

О. В. Левицкая, А. В. Сыроешкин, Т. В. Плетенева

АРРЕНИУСОВСКАЯ КИНЕТИКА КАК КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ БИОАКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198, titorovicholga@gmail.com

Описывается применение закономерностей аррениусовской кинетики, в частности значений E_a для оценки биологической активности водных растворов фармацевтических веществ с разным соотношением Д/Н. Полученные значения энергии активации указывают на снижение токсичности/биологической активности растворов со снижением содержания тяжелого изотопа водорода дейтерия.

Ключевые слова: фармацевтические субстанции; вспомогательные вещества; энергия активации.

Доклинические испытания потенциальных лекарственных веществ проводят, используя биологические объекты разного иерархического уровня — от клеток до млекопитающих [1]. В новой методике оценки безопасности фармацевтически активных субстанций (ФАС) и вспомогательных веществ (ВВ) использован метод биотестирования (модель Spirotox) на основе аппарата химической кинетики. Зависимость значений энергии активации лиганд-индуцируемой кинетики гибели инфузории *Spirostomum ambiguum* от температуры исследована для водных растворов с разным содержанием тяжелого изотопа водорода дейтерия.

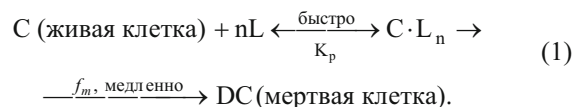
Экспериментальная часть

В работе исследовали гидрохлорид 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина (соль I, эмоксипин) и сукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина (соль II, мексидол, “Бион”, Россия); гликолевую кислоту (Panreac Química, Испания); аскорбиновую кислоту, Na₂ЭДТА, сульфат цинка, сульфит натрия (Sigma-Aldrich); трихлоруксусную кислоту, хлорид натрия (Реахим, Россия, х.ч.), фенол (Реахим, Россия, ч.д.а.), а также воду разного изотопного состава: с пониженным содержанием дейтерия (DDW, D/H = 6 ppm, ЗАО “Лёгкая вода”); деионизированную высокоомную воду (BD, D/H = 140 ppm, Milli-Q — Millipore).

В качестве тест-объекта использовали клеточный биосенсор — инфузории *Spirostomum ambiguum*. Экспериментальная установка включала термостатируемый 5-луночный планшет (Lauda Alpha A6) и биноккуляр МБС-10. Для дополнительного освещения использовали маломощные лампы (~10 Вт) дневного света. В каждую из лунок планшета вносили по 75 мкл рабочих растворов и отсаживали по одной инфузории. Время жизни клетки ($t_{ж}$, с) рассчитывали как интервал от момента инкубации до гибели клетки. Гибель констатировали по обездвиживанию с отсутствием сократительной реакции на механическое раздражение или по нарушению целостности клеточной стенки с выходом содержимого клетки в раствор субстанции.

Результаты и их обсуждение

Аппарат химической кинетики успешно применяют для описания клеточных превращений [2, 3]. Как было показано ранее [4], в процессе лиганд-индуцируемой гибели клетки медленная, скоростьопределяющая стадия следует за образованием промежуточного состояния $C \cdot L_n$, аналогичного комплексу фермента с субстратами:



Для характеристики энергетического барьера процесса лиганд-индуцируемой гибели клетки рассчитывали энергию активации E_a . Найденные значения позволяют расположить исследуемые субстанции в ряд, согласно их биологической активности/токсичности.

Использованию уравнения С. Аррениуса:

$$V = \frac{1}{t_{ж}} = A e^{-\frac{E_a}{RT}},$$

для установления зависимости скорости лиганд-индуцируемой гибели клетки ($V = 1/t_{ж}$) от температуры предшествовали предварительные исследования зависимости “доза (концентрация, C) — ответ (скорость гибели, $1/t_{ж}$)” для 10 исследуемых фармацевтических и вспомогательных субстанций при разных температурах.

В связи с однотипностью методики эксперимента в качестве примера обсуждение результатов изучения аррениусовской кинетики приведено для субстанции препаратов антигипоксанта действия — солей I и II. Скорость гибели инфузорий в растворах исследуемых субстанций изменяется экспоненциально в температурном диапазоне 28 – 36 °С в воде разного изотопного состава (рис. 1).

