы каннабиноида ориентирована перпендикулярно оси бислоя. [51] Такая ориентация способствует расположению фенольной гидроксильной группы каннабиноида рядом с карбонильной группой DMPC. Эти исследования также показали, что биологический эффект каннабиноидов по крайней мере частично связан с взаимодействием молекулы с липидным бислоем, а не только с мембранными белками. [51]

Средствами малоуглового рентгеновского рассеяния изучалось также воздействие антигипертензивного препарата валсартана на свойства модельной липидной мембраны DPPC. Воздействие 20 мол.% валсартана приводит к возникновению в бислое богатых валсартаном участков с изменением фазы и упаковки липидов, и бедных валсартаном участков, сохранивших упаковку и фазовое состояние. [52]

1.3.4. Ядерный магнитный резонанс

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) обладает очень широким набором инструментов для исследования взаимодействия лекарств с мембранами. Для этих целей применяются подходы ЯМР как в жидкости, так и в твердом теле. Отличительной особенностью ЯМР в жидкости является возможность проведения экспериментов при физиологических условиях (рН, температура), что позволяет переносить выводы, полученные *in vitro*, на живые системы. Кроме того, ЯМР в жидкости предоставляет широкие возможности для исследования структуры и динамики различных систем. Основными характеристиками ЯМР спектра являются:

- 1) Магнитное поле, при котором происходит резонанс. Оно зависит от выбранных ядер: ^1H , ^{13}C , ^{31}P и т. д.
- 2) Величина спин-спинового взаимодействия, зависящая от эффектов окружения
- 3) Время спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации, оказывающие влияние на ширину линий спектра

Все эти параметры могут помочь получить дополнительную информацию об изучаемой системе. Помимо этого, существуют двумерные корреляционные методы ЯМР (NOESY, ROESY, COSY и т. д.), которые позволяют по положению кросс-корреляционных пиков определить наличие взаимодействия между ядрами, и, как следствие, положение лекарства внутри или снаружи мембраны. Еще один инструмент ЯМР, имеющий большое значение при изучении взаимодействия лекарств с мембранами, это диффузионная ЯМР-спектроскопия (DOSY). Данный метод позволяет измерить коэффициент самодиффузии молекулы, что имеет большое значение при изучении

процесса проникновения лекарства через липидный бислой.

Один из самых доступных методов для исследования динамики систем “бислой-лекарство” - это метод измерения времени спин-спиновой релаксации. Молекулярные движения принято характеризовать временем корреляции τ_c . В простейшем случае диффузии время корреляции определяют как среднее время между двумя соударениями данной молекулы с другими молекулами, а за вращательное время корреляции принимают время, за которое молекула поворачивается на 1 радиан. Время корреляции τ_c – это усредненная величина. Индивидуальные молекулы в жидкости и газе двигаются с разными скоростями. При этом возникают «флуктуирующие поля» с широким спектром частот, вызванные броуновским движением молекул, содержащих магнитные ядра. Для небольших молекул, которые в невязких растворах двигаются очень быстро, характерны очень короткие времена корреляции порядка 10^{-13} - 10^{-10} сек, но эти времена становятся все более длинными, по мере того, как уменьшаются скорости молекулярных движений, например, при увеличении вязкости раствора вплоть до перехода к твердому телу. [53, 54]

Время спин-спиновой релаксации T_2 описывает поведение поперечной намагниченности. Спин-спиновая релаксация это процесс «потери спиновой когерентности» в ансамбле ядерных спинов, который происходит за счет возникновения разброса в резонансных частотах одинаковых ядер. Такой разброс возникает за счет того, что флуктуирующие локальные поля, которые создаются при молекулярном движении для ядер одного типа, находящихся в разных молекулах, оказываются разными. Так, не усредненные диполь-дипольные взаимодействия приводят к очень коротким временам T_2^* в спектрах твердых тел. При уменьшении скорости движения (колебаний и вращений) молекул в растворе T_2 монотонно уменьшается до значения, характерного для совершенно жесткой решетки твердого тела. [53, 54]

Таким образом, время спин-спиновой релаксации чувствительно к молекулярным движениям, в частности, к низкочастотным липидным движениям. [55, 56] Для анализа нами были выбраны времена спин-спиновой релаксации $-N+(CH_3)_3$ -группы в полярной голове липида и концевой CH_3 -группы в гидрофобном хвосте. Время спин-спиновой релаксации T_2 зависит от времени корреляции вращения резонирующего ядра, которое, в свою очередь, определяется вращательной диффузией ядра и вязкостью раствора: $\frac{4\pi\eta a^3}{3kT}$, где η - вязкость раствора, a - характерный радиус молекулы, T - температура. [53]. Таким образом, измеряя время T_2 либо ширину линии в ЯМР спектре, можно сделать выводы об изменении подвижности определенных функциональных групп молекулы. Изменение подвижности может происходить в результате нековалентного связывания молекул, изменении упаковки, степени упорядочения, окружения и т.

д. Таким образом, на основании данных ЯМР можно делать выводы о проникновении/встраивании молекулы в липидный бислой а также о её расположении внутри бислоя. Так, методом ЯМР с добавлением шифт-реагента было изучено взаимодействие антибиотика амфотерицина Б с липидными мембранами. Добавление шифт-реагента, благодаря псевдо-контактному взаимодействию, приводит к сдвигу резонансных сигналов от ядер, находящихся в окружении шифт-реагента. Таким образом, используя гидрофильный шифт-реагент PrCl_3 можно добиться разделения сигналов от внешнего и внутреннего полуслоя мембраны. Это позволяет получить более полную информацию о локализации молекулы лекарства внутри/снаружи бислоя. [57]

По изменению ширины линий в спектре ЯМР также можно судить о происходящих в мембране фазовых переходах. “Текучесть” мембраны связана с температурой плавления липидов, так что по изменению ширины линии (а значит и подвижности) можно судить о фазовом состоянии мембраны. В предельном случае “кристаллизованной” мембраны линия бесконечно уширяется и полностью исчезает из спектра. Данный метод был предложен в качестве альтернативы популярному методу дифференциально-сканирующей калориметрии. [58]

Проникновение лекарства в мембрану может быть изучено с помощью нескольких подходов. Первый из них основывается на добавлении в раствор парамагнитных ионов и измерении времени спин-решеточной релаксации T_1 по методу инверсии-восстановления. Тогда подаваемый 180° -импульс создает на ядрах исследуемой молекулы, находящихся внутри клетки, своего рода магнитную метку, которая теряется сразу же при выходе из клетки из-за контакта с парамагнитными ионами. Таким образом, наблюдаемое время спин-решеточной релаксации определяется главным образом времени нахождения исследуемой молекулы внутри клетки. Данным методом исследовалось время обмена воды и формиат-ионов через мембрану эритроцитов. [59]

Второй подход заключается в использовании диффузионной ЯМР-спектроскопии для определения коэффициента самодиффузии лекарственного соединения во внеклеточном/внутриклеточном окружении или мембране. Данный подход основывается на детектировании спинового эха после импульса градиентного магнитного поля. Подается дефокусирующий импульс градиентного магнитного поля с последующей рефокусировкой. Рефокусировка достаточно эффективна только для тех ядер, которые незначительно переместились за период между импульсами. Диффузия ядер в промежутке между двумя этими импульсами приводит к снижению эффективности рефокусировки и, как следствие, падению интенсивности сигнала. Чем сильнее градиент, тем более он селективен и тем меньше интенсивность сигнала. Таким образом, интенсивность и продолжительность градиентного

импульса определяет расстояние, на которое могут переместиться ядра, всё ещё давая значительный сигнал. Повторяя данную импульсную последовательность многократно с различной силой градиента, можно определить коэффициент диффузии ядер.

Данный метод широко используется для исследования связывания лекарств с мембранами [62], диффузии воды через клеточную мембрану [59], связывания лекарств с белками [61, 62]

Таким образом, метод ЯМР имеет широкий набор инструментов для разностороннего исследования связывания лекарственных препаратов с модельными липидными и живыми клеточными мембранами при физиологических условиях.

1.4. Глицирризиновая кислота: биологическая активность и перспективы для доставки лекарств

Последние достижения в области нанотехнологий и супрамолекулярной химии в настоящее время существенно расширяют наши возможности по решению широкого круга медицинских проблем. Одним из важнейших научных достижений является использование наноразмерных супрамолекулярных агрегатов для увеличения растворимости лекарств и улучшения их адресной доставки к очагу заболевания [63, 64]. Стоит отметить, что количество научных работ посвященных разработке средств адресной доставки лекарств (Drug Delivery Systems), а также объем финансирования этих работ превысили таковой для разработки и исследования новых лекарственных препаратов. Одной из целей таких исследований является поиск новых нетоксичных комплексантов, способных защитить молекулы "гостя", уменьшить гидрофобность, контролировать их реакционную способность и улучшить биодоступность и терапевтическую активность препарата.

Глицирризиновая кислота (ГК, глицирризин) - тритерпеновый гликозид из экстракта корней солодки. Глицирризин известен, главным образом, благодаря своей противовоспалительной и противовирусной активности, хотя существуют данные о его положительном эффекте при лечении самых различных заболеваний. Наиболее интересными аспектами являются собственная противораковая активность глицирризиновой кислоты, а также её способность аккумулироваться в определенных типах тканей (в частности, тканях печени). Помимо этого, глицирризин обладает рядом свойств, которые делают его привлекательным объектом для доставки лекарственных препаратов. Её привлекательность заключается в том, глицирризиновая кислота представляет собой амфифильную молекулу: гидрофильная часть представлена глюкозными кольцами, гидрофобная - остатком глицирретиновой кислоты (Рис. 1.6).

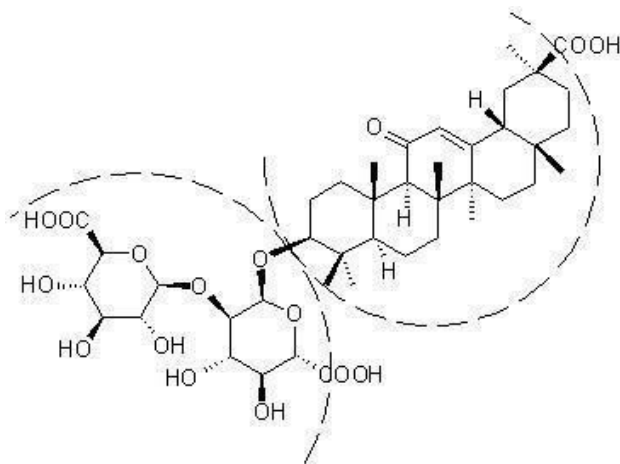


Рис. 1.6. Структурная формула глицирризиновой кислоты

Стоит отметить, что ГК является одним из самых широко исследуемых тритерпеновых соединений. Число ссылок в PubMed с 1953 года составляет около 2000, а за 2015 год - более 150. В то же время, общее число публикаций, посвященных исследованию ГК в Google Scholar составляет около 12000, а число публикаций за 2015 год - около 1000.

1.4.1. Противовирусная активность ГК

Имеется целый ряд данных о противовирусной активности ГК в отношении различных вирусов. Так, в работе [65] показано, что ГК в концентрациях 0,04 - 4,8 мМ ингибирует репликацию вируса Эпштейна-Барр (вируса герпеса человека 4 типа) *in vitro*, причем индекс селективности ГК в 2 раза выше, чем у противовирусного препарата Зидовудин, и в 2 раза ниже, чем у популярного препарата Ацикловир. Также в этой работе установлено, что механизм действия ГК не связан с прямой инактивацией вируса. Предположительно, воздействие ГК происходит на стадии проникновения вируса. В работе [66] показано, что ГК способна ингибировать репликацию коронавируса ТОРС *in vitro*. Исследования противовирусной активности ГК и 15 различных ее производных проводились на клеточной линии Vero, полученной из эпителия почки, взятой у африканской зеленой марышки. Установлено, что при концентрации 365 мкМ ГК ингибирует цитопатический эффект (разрушение клеток) вируса в 50% зараженных клеток. При этом концентрация ГК, при которой происходит снижение жизнеспособности клеток на 50% составляет более 24 мМ.

В работе [67] показано, что глицирризин концентрации 500 мкг/мл *in vitro* ингибирует клеточную деструкцию для трех исследуемых штаммов вируса японского энцефалита: Nakayama, P-20778 и 821564 ХУ48 после 96 часов. Схожий эффект наблюдался для 1000 мкг/мл экстракта солодки и аммониевой соли глицирризиновой кислоты. Минимальная концентрация, для которой

наблюдалось ингибирование, оказалась не токсична для клеточных линий свиной почки (PS) и рака шейки матки человека (HeLa). Установлена также способность ГК ингибировать репликацию целого ряда других не родственных вирусов: вирус коровьей оспы, вирус простого герпеса первого типа, вирус Ньюкаслской болезни, полиовируса первого типа и вируса везикулярного стоматита. [68, 69] Исследования проводились *in vitro* на линии анеуплоидных клеток человека HEp2. Обнаружено, что добавление 8 мМ ГК к инфицированным клеточным культурам ингибирует как рост вирусов коровьей оспы, простого герпеса первого типа, Ньюкаслской болезни, и везикулярного стоматита, так и их цитопатический эффект. При этом защита клеточных культур от вирусного воздействия оказалась настолько эффективна, что практически отсутствуют отличия между зараженными клетками, обработанными ГК и незараженными клетками при микроскопических наблюдениях. Пост-обработка (спустя 3 часа после инфицирования) 8 мМ ГК также приводит к подавлению роста вирусов и останавливает прогрессирование цитопатического эффекта. Эффект также наблюдается при концентрациях ГК 4 мМ и 2 мМ, но отсутствует при концентрации 1 мМ. Вместе с этим наблюдается необратимая активация вируса простого герпеса первого типа после обработки инфицированных клеток 8 мМ глицирризиновой кислоты всего в течение 15 минут. Следует отметить, что подобного эффекта не наблюдается больше ни для одного из исследованных в данной работе вирусов даже при обработке вплоть до 3 часов. Также отсутствует какое-либо воздействие ГК на полиовирус первого типа.

Несмотря на обилие исследований активности ГК против различных несвязанных ДНК- и РНК-вирусов, механизм её противовирусного действия остается неясным. В работе [70] показано, что действие ГК на герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши, связано с ингибированием синтеза вирусных РНК. Воздействие ГК на репликацию различных вирусов обнаружено еще в ряде работ. [71-73] Однако тот факт, что противовирусная активность ГК обнаружена в отношении различных слабо связанных между собой ДНК- и РНК-вирусов, позволяет предположить, что эффект ГК связан не только с воздействием на синтез РНК. В работе [65] установлено, что при добавлении ГК спустя 6 часов после заражения клеток противовирусного действия не наблюдается. При этом при добавлении ГК сразу после заражения и отмывке ГК спустя 5 часов, противовирусное действие остается необратимым. На основании этого делается вывод, что ГК селективно блокирует проникновение вируса в клетку, т. к. это процесс, которые имеет место примерно первые 5 часов после заражения. В работе [74] в случае вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней показано, что действие ГК связано в основном со стадией проникновения вируса и слабо влияет на этапы абсорбции и высвобождения вируса.

Кроме того, авторы исключили прямое ингибирующее действие ГК на вирусные частицы. Также в ряде работ показано, что ГК и ее производные препятствует проникновению целого ряда вирусов через плазматическую мембрану [65, 66, 75-77]. Кроме того, установлено что воздействие ГК приводит к уменьшению текучести клеточных мембран. [75, 78] Также в работе [79] установлено, что ГК может препятствовать распространению вируса, ингибируя выход вирусных частиц из зараженной клетки.

Таким образом, глицирризин является эффективным противовирусным агентом в отношении целого ряда вирусов. При этом действие ГК может проявляться на разных стадиях заражения: препятствование проникновению вирусных частиц в клетку, ингибирование репликации вирусных частиц и препятствование выходу вирусных частиц из зараженной клетки.

1.4.2. Противовоспалительная активность ГК

С давних пор ГК известна как соединение, обладающее противовоспалительной активностью. Этому вопросу посвящено множество исследований, которые рассматривают противовоспалительную активность глицирризина в основном с точки зрения ингибирования основных медиаторов воспаления. В частности, показано что ГК ингибирует продукцию таких первичных медиаторов воспаления, как TNF- α , интерлейкинов IL-1 β и IL-6. [79] В ряде исследований предполагается, что противовоспалительная активность ГК связана с её антиоксидантной активностью. В частности показано, что наряду с другими компонентами экстракта солодки, глицирризин ингибирует синтез NO и воспалительных цитокинов на модели липополисахарид-стимулированных микроглиальных клеток [80, 81]. Также ГК, как и ряд других терпеновых кислот, демонстрирует антиоксидантную активность в отношении H₂O₂ в клетках эпителия бронхов человека. [82] Защитный механизм ГК связан с тем, что H₂O₂ снижает экспрессию регулятора апоптоза Bcl-2, в то время как ГК уже при концентрации 8 мкм/л обращает этот эффект. Эксперименты показывают, что ГК не снижает жизнеспособность клеток [79, 82], в то время как обработка H₂O₂ снижает жизнеспособность и повышает фрагментацию ДНК в тестируемых клетках [82]. Предобработка глицирризиновой кислотой в этом случае повышает жизнеспособность клеток и снижает фрагментацию ДНК. Кроме того, глицирризин снижает выработку каспазы-3 и факторов окисления и воспаления, индуцированную H₂O₂ [82]. В работе [83] продемонстрировано, что ГК в значительной мере снижает выработку активных форм кислорода, в частности, O₂⁻, H₂O₂ и OH радикалов, *in vitro*, посредством ингибирования метаболизма нейтрофилов. Отчасти с этим связывают и противовоспалительный эффект ГК. Другой предполагаемый механизм противовоспалительной активности ГК связывают с

ингибированием синтеза простогландина E_2 , который является одним из медиаторов воспаления [84]. В данном исследовании макрофаги инкубировались в течение 20 часов в среде, содержащей различные концентрации ГК. Значительное ингибирование синтеза простогландина E_2 активированными макрофагами наблюдалось при концентрации ГК 0,1 и 1 мг/мл. Установлено также, что ГК в таких концентрациях не токсична для макрофагов.

Одним из предполагаемых механизмов воздействия ГК, как и в случае противовирусной активности, является изменение функциональных свойств плазматической мембраны клеток обработанных глицирризином. В частности, предполагается что ГК разрушает липидные рафты, посредством извлечения холестерина, что приводит к затруднению транслокации рецептора TLR4 в липидные рафты и ингибированию липополисахарид-индуцированного воспалительного ответа в клетках RAW264.7. TLR4 - мембранный белок, относится к группе толл-подобных рецепторов, участвующих во врождённом иммунитете, является основным рецептором липополисахаридов в клетках RAW264.7, и потому напрямую регулирует клеточный ответ на бактериальные липополисахариды, являющиеся маркером инфекции [79].

1.4.3. Гепатопротекторная активность ГК

Антиоксидантная активность глицирризиновой кислоты в значительной мере обуславливает также её гепатопротекторную активность в отношении ряда токсичных соединений. Так, в работе [85] показано, что ГК существенно уменьшает некроз и апоптоз клеток печени крыс, подвергшихся воздействию наночастиц диоксида титана. Также в данном исследовании обнаружено, ГК снижает перекисное окисление липидов и демонстрирует антиоксидантную активность, и предполагается, что снижение окислительного стресса в значительной мере обуславливает снижение апоптоза и некроза гепатоцитов, индуцированного диоксидом титана. Гепатопротекторные и антиоксидантные свойства глицирризина проявляются также в отношении CCl_4 [86-88], и ряда других цитотоксичных соединений [89-91].

Некоторые исследования говорят о гепатопротекторной функции ГК, в том числе активности против рака печени, на уровне экспрессии генов. [92, 93] В частности, показано, что ГК регулирует экспрессию генов, ответственных за апоптоз и окислительный стресс в клетках гепатомы человека. [92]

Имеются данные, указывающие на специфичность ГК к заболеваниям печени. В частности, установлено, что ГК обладает гепатопротекторным действием. Противовоспалительный и антиапоптотический эффект ГК при лечении заболеваний печени связывают с подавлением фактора некроза опухоли TNF-alpha и каспазы-3, что обуславливает гепатопротекторный эффект

ГК. [94] Наряду с этим есть данные, указывающие на проявление гепатопротекторной функции ГК посредством прямого воздействия на клетки печени. В частности, Nakamiga и др. индуцировали утечку лактатдегидрогеназы и глутаминовой щавелевоуксусной трансаминазы в монослойной культуре гепатоцитов крыс, подвергая эти клетки воздействию CCl_4 . Утечка этого фермента вызвана изменением проницаемости мембраны. Добавление глицирризина вызвало изменения высвобождения фермента. Небольшой эффект наблюдался при концентрации ГК 25 мкг/мл, максимальный эффект - при концентрации 200 мкг/мл. Глицирризин, вероятно, оказывал прямое защитное действие на мембраны гепатоцитов, предотвращая изменение их проницаемости. [95]

1.4.4. Противораковая активность ГК

В ряде работ показано, что глицирризиновая кислота демонстрирует значительную противораковую активность. Она способна индуцировать апоптоз в опухолевых клетках различных видов рака. [96-97] Обнаружено, что добавление 10 мкМ глицирритиновой кислоты (метаболита глицирризиновой кислоты, образующегося при ее пероральном употреблении, Рис. 1.7) к митохондриям печени крыс приводит к их набуханию, потере мембранного

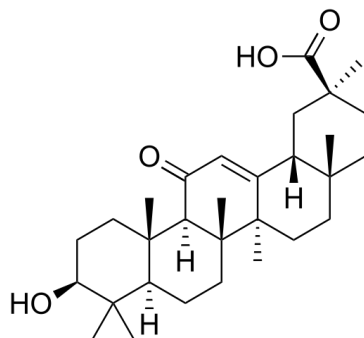


Рис. 1.7. Структурная формула глицирритиновой кислоты

потенциала и выходу цитохрома С. Данный результат указывает на то, что глицирритиновая кислота способна инициировать открытие митохондриальных пор, и таким образом запускать про-апоптотический путь. [102] Следует отметить, что данная концентрация - 10 мкМ - соответствует концентрации глицирритиновой кислоты в плазме при непосредственном употреблении солодки в пищу. [103] Дальнейшие исследования показали, что данный эффект является результатом совместного действия глицирритиновой кислоты и Ca^{2+} , которые путем взаимодействия с митохондриальной дыхательной цепью способны генерировать перекись водорода. Она, в свою очередь, окисляет определенные тиольные группы и эндогенные пиридиновые нуклеотиды, что приводит к открытию митохондриальной поры. [104] Этот

механизм проявляется также при обработке глицирритиновой кислотой клеток линии SiHa, полученных из материала рака шейки матки. [105] Данный механизм представляет интерес, т. к. формирование митохондриальной поры вовлечено в различные токсические и окислительные формы повреждения клеток, а также апоптоз. Открытие митохондриальных пор вызывает деполяризацию трансмембранного потенциала, высвобождение Ca^{2+} и цитохрома C, и потерю жизнеспособности клеток. [106]

1.4.5. Комплексообразование ГК с лекарственными препаратами

Одной из важных проблем медицинской химии на данный момент является низкая растворимость используемых лекарственных соединений, причем особенно важную роль играет растворимость лекарств, предназначенных для перорального приема. Возможный путь её решения - использование систем доставки в виде комплексов с хорошо растворимыми соединениями. Во многих случаях это позволяет существенно снизить действующие дозы при сохранении лечебного действия. Гидрофобная молекула лекарства способна проходить через гидрофобный липидный слой за счет пассивного транспорта (против градиента концентрации), но для этого нужно достигнуть достаточно большой концентрации лекарственного соединения во внеклеточном окружении. Однако ~30% выпускающихся лекарственных соединений классифицируются как практически нерастворимые. Тот факт, что ~85% самых популярных препаратов принимаются перорально, делает данное направление наиболее перспективным.

Физико-химические исследования показывают, что комплексообразование лекарственных препаратов с глицирризиновой кислотой способно в десятки раз повысить растворимость лекарства по сравнению с исходным соединением. Целый ряд работ посвящен исследованию подвижности лекарственного соединения в составе супрамолекулярных комплексов с глицирризиновой кислотой методом ^1H ЯМР спектроскопии [1,2]. Времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации (T_1 и T_2 , соответственно) очень чувствительны к изменению подвижности молекул [55, 56]. При комплексообразовании диффузионная подвижность молекул снижается, что приводит к уменьшению наблюдаемого времени релаксации. В случае быстрого обмена между комплексом и раствором, спад сигнала ЯМР носит моноэкспоненциальный характер, в случае медленного обмена (по сравнению с временем релаксации) кинетика спада становится биэкспоненциальной:

$$I(t) = P_1 \times \exp(-t/T_{21}) + P_2 \times \exp(-t/T_{22})$$

Предэкспоненциальные множители в этом случае соответствуют доле протонов с различной вращательной подвижностью. Так, при условии равновесия между закомплексованной

и свободной формой лекарственного вещества, в случае биэкспоненциальной кинетики, компонента P_1 относится к доле молекул в комплексе, а P_2 - доле молекул в растворе.

Ряд исследований на животных показал, что комплексы фенибута - ноотропного и транквилизирующего средства – с ГК демонстрирует аналогичное эффекту самого препарата действие в дозе, сниженной в 16 раз. [3] Кроме того, исследуемый агрегат повышает мнестические способности (способность к запоминанию) животных и снижает побочное действие фенибута – сонливость и аллергические реакции. При этом токсичность уменьшается в 1.7 раза, а широта терапевтического индекса возрастает в 17 раз. [3] Сходные эффекты замечены для комплексообразования ГК с лекарственными препаратами других классов, к примеру, в комплексах нифедипина с ГК терапевтический эффект проявляется при 10-кратном снижении дозы, которая обуславливает антигипертензивную активность препарата. [3, 4]

Методами оптической спектроскопии изучались защитные свойства комплексов в растворе. Известно, что многие лекарственные соединения отличаются низкой стабильностью в растворах: фоточувствительностью, подверженностью к окислению посредством свободных радикалов, образующихся в организме в естественных условиях, и т. д. Комплексообразование с глицирризиновой кислотой в ряде случаев позволяет существенно повысить стабильность лекарственного вещества и защитить его от нежелательных воздействий. Так, в работах [1, 5] было проведено исследование влияния различных комплексантов, включая ГК, на окислительную стойкость молекул каротиноидов - лютеина и зеаксантина. Зеаксантин и лютеин выполняют важную защитную роль в сетчатке глаз человека и других млекопитающих. Недостаток этих каротиноидов может привести к повреждениям глаза коротковолновым видимым светом и активными формами кислорода, что, в конечном итоге, приводит к возрастной макулярной дегенерации, являющейся основной причиной необратимой слепоты в развитых странах мира. Эти каротиноиды не производятся в организме человека и должны потребляться с пищей. С другой стороны, чрезвычайно низкая растворимость в воде и нестабильность этих каротиноидов ограничивают их практическое применение в качестве компонентов пищи или лекарственных препаратов. Получение супрамолекулярных комплексов зеаксантина и лютеина с глицирризиновой кислотой, её динатриевой солью и природным полисахаридом арабиногалактаном позволяет свести к минимуму указанные выше недостатки, что открывает перспективы использования комплексов этих каротиноидов в пищевой промышленности, а также для производства лекарственных препаратов с повышенной растворимостью и стабильностью. Формирование супрамолекулярных комплексов было исследовано с помощью ЯМР-релаксации, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и оптических методов поглощения [1, 5]. Авторами

было показано, что комплексы с полисахаридами увеличивают растворимость каротиноидов более чем в 1000 раз. Также была исследована окислительная стойкость каротиноидов в реакции с молекулами озона, пероксильными радикалами и ионами металлов в воде и органических растворителях, и обнаружено значительное увеличение стойкости к окислению лютеина и зеаксантина в составе комплексов с арабиногалактаном и глицирризиновой кислотой.

1.4.6. Самоассоциация ГК и её применение для доставки лекарственных препаратов

Как уже обсуждалось ранее, глицирризиновая кислота представляет собой амфифильную молекулу. Процесс самоассоциации ГК изучался различными методами. Так, в работе [107] образование самоассоциатов показано методом ЯМР. Было показано, что в водно-метанольных растворах с малым содержанием метанола (20 %) происходит мицеллообразование глицирризиновой кислоты, тогда как при увеличении содержания спирта до 50 % мицеллы не образуются. В работе [108] также изучался процесс мицеллообразования и гелеобразования ГК в водно-метанольной смеси (20% метанола). Показано, что мицеллы образуются при гидрофобном взаимодействии тритерпеновой части ГК. Исследования самоассоциации ГК методом молекулярной динамики также показывают, что образование агрегатов происходит за счет гидрофобного взаимодействия между терпеновыми остатками. [109] Исследование мицелл ГК методами малоуглового рассеяния показывает, что ГК образует стержнеобразные мицеллы с радиусом 1,5 нм и длиной 21 нм, при концентрации 5 мМ в растворителе с рН=5. [110]

Способность к самоассоциации в водных растворах и комплексообразованию с лекарственными препаратами делает ГК перспективным агентом для доставки лекарств. Некоторые исследования последних лет посвящены изучению перспектив применения ГК для drug delivery. В частности, изучалась возможность использования мицелл глицирризиновой кислоты для доставки палитаксела, цитотоксического противоракового препарата, характеризующегося низкой пероральной биодоступностью (<2%). [111] Полученные в данной работе мицеллы ГК, содержащие палитаксел, имеют размер около 250 нм, в то время как размер чистых мицелл составляет ~ 80нм, что позволяет предположить, что препарат находится внутри мицелл. При этом снимки ТЭМ показывают, что все частицы имеют сферическую форму. Растворимость препарата в составе агрегатов с ГК растет как функция от концентрации ГК, максимальное наблюдаемое увеличение составляло 200 раз при концентрации ГК 10 мМ. Конечные агрегаты демонстрируют увеличение пероральной биодоступности примерно в 6 раз по сравнению с исходным соединением в экспериментах *in vivo*, что обуславливается предположительно усилением всасывания лекарства в кишечнике.

В работе [112] исследовались перспективы использования мицелл глицирризиновой кислоты для трансдермальной доставки подофиллотоксина (ПТ), препарата для лечения папилломавируса человека 6 и 11 типа. Исследования показывают, что в присутствии ГК растворимость подофиллотоксина в водо-этанольной смеси возрастает примерно в пять раз при соотношении ПТ/ГК 1:8 в 25% этаноле. Размеры чистых мицелл в данных условиях составляли ~6 нм, а мицелл содержащих лекарство ~10 нм. Мицеллы содержащие ПТ характеризуются большим временем высвобождения и проникновения через кожу, чем раствор ПТ, но более стабильной концентрацией действующего вещества в коже в течение 12 часов, и, что не менее важно, конечная концентрация действующего вещества в коже в случае мицелл была выше, чем в случае раствора.

Изучалось также влияние глицирризина и хитозана на трансдермальную доставку карведиола. [113] Обнаружено, что растворимость карведиола в растворе, содержащем 0,75% ГК, повышается в 59 раз по сравнению с буферным раствором. Исследования также показали, что проницаемость карведиола через кожу в присутствии ГК значительно выше, чем при использовании пропиленгликоливо-этанольной смеси. *In vitro* проницаемость карведиола через эпидермис крысы при использовании 0,75% раствора ГК возрастает в 3 раза по сравнению с буферным раствором. Эксперименты показывают также, что ГК при концентрациях выше, чем критическая концентрация мицеллообразования, ухудшает проникновение лекарства в эпидермис. Предположительный механизм усиления проницаемости кожи связывают с модуляцией состояния эпидермального барьера посредством воздействия на биохимический состав кожи. Методами СЭМ и ТЭМ обнаружено также, что использование ГК приводит к образованию небольших пор в роговом слое.

Существуют также исследования возможностей применения метаболита глицирризиновой кислоты - глицирритиновой кислоты - для адресной доставки лекарственных препаратов в клетки печени. [114, 115] Поверхность гепатоцитов богата рецепторами глицирритиновой кислоты, и это открывает перспективы её использования для адресной доставки.

Постановка задачи

Приведенные в литературном обзоре факты говорят о том, что глицирризиновая кислота - биологически активная молекула с широкими перспективами применения в адресной доставке лекарственных препаратов. Широко изучается её собственная биологическая активность, имеется множество данных о противовирусном, противовоспалительном, гепатопротекторном, противораковом действии. Существуют также данные об улучшении биодоступности лекарственных препаратов в присутствии ГК. Однако молекулярный механизм действия ГК в настоящий момент не изучен. Не имеется данных о воздействии ГК на физические и функциональные свойства клеточных мембран (упругость, проницаемость, подвижность липидов). Кроме того, недостаточно данных о возможностях применения ГК в качестве средства доставки лекарственных препаратов, а также о возможных механизмах доставки. Именно эти аспекты действия ГК выбраны для изучения в данной работе.

Основные задачи исследования:

1. Изучение комплексообразования холестерина с глицирризиновой кислотой; установление стехиометрии комплексов, их структуры и констант стабильности.
2. Выяснение влияния глицирризиновой кислоты на физические и функциональные свойства клеточных мембран: упругость, проницаемость; сравнение влияния ГК с другими средствами доставки лекарств (арабиногалактан, циклодекстрин)
3. Изучение взаимодействия ГК с модельными липидными мембранами. Установление влияния ГК на подвижность липидов клеточных мембран. Определение локализации молекул глицирризиновой кислоты в липидной мембране.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Комплексы глицирризиновой кислоты с холестерином и продуктами его окисления

Растворы холестерина (Aldrich), глицирризиновой кислоты и их комплексы готовились в дейтерированных растворителях CD_3OD (99,5% D) или CD_3CN (99,5% D) (Aldrich). Комплексы готовились путем перемешивания реагентов в различных соотношениях в течение нескольких часов. Процесс установления равновесия занимал несколько дней при комнатной температуре, и его заметно ускоряло повышение температуры до 60°C. ГК была предоставлена проф. Н. Ф. Салахутдиновым (НИОХ СО РАН). Окисление холестерина производилось посредством озонирования с помощью бытового озонатора “Гроза” с выходом озона 300 мг/час. Продукты озонлиза получались посредством озонирования как сухих пленок, так и раствора холестерина в метаноле. Анализ выхода продуктов озонлиза холестерина производился методом 1H ЯМР.

Изучение взаимодействия холестерина с ГК проводилось на спектрометре ЯМР Bruker DPX-200 по изменению времени спин-спиновой релаксации протонов холестерина T_2 . Времена релаксации измерялись при температурах 300 и 320 К. Аналогичный подход был применен для исследования связывания ассоциата холестерин-ГК с лекарственными молекулами (нифедипин). Время спин-спиновой релаксации T_2 измерялось посредством импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Гилла.

2.2. Эритроциты крови человека

Для анализа использовались образцы крови человека. Для экспериментов по измерению упругости и степени гемолиза образцы крови помещали в фосфатно-солевой буфер производства фирмы «Биолот» с рН 7.3, содержащий NaCl (0,137 моль/л) и KCl (0.0027 моль/л).

Эритроциты центрифугировали (3000 g, 5 минут, три раза) с замещением сыворотки буферным раствором [116]. Затем эритроциты помещались в буферный раствор с различными концентрациями ГК, где выдерживались в течение часа. После этого, для экспериментов по изучению структуры мембраны, осажденные эритроциты наносились на предметное стекло. Измерение упругости эритроцитов проводилось в жидкости. Образцы крови для данных экспериментов готовились таким же образом, затем клетки иммобилизовались на предметном стекле, покрытым поли-*l*-лизином (Thermo, Dreieich, Германия) в течение 10 минут и помещались в буферный раствор с различными концентрациями ГК, в котором инкубировались в течение

20-30 минут. Связывание клеток с полилизинном часто используется для измерения упругости методом атомно-силовой микроскопии [117]. Исследование структуры поверхности клеток и их упругости производилось с помощью атомно-силового микроскопа Solver P47 Bio производства фирмы NT-MDT (Зеленоград, Россия). Использовались контактные зонды с радиусом наконечника около 20 нм и силовой константой 0.003–0.13 Н/м. Для всех экспериментов использовался один и тот же зонд.

В экспериментах по измерению времени обмена образцы крови помещались в другой буфер (D_2O , 5 mM HEPES, 150 mM NaCl, KOD добавлялся до достижения pH равного 7.4). Это вызвано тем, что $MnCl_2$, необходимый для данных экспериментов, нерастворим в фосфатном буфере. Поэтому эксперименты проводились в буфере HEPES, как в работе [116]. Эритроциты центрифугировались (3000 g, 5 минут, три раза) [117]. Затем готовилась суспензия с объемной долей эритроцитов в буфере ~50%. В суспензию добавлялся формиат натрия (5 mM), 2 mM $MnCl_2$ и альбумин для предотвращения проникновения ионов Mn^{2+} через мембрану эритроцитов. Также в суспензию добавлялись различные концентрации ГК, образец выдерживали 15 мин при комнатной температуре (~20 °C) и измеряли время спин-решеточной релаксации. Эксперименты проводили при концентрациях ГК 0—1 ммоль/л. Эксперименты для каждой концентрации проводили трижды. Измерения проводили на ЯМР-спектрометре «Bruker Avance III 500 МГц» с помощью стандартной импульсной последовательности инверсия—восстановление.

2.3. Клетки K562

Клетки миелоидного лейкоза линии K562 (клетки миелобластного лейкоза человека) выращивали в среде DMEM/F12 (GIBCO), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Thermo Scientific HYCLONE»), 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина («Sigma»), в атмосфере, содержащей 5% CO_2 , при 37 °C [118]. Клетки были предоставлены Лабораторией молекулярных механизмов патологических процессов ИЦиГ СО РАН.

Клетки K562 дважды центрифугировали в водном буферном растворе (5 mM HEPES, 150 mM NaCl, КОН добавлен до pH 7.4) [119] и один раз в буферном растворе в D_2O , содержавшем те же компоненты. Все эксперименты проводили в упомянутом буфере в D_2O . Формиат натрия (5 mM) добавляли в клеточную суспензию для измерения времени транспорта. Для экспериментов с добавлением 0.5 mM $MnCl_2$ использовали бычий сывороточный альбумин (BSA), чтобы избежать проникновения ионов Mn^{2+} внутрь клеток. Предварительно, в отсутствие клеточной суспензии, было проверено, что добавление 0.5 mM $MnCl_2$ приводит к полному уширению линии формиат-иона в спектре ЯМР 1H . Затем в клеточную суспензию добавляли комплексант

(глицирризиновая кислота, арабиногалактан, β -циклодекстрин), образец выдерживали 15 мин при комнатной температуре (~ 20 °C) и измеряли время спин-решеточной релаксации. Эксперименты проводили при концентрациях комплексантов (ГК, АГ и ЦД) 0—5 ммоль/л. Эксперименты для каждой концентрации комплексанта проводили трижды. Измерения проводили на ЯМР-спектрометре «Bruker Avance III 500 МГц» с помощью стандартной импульсной последовательности инверсия—восстановление.

2.4. Однослойные липосомы

Липосомы были приготовлены из 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC, Avanti Polar Lipids, чистота >99%) и холестерина (MP Biomedicals) согласно процедуре описанной в [120]. Порошковые компоненты предварительно растворялись в хлороформе. Использовались образцы с содержанием холестерина 0,05 мМ, 0,25 мМ и 0,5 мМ. После удаления растворителя, сухая липидная пленка растворялась в D₂O. Концентрация липида составляла 10 мМ, а максимальная концентрация холестерина - 5 мол.% по отношению к липиду. Для приготовления однослойных липосом суспензия подвергалась воздействию ультразвука (~ 37 кГц, 1 час). Суспензия (0,6 мл) помещалась в стандартную 5мм ЯМР ампулу, в нее добавлялся PtCl₂ (4 мМ). После этого в суспензию добавлялась ГК (0,05, 0,25, 0,5 мМ). Максимальная концентрация ГК составляла 5 мол.% по отношению к концентрации липида. Все эксперименты проводились на спектрометре Bruker Avance III 500 МГц, время спин-спиновой релаксации измерялось с помощью импульсной последовательности Карра-Парселла-Меибума-Гилла (КПМГ). Во время экспериментов поддерживалась постоянная температура 300 К. Эксперименты повторялись трижды, параметры представляющие собой результаты анализа ЯМР спектров являются арифметическим средним.

2.5. Измерение времени обмена через клеточную мембрану

Клеточная мембрана формирует границу между внешне- и внутриклеточным водным окружением. Эта граница может быть проницаема для молекул воды, а также для небольших полярных молекул. Для исследования проницаемости мембран был разработан метод ЯМР-релаксации в присутствии парамагнитных ионов, в частности, ионов Mn²⁺ [116]. Благодаря присутствию таких ионов, релаксация протонов, находящихся снаружи, будет происходить значительно быстрее, чем соответствующая релаксация протонов, находящихся внутри клетки. Это позволяет разделить внешнее и внутреннее окружение, добавляя во внешнюю часть суспензии парамагнитные ионы. Таким образом, измеряя время релаксации протонов, можно исследовать

процесс диффузии молекулы через мембрану.

Для измерения скорости обмена может быть использовано время продольной релаксации T_1 , при условии что T_1 исследуемых ядер больше, чем время прохождения соединения через мембрану, и время релаксации молекул вне клетки много меньше времени обмена. Второе условие как раз достигается добавлением в буферный раствор, в котором суспендированы клетки, парамагнитных ионов Mn^{2+} [121].

ЯМР эксперименты по измерению времени обмена базируются на том, что внешне- и внутриклеточные компоненты окружения магнитно метятся π -импульсом (180°), но через несколько миллисекунд внешняя метка полностью исчезает, благодаря быстрой релаксации, обусловленной присутствием ионов Mn^{2+} . При этом внутриклеточный ансамбль молекул теряет свою магнитную метку только после выхода из клетки при контакте с внешним окружением. Таким образом, время существования магнитной метки, и, как следствие, наблюдаемое время релаксации T_1 , определяется временем жизни молекулы внутри клетки:

$$1/T_1 = 1/T_{ex} + 1/T_{in} \quad (2.1)$$

где T_1 – наблюдаемое время релаксации, T_{ex} – время прохождения молекулы через мембрану, T_{in} – время релаксации протонов внутри клетки (в отсутствие ионов Mn^{2+}), а коэффициент проницаемости мембраны может быть найден из следующего соотношения:

$$P = V / (S * T_{ex}), \quad (2.2)$$

где V – объем клетки, S – площадь ее поверхности [119].

2.6. Модель диффузии молекулы через клеточную мембрану

Транспорт молекулы через мембрану можно представить в виде следующей кинетической схемы [6, 122]:



где F_o , F_i - концентрация молекулы во внеклеточном и внутриклеточном окружении, соответственно, Y - концентрация свободных мембранных сайтов связывания, FY - концентрация молекул, связанных с мембраной, k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} - константы скорости реакции. Концентрационная зависимость проницаемости для потока формиата из клеток может быть представлена следующим выражением, аналогичным уравнению Михаэлиса-Ментен [116]:

$$P = \frac{V_m}{K_m + [F_i]} \quad (2.4)$$

При этом K_m выражается следующим образом:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.5)$$

Величина V_m определяет максимальную скорость диффузии при данной концентрации свободных мембранных сайтов и в условиях избытка транспортируемых молекул. Константа K_m численно равна концентрации транспортируемых молекул, при которой $V=V_m/2$, и характеризует сродство транспортируемых молекул к мембранным сайтам. K_m является величиной постоянной, не зависящей от концентрации транспортируемых молекул. Чем меньше K_m , тем больше сродство транспортируемых молекул к мембранным сайтам и выше начальная скорость переноса и наоборот, чем больше K_m , тем меньше начальная скорость переноса и меньше сродство транспортируемых молекул к мембранным сайтам.

2.7. Измерение упругости клеток методом атомно-силовой микроскопии

Для каждого образца записывался массив кривых: на поверхности, покрытой монослоем эритроцитов, выбирался участок 100×100 мкм, который покрывали сеткой 10 на 10 точек, и в каждой точке записывали силовую кривую. Таким образом, получался массив из 100 кривых. Операция повторялась трижды для увеличения доверительного интервала.

Для обработки силовых кривых была написана программа в пакете MathCAD. Алгоритм обработки следующий: по максимуму второй производной от кривой определяется начало характерной области (точка С на Рис. 2.1), затем производится аппроксимация зависимости отклонения кантилевера от Δz квадратичной функцией. Чтобы избежать неточностей, связанных с определением параметров зонда и клетки, анализировался весь множитель $\xi = \frac{2E_{cell}}{\pi(1-\eta_{cell}^2)tg \alpha}$, который позволяет определить относительное изменение модуля упругости клетки по сравнению с исходным, необработанным образцом. В этом выражении E_{cell} - модуль Юнга мембраны, η_{cell} - отношение Пуассона для клетки, α – половинный угол острия зонда. Измерения производились на одном типе клеток и с использованием одного и того же зонда, так что η_{cell} и α являются постоянными. Для каждой кривой определялось значение параметра ξ и строилось распределение этого параметра для массива кривых.

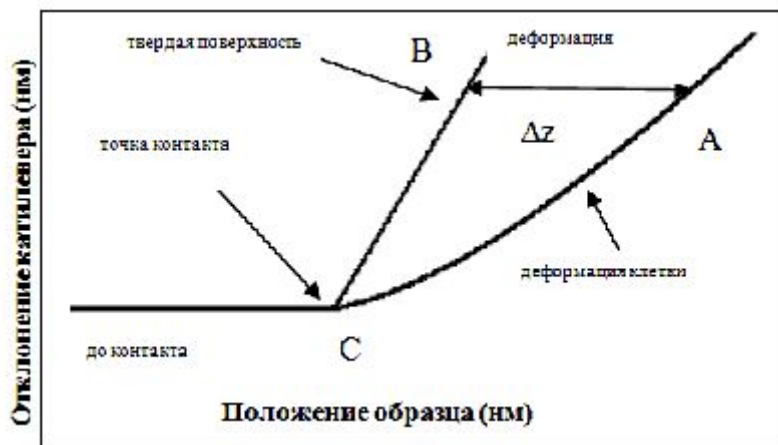


Рис. 2.1. Схема измерения упругости клеток (кривая А соответствует мягкой клеточной поверхности, способной деформироваться под действием зонда, кривая В – жесткой недеформируемой поверхности, С – точка контакта)

Анализ данных атомно-силовой микроскопии проводился исходя из модели Снеддона [9], предполагающей коническую форму зонда атомно-силового микроскопа. Клетка рассматривается как эластичный и изотропный материал. В рассматриваемой модели для конического зонда сила действия на него со стороны клетки записывается как:

$$F(\Delta z) = \frac{2E_{cell}}{\pi(1-\eta_{cell}^2)\tan\alpha} \Delta z^2, \quad (2.6)$$

где E_{cell} - модуль Юнга мембраны, η_{cell} - отношение Пуассона для клетки, α – половинный угол острия зонда [9].

2.8. Метод ЯМР с добавлением шифт-реагентов

Как обсуждалось в главе 1, время спин-спиновой релаксации чувствительно к молекулярным движениям, в частности, к низкочастотным липидным движениям. [57, 58] Для анализа нами были выбраны времена спин-спиновой релаксации $-N+(CH_3)_3$ -группы в полярной голове липида и концевой CH_3 -группы в гидрофобном хвосте. Так как время спин-спиновой релаксации T_2 напрямую связано с подвижностью молекулы и обратно пропорционально времени вращательной корреляции, то по его изменению можно судить об изменении состояния (свободное/связанное) молекулы.

Для более детального понимания локализации молекул ГК нами был использован метод добавления шифт-реагентов. В качестве шифт-реагента был выбран $PrCl_3$. Известно, что ионы Pr^{3+} не проникают внутрь мембраны, так что добавление данного реагента приводит к разделению

сигнала от $-N+(CH_3)_3$ -группы в полярной голове липида на два - от внешнего полуслоя липосомы и от внутреннего. Так описанный метод позволяет изучить влияние ГК на движение липидов на обеих поверхностях липосомы и в центре липидного бислоя.

2.9. Метод молекулярной динамики

Компьютерная симуляция взаимодействия ГК с липидным бислоем производилась лабораторией молекулярной динамики и структуры ИХКГ СО РАН. Все симуляции проводились с использованием пакета GROMACS 5.0. [123] Набор параметров и равновесные фрагменты липидного бислоя были взяты из базы lipidbook.bioch.ox.ac.uk. Для всех используемых липидов (DOPC, POPC, DPPC) применялась липидная модель Бергера. [124] Каждая модель содержала 128 молекул липида, ориентированных в плоскости x-y и 5000-7000 SPC-молекул воды [125], а также одну или несколько молекул глицерризиновой кислоты. Использовался шаг в 2 фс и алгоритм интегрирования leap-frog. Связи были образованы с помощью алгоритма LINCS. [126] Электростатические взаимодействия вычислялись методом Эвальда [126] с интерполяцией четвертого порядка. В запусках поддерживалось давление в 1 бар и температура 310 К. Использовался термостат Нозе-Гувера с временем релаксации 0,5 пс и баростат Парринелло-Рамана с временем релаксации 2 пс.

Было произведено 10 независимых запусков продолжительностью 100-200 нс для каждого из используемых липидов. Дополнительные 10 запусков были произведены при температуре 323 К для DPPC, так как он имеет температуру плавления около 315 К. Также было произведено 3 запуска продолжительностью 200 нс для двух, трех и четырех молекул ГК с DOPC. Начальное положение ГК по отношению к мембране составляло около 4 нм в направлении оси z. Это расстояния было достаточным для того, чтобы молекула ГК успела повернуться несколько раз до достижения поверхности липидной мембраны. Начальная ориентация молекулы ГК была случайной во всех запусках. Размер модельного бокса по осям x, y и z был примерно 6x6x10 нм.

2.9.1 Вычисление свободной энергии

Потенциал средней силы (ПСС) для процесса проникновения ГК в бислой DOPC вычислялся методом umbrella sampling. [127, 128]. Использовались 30 окон с интервалом 0,2 нм. Центр масс ГК подвергался действию гармонического потенциала с силовой константой $1000 \text{ кДж/моль/нм}^2$. Каждое окно содержало симуляцию длительностью 150 нс, суммарное покрытие составляло 4,5 мкс. Реконструкция ПСС производилась методом анализа гистограмм с

весами [129, 130] Анализ сходимости результирующего профиля представлен на Рис. 2.2.

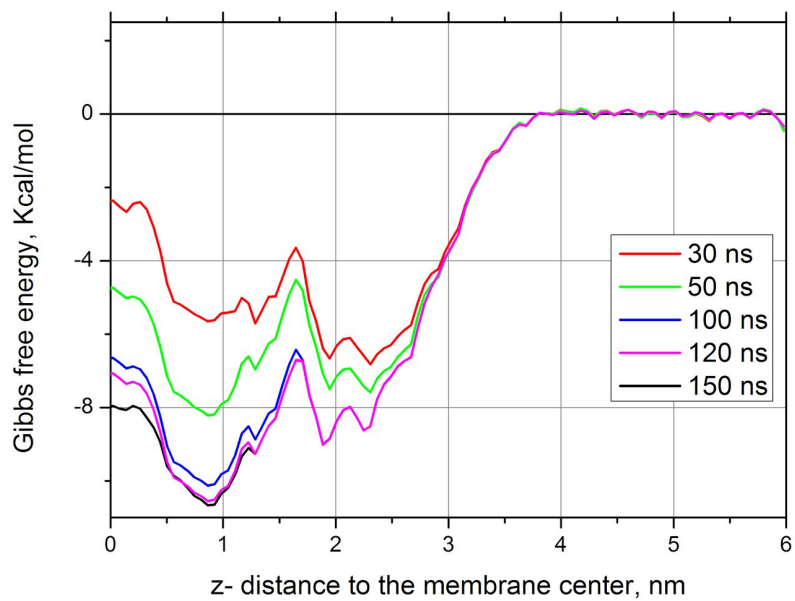


Рис. 2.2. Сходимость профиля свободной энергии Гиббса

Глава 3. Комплексообразование глицирризиновой кислоты с компонентами клеточной мембраны

3.1. Комплексообразование холестерина с глицирризиновой кислотой

Холестерин - один из важнейших компонентов клеточных мембран, ответственный за их текучесть и стабильность в широком интервале температур. Кроме того, современные представления о структуре клеточной мембраны говорят о наличии в ней высоко динамических областей, богатых сфингомиелином и холестерином, называемых липидными рафтами. Холестерин в липидных рафтах играет роль клея, делающего их структуру более жесткой, чем структура окружающей мембраны. Липидные рафты являются местом локализации многих мембранных белков, а также участвуют в передаче ряда внутриклеточных сигналов. [131] Поэтому первым шагом данной работы было исследование возможности связывания глицирризиновой кислоты с холестерином.

Для исследования комплексообразования холестерина с глицирризиновой кислотой использовались образцы, приготовленные по методике описанной в пункте 2.1. Комплексообразование обычно изучается в водных средах, но поскольку комплексы глицирризиновой кислоты с холестерином оказались нерастворимы в воде и водно-спиртовых растворах, в настоящей работе взаимодействие холестерина с ГК изучалось в чистом метаноле. Следует отметить, что в отличие от большинства полисахаридов и олигосахаридов, используемых для доставки лекарств, ГК способна образовывать комплексы не только в водных растворах, но и в ряде органических растворителей (спирты, ДМСО, ацетонитрил). [1, 132]

На Рис. 3.1 представлен ^1H ЯМР спектр холестерина с глицирризиновой кислотой в метаноле. Комплексообразование было доказано методом ЯМР релаксации. Время спин-спиновой релаксации (T_2) очень чувствительно к изменению подвижности молекул. Изменение времени релаксации в результате комплексообразования зависит от изменения времени корреляции вращения молекул. Время корреляции вращения зависит, в свою очередь, от размера частицы, который может изменяться в результате ассоциации молекул “хозяина” и “гостя”.

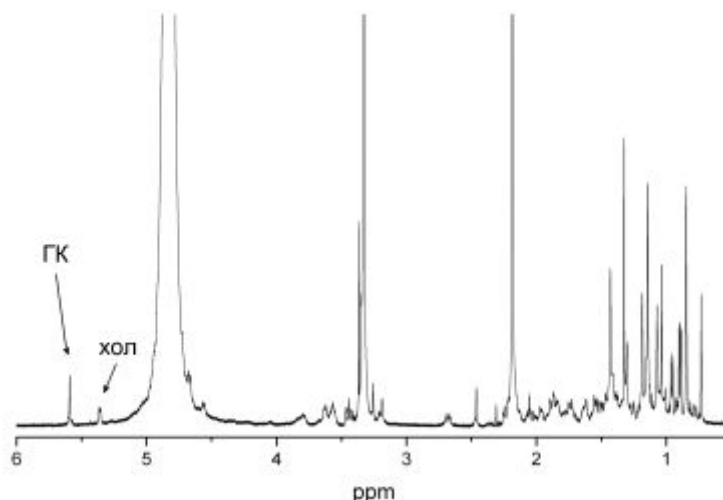


Рис. 3.1. Спектр смеси ГК и холестерина в MeOD, соотношение 1:1, концентрация 5 мМ

На Рис. 3.2 приведены типичные кинетики спада сигнала эха для =CH- протонов холестерина до и после смешивания с ГК в соотношении 1:1, концентрация 5 мМ (в логарифмическом масштабе).

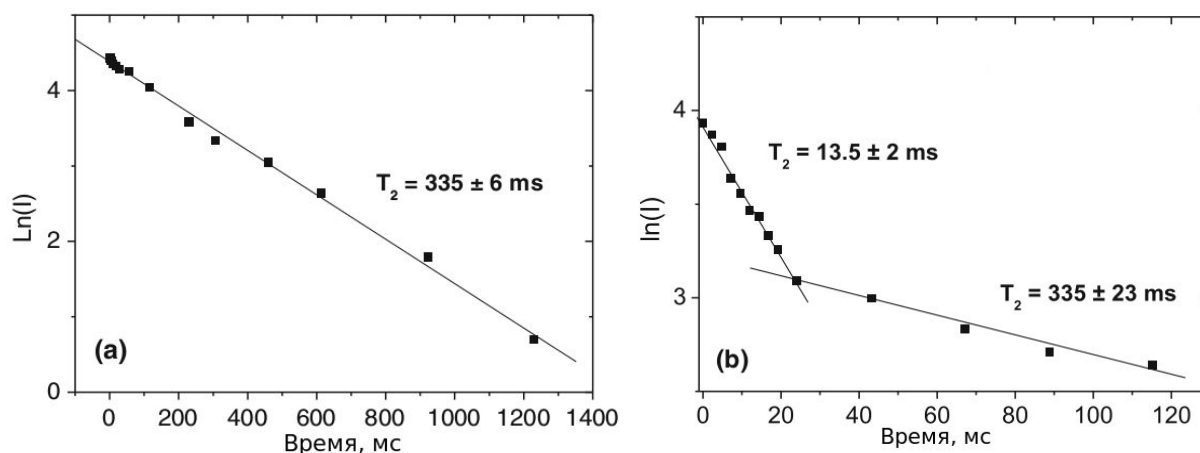


Рис. 3.2. Кинетика спада сигнала эха =CH- протонов холестерина до (слева) и после (справа) смешивания с ГК (в логарифмическом масштабе)

Кинетика спада сигнала эха для протонов чистого холестерина носит моно-экспоненциальный характер. При добавлении ГК кинетика принимает би-экспоненциальный характер и описывается следующим уравнением:

$$I(t) = I_1 \exp(-t/T_{21}) + I_2 \exp(-t/T_{22}) \quad (3.1)$$

При этом время “длинной” компоненты совпадает в пределах погрешности со временем релаксации протонов “свободного” холестерина (в растворе без ГК). А наличие быстро спадающей компоненты означает, что в случае добавления ГК, в растворе присутствуют как свободные

молекулы холестерина, так и связанные с молекулами ГК. Наблюдаемое в эксперименте короткое время релаксации - 13 мс - говорит о наличии крупных ассоциатов [133].

Измерение предэкспоненциальных множителей позволяет определить долю молекул находящихся в комплексе и вычислить константы стабильности и стехиометрию комплексов. В общем случае, константа стабильности K для реакции комплексообразования



вычисляется следующим образом:

$$K = \frac{[Chol_nGA_m]}{[Chol]^n[GA]^m}, \quad (3.2)$$

где $[Chol]$ - концентрация свободного холестерина, $[GA]$ - концентрация свободной ГК, $[Chol_nGA_m]$ - концентрация комплекса. Стехиометрические коэффициенты определялись на основании серии экспериментов с различными соотношениями концентраций холестерин:ГК с помощью оптимизационной программы, написанной в среде MathCAD.

Так как холестерин нерастворим в воде, в данной части работы комплексы были приготовлены путем смешения исходных соединений в дейтерированном метаноле. Для вычисления констант стабильности и термодинамических параметров комплексообразования образцы с различным соотношением холестерин:ГК (5мМ:5мМ, 10мМ:5мМ и 5 мМ:10мМ) были проанализированы при различных температурах: 300 К и 320 К. Стехиометрия и константа стабильности комплекса вычислялась посредством фитирования кинетики спада при различных концентрациях холестерина и глицирризина после установления равновесия, с использованием уравнений (3.1) и (3.2). Концентрации комплекса и чистого холестерина определялись из условий $n*[Chol_nGA_m] = I_1$, $[Chol] = I_2$. В результате было определено, что комплекс имеет стехиометрию 1:2, т. е. одна молекула холестерина связывается с двумя молекулами ГК. Этот результат согласуется с экспериментальными данными об ассоциации ГК с другими гидрофобными соединениями [2, 134]. Вычисленная для этой стехиометрии константа стабильности комплекса в метаноле составила $K_{12} = (3 \pm 0.6) \times 10^3 \text{ M}^{-2}$. Термодинамические параметры были вычислены из температурной зависимости константы стабильности:

$$\Delta H = \frac{R \ln \frac{K_2}{K_1}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}}, \quad \Delta G(T) = -RT \ln K, \quad \Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

и составили $\Delta G(300 \text{ K}) = -20 \pm 4 \text{ кДж/моль}$, $\Delta H = 0,4 \pm 0,1 \text{ кДж/моль}$ и $\Delta S(300 \text{ K}) = 68 \pm 14 \text{ Дж/моль} \cdot \text{K}$. Полученные данные указывают, что изменение энтропии вносит основной вклад в стабильность ассоциата холестерин:ГК в метаноле.

3.2 Ассоциаты холестерина с глицирризиновой кислотой - система доставки лекарств

Следующей частью исследования взаимодействия ГК с холестерином стало изучение способности ассоциатов холестерин-ГК захватывать малые молекулы, например, молекулы лекарства. Этот вопрос представляет отдельный интерес, так как недавние исследования показывают существование самособирающихся систем, основанных на комплексах включения бета-циклодекстрина и холестерина [135]. Авторы предполагают, что данные системы могут быть перспективными средствами доставки лекарств, благодаря ожидаемой биосовместимости и физиологической безопасности. С этой точки зрения, в качестве примера, в настоящей части работы был взят нифедипин (Рис. 3.3), который может образовывать комплексы стехиометрии 1:2 с ГК в водных и метанольных растворах [2]. В работе [2] показано, что такая ассоциация приводит к уменьшению времени спин-спиновой релаксации протонов нифедипина на ~30-50%.

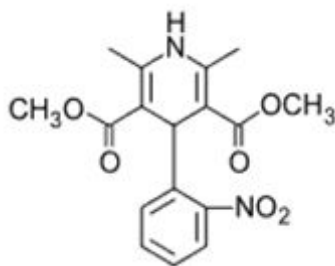


Рис. 3.3. Структурная формула нифедипина

На Рис. 3.4 приведена кинетика спада сигнала эха ароматических протонов нифедипина (1 мМ) в присутствии холестерина (5 мМ) и ГК (5 мМ) в логарифмическом масштабе. Можно заметить, что кинетика спада носит биэкспоненциальный характер. Измерения показывают, что короткая компонента имеет время релаксации 40 ± 8 мс. При этом длинная компонента 1450 ± 40 мс соответствует времени релаксации свободного нифедипина. Это может быть связано с тем, что нифедипин встраивается в агрегаты холестерин-ГК. Наблюдаемая биэкспоненциальная кинетика означает медленный обмен между свободным нифедипином и комплексом. Этот результат может рассматриваться с точки зрения применения комплексов холестерин-ГК в качестве средства доставки лекарственных препаратов с медленным высвобождением молекулы лекарства. Кроме того, данный факт может приводить к усилению проницаемости мембран для молекул нифедипина в случае образования подобных ассоциатов холестерин:ГК внутри мембраны.

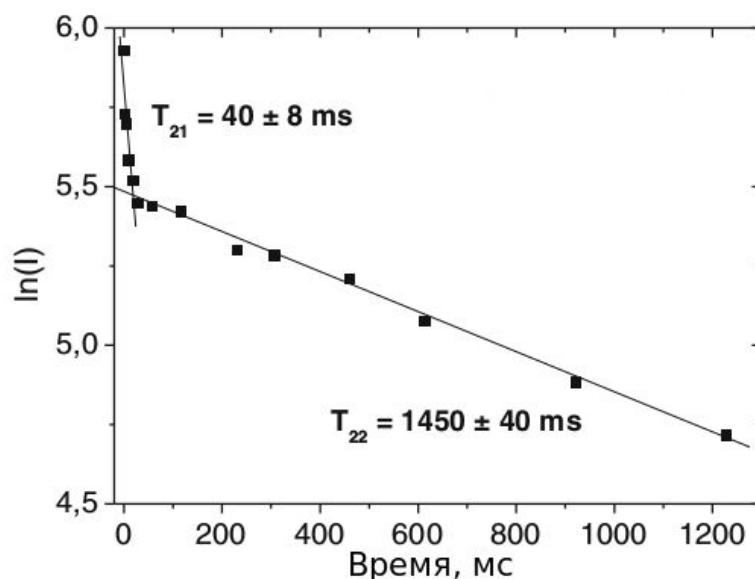


Рис. 3.4. Кинетика спада сигнала эха ароматических протонов нифедипина

3.3 Комплексообразование ГК с продуктами окисления холестерина

Холестерин – молекула с двойной связью, которая обеспечивает ее подверженность окислению. В организме присутствуют различные активные формы кислорода: супероксид-анион (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (ОН), гидроксид-анион (OH^-). Эти формы могут взаимодействовать с биологическими молекулами, изменяя их свойства. Антиоксидантные ферменты защищают ткани от неблагоприятного воздействия активного кислорода. Если образование активных форм превосходит возможности антиоксидантных систем, происходит окислительный стресс, который играет важную роль в патогенезе многих серьезных болезней, в частности, атеросклероза. В недавних исследованиях была идентифицирована еще одна активная форма кислорода – озон – в артериях человека, пораженных атеросклерозом.[136] Последующие эксперименты показали, что атеросклеротические ткани содержат продукты, образующиеся при окислении холестерина озоном.[136]

В настоящей работе мы исследовали как влияние ГК на скорость окисления холестерина, так и способность ГК связывать образующиеся продукты окисления. Образцы были приготовлены по методике описанной в пункте 2.1. Известно, что при озонировании холестерина в различных растворителях образуются различные продукты окисления [137]. Нами были исследованы процессы комплексообразования трех продуктов озонлиза: озонида (II), возникающего при окислении сухих пленок, продукта, возникающего при окислении холестерина в метанольном растворе (IIb) и 5,6-секостерола (IIa), образующегося в обоих случаях (Схема 1.1).

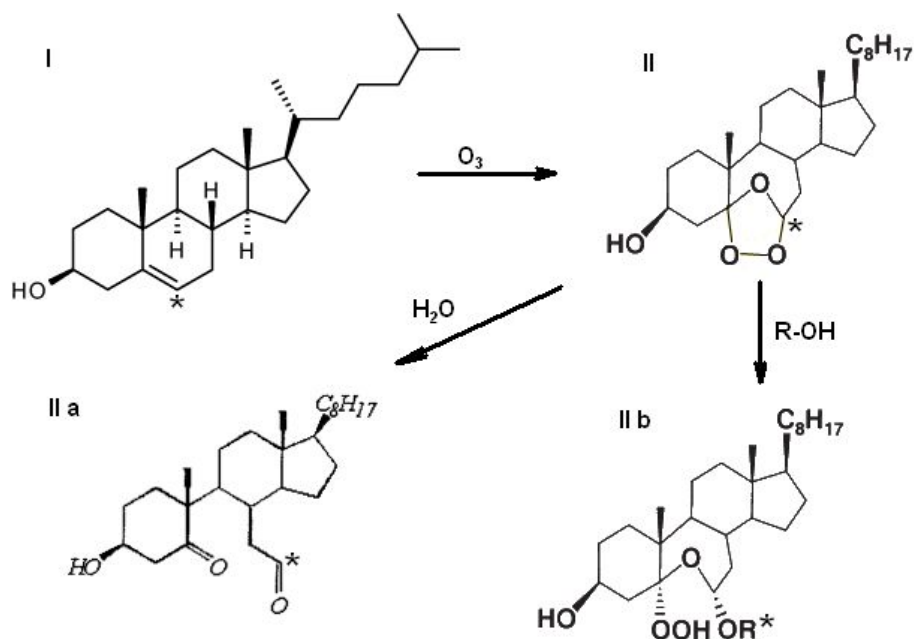
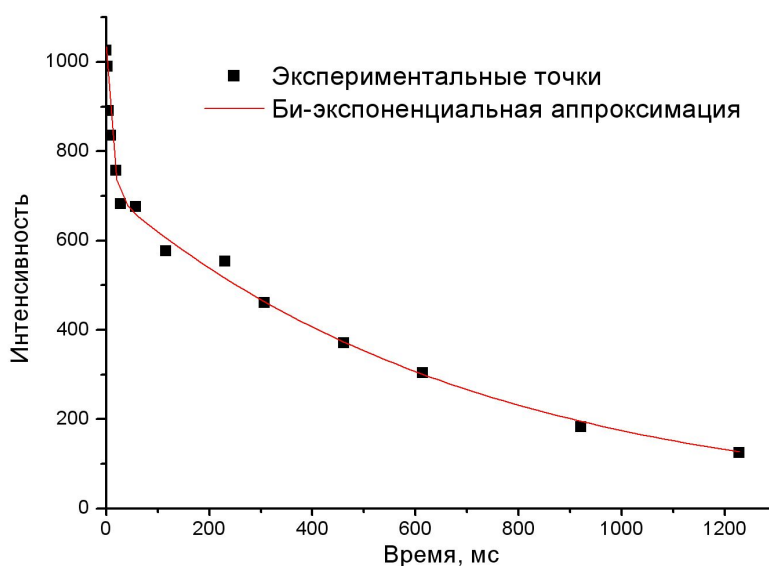


Схема 1.1. Схема озонлиза холестерина. I - холестерин, II - озонид, IIa - 5,6-секостерол, IIb - продукт в метанольном растворе

На Рис. 3.5 представлены кинетики релаксации продукта (IIb) окисления холестерина в метаноле и озонида (II). Видно, что кинетики имеют би-экспоненциальный характер, короткое время порядка 20 мс соответствует связанному состоянию. Для секостерола как при озонировании сухих пленок, так и при окислении в метаноле кинетика релаксации носит моно-экспоненциальный характер, что может означать отсутствие какого-либо связывания этого продукта с ГК.



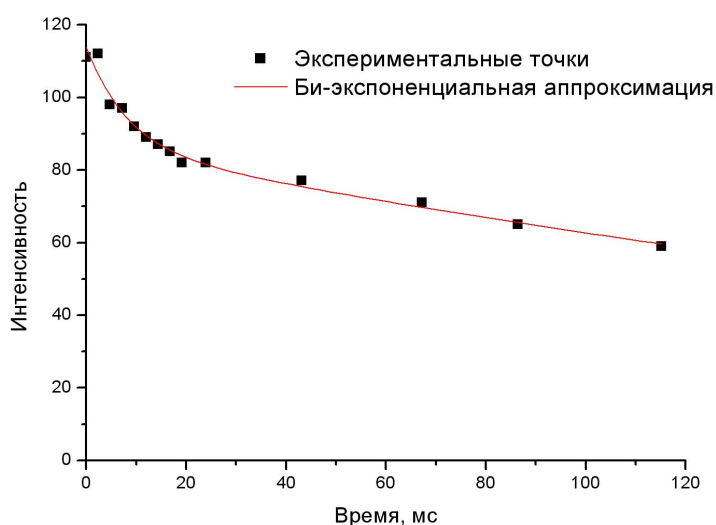


Рис. 3.5. Кинетика спада сигнала эха протонов продукта Пб озонирования I в метаноле (вверху) и озонида II (внизу)

Для озонида были рассчитаны константы стабильности при комнатной температуре и при температуре 320 К в предположении стехиометрии 1:2 рассчитанной для комплекса холестерина (см. раздел 3.1). Рассчитанная константа стабильности для комплекса озонида с ГК составила $K_{12}(300\text{ K}) = 7 \cdot 10^7 \pm 3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-2}$. Затем были вычислены термодинамические параметры комплексообразования: $\Delta H = (-28 \pm 14) \text{ кДж/моль}$, $\Delta G(300\text{K}) = (-45 \pm 22) \text{ кДж/моль}$, $\Delta S(300\text{K}) = (57 \pm 25) \text{ Дж/моль} \cdot \text{K}$. Отрицательное изменение энтальпии говорит о том, что, в отличие от комплексов самого холестерина с ГК, для которого стабилизация комплекса происходит исключительно за счет энтропийного фактора, существует дополнительный вклад в образование комплекса, который вносит энтальпийный фактор. Это проявляется и в более высокой константе стабильности комплекса.

Дополнительно было исследовано влияние ГК на скорость окисления холестерина озонном. Для этого сравнивались интенсивности сигналов ЯМР продуктов озонлиза сухих пленок чистого холестерина и комплекса холестерина с ГК (Рис. 3.6). По интенсивностям сигналов, соответствующих озониду, установлено, что в комплексе с ГК выход продукта окисления уменьшается приблизительно в 4.5 раза. Этот эффект может быть связан с антиоксидантными свойствами самой глицирризиновой кислоты [138], а также с тем что расположение молекул холестерина внутри комплекса с ГК затрудняет протекание химической реакции окисления озонном.

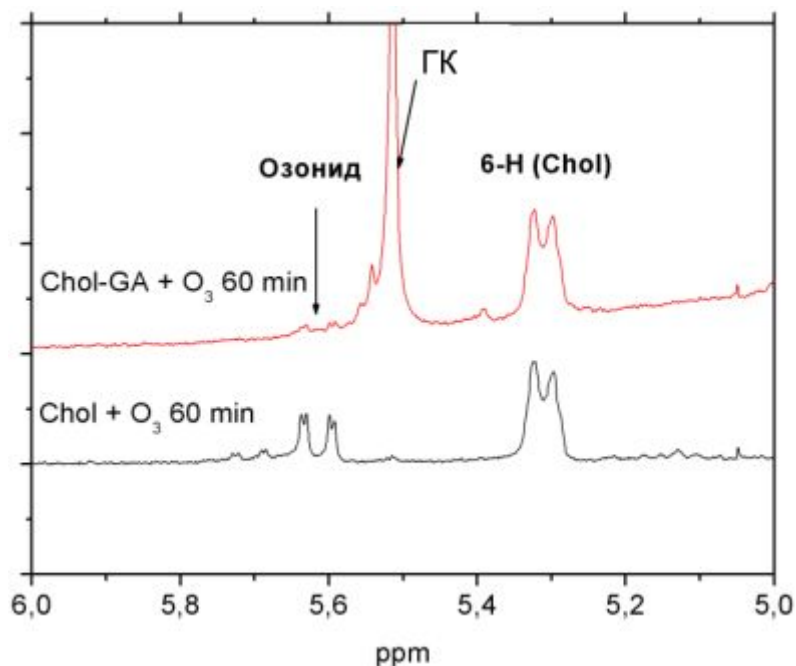


Рис. 3.6. Фрагменты ЯМР ^1H продуктов озонлиза сухих пленок чистого холестерина (вверху) и комплекса холестерина с ГК (1мг хол: 2мг ГК) в CD_3OD (внизу). Продолжительность озонлиза 60 мин.

3.4 Заключение к главе 3

Было исследовано взаимодействие глицирризиновой кислоты холестерином - с компонентом клеточных мембран, ответственным за их "текучесть". Установлен факт образования крупных ассоциатов холестерин:ГК в метаноле, стехиометрия данных комплексов составила 1:2 и константа стабильности для данной стехиометрии $K_{12} = (3 \pm 0.6) \times 10^3 \text{ M}^{-2}$. Также были определены термодинамические параметры реакции комплексообразования: $\Delta G (300 \text{ K}) = -20 \pm 4$ кДж/моль, $\Delta H = 0,4 \pm 0,1$ кДж/моль и $\Delta S (300 \text{ K}) = 68 \pm 14$ Дж/моль, то есть стабилизация комплекса происходит за счет энтропийного фактора.

На модели молекулы нифедипина изучена возможность захвата малых молекул лекарства ассоциатами холестерин:ГК. Обнаружено, что молекула нифедипина может встраиваться в ассоциаты холестерин:ГК, причем имеет место медленный обмен между раствором и комплексом. Данный факт может указывать на возможное усиление проницаемости мембран для молекул нифедипина в случае образования подобных ассоциатов холестерин:ГК внутри мембраны.

Изучено связывание ГК с продуктами окисления холестерина: озонидом (II) и продуктом IIb (см. Схему 1.1). Рассчитанная константа стабильности для комплекса озонида с ГК составила $K_{12} (300 \text{ K}) = 7 \cdot 10^7 \pm 3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-2}$, термодинамические параметры комплексообразования: $\Delta H = (-28 \pm 14)$ кДж/моль, $\Delta G(300\text{K}) = (-45 \pm 22)$ кДж/моль, $\Delta S(300\text{K}) = (57 \pm 25)$ Дж/моль*К. В отличие от холестерина, в стабильность этого комплекса вносят вклад как энтропийный, так и энтальпийный

факторы. Возможно, это связано с наличием дополнительных атомов кислорода в составе молекулы озонида. Это проявляется и в более высокой константе стабильности комплекса. Также показано, что в комплексе с ГК выход продукта окисления уменьшается приблизительно в 4.5 раза, что говорит о проявлении антиоксидантных свойств глицирризиновой кислоты. Данные результаты могут иметь практическое значение для связывания и вывода из организма продуктов окисления холестерина, играющих существенную роль в развитии атеросклероза.

Глава 4. Влияние глицирризиновой кислоты на проницаемость клеточных мембран

4.1 Влияние глицирризиновой кислоты на проницаемость мембран эритроцитов

Для исследования влияния глицирризина на проницаемость мембран эритроцитов использовались образцы, приготовленные по методике, описанной в пункте 2.2. В качестве модельного соединения, проходящего через мембрану, был выбран ион формиата. Время обмена формиата через клеточную мембрану измерялось по методике, описанной в пункте 2.5.

Измерения времени спин-решеточной релаксации протонов формиат-ионов были проведены в отсутствии и в присутствии различных концентраций ГК: 0,01 мМ, 0,05 мМ, 0,1 мМ, 0,5 мМ и 1 мМ. По этим данным, согласно формуле (2.1) из главы 2 было вычислено время прохождения формиат-ионов через мембрану эритроцита. Зависимость времени обмена от концентрации ГК представлена на Рис. 4.1. Концентрация 10^{-5} М ГК соответствует началу образования ее предмицеллярных состояний [107], и примечательно, что самое значительное увеличение проницаемости (на 30%) соответствует именно этой концентрации, а дальнейшее увеличение носит линейный характер. Концентрация 10^{-3} М соответствует концентрации мицеллообразования ГК [107], увеличение проницаемости для этой концентрации составило примерно 50%.

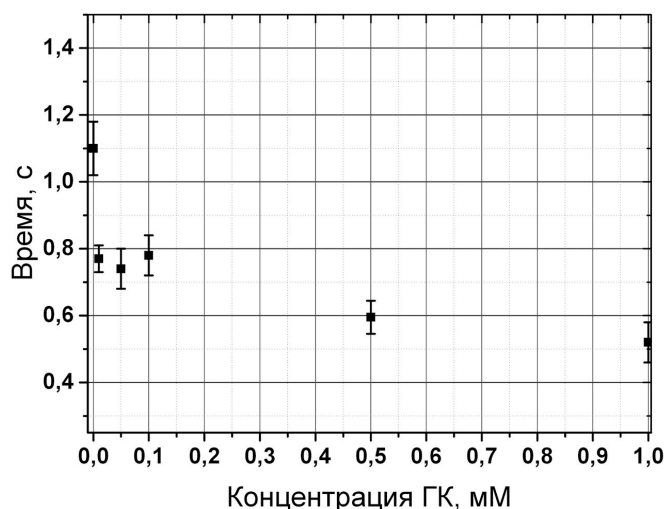


Рис. 4.1. Зависимость времени обмена формиата через мембрану эритроцитов от концентрации ГК

Таким образом, показано, что модификация мембраны эритроцитов глицирризиновой кислотой приводит к существенному увеличению ее проницаемости для ионов формиата. Механизм этого явления будет обсужден ниже.

4.2 Влияние глицирризиновой кислоты на проницаемость мембран клеток К562

Для исследования влияния глицирризина на проницаемость мембран клеток миелоидного лейкоза К562 использовались образцы, приготовленные по методике описанной в пункте 2.3. В качестве модельной молекулы был выбран ион формиата. Время обмена формиата через клеточную мембрану измерялось по методике, описанной в пункте 2.5.

В данной части работы было проведено сравнение воздействия глицирризина с действием других комплексантов: арабиногалактана (АГ) и бета-циклодекстрина (ЦД), их структурные формулы приведены на Рис. 4.2. Оба эти соединения широко используются для комплексообразования с лекарственными препаратами. [1, 16, 140] Как обсуждалось в главе 2, ЦД может увеличивать проницаемость посредством прямого воздействия на мембраны клеток слизистой оболочки и усиливают абсорбцию лекарства и его биодоступность. [17, 20] Солюбилизация специфических мембранных липидов эритроцитов человека посредством комплексообразования с ЦД и их способность вызывать нарушение целостности мембран оказывает влияние на абсорбцию лекарств и их токсичность. В ряде работ установлено, что ЦД, благодаря их способности извлекать холестерин из клеточных мембран, может увеличивать текучесть мембран. [22]

Для характеристики влияния различных комплексантов на проницаемость клеток миелоидного лейкоза К562 было изучено влияние ГК, АГ и ЦД на время обмена иона формиата через клеточную мембрану методом ЯМР с добавлением парамагнитных ионов. Так как ЦД способны извлекать холестерин из клеточной мембраны, сравнение действия различных комплексантов с действием ЦД может дать дополнительное представление о механизме влияния на свойства клеточной мембраны.

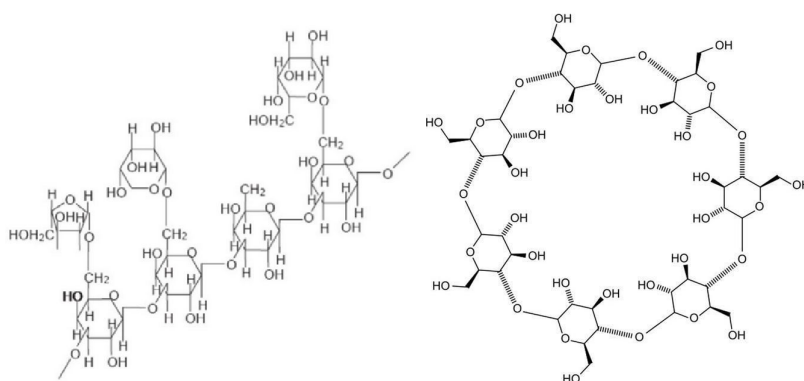


Рис. 4.2. Структурные формулы фрагмента арабиногалактана (слева) и бета-циклодекстрина (справа)

Для характеристики влияния комплексантов на проницаемость мембран было измерено время продольной релаксации (T_1) в присутствии парамагнитных ионов Mn^{2+} . Средние значения T_1 для трех серий экспериментов приведены в Таблице 4.1. Затем по формуле (2.1) из главы 2 было рассчитано время нахождения молекулы формиата внутри клетки.

Таблица 4.1. Времена продольной релаксации ионов формиата в клеточной суспензии в присутствии парамагнитных ионов Mn^{2+}

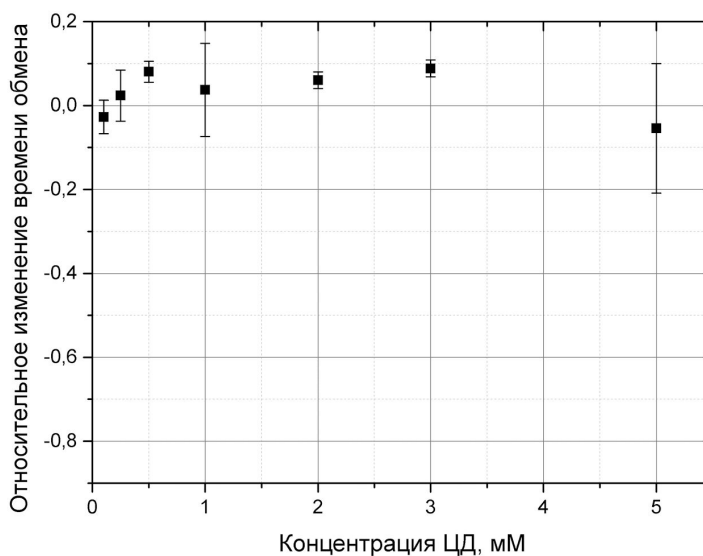
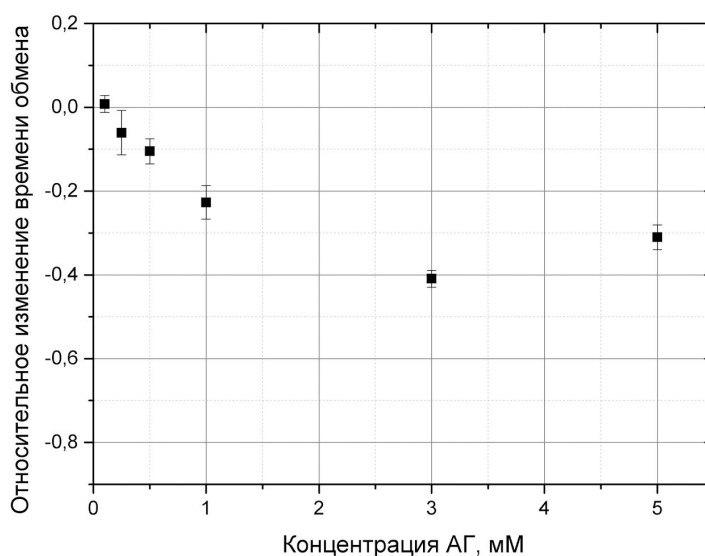
Концентрация комплексанта, мМ	T_1 в присутствии ГК, мс	T_1 в присутствии АГ, мс	T_1 в присутствии ЦД, мс
0	690±7	703±4	686±6
0,1	665±5	682±5	673±5
0,25	634±8	685±7	704±5
0,5	579±7	714±8	737±6
1	542±3	647±7	712±8
2	280±4	--	725±7
3	275±5	432±5	742±5
5	227±3	516±7	657±6

Далее изучалось относительное изменение времени обмена по сравнению с контрольным необработанным образцом в зависимости от концентрации комплексанта:

$$\Delta = \frac{T_{ex} - T_{ex0}}{T_{ex0}} \quad (4.1)$$

где T_{ex0} , T_{ex} - времена обмена исходного необработанного образца, и образца с добавлением комплексанта, соответственно.

Результаты измерений представлены на Рис. 4.3. На Рис. 4.4 приведены рассчитанные значения проницаемости мембраны для ионов формиата при различных концентрациях комплексантов. Вычисления производились в предположении, что клетки являются сферическими частицами диаметром ~ 17 мкм [140].



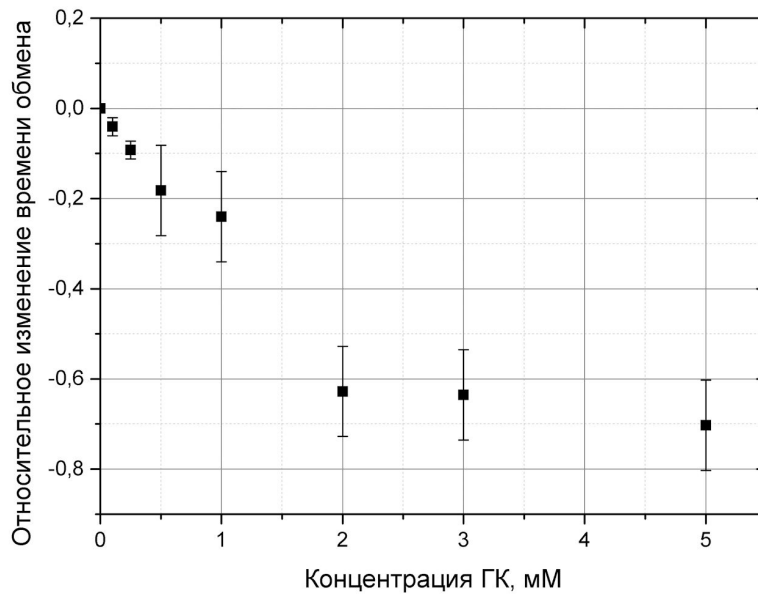


Рис. 4.3. Относительное изменение времени обмена (относительно необработанного образца) в присутствии различных концентраций ГК, АГ и β -ЦД

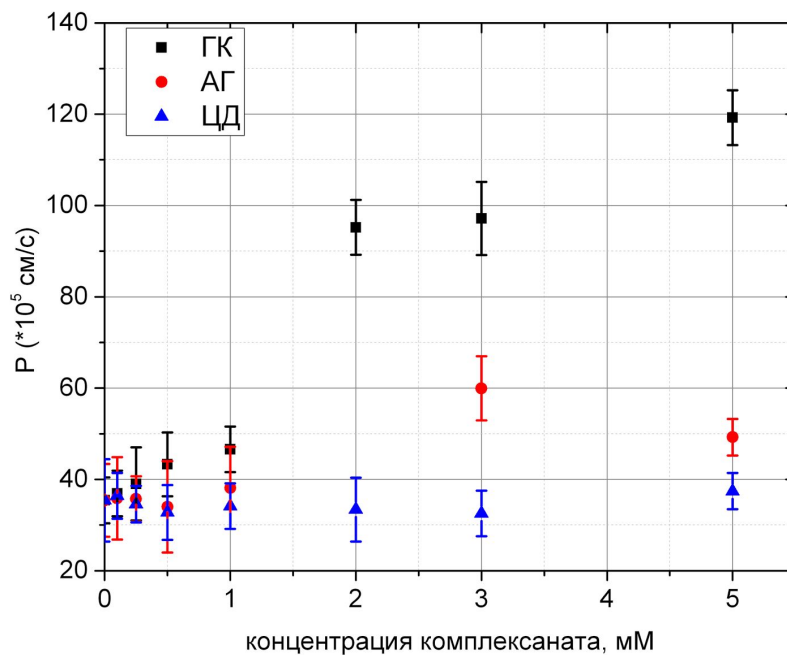


Рис. 4.4. Зависимость проницаемости мембраны для ионов формиата от концентрации комплексанта (ГК, АГ, ЦД)

Следует отметить, что ГК и АГ имеют схожий характер влияния на проницаемость мембраны, в то время как воздействия ЦД обнаружено не было. Это позволяет предположить, что механизм действия ГК и АГ не связан с экстракцией мембранного холестерина. Полученные результаты согласуются с установленным эффектом увеличения проницаемости мембран

эритроцитов в присутствии ГК.

На Рис. 4.5 приведены вычисленные значения $1/P$ клеток K562 для иона формиата в зависимости от его концентрации (координаты Хэйенса-Вульфа) в отсутствии и в присутствии 1,5 мМ ГК. Вычисления производились в предположении, что клетки являются сферическими частицами диаметром ~ 17 мкм [139]. Зависимость имеет линейный характер, что является типичным для облегченной диффузии [6, 121, 122].

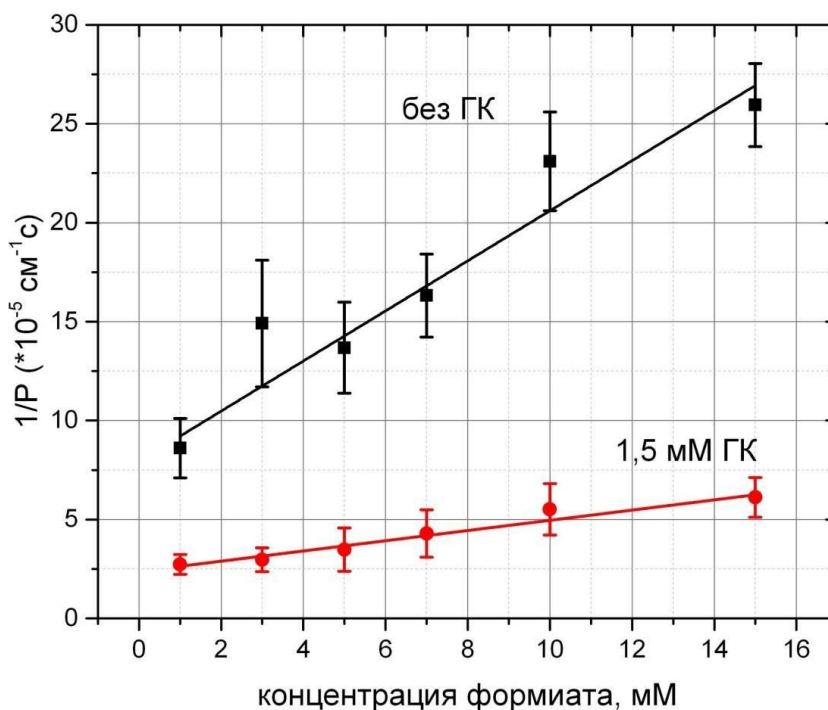


Рис. 4.5. Зависимость проницаемости мембраны для ионов формиата от его концентрации в отсутствии и в присутствии 1,5 мМ ГК, координаты Хэйенса-Вульфа

В Таблице 4.2 приведены результаты вычисления констант K_m и V_m . V_m в присутствии 1,5 мМ ГК примерно в 5,5 раз, а K_m в 1,5 раза больше, чем в отсутствии ГК. Так как V_m соответствует максимальной скорости диффузии, а K_m характеризует начальную скорость процесса и сродство транспортируемых молекул к мембране, это означает, что процесс диффузии в присутствии ГК происходит быстрее, хотя сродство формиата к мембране в присутствии ГК меньше, чем в отсутствии. Учитывая, что проницаемость клеток в присутствии ГК увеличивается, можно сделать вывод, что в присутствии ГК константа скорости реакции k_2 вхождения формиата внутрь клетки из контакта с мембраной выше, чем в отсутствии.

Таблица 4.2. Характеристические константы для диффузии формиата через клеточную мембрану

	Без ГК	1,5 мМ ГК
K_m	6,2±1,4 мМ	8,9±1,3 мМ
V_m	(7±1)*10 ⁻⁹ М/(см ² *с)	(38±3)*10 ⁻⁹ М/(см ² *с)

4.3 Заключение к главе 4

Было исследовано влияние ГК на проницаемость мембран эритроцитов и клеток миелоидного лейкоза K562. Обнаружено, что ГК существенно ускоряет обмен формиат-ионов через клеточную мембрану. Для эритроцитов уменьшение времени обмена на 30% происходит при концентрации ГК 10⁻⁵ М, которая соответствует началу образования ее предмицеллярных состояний. Максимальное уменьшение времени обмена формиат-ионов между внутриклеточным и внеклеточным окружением для эритроцитов составило примерно 50%, для клеток K562 - примерно 60%. Проведено также сравнение действия ГК с действием других комплексантов: арабиногалактана и метил-бета-циклодекстрина. Эффект арабиногалактана схож с эффектом ГК, в то время как эффекта циклодекстрина на время обмена формиат-ионов не наблюдалось. Так как известно, что циклодекстрин способен извлекать холестерин из клеточных мембран, изменяя таким образом их динамические характеристики, это позволяет предположить, что механизм действия ГК и арабиногалактана не связан с экстракцией мембранного холестерина. Также показано, что зависимость проницаемости мембраны от концентрации формиата имеет характер, свойственный облегченной диффузии. При этом процесс диффузии формиат-ионов в присутствии ГК происходит быстрее, хотя сродство формиат-ионов к мембране в присутствии ГК меньше, чем в отсутствии. Это означает, что в присутствии ГК константа скорости реакции вхождения формиата внутрь клетки из контакта с мембраной выше, чем в отсутствии.

Принимая во внимание эти результаты, можно предположить, что встраивание ГК облегчает проникновение ионов формиата в клетку. Глицирризиновая кислота, как и циклодекстрин, способна образовывать комплексы с холестерином. Однако, воздействие их на проницаемость клеточных мембран отличается: ГК существенно увеличивает проницаемость, в то время как ЦД не оказывает на нее влияния. Это различие может быть обусловлено различными механизмами взаимодействия данных молекул с мембраной: ГК, связываясь с холестерином, встраивается в липидный бислой, а циклодекстрин, связываясь с холестерином, извлекает его из

мембраны. Более детально процесс встраивания ГК внутрь мембраны будет обсуждаться в последующих главах.

Глава 5. Влияние глицирризиновой кислоты на свойства мембран эритроцитов

5.1 Влияние глицирризиновой кислоты на упругость мембран эритроцитов

Образцы эритроцитов для исследования влияния ГК на упругость мембран готовились по методике, описанной в пункте 2.2. Обработка экспериментальных данных производилась по методике, описанной в пункте 2.7.

Результаты исследования влияния ГК на упругость эритроцитов приведены в Таблице 5.1. Для трех типов образцов – контрольного (необработанного ГК), обработанного 0.05 мМ ГК и обработанного 0.5 мМ ГК – были произведены измерения упругости и построены распределения параметра $\xi = \frac{2E_{cell}}{\pi(1-\eta_{cell}^2)\tan\alpha}$ (см. раздел 2.7), характеризующего модуль Юнга, по поверхности эритроцитов. Гистограммы распределения параметра ξ приведены на Рис. 5.1.

Таблица 5.1. Значение параметра ξ и ширина его распределения для образцов, обработанных различными концентрациями ГК

Образец	Среднее значение ξ , Н/м ²	Ширина распределения ξ на полувысоте, Н/м ²
контроль	$3 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$
0,05 мМ ГК	$9 \cdot 10^2$	10^3
0,5 мМ ГК	$5 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^2$

Видно, что при увеличении концентрации ГК среднее значение параметра ξ сдвигается, что говорит об относительном уменьшении модуля упругости мембран по сравнению с необработанным образцом. Кроме того, сужается также само распределение, что, возможно, говорит о том, что поверхность эритроцита становится более однородной.

а)

б)

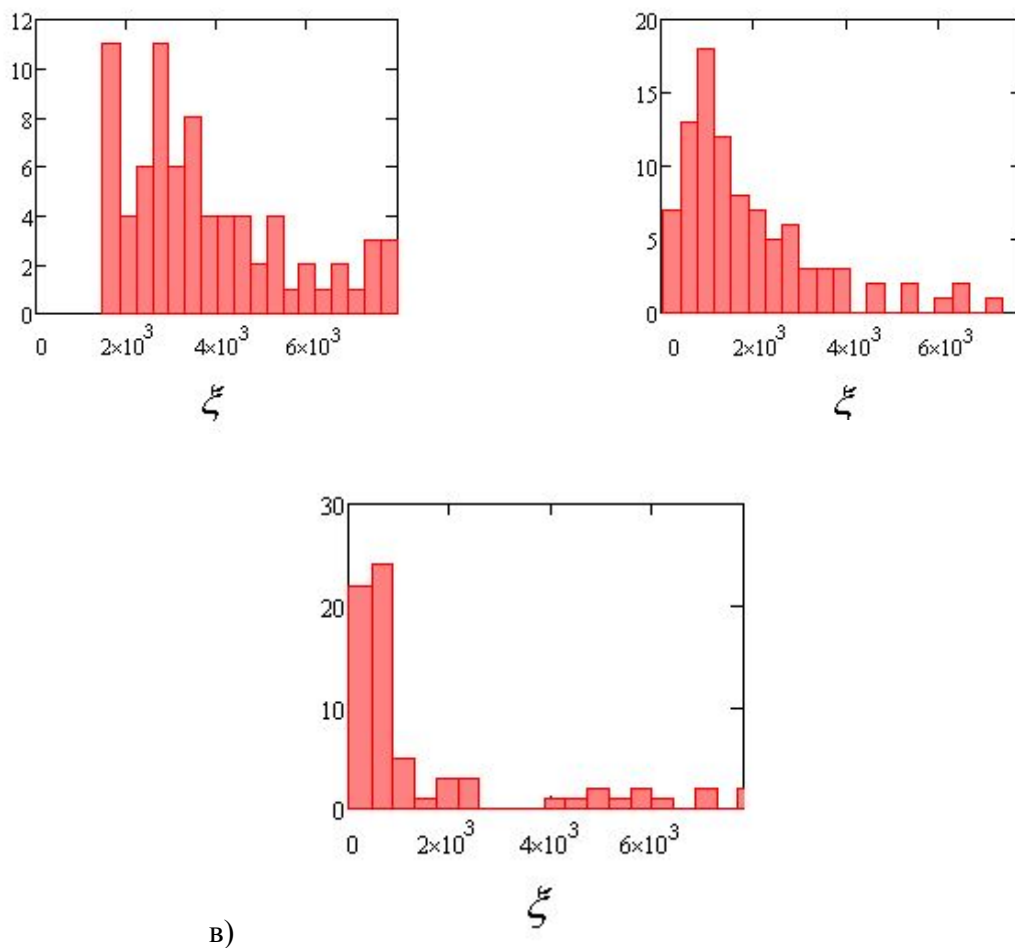


Рис. 5.1. Распределение параметра ξ . а) контрольный необработанный образец, б) образец обработанный 0,05 мМ ГК, в) образец обработанный 0,5 мМ ГК

Старение эритроцитов сопровождается появлением неоднородностей на его поверхности и снижением эластичности, что приводит к затруднению прохождения этих клеток через мелкие поры. На этом основан механизм внутриклеточного гемолиза: «постаревшие» эритроциты задерживаются в специальных фильтрах в селезенке и поглощаются макрофагами. Полученные результаты указывают на то, что под воздействием ГК происходит своего рода «омоложение» эритроцитов: поверхность становится менее шероховатой и повышается эластичность, что, возможно, способно приводить к продлению жизненного цикла клеток.

5.2 Влияние глицирризиновой кислоты на структуру поверхности эритроцитов

Образцы эритроцитов для исследования влияния ГК на структуру поверхности клеток

готовились по методике, описанной в пункте 2.2. На Рис. 5.2 приведены типичные примеры карт поверхности эритроцитов, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии. На поверхности эритроцитов, обработанных ГК заметны белые точки (Рис. 5.2, с). Это небольшие наноразмерные выпуклости, которые становятся более заметными при увеличении (Рис. 5.2, d). Следует отметить, что при аналогичном увеличении на необработанной поверхности эритроцитов подобных выпуклостей не наблюдается (Рис. 5.2, b).

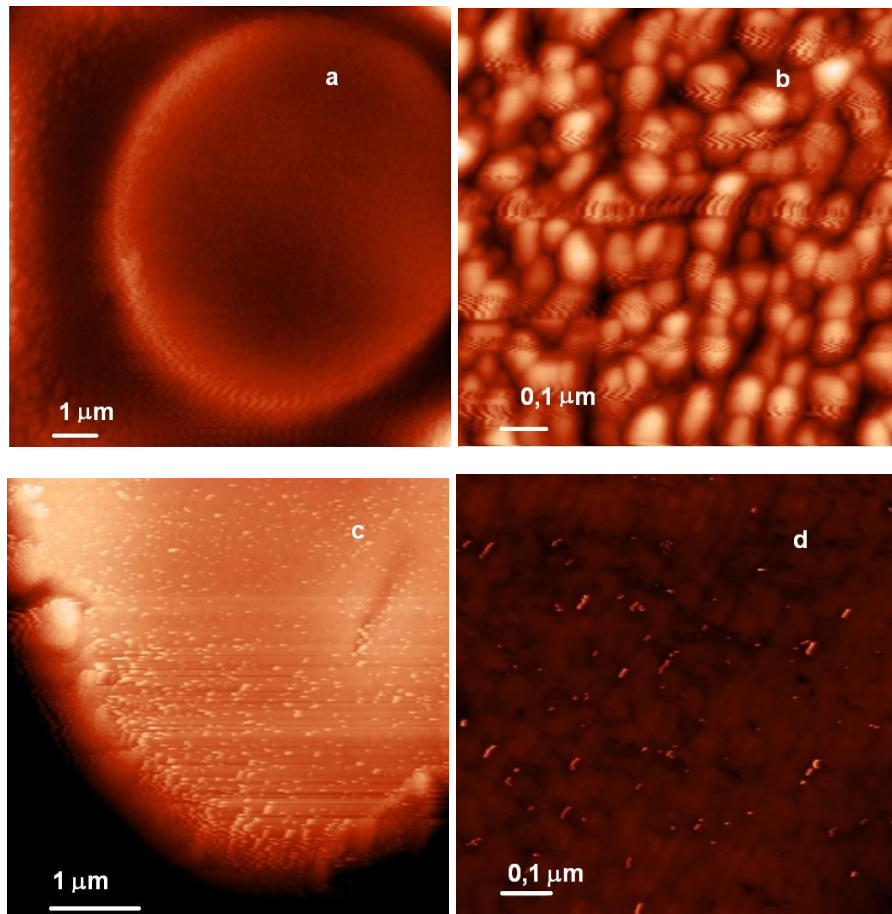


Рис. 5.2. Поверхность эритроцитов при различном увеличении, данные атомно-силовой микроскопии, a, b – контрольный необработанный образец; c, d – образец обработанный 0,05 мМ ГК.

Различия становятся более заметны на Рис. 5.3, на котором показаны профили поверхности эритроцитов в отсутствии и в присутствии 0,05 мМ ГК. Можно заметить, что после обработки ГК на поверхности эритроцитов возникают выпуклости размером примерно 20-40 нм.

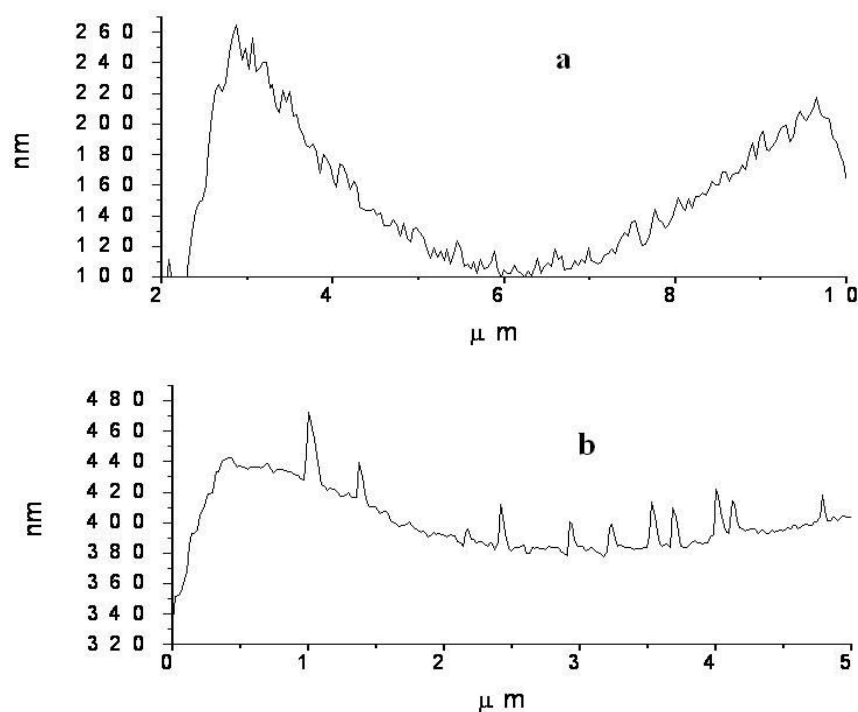


Рис. 5.3. Профили поверхности эритроцитов, полученные методом атомно-силовой микроскопии, а – контрольный необработанный образец, b – образец обработанный 0,05 мМ ГК

Образование такого рода неоднородностей на поверхности клетки может быть связано со способностью ГК встраиваться внутрь клеточной мембраны с образованием супрамолекулярных ассоциатов с холестерином, приводящим к изменению структуры поверхности.

5.3 Влияние глицирризиновой кислоты на осмотическую стойкость эритроцитов

В связи с полученными в главах 4 и 5 результатами об изменении проницаемости и упругости клеточных мембран под действием ГК встает вопрос о сохранении целостности и жизнеспособности клеток при такой обработке. Данный вопрос был исследован нами на примере осмотического гемолиза эритроцитов.

Степень гемолиза эритроцитов изучалась оптическими методами. Первый подход основан на том, что гемоглобин практически не поглощает в диапазоне длин волн выше 650 нм. Поэтому когда мы имеем дело с полностью разрушенными эритроцитами и раствором гемоглобина, оптическая плотность на длинах волн больше 650 нм практически равна нулю. В случае же присутствия в растворе целостных эритроцитов, дополнительный вклад в спектр вносит рассеяние на эритроцитах, что приводит к появлению ненулевой оптической плотности на длинах волн

больше 650 нм (Рис. 5.4). Однако наличие эритроцитов в растворе вносит искажения в спектр, что затрудняет количественную характеристику осмотической стойкости эритроцитов.

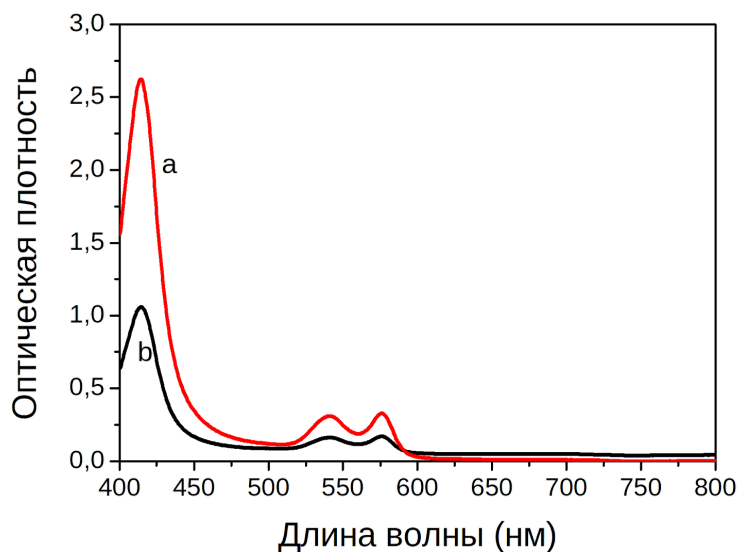


Рис. 5.4. Спектр поглощения гемоглобина: красная линия – суспензия эритроцитов в растворе 0,35% NaCl, наблюдается только поглощение; черная линия - суспензия эритроцитов в растворе 0,8% NaCl, в спектре виден вклад от рассеяния.

Другой подход заключается в следующем: после помещения эритроцитов в гипотонический раствор образец центрифугируется для осаждения клеток, сохранивших целостность, и для спектрофотометрического анализа используется надосадочная жидкость. Это позволяет в спектре избавиться от рассеяния на взвешенных в растворе частицах.

Эритроциты в крови человека живут около трех месяцев, и в любом образце крови всегда присутствуют эритроциты разного возраста. Возраст клеток оказывает существенное влияние на свойства их мембран, в том числе их прочность и эластичность. Это, в свою очередь, влияет на их осмотическую стойкость. Поэтому в одном и том же образце при фиксированной концентрации NaCl часть эритроцитов лизирует, а часть сохраняет свою целостность. Для количественной характеристики степени гемолиза эритроцитов вводят некий усредненный параметр – осмотическую хрупкость. Осмотическая хрупкость – это концентрация NaCl, при которой лизирует 50% эритроцитов в суспензии.

На Рис. 5.5 приведены спектры поглощения для суспензии эритроцитов в 0,4% растворе NaCl. На спектрах видно, что для контрольного, необработанного образца (рис. 4а) рассеяние на эритроцитах практически отсутствует. Для образца, обработанного 0,5 мМ ГК, при той же концентрации NaCl в растворе, присутствует вклад от рассеяния (рис. 4б). Это может означать, что

под воздействием ГК мембраны эритроцитов изменяют свои свойства таким образом, что большее количество клеток сохраняет свою целостность.

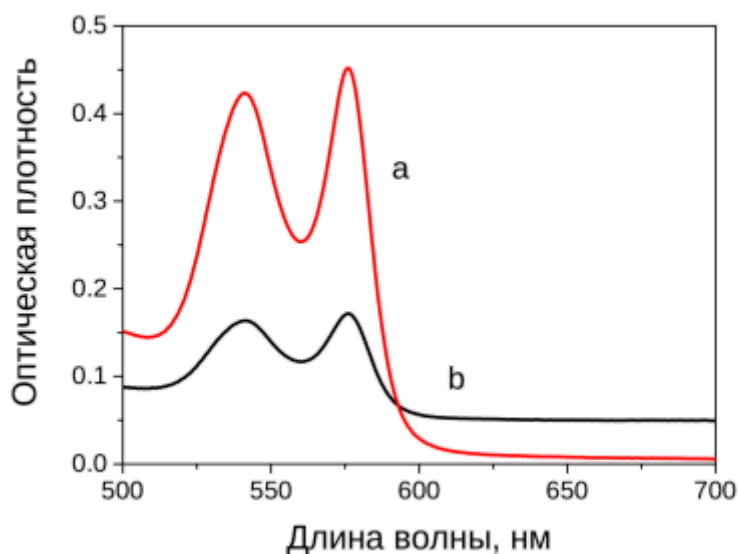


Рис. 5.5. Сравнение спектров поглощения образцов в отсутствие и в присутствии ГК: а – спектр контрольного образца; b – спектр образца, обработанного 0,5 мМ ГК

На Рис. 5.6 представлены спектры надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования эритроцитов, помещенных в растворы различной концентрации NaCl. Видна общая тенденция понижения оптической плотности при повышении концентрации NaCl в растворе для контрольного образца необработанных эритроцитов (Рис. 5.6, а). Это согласуется с тем фактом, что повышение концентрации соли ведет к ослаблению гемолиза. Для образцов, предварительно помещенных на 15 минут в раствор ГК концентрации 1 мМ, наблюдается значительное ослабление гемолиза по сравнению с контролем даже в дистиллированной воде (Рис. 5.6, b).

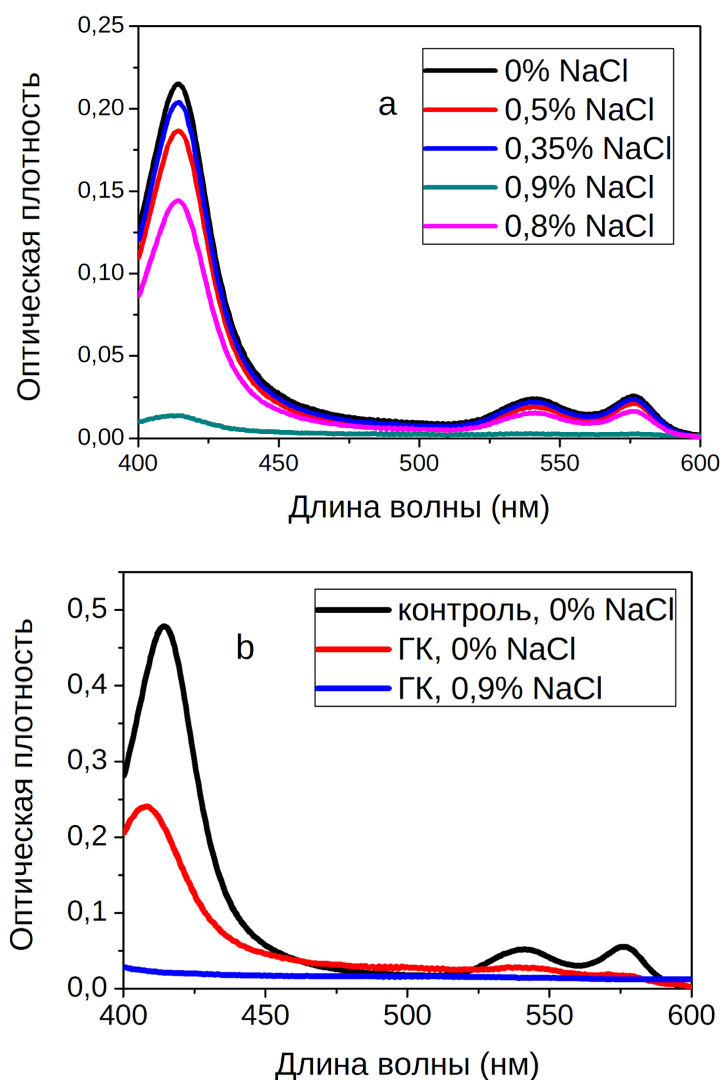


Рис. 5.6. Спектры поглощения надосадочной жидкости в растворах разной концентрации NaCl: а – контрольный необработанный образец, б – образец, обработанный 0,5 мМ ГК.

5.4 Заключение к главе 5

Было обнаружено уменьшение модуля упругости мембран эритроцитов обработанных ГК по сравнению с необработанным образцом. Кроме того, сужается также распределение значений модуля упругости по поверхности эритроцита, что, возможно, говорит о том, что поверхность эритроцита становится более однородной. Известно, что за время жизненного цикла эритроцита происходит его старение, сопровождающееся появлением неоднородностей на поверхности и снижением эластичности. Полученные результаты указывают на то, что под воздействием ГК происходит своего рода «омоложение» эритроцитов: поверхность становится менее шероховатой и повышается эластичность, что, возможно, способно приводить к продлению жизненного цикла

клеток.

В связи с этими результатами, интерес представляет также влияние ГК на гемолиз эритроцитов. Для образцов эритроцитов обработанных 1 мМ ГК наблюдается значительное ослабление гемолиза по сравнению с контролем даже в дистиллированной воде. Осмотическая хрупкость эритроцитов может зависеть от многих факторов: отношения объема клетки к площади поверхности цитоплазматической мембраны, эластичности мембран, концентрации осмотически активного материала в клетке и от изменения количества этого материала, изменения свойств мембраны под действием физических факторов и экзогенных химических соединений. Принимая во внимание факт изменения модуля Юнга (а значит и эластичности) мембраны под воздействием ГК, можно предположить, что увеличение осмотической стойкости эритроцитов происходит благодаря модификации мембраны, приводящей к изменению её механических свойств.

Глава 6. Взаимодействие глицирризиновой кислоты с липидной мембраной

6.1 Влияние ГК на подвижность липидов в мембране эритроцитов.

Известно, что времена спин-решеточной T_1 и спин-спиновой T_2 релаксации протонов очень чувствительны к межмолекулярному взаимодействию, а также к вращательной и диффузионной подвижности молекул [141]. Это позволяет использовать этот метод для исследования межмолекулярных взаимодействий и комплексов включения [18-22]. В ситуации, когда молекулы в связанном и свободном состоянии находятся в состоянии быстрого обмена, изменение сигнала ЯМР при варьировании задержки описывается моно-экспоненциальным законом. В случае же так называемого медленного обмена (по сравнению с временем релаксации) наблюдается би-экспоненциальная кинетика:

$$A(t) = P_1 \times \exp(-t/T_{21}) + P_2 \times \exp(-t/T_{22})$$

Компоненты P_1 и P_2 соответствуют доле молекул, различающихся диффузионной подвижностью. На Рис. 17 представлен фрагмент ^1H ЯМР-спектра эритроцитов. Сигнал на 3.1 мд принадлежит метильным протонам $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ группы, расположенной в полярной «голове» липида в мембране [142].

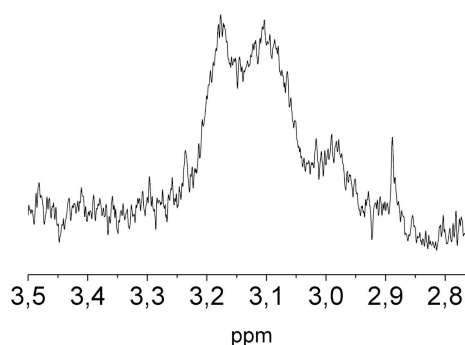


Рис. 17. Фрагмент ^1H ЯМР спектра эритроцитов в фосфатно-солевом буфере, рН=7,4

Была проведена серия экспериментов с малым количеством крови (50 мкл на ампулу 0,6 мл) и различными концентрациями ГК в растворе (0, 0,5, 1, 2, 5 мМ). Для чистых эритроцитов, необработанных глицирризиновой кислотой, кинетика спада сигнала эха носит моно-экспоненциальный характер со временем релаксации 10 мс. На Рис. 6.1 и 6.2 приведены

кинетики спада сигнала эха для сигнала от липида в логарифмических координатах при 2 мМ и 5 мМ ГК, соответственно.

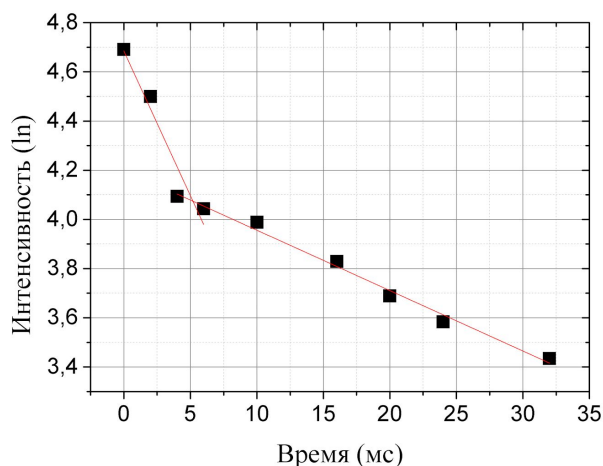


Рис. 6.1. Кинетика спада сигнала эха на 3.1 мд (метильные протоны $-N^+(CH_3)_3$ группы), 2 мМ ГК

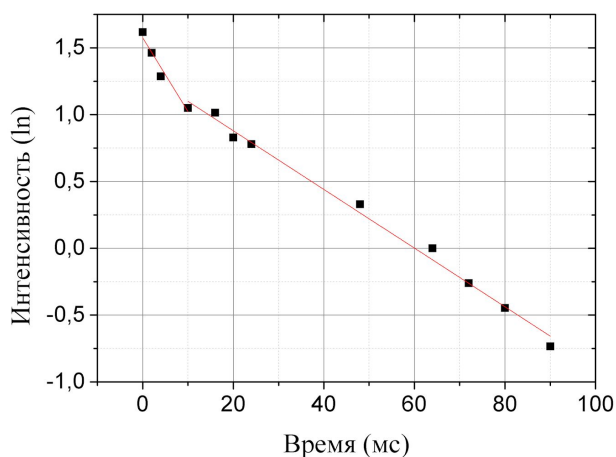


Рис. 6.2. Кинетика спада сигнала эха на 3.1 мд (метильные протоны $-N^+(CH_3)_3$ группы), 5 мМ ГК

Видно, что в обоих случаях кинетика имеет би-экспоненциальный характер. Короткие времена составляют 10 ± 3 и 18 ± 5 мс, соответственно, а длинная - 50 ± 5 мс, что в 5 раз превышает время релаксации протонов липида в отсутствие ГК. Короткая компонента составляет $\sim 50\%$ в обоих случаях. Так как клеточная мембрана имеет вид бислоя, в спектре мы наблюдаем сигнал как от внешнего, так и от внутреннего слоя. При добавлении ГК, вероятно, воздействию подвергается только внешний слой, что приводит к появлению би-экспоненциальной кинетики, с соотношением длинной и короткой компоненты 1:1. Полученный результат означает существенное увеличение подвижности верхнего слоя мембраны обработанной ГК.

6.2 Изменение подвижности глицирризиновой кислоты.

Для выяснения вопроса о возможности встраивания молекул ГК в липидный слой мембраны методом ЯМР релаксации была изучена подвижность самой глицирризиновой кислоты в суспензии эритроцитов. Для этого были проведены эксперименты с большим количеством крови (0,3 мл на ампулу 0,6 мл). На Рис. 6.3 приведены ЯМР-спектр эритроцитов и 5 мМ глицирризиновой кислоты. В качестве сигнала от ГК для анализа был выбран сигнал 1.13 мд.

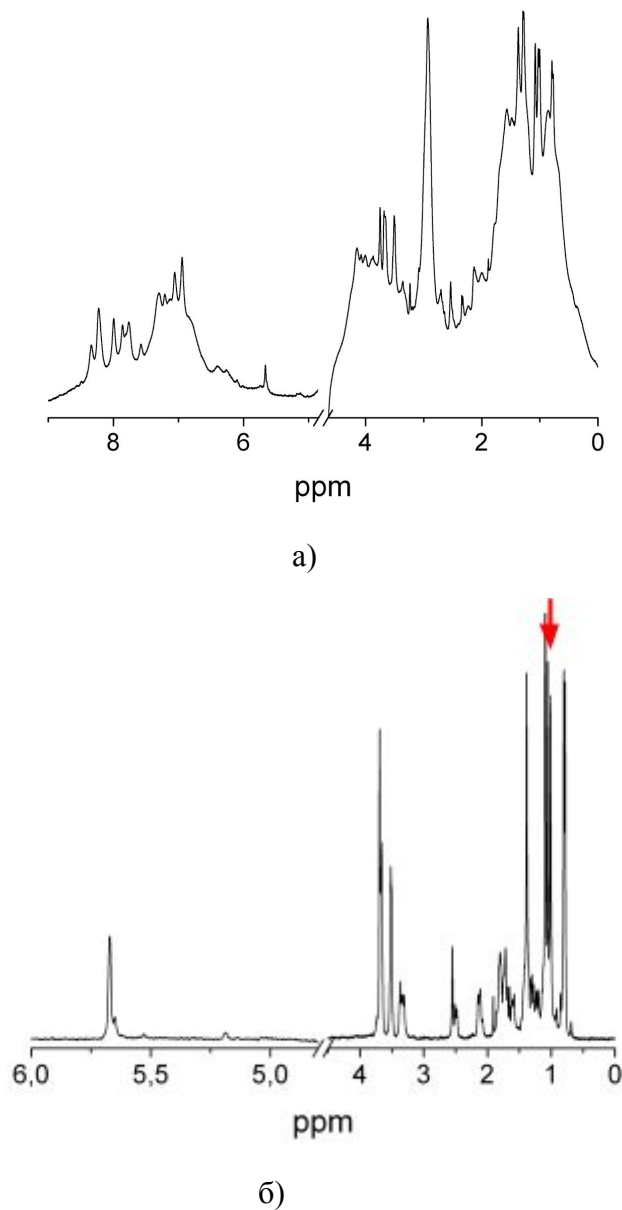


Рис. 6.3. ^1H ЯМР спектры. а–чистые эритроциты в фосфатно-солевом буфере, рН=7,4, б – 5 мМ ГК в фосфатно-солевом буфере, рН=7,4. Стрелкой отмечено положение исследуемого сигнала ГК

На Рис. 6.4 и 6.5 приведены кинетики спада сигнала эха в логарифмических координатах на

1.13 мд для 5 мМ ГК без добавления эритроцитов и для смеси эритроцитов и 5 мМ ГК.

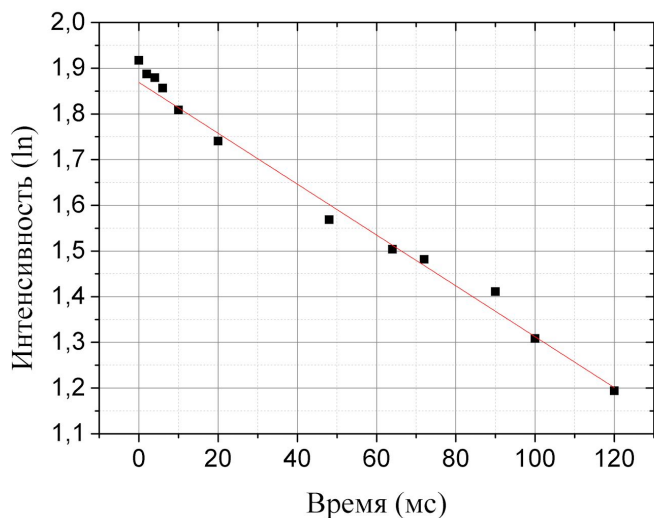


Рис. 6.4. Кинетика спада сигнала эха на 1.13 мд, 5 мМ ГК в фосфатно-солевом буфере, рН=7,4

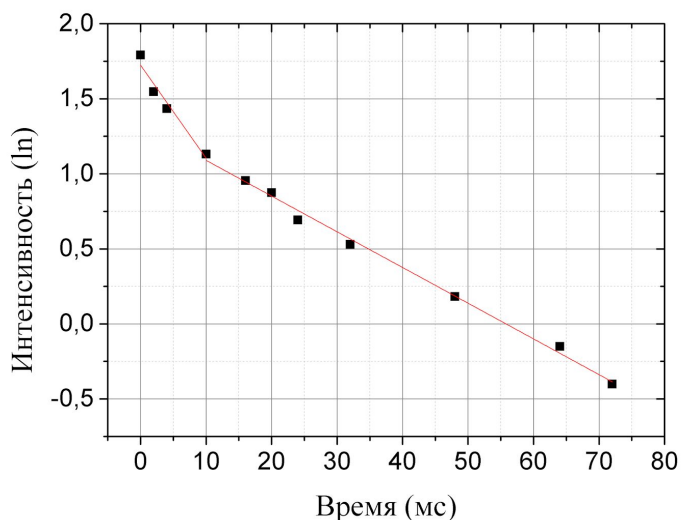


Рис. 6.5. Кинетика спада сигнала эха 1,13 м. д., эритроциты + 5 мМ ГК в фосфатно-солевом буфере, рН=7,4

Времена релаксации приведены в Таблице 6.1. Эритроциты не имеют сигнала в спектре в этой области. Для чистой ГК кинетика носит моно-экспоненциальный характер, для смеси наблюдается би-экспоненциальная зависимость. Кроме того, в кинетике для смеси не наблюдается присутствия длинной компоненты со временем близким к времени релаксации свободной глицирризиновой кислоты. Это означает, что вся глицирризиновая кислота находится в связанном виде. Данная концентрация при пересчете на единицу поверхности эритроцита соответствует

примерно $5 \cdot 10^4$ молекул ГК на $\mu\text{км}^2$ (при оценке средний объем эритроцита считался равным 100 фл, а средняя площадь поверхности - $145 \mu\text{км}^2$).

Таблица 6.1. Времена спин-спиновой релаксации для эритроцитов (короткая компонента – T_{21} , длинная – T_{22})

	5 мМ ГК	Эритроциты + 5 мМ ГК
T_{21} , мс	-	16
T_{22} , мс	180	40

6.3 Липидные мембраны, содержащие РОРС и холестерин

Для исследования вопроса о способности ГК проникать внутрь липидной мембраны и о ее локализации в мембране, дальнейшие эксперименты проводились на модельном липидном бислое – липосоме. Способность ГК встраиваться в липидный бислой и ее воздействие на подвижность липидов в мембране также исследовалось методом ЯМР релаксации. Как уже отмечалось ранее, время спин-спиновой релаксации очень чувствительно к изменению вращательной подвижности различных функциональных групп органических молекул. Таким образом, наблюдая за влиянием ГК на подвижность липидов в различных частях мембраны, мы сможем судить о ее положении в бислое. В случае липидного бислоя, добавление шифт-реагентов (в данной работе использовался Pr^{3+}) в раствор позволяет разделить в ЯМР-спектре сигнал от внешнего и от внутреннего “полуслоя”. [143,144]

На Рис. 6.6 представлен фрагмент ^1H ЯМР спектра водной суспензии липосом на основе РОРС в отсутствие и в присутствии PrCl_3 . Липосомы готовились по методике, описанной в пункте 2.3. В отсутствие PrCl_3 сигнал от протонов полярной головы имеет форму линии, схожую с наблюдаемой для фосфатидилхолиновых липосом, более узкий пик, сдвинутый в слабое поле относят к внешним $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -группам, в то время как более широкий пик, сдвинутый в сильное поле относят к внутренним $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -группам липосом. [57, 145] Добавление ионов Pr^{3+} приводит к разделению линий ЯМР, соответствующих $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -группам (между 3.0 и 3.5 м. д.), возникающему из-за псевдоконтактного сдвига, производимого шифт-реагентами группы лантаноидов (таких как Pr^{3+}). [144] Пик лежащий в высоком поле (более низкие значения м. д.) соответствует внутренней поверхности липосом. Однослойность липосом контролировалась по соотношениям интенсивностей линий ЯМР от внешнего и внутреннего ансамблей протонов $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп.

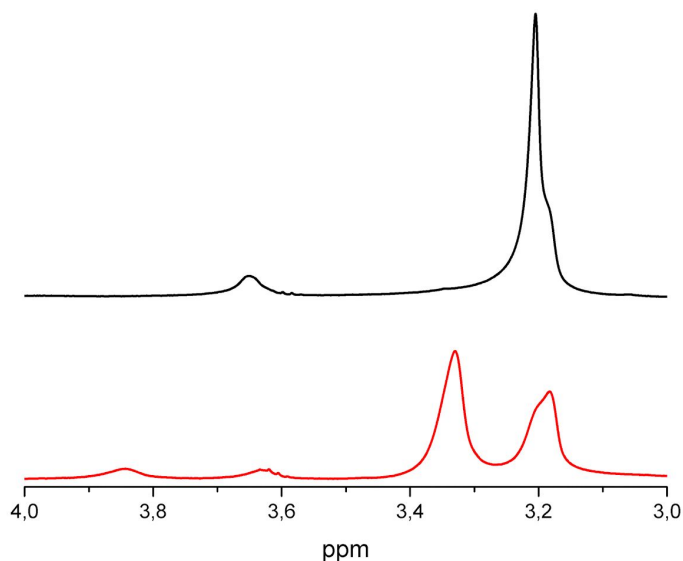


Рис. 6.6. Фрагмент ^1H ЯМР спектра суспензии липосом на основе POPC в отсутствие (сверху) и в присутствии (снизу) ионов Pr^{3+}

Интенсивность сигнала прямо пропорционально числу резонирующих ядер, которое в свою очередь прямо пропорционально площади поверхности “полуслоя”. Рассматривая липосому как сферическую оболочку (Рис. 6.7), мы приходим к следующей оценке соотношения между толщиной бислоя и внутренним радиусом:

$$\frac{\Delta r}{r} = \sqrt{\frac{I_o}{I_i}} - 1,$$

где Δr это толщина бислоя, r - внутренний радиус, I_o - интегральная интенсивность линии ЯМР внешнего ансамбля $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп, I_i - интенсивность линии ЯМР внутреннего ансамбля $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп. Принимая для оценки $\Delta r = 5$ нм, используя измеренные интенсивности линий ЯМР, получаем внутренний радиус липосом ~ 20 нм, что соответствует литературным данным.

[144]

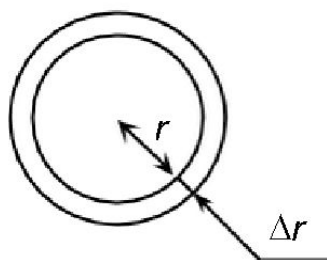


Рис. 6.7. Схема однослойной липосомы для оценки ее размеров

Средние значения отношения $\frac{I_o}{I_i}$ исследуемых образцов для серии из трех экспериментов приведены на Рис. 6.8. Добавление небольшого количества ГК или холестерина (концентрация 0,05 мМ) не влияет на размер липосом. Однако рост концентрации глицирризина, так же как и холестерина, уменьшает соотношение $\frac{I_o}{I_i}$.

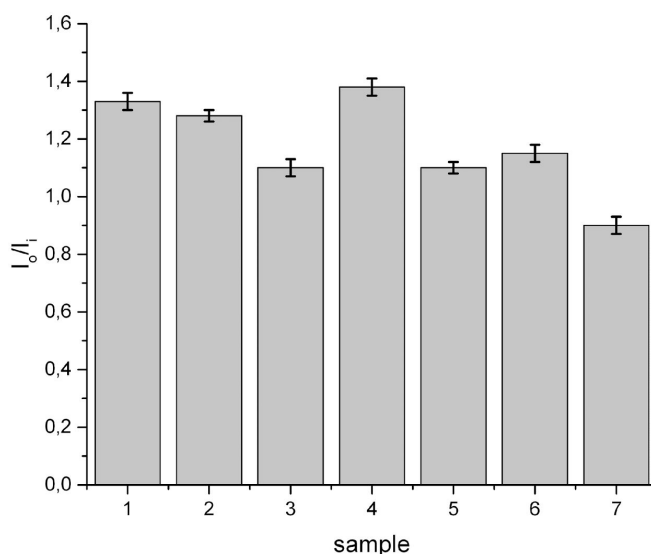


Рис. 6.8. Соотношение между интенсивностями внутреннего (I_i) и внешнего (I_o) сигнала ЯМР $N^+(CH_3)_3$ -групп для различных образцов: 1 – РОРС, 2 – 0.05 мМ ГК, 3 – 0.5мМ ГК, 4 – 0.05 мМ холестерина, 5 – 0.5 мМ холестерина, 6 – 0.25 мМ ГК + 0.25 мМ холестерина, 7 – 0.5 мМ ГК + 0.5 мМ холестерина

Были измерены времена спин-спиновой релаксации протонов от внешних и от внутренних $N^+(CH_3)_3$ -групп (сигналы между 3.2 и 3.4 м. д.) и концевой CH_3 -группы гидрофобного хвоста (линия на 0.9 м. д.) для следующих образцов: 10 мМ чистого РОРС, 10 мМ РОРС + 0.05 мМ ГК, 10 мМ РОРС + 0.5 мМ ГК, 10 мМ РОРС + 0.05 мМ холестерина, 10 мМ РОРС + 0.5 мМ холестерина,

10 мМ РОРС + 0.25 мМ ГК + 0.25 мМ холестерина, 10 мМ РОРС + 0.5 мМ ГК + 0.5 мМ холестерина.

^1H ЯМР спектры перечисленных образцов представлены на Рис. 6.9. После добавления 0,05 мМ ГК никаких значительных изменений в спектре не наблюдается. Однако при повышении концентрации ГК до 0,5 мМ (5 мол.% по отношению к липиду) наблюдается падение интенсивности спектра. Также наблюдается выделение широкой компоненты сигнала от внутренних $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп и смещение ее в сторону низкого поля. Совместное добавление 0,5 мМ ГК и 0,5 мМ холестерина приводит к более значительному падению интенсивности, смещению сигнала от внутренних $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп в сторону низкого поля и исчезновению разделения между сигналами от внутренних и внешних $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп, вызванного добавлением PrCl_3 . Получившаяся форма линии схожа с формой линии от $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп в отсутствие шифт-реагента (Рис. 6.6), можно увидеть более узкий пик от внешних $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп и более широкий - от внутренних, однако оба сигнала сдвинуты в сторону низкого поля. Это может означать, что обе части бислоя находятся в контакте с шифт-реагентом, т. е. шифт-реагент проник внутрь липосом. Этот эффект сопровождается общим падением интенсивности спектра, что может быть вызвано значительным уширением, вызванным возникновением жестких структур в бислое и падением подвижности молекул липида. Как видно из Рис. 6.6, добавление PrCl_3 само по себе не приводит к такому значительному уширению линий. Обычно уширение линий связано с некими обменными процессами, в данном случае это может быть связано с обменом ионов Pr^{3+} через липидный бислой. Обратимое проникновение ионов Pr^{3+} внутрь может быть вызвано образованием пор в бислое. Это также объясняет увеличение проницаемости клеточной мембраны для ионов формиата, описанное в разделах 4 и 5.

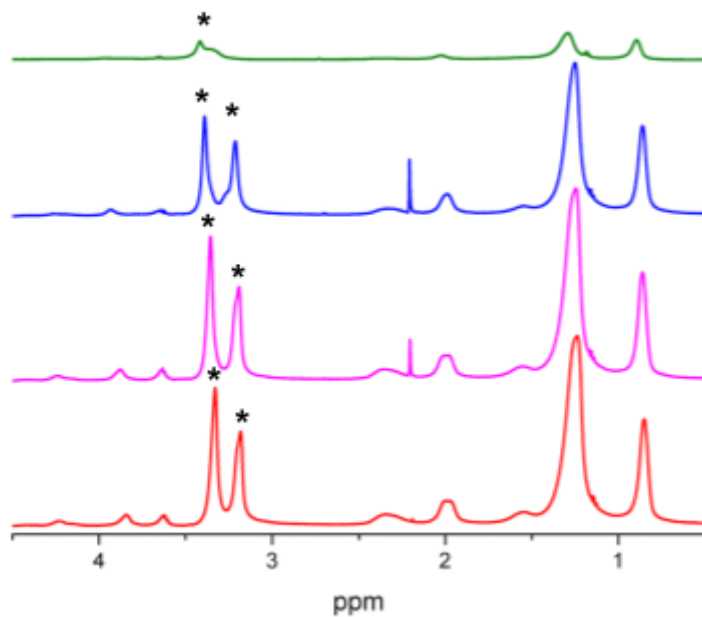


Рис. 6.9. Фрагменты ^1H ЯМР спектров образцов (снизу вверх): 10 мМ чистого РОРС, 10 мМ РОРС + 0.05 мМ ГК, 10 мМ РОРС + 0.5 мМ ГК, 10 мМ РОРС + 0.5 мМ ГК + 0.5 мМ холестерина. Символом * отмечены сигналы от (N^+CH_3) -групп протонов

Кинетика спада сигнала эха имеет би-экспоненциальный характер для всех образцов (Рис. 6.10):

$$I(t) = P_1 \exp\left(-\frac{t}{T_{21}}\right) + P_2 \exp\left(-\frac{t}{T_{22}}\right)$$

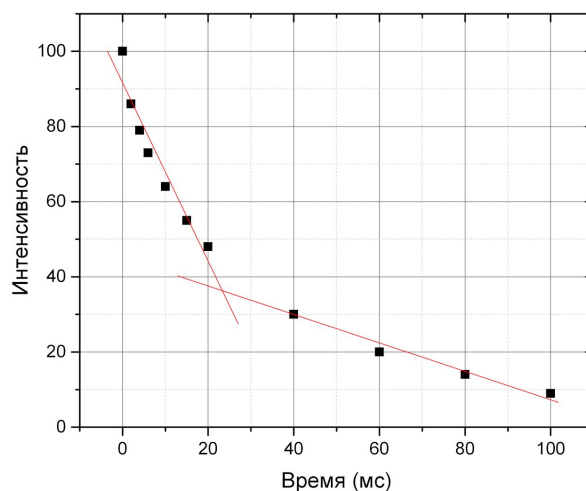
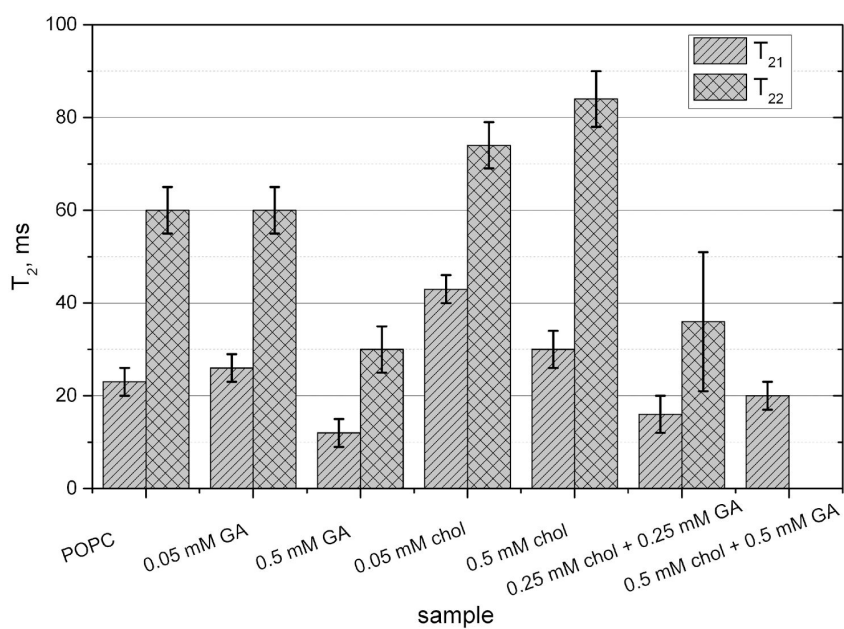


Рис. 6.10. Кинетика спада сигнала эха протонов внешних $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп для чистого РОРС

Времена спин-спиновой релаксации T_{21} и T_{22} $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ - и CH_3 -групп для различных образцов представлены на Рис. 6.11. Время спин-спиновой релаксации измерялось с помощью стандартной импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Гилла для серии из трех

экспериментов. Результирующие значения T_{21} и T_{22} вычислялись как арифметическое среднее, результирующая ошибка вычислялась по формуле: $S = S/\sqrt{n-1}$, где $n = 3$ число серий экспериментов. Би-экспоненциальная природа релаксации может быть связана с наличием нескольких типов молекулярных движений изучаемых групп протонов. Согласно Т. L. James два типа молекулярных движений соответствуют двум временам релаксации: вращение молекулы вокруг вращательной оси и реориентация цепи.[142] В случае образцов, содержащих 0,5 мМ ГК и 0,5 мМ холестерина, сигналы от внешней и внутренней частей сливаются, и мы относим узкую часть линии (с более длинным времени релаксации) к внутреннему слою, а широкую (более короткое время релаксации) к внешнему слою, так как узкая часть оказывается слегка сдвинута в область низкого поля.



a)

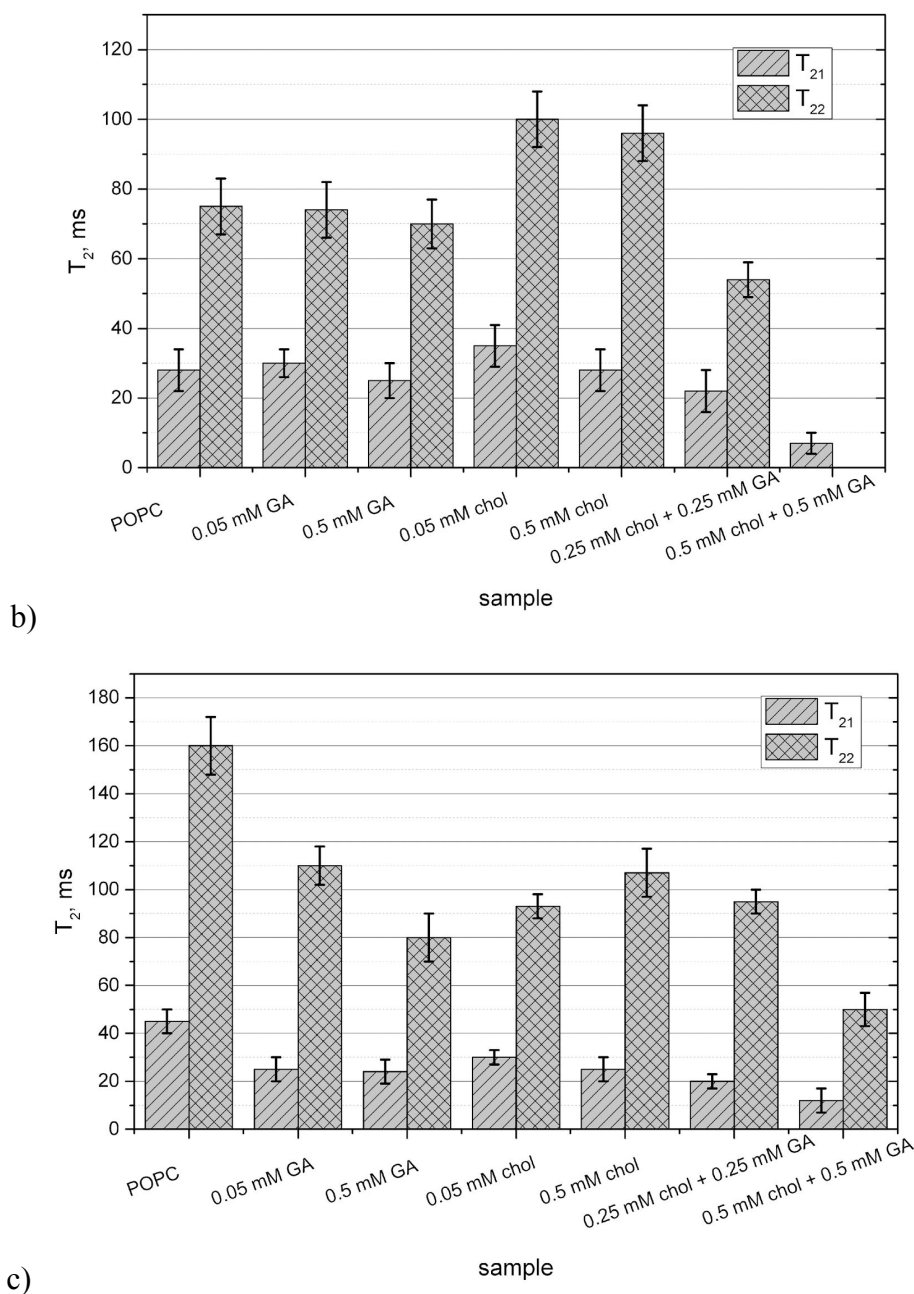


Рис. 6.11. Времена спин-спиновой релаксации T_{21} и T_{22} , отвечающие двум временным константам в биэкспоненциальной кинетике а) сигнал от внешних $N^+(\text{CH}_3)_3$ -групп б) сигнал от внутренних $N^+(\text{CH}_3)_3$ -групп в) сигнал от концевой CH_3 -группы

Добавление малого количества (0,05 мМ, 0,5 мол.% по отношению к концентрации липида) ГК значительно влияет только на подвижность концевых CH_3 -групп в гидрофобном хвосте РОРС. Оба времени релаксации, T_{21} и T_{22} , значительно уменьшаются. Это означает, что связывание ГК с липидной мембраной даже в такой малой концентрации приводит уменьшению подвижности липидных хвостов. В то же время не наблюдается изменения подвижности гидрофильных голов. Это означает, что ГК преимущественно локализована во внутренней (гидрофобной) части

липидного бислоя.

Увеличение концентрации ГК (0,5 мМ, 5 мол. % по отношению к концентрации липида) приводит к изменению времен релаксации как концевых CH_3 -групп, так и внешних $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп. Оба времени релаксации, T_{21} and T_{22} , существенно уменьшаются, а значит уменьшается подвижность этих групп. В то же время отсутствие изменений подвижности внутренних $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп означает, что ГК преимущественно локализована во внешнем полуслое липосомы. Это предположение также подтверждается данными по изменению соотношения интенсивностей внутреннего и внешнего сигнала $\frac{I_o}{I_i}$ (Рис. 6.8). Можно предположить, что встраивание ГК инициирует переход липидов из внешнего во внутренний полуслой для сохранения площади поверхности и структуры липосом, что приводит к росту интенсивности сигнала от внутренних протонов по отношению к сигналу от внешних.

Влияние холестерина на подвижность липидных голов является противоположным влиянию ГК. Добавление холестерина приводит к увеличению подвижности холиновых групп как внешнего, так и внутреннего полуслоя. В то же время, действие холестерина на подвижность гидрофобных хвостов аналогично действию ГК. Известно, что холестерин является модификатором динамических и структурных свойств липидной мембраны. Упорядочивание липидов в присутствии холестерина является объектом множества исследований. Его гидрофобная структура приводит к локализации холестерина полностью внутри гидрофобной части мембраны, его гидроксильные группы расположены близко к карбонильным группам фосфолипида. [15] Различие действия ГК и холестерина означает, что молекулы ГК расположены частично между гидрофильными головами липида, частично между липидными хвостами, либо мы имеем дело с быстрым обменом молекул ГК между раствором и гидрофобной частью бислоя.

В случае совместного добавления холестерина и ГК наблюдается очень сильное уменьшение подвижности для всех исследуемых функциональных групп. При максимальной использованной концентрации ГК и холестерина (0,5 мМ + 0,5 мМ) времена релаксации существенно укорачиваются, что означает возникновение сильно упорядоченных структур. Принимая во внимание сдвиг сигнала от внутренних холиновых групп в область более низкого поля, можно предположить, что возникают поры в липидном бислое, через которые ионы $\text{P}g$ могут проходить внутрь липосомы. Такие поры потенциально могут уменьшать барьер для проникновения ионов и малых молекул через липидный бислой и ускорять мембранный транспорт. Такая возможность подтверждается результатами по увеличению проницаемости клеточных мембран для формиат-ионов, обсуждавшимися в главе 4.

Следует отметить, что образование пор в модельных липидных бислоях происходит при

фазовых переходах. [146] Данный процесс может сопровождаться образованием сквозных пор. При этом, если фазовый переход претерпевает только один полуслой мембраны, может происходить изменение площади его поверхности и характера взаимодействия с ионами. [146]. Все эти эффекты (изменение площади поверхности, образование пор, изменение проницаемости для ионов) при взаимодействии липидного бислоя с ГК описаны в данной главе и главе 4. Данные эффекты сопровождаются уменьшением подвижности липидов внешнего полуслоя мембраны, что может означать локальное “замерзание” бислоя в присутствии ГК. Фазовое состояние мембраны и её вязкость способны оказывать большое влияние на активность ферментов живых клеток, а также на упругость клеток и состояние спектральной сетки. [6] Наблюдаемые изменения упругости клеточных мембран в присутствии ГК были описаны в главе 5.

6.4 Сравнение с другими комплексантами

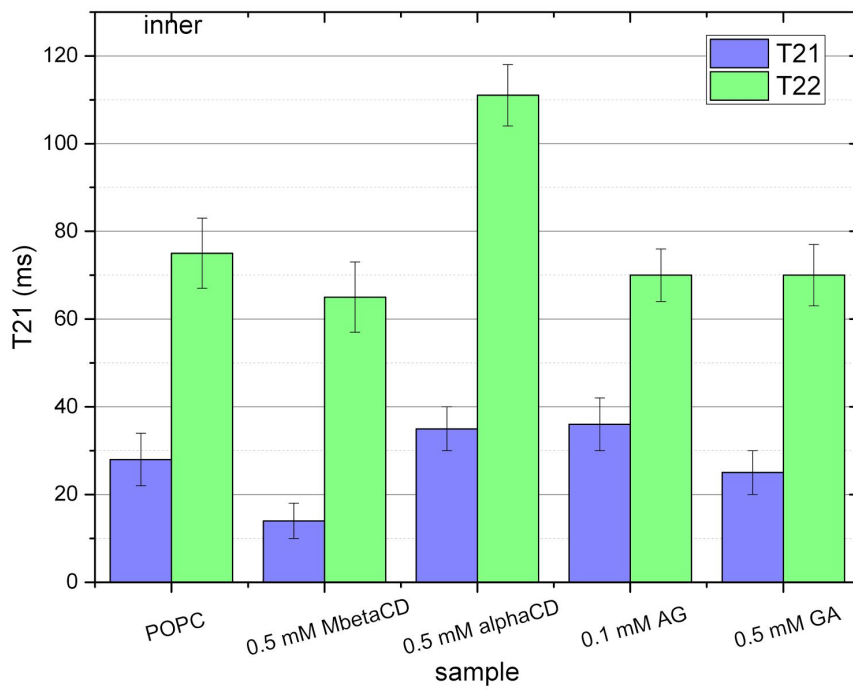
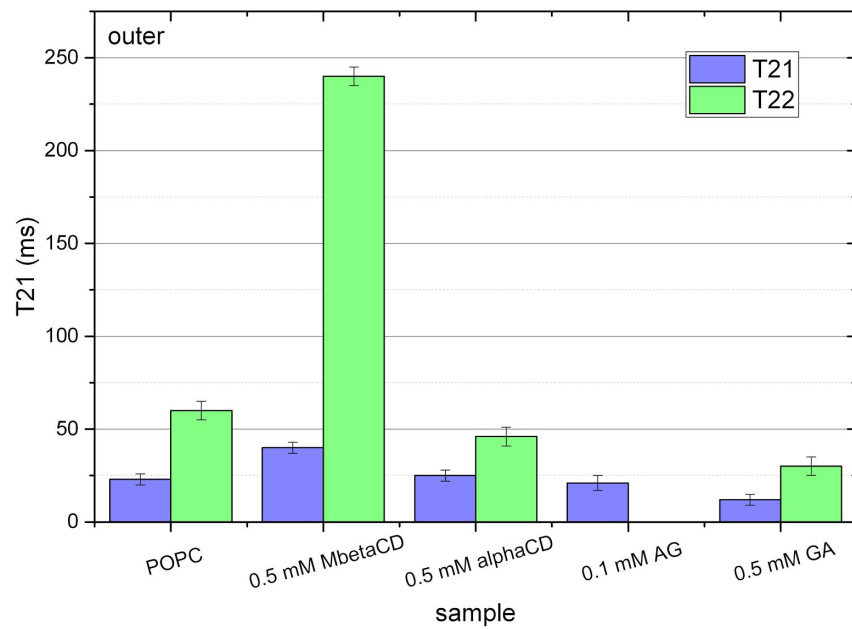
Была проведена также серия экспериментов для сравнения действия ГК с действием других комплексантов: арабиногалактаном, альфа-циклодекстрином, метил-бета циклодекстрином.

На Рис. 6.12 приведены времена спин-спиновой релаксации в предположении би-экспоненциального спада сигнала эха для различных комплексантов для сигналов внешних и внутренних $N^+(CH_3)_3$ -групп и концевых CH_3 -групп фосфолипида РОРС. Известно, что циклодекстрины могут образовывать комплексы с фосфолипидами и извлекать их из мембран эритроцитов и липидных везикул.[147] Как Ме-β-ЦД, так и α-ЦД инициируют обмен фосфолипидов между комплексом ЦД-липид и везикулой, но только Ме-β-ЦД при высоких концентрациях способен растворять липидные везикулы. [147]

На Рис. 6.12 видно, что добавление 0,5 мМ Ме-β-ЦД приводит к существенному увеличению подвижности протонов $N^+(CH_3)_3$ -групп “внешнего” полуслоя, т. е. находящегося в растворе, в контакте с шифт-реагентом. Это может соответствовать росту подвижности полярных “голов” фосфолипида в комплексе с Ме-β-ЦД, т. к. фосфолипид входит в комплекс гидрофобной цепью. Такого значительного роста времени релаксации (а значит и вращательной подвижности) не наблюдается более ни для одного из комплексантов. Это позволяет предположить, что ГК не инициирует обмена фосфолипидов между везикулой и окружением.

Следует отметить также существенное уменьшение подвижности $N^+(CH_3)_3$ -групп “внешнего” полуслоя в присутствии арабиногалактана. Арабиногалактан - разветвленный гидрофильный полимер с большой молекулярной массой (~17кДа). Он может обладать способностью садиться на поверхность липидных везикул, снижая тем самым подвижность липидных “голов”, однако вследствие своего размера и гидрофильности, он не способен

проникать внутрь липосом, что проявляется в отсутствии влияния на внутренний полуслой.



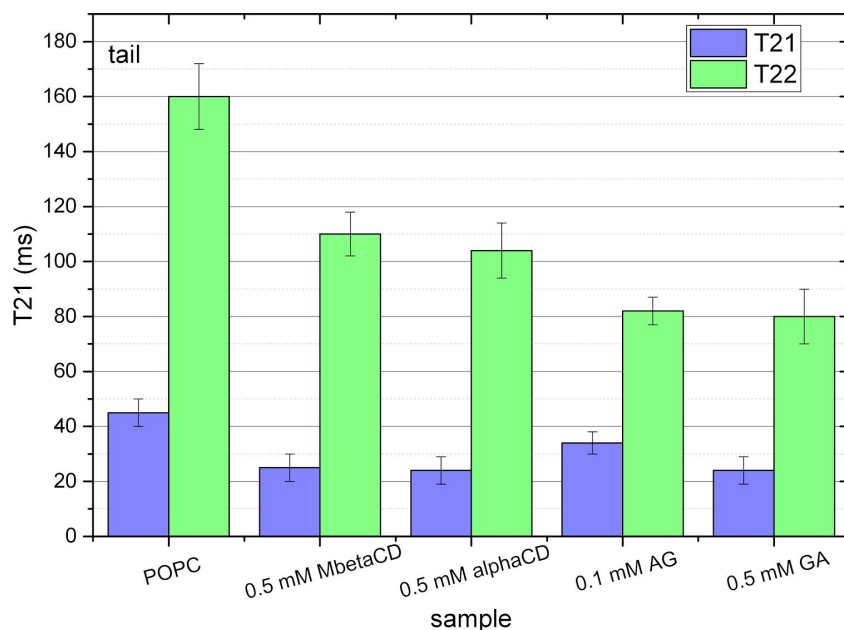
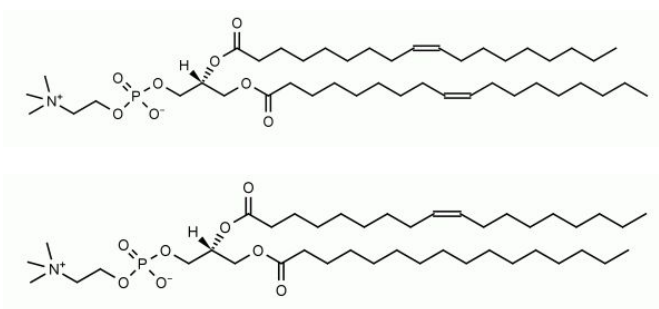


Рис. 6.12. Времена релаксации протонов внешних и внутренних $N^+(CH_3)_3$ -групп и концевых CH_3 -групп фосфолипида POPC (сверху вниз) в отсутствие и в присутствии различных комплексантов.

6.5 Молекулярная динамика взаимодействия ГК с липидным бислоем

Для проверки сделанных выводов о взаимодействии ГК с липидным бислоем были спланированы и проведены компьютерные эксперименты совместно с лабораторией молекулярной динамики и структуры ИХКГ СО РАН.

Симуляция методом молекулярной динамики производилась для трех типов фосфолипидов: дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), 1-пальмитил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (POPC) и 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC). Структурные формулы данных фосфолипидов приведены на Рис. 6.13.



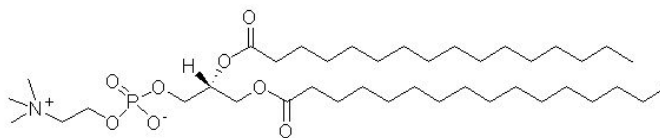


Рис. 6.13. Структурные формулы фосфолипидов (сверху вниз):DOPC, POPC, DPPC

Симуляция показала, что ГК демонстрирует схожее поведение для всех трех использованных липидов. После непродолжительной свободной диффузии в воде, ГК садится на мембрану и движется вдоль поверхности в течение примерно 20-80 нс. В 10% случаев ГК отделяется от мембраны (для DPPC при 323 К и POPC при 310 К). Во время движения по поверхности ГК встречает полость, в которую может проникнуть. Затем ГК проникает в бислои. В 20% случаев ГК не проникает в мембрану за 100 нс. Она может равновероятно проникать как тритерпеновым остатком, так и глюкозными кольцами вперед. После проникновения в бислои DPPC ГК остается в нем в течение долгого времени и не проникает в следующий полуслой, так как существует энергетический барьер между двумя полуслоями. Статистика поведения ГК в независимых запусках приведена в Таблице 6.2.

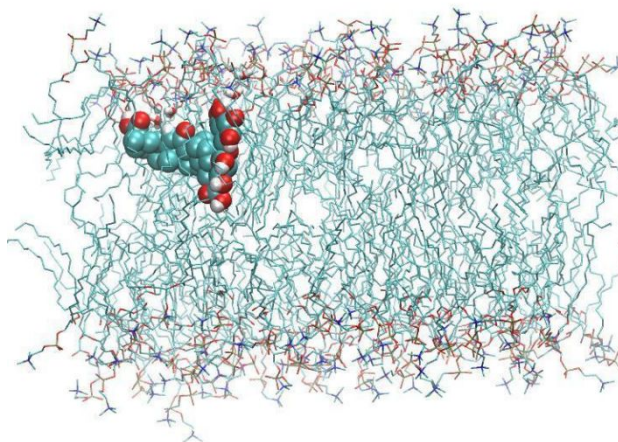
Таблица 6.2. Поведение молекулы ГК в независимых запусках

	Движение по поверхности мембраны	Проникновение в бислои	Терпеновой (t) сахарозной (s) частью вперед	Проникает во внутренний полуслой
DPPC	10/10	8/10	t: 3/10 s: 5/10	2/10
POPC	10/10	9/10	t: 2/10 s: 7/10	0/10
DPPC (310 К)	10/10	9/10	t: 5/10 s: 3/10 t+s (back): 1/10	0/10
DPPC (323 К)	10/10	10/10	t: 5/10 s: 5/10	2/10

Эти данные хорошо согласуются с результатами экспериментов, приведенными в пункте 6.3, показывающими, что ГК преимущественно располагается во внешнем полуслое мембраны.

Согласно результатам моделирования методом молекулярной динамики, ГК располагается в области вблизи средней части углеродных хвостов липида (Рис. 6.14, а). Этот факт объясняет значительное влияние ГК на молекулярные движения липидных хвостов, наблюдаемое в ЯМР экспериментах (Рис. 6.11, с).

В случае мембран DPPC ГК проходит в следующий полуслой в 20% случаев при температуре 323 К и в 10% случаев при 310 К. Такой переход не наблюдается для других типов мембран. В процессе перехода ГК между слоями существует момент, когда ГК сводит вместе две границы мембраны, делая ее существенно тоньше (Рис. 6.14, б). Это результат особенности структуры молекулы ГК: она содержит гидрофобную область, заключенную между двумя гидрофильными (сахароза на одном конце и карбоксильная группа на другом). Также обнаружено, что молекула ГК всегда облегчает проникновение нескольких молекул воды внутрь мембраны поблизости от молекулы ГК. Такое воздействие ГК на транспорт молекул воды может объяснять и описанное в главе 4 усиление проницаемости мембран для ионов. Способность молекулы глицирризина делать липидный бислой тоньше может обуславливать образование пор в случае нескольких молекул ГК, которое наблюдается в ЯМР экспериментах. Следует отметить, что переход молекулы ГК во внутренний полуслой осуществляется только в случае DPPC мембраны, которая является наиболее жесткой из всех исследуемых нами систем. Известно, что холестерин также делает мембрану более жесткой. Таким образом, можно предположить что добавление холестерина также будет улучшать проникновение ГК в следующий полуслой, как наблюдалось в ЯМР экспериментах (Рис. 6.9).



а)

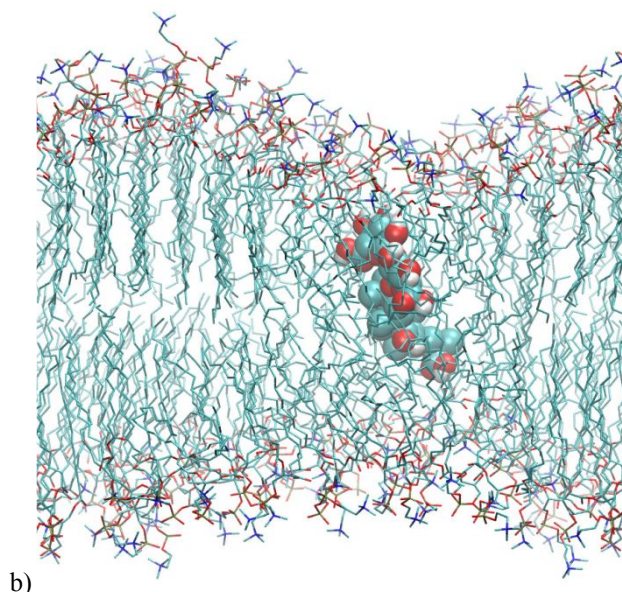
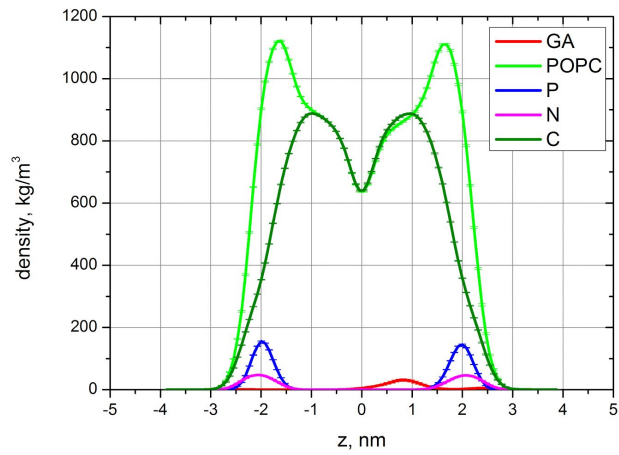


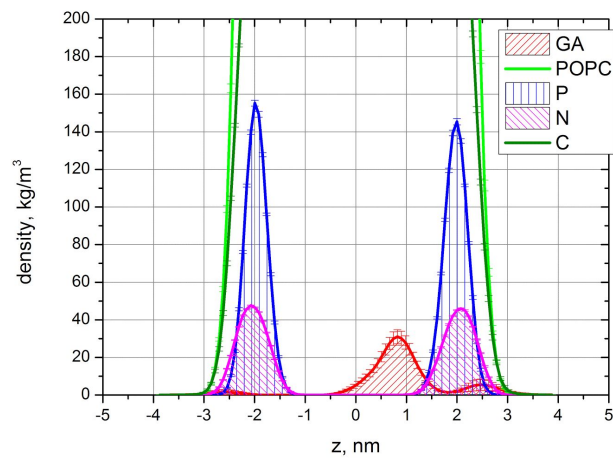
Рис. 6.14. Снимки моделирования взаимодействия ГК с липидным бислоем. а) молекула ГК располагается во гидрофобной внутренности бислоя DOPC, вблизи неё расположились несколько принесенных молекул воды, б) ГК делает бислой DPPC тоньше

На Рис. 6.15, а) представлена локальная плотность мембраны POPC вдоль толщины бислоя (ось z). Использовались 100 слоев на ~ 9.6 нм. Статистика собиралась в течение 1500 нс. На Рис. 6.15, б) данные представлены в увеличенном масштабе. В начале моделирования расстояние между молекулой ГК и центром мембраны составляло более 4 нм. Таким образом, данные графики показывают, что ГК преимущественно локализована во внешнем полуслое и может перемещаться между полярными головами полуслоя и его гидрофобной внутренностью.

Профиль свободной энергии для проникновения ГК в бислой DOPC показан на Рис. 6.16, а). видна энергетическая яма при приближении к границе воды и поверхности бислоя. Также существуют два энергетических барьера: один расположен на поверхности бислоя, второй в центре бислоя. Величина барьера в центре бислоя составляет приблизительно 3 ккал/моль, что соответствует примерно $5RT$. Термическая энергия не превышает этот барьер, так что ГК остается в первом полуслое мембраны. Профиль плотности ГК в мембране DOPC, приведенный на Рис. 6.16, б), хорошо согласуется с профилем свободной энергии.



a)



b)

Рис. 6.15. Профиль локальной плотности бислоя, а) малый масштаб, б) увеличенный масштаб

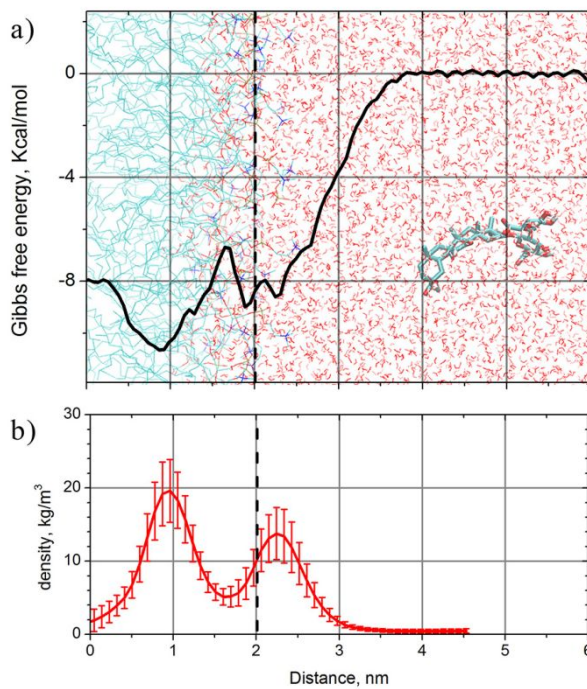


Рис. 6.16. а) Профиль свободной энергии Гиббса в бислое DOPC. Типичный вид мембраны с ГК в воде показан на фоне. Пунктирная линия в 2 нм от срединной плоскости мембраны примерно соответствует границе бислоя. б) Профиль плотности ГК в DOPC (статистика на 1600 нс)

Так как известно, что ГК образует самоассоциаты в воде [110, 148, 149], мы также моделировали их поведение у поверхности мембраны. Симуляции с двумя, тремя и четырьмя молекулами ГК проводились для бислоя DOPC. За самоассоциацией ГК в воде с образованием димеров и иногда тримеров следовало прилипание ассоциатов к поверхности мембраны. Затем такие агрегаты понемногу проникали в бислой (Рис. 6.17). Когда молекулы ГК достигали мембраны по одной, они проникали внутрь бислоя по механизму описанному выше для одиночных молекул.

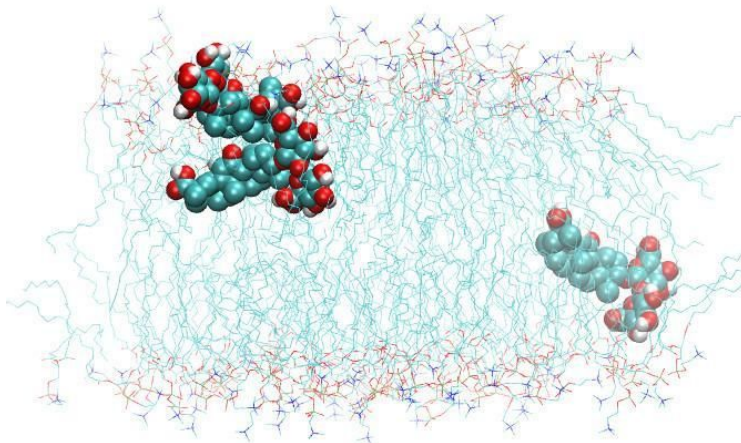


Рис. 6.17. Проникновение самоассоциата ГК внутрь мембраны DOPC

6.6 Заключение к главе 6

Показано, что обработка эритроцитов глицирризиновой кислотой приводит к увеличению подвижности полярных голов внешнего полуслоя. Также, при концентрации ГК 5 мМ в суспензии эритроцитов объемом 0,6 мл с объемной долей эритроцитов ~50% вся ГК находится в связанном виде.

Влияние ГК на внешний полуслой липидной мембраны наблюдалось также в модельных системах на примере однослойных липосом. В данных системах показано также, что ГК оказывает влияние как на подвижность липидных голов внешнего полуслоя, так и на подвижность концевых CH_3 -групп. Это означает, что ГК локализована преимущественно во внешнем полуслое мембраны.

Кроме того, встраивание ГК инициирует переход липидов из внешнего во внутренний полуслой для сохранения площади поверхности и структуры липосом. Также обнаружено, что совместное добавление ГК и холестерина способствует транспорту ионов Pr^{3+} , что можно интерпретировать как образование пор в мембране, проницаемых для ионов Pr^{3+} . Такие поры потенциально могут уменьшать барьер для проникновения ионов и малых молекул через липидный бислой и ускорять мембранный транспорт. Данный факт представляет особый интерес в связи с представленными в главе 4 результатами об увеличении проницаемости клеточных мембран для формиат-ионов в присутствии глицирризиновой кислоты. Такое совместное действие может быть связано с возможностью комплексообразования ГК с холестерином, обсуждавшейся в главе 3.

Способность глицирризиновой кислоты встраиваться в липидный бислой подтверждается также результатами моделирования методом молекулярной динамики. Компьютерная симуляция показывает, что ГК преимущественно локализована во внешнем полуслое и может перемещаться между полярными головами полуслоя и его гидрофобной внутренностью, облегчая при этом проникновение молекул воды внутрь бислоя. Для бислоя DPPC в 20% случаев наблюдается переход ГК во внутренний полуслой. В процессе этого перехода существует момент, когда ГК сводит вместе две границы мембраны, что может давать начало образованию пор. Можно предположить, что поведение ГК и процесс образования пор в “жесткой” мембране DPPC схожи с наблюдаемыми в ЯМР экспериментах при добавлении холестерина, который также делает мембрану более “жесткой”.

Основные результаты и выводы

1. Установлен факт комплексообразования глицирризиновой кислоты с холестерином в метаноле. Определена стехиометрия комплексов холестерин:ГК - 1:2, рассчитаны константы стабильности и термодинамические параметры комплексообразования.
2. Обнаружено влияние ГК на проницаемость клеточных мембран в модельных системах (эритроциты, клетки K562). Обработка ГК снижает время обмена формиат-ионов между внутри- и внеклеточным окружением примерно на 50% для эритроцитов и на 60% для клеток K562. Установлено, что зависимость проницаемости мембраны клеток K562 от концентрации формиата имеет вид характерный для облегченной диффузии. При этом константа скорости вхождения формиата внутрь клетки повышается в присутствии ГК.
3. Показано, что для эритроцитов обработанных ГК происходит значительное ослабление осмотического гемолиза. Установлено, что обработка эритроцитов ГК снижает среднее значение модуля упругости в 3-6 раз. При этом происходит сужение распределения величины модуля упругости по поверхности клетки в 1,5-3,5 раз. Можно заключить, что увеличение осмотической стойкости эритроцитов происходит благодаря модификации мембраны, приводящей к изменению её механических свойств.
4. Показано, что обработка эритроцитов ГК приводит к увеличению подвижности $(N^+CH_3)_3$ -групп внешнего полуслоя бислойной мембраны. Также, при концентрации ГК 5 мМ в суспензии эритроцитов с объемной долей эритроцитов ~50% вся ГК находится в связанном виде. Продемонстрирована способность ГК встраиваться во внешний полуслой модельной липидной мембраны.
5. Показано, что совместное добавление ГК и холестерина способствует транспорту ионов Rf^{3+} через модельную липидную мембрану, что можно интерпретировать как образование пор. Такие поры потенциально могут уменьшать барьер для проникновения ионов и малых молекул через липидный бислой и ускорять мембранный транспорт.

Заключение

В данной работе с помощью ряда физико-химических методов (ЯМР, атомно-силовая микроскопия, оптическая спектроскопия поглощения) охарактеризовано влияние глицерризиновой кислоты на физические и функциональные свойства мембраны. В частности, установлено комплексообразование ГК с компонентом клеточной мембраны - холестерином. Изучено изменение проницаемости эритроцитов и клеток K562 для формиат-ионов в присутствии ГК. Исследовано влияние ГК на упругость мембран эритроцитов и их осмотическую стойкость.

Показано, что при взаимодействии с биомембраной, молекулы ГК способны встраиваться в липидный бислой, локализуясь преимущественно во внешнем полуслое и изменяя подвижность липидов окружения. Также продемонстрировано, что совместное действие ГК и холестерина приводит к образованию пор в липидном бислое.

Следует отметить, что все перечисленные результаты имеют большое значение для понимания молекулярных механизмов действия средств доставки лекарственных препаратов. Данный механизм очень важен с точки зрения концепции Rational drug design - разработки лекарственных препаратов на основании имеющихся знаний о потенциально значимых “мишенях” внутри организма и о механизмах воздействия лекарственных препаратов на эти “мишени”. Эта концепция набирает всё большую популярность во всем мире по мере накопления знаний о протекающих в организме процессах. Эта концепция широко применяется для разработки лекарственных препаратов, однако не меньшее значение она имеет и для выбора подходящего средства доставки, которое сделает используемое лекарство более безопасным и эффективным.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, Полякову Николаю Эдуардовичу, за поддержку и помощь в планировании работы и анализе результатов. Также автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории молекулярной динамики и структуры А. В. Ким и Шелеповой Е. А. за проведение компьютерных симуляций методом молекулярной динамики, сотруднику лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ИЦиГ СО РАН Шилову А. Г. за предоставление образцов клеток K562, сотрудникам лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Зайцеву Б. Н. и Корнееву Д. В. за помощь в проведении экспериментов методом атомно-силовой микроскопии.

Список сокращений и условных обозначений

АГ - арабиногалактан

ГК - глицирризиновая кислота

ЦД - циклодекстрин

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

DOPC - 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPPC - Dipalmitoylphosphatidylcholine

POPC - 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine

Δ - относительное изменение времени обмена

T_2 - время спин-спиновой релаксации

T_{21} - время соответствующее короткой компоненте спада сигнала эха

T_{22} - время соответствующее длинной компоненте спада сигнала эха

Список цитируемой литературы

1. Apanasenko, I. E. Solubilization and stabilization of macular carotenoids by water soluble oligosaccharides and polysaccharides / I. E. Apanasenko, O. Yu. Selyutina, N. E. Polyakov, L. P. Suntsova, E. S. Meteleva, A. V. Dushkin, P. Vachali, P. S. Bernstein // Archives of Biochemistry and Biophysics - 2015. - Vol. 572. - P. 58-65.
2. Polyakov, N. E. Complex of Calcium Receptor Blocker Nifedipine with Glycyrrhizic Acid / N. E. Polyakov, V. K. Khan, M. B. Taraban, T. V. Leshina // Journal of Physical Chemistry B - 2008. - Vol. 112. - P. 4435-4440.
3. Tolstikova, T.G. The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents / T. G. Tolstikova, M. V. Khvostov, A. O. Bryzgalov // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry - 2009. - Vol. 9. - P. 1317-132.
4. Polyakov, N.E. Glycyrrhizic Acid as a Novel Drug Delivery Vector. Synergy of Drug Transport and Efficacy / N. E. Polyakov, T. V. Leshina // The Open Conference Proceedings Journal - 2011. - Vol. 2. - P. 64-72.
5. Polyakov, N. E. Photochemical and optical properties of water-soluble xanthophyll antioxidants: aggregation vs complexation / N. E. Polyakov, A. Magyar, L. D. Kispert // Journal of Physical Chemistry B - 2013. - Vol. 117. - P. 10173-10182
6. Рубин, А. Б. Биофизика, том 2 / А. Б. Рубин. - Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 2004. - 469 с.
7. Антонов, В.Ф., Черныш, А.М. и др., Биофизика, Учебник для студентов высших учебных заведений / В.Ф. Антонов. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Владос, 2003. — 288 с.
8. Арсланова, Д. Р. Влияние фемтосекундного лазерного излучения на эритроциты IN VITRO / Д. Р. Арсланова, Т. В. Абакумова и др. // Лазерная медицина - 2011. - Т.15. - № 2. - С. 215-215.
9. Vileno, B. Stiffness Alterations of Single Cells Induced by UV in the Presence of NanoTiO₂ / B. Vileno, M. Lekka, A. Sienkiewicz, S. Jeney, G. Stossel, J. Lekki, L. Forro, Z. Stachura // Environmental Science & Technology - 2007. - Vol. 41. - P. 5149-5153
10. Нагорнов, Ю. С. Оптимизация формы эритроцита в соответствии с данными атомно-силовой микроскопии / Ю. С. Нагорнов, И. В. Жиляев // Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. - 2013. - Т. 12. - Вып. 1.
11. Дрозд, Е. С. Атомно-силовая микроскопия структурно-механических свойств мембран эритроцитов / Е. С. Дрозд, С. А. Чижик, Е. Э. Константинова // Российский журнал биомеханики - 2009. - Т.13. - С. 22–30.

12. Wenz, G. An Overview of Host-Guest Chemistry and its Application to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs / G. Wenz // *Clinical Drug Investigation* - 2000. - Vol. 19. - P. 21–25.
13. Challa, R. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review / R. Challa, A. Ahuja, J. Ali and R. K. Khar // *AAPS PharmSciTech* - 2005. Vol. 6 (2). - P. E329–E357.
14. Higuchi, T. Phase-solubility techniques / T. Higuchi, K. A. Connors // *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* - 1965. - Vol. 4. - P. 212-217.
15. Londhe, V. Comparison between Hydroxypropyl- β -cyclodextrin and polyvinyl pyrrolidone as carriers for carbamazepine solid dispersions / V. Londhe, M. Nagarsenker // *Indian Journal of Pharmaceutical Science* - 1999. - Vol. 61. - P. 237-240
16. Bettinetti, G. Thermal behavior and dissolution properties of naproxen in combinations with chemically modified beta-cyclodextrins. // G. Bettinetti, A. Gazzaniga, P. Mura, F. Giordano, M. Setti - *Drug Development and Industrial Pharmacy* - 1992. - Vol. 18. - P. 39-53.
17. Loftsson, T. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye / T. Loftsson, E. Stefánsson // *Drug Development and Industrial Pharmacy* - 1997. Vol. 23. - P. 473-481;
18. Van Dorne, H. Interaction between cyclodextrins and ophthalmic drugs. / H. Van Dorne // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* - 1993. Vol. 39. - P. 133-139.
19. Loftsson, T. Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. / T. Loftsson, N. Leeves, B. Bjornsdottir, L. Duffy, M. Masson, M. // *Journal of Pharmaceutical Sciences* - 1999. - Vol. 88. - P. 1254-1258.
20. Matsuda, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. / H. Matsuda, H. Arima // *Advanced Drug Delivery Reviews* - 1999. - Vol. 36. - P. 81-99
21. Irie, T. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. / T. Irie, K. Uekama // *Journal of Pharmaceutical Sciences* - 1997. - Vol. 86. - P. 147-162.
22. Israelachvili, J. N. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers / J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* - 1976. - Vol. 72. - P. 1525–1568.
23. Mezzenga, R. Understanding foods as soft materials / R. Mezzenga, P. Schurtenberger, A. Burbidge, M. Michel // *Nature materials* - 2005. - Vol. 4. - P. 729–40.
24. Zhang, N. Polysaccharide-Based Micelles for Drug Delivery / N. Zhang, P. R. Wardwell, R. A. Bader // *Pharmaceutics* - 2013. - Vol. 5. - P. 329-352.
25. Garrec, D. L. Micelles in Anticancer Drug Delivery / D. L. Garrec, M. Ranger and J.-C. Leroux // *American Journal of Drug Delivery* - 2004. - Vol. 2. - P. 15-42.

26. Allen, C. Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone. / C. Allen, J. Han, Y. Yu et al. // *Journal of Controlled Release* - 2000. - Vol. 63. - 275-86.
27. Dang, J.M. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering / J. M. Dang, K. W. Leong // *Advanced Drug Delivery Reviews* - 2006. - Vol. 58. - P. 487–499.
28. Ratner, B.D. Biomaterials: Where we have been and where we are going / B. D. Ratner, S. J. Bryant // *Annual Review of Biomedical Engineering*. - 2004. - Vol. 6. - P. 41–75.
29. Chen, J. Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery / J. Chen, S. Jo, K. Park // *Carbohydrate Polymers* - 1995. - Vol. 28. - P. 69–76.
30. Mizrahy, S. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics / S. Mizrahy, D. Peer // *Chemical Society Reviews* - 2012. - Vol. 41. - P. 2623–2640.
31. Jain, A. Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site specific drug delivery to the colon / A. Jain, Y. Gupta, Y., S. K. Jain // *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* - 2007. - Vol. 10. - P. 86–128.
32. Jian, F. Toxicity of Biodegradable Nanoscale Preparations. / F. Jian, Y. Zhang, J. Wang, K. Ba, R. Y. Mao, W. L. Lai, Y. F. Lin // *Current Drug Metabolism* - 2012. - Vol. 13. - P. 440–446.
33. Mourya, V.K. Trimethyl chitosan and its application in drug delivery / V. K. Mourya, N. N. Inamdar // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* - 2009. - Vol. 20. - P. 1057–1079.
34. Thanou, M. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. / M. Thanou, J. C. Verhoef, H. E. Junginger // *Advanced Drug Delivery Reviews* - 2001. - Vol. 52. - P. 117–126.
35. Thanou, M. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers / M. Thanou, J. C. Verhoef, H. E. Junginger // *Advanced Drug Delivery Reviews* - 2001. - Vol. 50. - P. S91–S101.
36. Bangham, A.D. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surfaceactive agents as observed in the electron microscope. / A. D. Bangham, R. W. Horne // *Journal of Molecular Biology* - 1964. - Vol. 8. - P. 660-668.
37. Sharma, A. Liposomes in drug delivery: progress and limitations / A. Sharma, U. S. Sharma // *International Journal of Pharmaceutics* - 1997. - Vol. 154. - P. 123-140.
38. Alving, C.R. Liposomes as carriers of antigens and adjuvants / C. R. Alving // *Journal of Immunological Methods* - 1991. - Vol. 140. P. 1-13.
39. Kim, H.-J. The adsorption of cationic liposomes to *Staphylococcus aureus* biofilms / H.-J. Kim, M. E. L. Gias, M. N. Jones // *Colloids and Surfaces A* - 1999. - Vol. 149. - P. 561-570.
40. Kim, J.-S. Liposomal drug delivery system / J.-S. Kim // *Journal of Pharmaceutical Investigation* - 2016 - Vol. 46. - Issue 4. - P. 387–392.

41. Storm, G. Liposomes: quo vadis? / G. Storm and D. J. A. Crommelin // *Pharmaceutical Science & Technology Today* - 1998. - Vol. 1. - P. 19-31.
42. Makeswar, K. B. Niosome: a Novel Drug Delivery System / K. B. Makeswar, S. R. Wasankar // *Asian Journal of Pharmaceutical Research* - 2013. - Vol. 3. - P. 16-20.
43. Peetla, C. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. / C. Peetla, A. Stine, V. Labhasetwar // *Molecular Pharmaceutics* - 2009. - Vol. 6. - P. 1264-76.
44. Rodrigues, C. Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-L-alpha-phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes / C. Rodrigues, P. Gameiro, S. Reis, J. L. Lima, B. de Castro // *Biophysical Chemistry* - 2001. - Vol. 94. - P. 97–106.
45. Turina, L. Electron spin changes during general anesthesia in *Drosophila* / L. Turina, E. M. C. Skoulakis and A. P. Horsfield // *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* - 2014. - Vol. 111. - P. 3524-3533.
46. Trudell, J.R., in *Drug and Anesthetic Effects on Membrane Structure and Function* / R.C. Aloia, C.C. Curtain, L.M.Gordon (Eds.). - Wiley-Liss, New York, 1991. - P. 1–13.
47. Fraceto, L.F. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers / L. F. Fraceto, L. M. A. Pinto, L. Franzon, A. A. C. Braga, A. Spisni, S. Schreier, E. Paula // *Biophysical Chemistry* - 2002. - Vol. 99. - P. 229–243.
48. Grof, P. The effect of anaesthetics on protein conformation in membranes as studied by the spin-labelling technique. / P. Grof, J. Belagyi // *Biochimica et Biophysica Acta* - 1983. - Vol. 734. - P. 319–328.
49. Smirnova, T. I. Peptide-membrane Interactions by Spin-labeling EPR / T. I. Smirnova and A. I. Smirnov // *Methods in Enzymology* - 2015. - Vol. 564. - P. 219–258.
50. Yonar, D. Interaction of Antidepressant Drug, Clomipramine, with Model and Biological Stratum Corneum Membrane as Studied by Electron Paramagnetic Resonance / D. Yonar, N. Horasan, D. D. Paktaş, Z. Abramović, J. Štrancar, M. M. Sünnetçioğlu, M. Šentjurc // *Journal of Pharmaceutical Sciences* - 2013. - Vol. 102. - P. 3762–3772.
51. Makriyannis, A. The orientation of (-)-delta 9-tetrahydrocannabinol in DPPC bilayers as determined from solid-state ²H-NMR. / A. Makriyannis, A. Banijamali, H. C. Jarell, D. P. Yang // *Biochimica et Biophysica Acta* - 1989. Vol. 986. - P. 141–145.
52. Potamitis, C. Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers / C. Potamitis, P. Chatzigeorgiou, E. Siapi, K. Viras, T. Mavromoustakos, A. Hodzic, G.

- Pabst, F. Cacho-Nerin, P. Laggner, M. Rappolt // *Biochimica et Biophysica Acta* - 2011. - Vol. 1808. - P. 1753–1763.
53. Керрингтон, А., Магнитный резонанс и его применение в химии / А. Керрингтон, Э. Мак-лечлан. - М.: Мир, 1970. - 448 с.
54. Гюнтер, Х., Введение в курс спектроскопии ЯМР / Х. Гюнтер. — М.: Мир, 1984. — 478 с.
55. Deese, L. J. Proton NMR T1, T2, and T1ρ relaxation studies of native and reconstituted sarcoplasmic reticulum and phospholipid vesicles / L. J. Deese and E. A. Dartz // *Biophysical Journal*. - 1982. - Vol. 37. - P. 207-216.
56. Bocian, F. NMR studies of membrane structure and dynamics / F. Bocian and S. I. Chan // *Annual Review of Physical Chemistry* - 1978. - Vol. 29. - P. 307-35.
57. Gabrielska, J., Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: a ¹H NMR study / J. Gabrielska, M. Gagoz, J. Gubernator, W. I. Gruszecki // *FEBS Letters* - 2006. - Vol. 580. - P. 2658–2677.
58. Pentak, D. Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC / D. Pentak // *Thermochimica Acta* - 2014. Vol. 584 - P. 36–44.
59. Himmelreich, U. Membrane permeability of formate in human erythrocytes: NMR measurements / U. Himmelreich, B.E. Chapman, P. W. Kuchel // *European Biophysical Journal* - 1999. - Vol. 28. - P. 158-165.
60. Wang, J. Amantadine partition and localization in phospholipid membrane: a solution NMR study / J. Wang, J. R. Schnell, J. J. Chou // *Biochemical and Biophysical Research Communications* - 2004. - Vol. 324. - P. 212–217.
61. He, J. Characterization of the interaction between acotiamide hydrochloride and human serum albumin: ¹H STD NMR spectroscopy, electrochemical measurement, and docking investigations / J. He, H. Yang, S. Li, K. Xu, Q. Wang, Y. Huang, H. Li // *RSC Advances* - 2016. Vol. 6. - P. 61119-61128.
62. Luo, R-S. NMR diffusion and relaxation study of drug–protein interaction / R-S. Luo, M.-L. Liu, X.-A. Mao // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* - 1999. - Vol. 55. - P. 1897–1901.
63. Kumari, A. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems / A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* - 2010. - Vol. 75. - P. 1–18.
64. Patel, D.P. Application of Supramolecules in Drug Delivery / D. P. Patel, B. G. Chaudhari // *Journal of Current Pharmaceutical Research* - 2012. - Vol. 9. - P. 1-5.

65. Lin, J. C. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro / J. C. Lin // *Antiviral Research* - 2003. - Vol. 59. - P. 41-47.
66. Hoever, G. Antiviral Activity of Glycyrrhizic Acid Derivatives against SARS-Coronavirus / G. Hoever, L. Baltina, M. Michaelis, R. Kondratenko, L. Baltina, G. A. Tolstikov, H. W. Doerr, J. Jr. Cinatl // *Journal of Medicinal Chemistry* - 2005. - Vol. 48. - P. 1256-1259.
67. Badam, L. In vitro antiviral activity of indigenous glycyrrhizin, licorice and glycyrrhizic acid (Sigma) on Japanese encephalitis virus / L. Badam // *Journal of Communicable Diseases* - 1997. - Vol. 29. - P. 91-99.
68. Pompei, R. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles / R. Pompei, O. Flore, M. A. Marccialis, A. Pani, B. Loddo // *Nature* - 1979. - Vol. 281. - P. 689-690.
69. Pompei, R. Antiviral activity of glycyrrhizic acid / R. Pompei, A. Pani, O. Flore, M.A. Marccialis, B. Loddo // *Experientia* - 1980. - Vol. 36. - P. 304.
70. Kang, H. Mechanism of Glycyrrhizic Acid Inhibition of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Disruption of CTCF-Cohesin-Mediated RNA Polymerase II Pausing and Sister Chromatid Cohesion / H. Kang, P. M. Lieberman // *Journal of virology* - 2011. - Vol. 85. P. 11159-11169.
71. Kimoto, M. Site-specific incorporation of fluorescent probes into RNA by specific transcription using unnatural base pairs / M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, Y. Harada, A. Sato, S. Yokoyama, I. Hirao // *Nucleic acids symposium series* - 2005. - Vol. 49. - P. 287-288.
72. Sekizawa, T. Glycyrrhizin increases survival of mice with herpes simplex encephalitis / T. Sekizawa, K. Yanagi, Y. Itoyama // *Acta virologica* - 2001. - Vol. 45. P. 51-54.
73. Baba, M. Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus in vitro / M. Baba, S. Shigeta // *Antiviral research* - 1987. Vol. 7. - P. 99-107.
74. Duan, E. Suppression of porcine reproductive and respiratory syndrome virus proliferation by glycyrrhizin / E. Duan, D. Wang, L. Fang, J. Ma, J. Luo, H. Chen, K. Li, S. Xiao // *Antiviral research* - 2015. - Vol. 120. - P. 122-125.
75. Harada, S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope / S. Harada // *Biochemical Journal* - 2005. - Vol. 392. - P. 191-199.
76. Crance, J. M. Studies on mechanism of action of glycyrrhizin against hepatitis A virus replication in vitro / J. M. Crance, F. Lévêque, E. Biziagos, H. van Cuyck-Gandr e, A. Jouan, R. Deloince // *Antiviral research* - 1994. - Vol. 23. - P. 63-76.
77. Sui, X. Antiviral effect of diammonium glycyrrhizinate and lithium chloride on cell infection by pseudorabies herpesvirus / X. Sui, J. Yin, X. Ren // *Antiviral research* - 2010. - Vol. 85. P. 346-353.

78. Wolkerstorfer, A. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell / A. Wolkerstorfer, H. Kurz, N. Bachhofner, O. H. Szolar // *Antiviral research* - 2009. - Vol. 83. - P. 171-178.
79. Matsumoto, Y. Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus In Vitro / Y. Matsumoto, T. Matsuura, H. Aoyagi, M. Matsuda, S. S. Hmwe, T. Date, N. Watanabe, K. Watashi, R. Suzuki, S. Ichinose, K. Wake, T. Suzuki, T. Miyamura, T. Wakita, H. Aizaki // *PLOS one* - 2013. - Vol. 8. - P. e68992.
80. Fu, Y. Glycyrrhizin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by reducing TLR4 recruitment into lipid rafts in RAW264.7 cells / Y. Fu, E. Zhou, Z. Wei, X. Song, Z. Liu, T. Wang, W. Wang, N. Zhang, G. Liu, Z. Yang // *Biochimica et Biophysica Acta* - 2014. - Vol. 1840. - P. 1755-1764.
81. Yu, J.Y. Anti-Inflammatory Activities of Licorice Extract and Its Active Compounds, Glycyrrhizic Acid, Liquiritin and Liquiritigenin, in BV2 Cells and Mice Liver / J. Y. Yu, J. Y. Ha, K. M. Kim, Y. S. Jung, J. C. Jung, S. Oh // *Molecules* - 2015. Vol. 20. - P. 13041-13054.
82. Tsao, S.M. Antioxidative and Antiinflammatory Activities of Asiatic Acid, Glycyrrhizic Acid, and Oleanolic Acid in Human Bronchial Epithelial Cells / S. M. Tsao, M. C. Yin // *Journal of agricultural and food chemistry* - 2015. - Vol. 63. - P. 3196-3204.
83. Akamatsu, H. Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation / H. Akamatsu, J. Komura, Y. Asada, Y. Niwa // *Planta medica* - 1991. Vol. 57. - P. 119-21.
84. Ohuchi, K. Glycyrrhizin inhibits prostaglandin E2 production by activated peritoneal macrophages from rats / K. Ohuchi, Y. Kamada, L. Levine, S. Tsurufuji // *Prostaglandins and medicine* - 1981. - Vol. 7. P. 457-63.
85. Orazizadeh, M. Effect of glycyrrhizic acid on titanium dioxide nanoparticles-induced hepatotoxicity in rats / M. Orazizadeh, F. Fakhredini, E. Mansouri, L. Khorsandi // *Chemico-biological interactions* - 2014. Vol. 220. P.214-221.
86. Huo, H.Z. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of Licorice Extract against CCl4-Induced Oxidative Damage in Rats / H. Z. Huo, B. Wang, Y. K. Liang, Y. Y. Bao, Y. Gu // *International Journal of Molecular Sciences* - 2011. Vol. 12. - P. 6529-6543.
87. Yin, G. Hepatoprotective and antioxidant effects of Glycyrrhiza glabra extract against carbon tetrachloride (CCl4)-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) / G. Yin, L. Cao, P. Xu, G. Jeney, M. Nakao, C. Lu // *Fish Physiology and Biochemistry* - 2011. - Vol. 37. P. 209-216.

88. Liang, B. Glycyrrhizic acid inhibits apoptosis and fibrosis in carbon-tetrachloride-induced rat liver injury / B. Liang, X. L. Guo, J. Jin, Y. C. Ma, Z. Q. Feng // *World Journal of Gastroenterology* - 2015. - Vol. 21. P. 5271-5280.
89. Wan, X.Y. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine / X. Y. Wan, M. Luo, X. D. Li, P. He // *Chemico-Biological Interactions* - 2009. - Vol. 181. P. 15-19.
90. Yin, J. Effects of glycyrrhizic acid on cocklebur-induced hepatotoxicity in rat and human hepatocytes / J. Yin, D. Li, W. Hu, Q. Meng // *Phytotherapy Research* - 2008. - Vol. 22. -P. 395-400.
91. Li, J.Y. Glycyrrhizic Acid in the Treatment of Liver Diseases: Literature Review / J. Y. Li, H. Y. Cao, P. Liu, G. H. Cheng, M. Y. Sun // *BioMed Research International* - 2014. - Vol. 2014. ID 872139.
92. Wang, Y.G. Pregnane X receptor mediated-transcription regulation of CYP3A by glycyrrhizin: A possible mechanism for its hepatoprotective property against lithocholic acid-induced injury / Y. G. Wang, J. M. Zhou, Z. C. Ma, H. Li, Q. D. Liang, H. L. Tan, C. R. Xiao, B. L. Zhang, Y. Gao // *Chemico-Biological Interactions* - 2012. - Vol. 200. P. 11-20.
93. Hsiang, C.Y. Glycyrrhizin, silymarin, and ursodeoxycholic acid regulate a common hepatoprotective pathway in HepG2 cells / C. Y. Hsiang, L. J. Lin, S. T. Kao, H. Y. Lo, S. T. Chou, T. Y. Ho // *Phytomedicine* - 2015. - Vol. 22. P. 768-777.
94. El-Tahawy, N. F. Effect of glycyrrhizin on lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute hepatitis in albino rats: a histological and immunohistochemical study / N. F. El-Tahawy, A. H. Ali, S. R. Saied and Z. A. Wahab // *The Egyptian Journal of Histology* - 2011. - Vol. 34. - P. 518-527.
95. Nakamura, T. Enzyme leakage due to change of membrane permeability of primary cultured rat hepatocytes treated with various hepatotoxins and its prevention by glycyrrhizin / T. Nakamura, T. Fujii, A. Ichihara // *Cell biology and toxicology* - 1985. - Vol. 1. - P. 285-95.
96. Hibasami, H. Glycyrrhizin induces apoptosis in human stomach cancer KATO III and human promyelotic leukemia HL-60 cells / H. Hibasami, H. Iwase, K. Yoshioka, H. Takahashi // *International Journal of Molecular Medicine* - 2005. Vol. 16. P. 233-236.
97. Thirugnanam, S. Glycyrrhizin induces apoptosis in prostate cancer cell lines DU-145 and LNCaP / S. Thirugnanam, L. Xu, K. Ramaswamy, M. Gnanasekar // *Oncology reports* - 2008. Vol. 20. P. 1387-1392.
98. Zhao, M.-X. β -Cyclodextrin/Glycyrrhizic Acid Functionalised Quantum Dots Selectively Enter Hepatic Cells and Induce Apoptosis / M.-X. Zhao, L.-N. Ji, Z.-W. Mao // *Chemistry - A European Journal* - 2012. - Vol. 18. - P. 1650-1658.

99. Yang, J.C. 18 β -Glycyrrhetic acid potentiates Hsp90 inhibition-induced apoptosis in human epithelial ovarian carcinoma cells via activation of death receptor and mitochondrial pathway / J. C. Yang, S. C. Myung, W. Kim, C. S. Lee // *Molecular and Cellular Biochemistry* - 2012. - Vol. 370. P. 209-219.
100. Patlolla, J.M. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects / J. M. Patlolla, C. V. Rao // *Current Pharmaceutical Biotechnology* - 2012. - Vol. 13. P. 147-155.
101. Tripathi, M. Glycyrrhizic acid modulates t-BHP induced apoptosis in primary rat hepatocytes / M. Tripathi, B. K. Singh, P. Kakkar // *Food and chemical toxicology* - 2009. Vol. 47. P. 339-347.
102. Salvi, M. Glycyrrhetic acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria / M. Salvi, C. Fiore, D. Armanini, A. Toninello // *Biochemical pharmacology* - 2003. Vol. 66. P. 2375-2379.
103. De Groot, G. Improvement of selectivity and sensitivity by column switching in the determination of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography / G. De Groot, R. Koops, E. A. Hogendoorn, C. E. Goewie, T. J. Savelkoul, P. van Vloten // *Journal of Chromatography* - 1988. - Vol. 456. - P. 71–81.
104. Fiore, C. On the mechanism of mitochondrial permeability transition induction by glycyrrhetic acid / C. Fiore, M. Salvi, M. Palermo, G. Sinigaglia, D. Armanini, A. Toninello // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* - 2004. - Vol. 1658. - P. 195–201.
105. Lee, C.S. 18 β -Glycyrrhetic acid induces apoptotic cell death in SiHa cells and exhibits a synergistic effect against antibiotic anti-cancer drug toxicity / C. S. Lee, Y.J. Kim, M.S. Lee, E.S. Han, S.J. Lee // *Life sciences* - 2008. Vol. 83. - P. 481-489
106. Mignotte, B. Mitochondria and apoptosis. / B. Mignotte, J. L. Vayssière // *European Journal of Biochemistry* - 1998. - Vol. 252. - P. 1–15.
107. Корниевская, В. С. Изучение влияния супрамолекулярных структур глицирризиновой кислоты на реакционную способность органических соединений методами ¹H ЯМР и ХПЯ. / В. С. Корниевская, А. И.Круппа, Т. В. Лёшина // *Вестник НГУ, серия: физика* - 2008. - Т. 3. - С. 37-46.
108. Petrova, S. S. Self-Association of Glycyrrhizic Acid. NMR Study. / S. S. Petrova, A. A. Schlotgauer, A. I. Kruppa, T. V. Leshina // *Zeitschrift für Physikalische Chemie* - 2016. - Vol. 231. - P. 1-17.
109. Zelikman, M. V. Structure of dimers of glycyrrhizic acid in water and their complexes with cholesterol: Molecular dynamics simulation. / M. V. Zelikman, A. V. Kim, N. N. Medvedev, O. Yu. Selyutina, N. E. Polyakov // *Journal of Structural Chemistry* - 2015. - Vol. 56. - P. 67-76.

110. Matsuoka, K. Aggregate formation of glycyrrhizic acid. / K. Matsuoka, R. Miyajima, I. Ishida, S. Karasawa, T. Yoshimura // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* - 2016.- Vol. 500. - P. 112–117.
111. Yang, F.H. Bioavailability Enhancement of Paclitaxel via a Novel Oral Drug Delivery System: Paclitaxel-Loaded Glycyrrhizic Acid Micelles. / F. H. Yang, Q. Zhang, Q. Y. Liang, S. Q. Wang, B. X. Zhao, Y. T. Wang, Y. Cai, G. F. Li // *Molecules* - 2015. - Vol. 20. - P. 4337-4356.
112. Wang, Y. Formulation and evaluation of novel glycyrrhizic acid micelles for transdermal delivery of podophyllotoxin. / Y. Wang, B. Zhao, S. Wang, Q. Liang, Y. Cai, F. Yang, G. Li // *Drug Delivery* - 2016. - Vol. 23. - P. 1623-1635.
113. Sapra, B. Transdermal Delivery of Carvedilol Containing Glycyrrhizinand Chitosan as Permeation Enhancers: Biochemical, Biophysical, Microscopic and Pharmacodynamic Evaluation. / B. Sapra, S. Jain, A. K. Tiwary // *Drug delivery* - 2008. - Vol 15. - P. 443-454.
114. Chen, Q. Novel glycyrrhetic acid conjugated pH-sensitive liposomes for the delivery of doxorubicin and its antitumor activities. / Q. Chen, H. Ding, J. Zhou, X. Zhao, J. Zhang, C. Yang, K. Li, M. Qiao, H. Hu, J. Ding, X. Zhao // *RSC Advances* - Vol. 6. - P. 17782-17791.
115. Cai, Y. Glycyrrhetic Acid Mediated Drug Delivery Carriers for Hepatocellular Carcinoma Therapy. / Y. Cai, Y. Xu, H. F. Chan, X. Fang, C. He, M. Chen // *Molecular pharmaceutics* - 2016. - Vol. 13. - P. 699-709.
116. Himmelreich, U. Membrane permeability of formate in human erythrocytes: NMR measurements. / U. Himmelreich, B. E. Chapman, P. W. Kuchel // *European Biophysics Journal* - 1999. - Vol. 28. - P. 158.
117. Maciaszek, J.L. Sickle cell trait human erythrocytes are significantly stiffer than normal. /J. L. Maciaszek, G. Lykotrafitis // *Journal of Biomechanics* - 2011. - Vol. 44. - P. 657–661.
118. Bryzgalov, L. O. Detection of regulatory SNPs in human genome using ChIP-seq ENCODE data. / L. O. Bryzgalov, E. V. Antontseva, M. Yu. Matveeva, A. G. Shilov, E. V. Kashina, V. A. Mordvinov, T. I. Merkulova // *PLoS One* - 2013. - Vol. 8. - e78833, DOI: 10.1371/journal.pone.0078833
119. Rocks, N. Curcumin–cyclodextrin complexes potentiate gemcitabine effects in an orthotopic mouse model of lung cancer. / N. Rocks, S. Bekaert, I. Coia, G. Paulissen, M. Gueders, B. Evrard, J. C. Van Heugen, P. Chiap, J. M. Foidart, A. Noel, D. Cataldo // *British Journal of Cancer* - 2012. - Vol. 107. - P. 1083-1092.

120. Dua, J.S. Liposome: methods of preparation and applications. / J. S. Dua, A. C. Rana, A. K. Bhandari // *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* - 2012. - Vol. III. - P. 14-20.
121. Colon, T. Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR technique. / T. Colon, R. Outhred // *Biochimica et Biophysica Acta* - 1972. Vol. 288. -P. 354-361.
122. Macey, R. I., Mathematical models of membrane transport processes. In: T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil, S.G. Schultz (eds), *Physiology of membrane disorders*. - Plenum, New York, 1986. - P. 111–131.
123. Hess, B. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. / B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl // *Journal of Chemical Theory and Computation* - 2008. - Vol. 4. - P. 435–447.
124. Shirley, W. Biomolecular simulations of membranes: Physical properties from different force fields. / W. Shirley, I. Siu, R. Vácha, P. Jungwirth, R. A. Böckmann // *Journal of Chemical Physics* - 2008. - Vol. 128. - P. 125103
125. Berendsen, H.J.C. Interaction models for water in relation to protein hydration. / H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, J. Hermans. - Reidel: Dordrecht, 1981. - P. 331–342.
126. Hess, B. Lincs: A linear constraint solver for molecular simulations. / B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. Fraaije // *Journal of Computational Chemistry* - 1997. - Vol. 18. - P. 1463–1472.
127. Essmann, U. A smooth particle mesh Ewald method. / U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen // *The Journal of chemical physics* - 1995. Vol. 103. - P. 8577–8592.
128. Kumar, S. The weighted histogram analysis method for free - energy calculations on biomolecules. I. The method. / S. Kumar et al. // *Journal of Computational Chemistry* - 1992. - Vol. 13. - P. 1011-1021.
129. Shirts, M. R. An introduction to best practices in free energy calculations. / M. R. Shirts, D. L. Mobley // *Biomolecular Simulations: Methods and Protocols* - 2013. - Vol. 924. - P. 271-311.
130. Torrie, G. M. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. / G. M. Torrie, J. P. Valleau // *Journal of Computational Physics* - 1977. - Vol. 23. - P. 187-199.
131. Staubach, S. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. / S. Staubach, F. G. Hanisch // *Expert Review of Proteomics* - 2011. - Vol. 8. - P. 263-77.

132. Polyakov, N.E. Water soluble biocompatible vesicles based on polysaccharides and oligosaccharides inclusion complexes for carotenoid delivery. / N. E. Polyakov, L. D. Kispert // Carbohydrate polymers - 2015. - Vol. 128. P. 207-219.
133. Kayvan, K. R. Chemistry and biochemistry of ^{13}C hyperpolarized magnetic resonance using dynamic nuclear polarization. / K. R. Kayvan, D. M. Wilson // Chemical Society Reviews - 2014. - Vol. 43. - P. 1627-1659.
134. Polyakov, N.E. Host-Guest Complexes of Carotenoids with b-Glycyrrhizic Acid / N. E. Polyakov, T. V. Leshina, N. F. Salakhutdinov, L. D. Kispert // Journal of Physical Chemistry B - 2006. - Vol. 110. - P. 6991-6998.
135. Manakker, F. Self-assembling hydrogels based on β -cyclodextrin/cholesterol inclusion complexes. / F. Manakker, M. Pot, T. Vermonden, C. F. Nostrum, W. E. Hennink // Macromolecules - 2008. - Vol. 41. - P. 1766–1773.
136. Wentworth, P. Evidence of ozone formation in human atherosclerotic arteries. / P. Wentworth, J. Nieva, C. Takeuchi, R. Galve, A. Wentworth, R. Dilley, G. DeLaria, A. Saven, B. Babior, K. Janda, A. Eschenmoser, R. Lerner // Science - 2003. - Vol. 302. - P. 1053-1056.
137. Tagiri-Endo, M. Ozonation of cholesterol in the presence of ethanol: identification of a cytotoxic ethoxyhydroperoxide molecule. / M. Tagiri-Endo, K. Nakagawa, T. Sugawara, K. Ono, T. Miyazawa // Lipids - 2004. - Vol. 39. - P. 259-264.
138. Polyakov, N. E. Antioxidant and Redox Properties of Supramolecular Complexes of Carotenoids with β -Glycyrrhizic Acid. / N. E. Polyakov, T. V. Leshina, N. F. Salakhutdinov, T. A. Konovalova, L. D. Kispert // Free Radicals Biology and Medicine - 2006. - Vol. 40. - P. 1804-1809.
139. Londhe, V. Comparison between Hydroxypropyl- β -cyclodextrin and polyvinyl pyrrolidone as carriers for carbamazepine solid dispersions. / V. Londhe, M. Nagarsenker // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences - 1999. - Vol. 61. - P. 237-40.
140. Henslee, B. E. Electroporation dependence on cell size: optical tweezers study. / B. E. Henslee, A. Morss, X. Hu, G. P. Lafyatis, L. J. Lee // Analytical Chemistry - 2011. Vol. 83. P. 3998-4003.
141. Emsley, J.W., High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy / J.W. Emsley, J. Feeney, L.H. - Pergamonpress, Oxford, 1966. - 410 p.
142. T. L. James, Nuclear magnetic resonance in biochemistry / T. L. James. - Academic press, 1975. - 413 p.
143. Jendrasiak, G. L. Halide interaction with phospholipids: proton magnetic resonance studies. / G. L. Jendrasiak // Chemical Physics of Lipids - 1972. - Vol. 9. - P. 133-146.

144. Sheetz, M. P. Effect of sonication on the structure of lecithin bilayers. / M. P. Sheetz, S. I. Chan // *Biochemistry* - 1972. - Vol. 11. - P. 4573-4581.
145. Hunt, G. R. A. Trans-bilayer pseudocontact shifts produced by lanthanide ions in the ¹H- and ³¹P-NMR spectra of phospholipids, vesicular membranes and their temperature variation. / G. R. A. Hunt, L. R. H. Tipping // *Journal of Inorganic Biochemistry* - 1980. - Vol. 12. - P. 17-36.
146. Харакоз, Д. П. О возможной физиологической роли фазового перехода “жидкое-твердое” в биологических мембранах. / Д. П. Харакоз // *Успехи биологической химии* - 2001. - Т. 41. - С. 333-364.
147. Huang, Z. Effect of Cyclodextrin and Membrane Lipid Structure upon Cyclodextrin–Lipid Interaction. / Z. Huang, E. London // *Langmuir* - 2013. Vol. 29. - P. 14631-14638.
148. Kornievskaya, V. S. NMR and photo-CIDNP investigations of the glycyrrhizinic acid micelles influence on solubilized molecules. / V. S. Kornievskaya, A. I. Kruppa, T. V. Leshina // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* - 2007. - Vol. 60. - P. 123–130.
149. Kornievskaya, V. S. Effect of glycyrrhizic acid on lappaconitine phototransformation. / V. S. Kornievskaya, A. I. Kruppa, N. E. Polyakov, T. V. Leshina // *Journal of Physical Chemistry* - 2007. -Vol. 111. - P. 11447-11452.