Как видно из полученных зависимостей, соль I (хлорид) проявляет большую токсичность по сравнению с солью II (сукцинат). Кроме того, как и в преды-

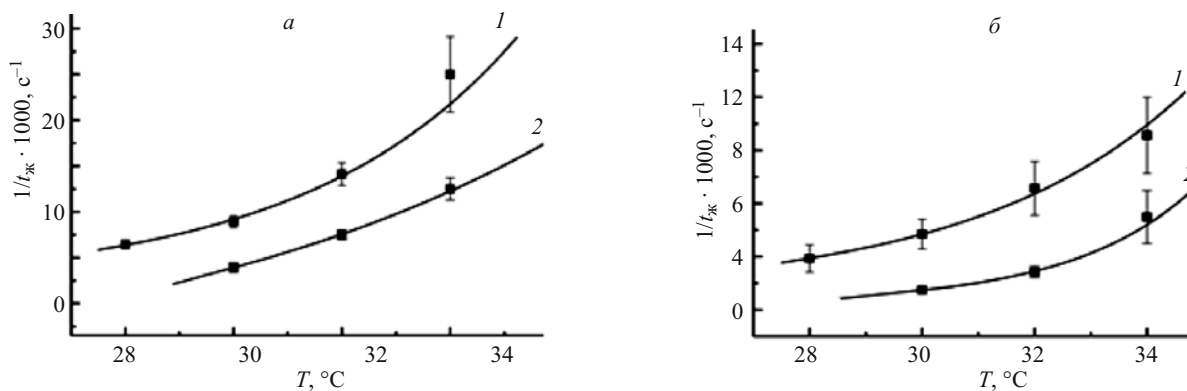


Рис. 1. Зависимость скорости гибели *S. ambigua* от температуры в растворах антигипоксантов – солей I (а) и II (б) в воде с разным содержанием дейтерия: 1 – DDW, 2 – BD. $C = 0,05$ моль/л; $N = 5$, $p = 0,95$. По оси абсцисс – температура, °C; по оси ординат – скорость гибели, $1/t_{ж}, c^{-1}$.

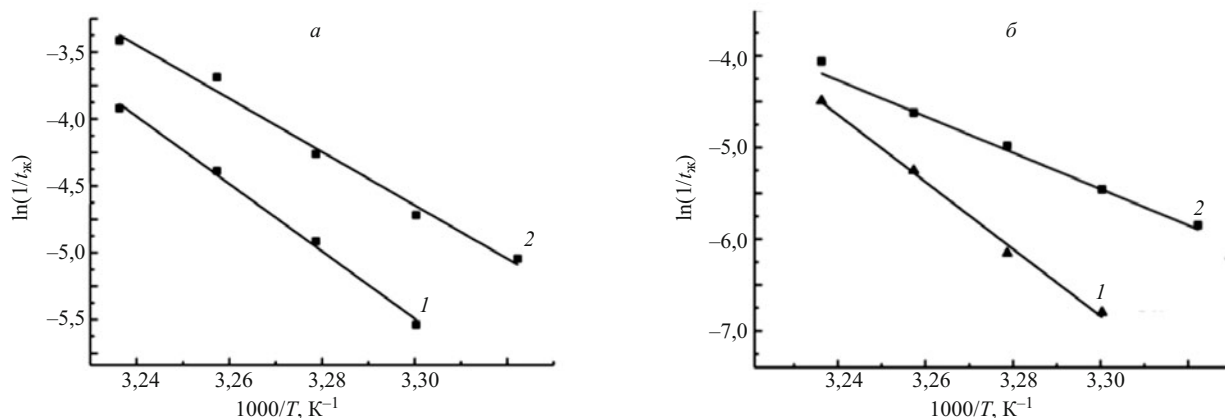


Рис. 2. Зависимость скорости гибели *S. ambigua* от обратной температуры в растворах антигипоксантов — солей I (а) и II (б) в воде с разным содержанием дейтерия: 1 — DDW, 2 — BD. По оси абсцисс — обратная температура по шкале Кельвина $1/T, K^{-1}$; по оси ординат — натуральный логарифм скорости гибели, $\ln(1/t_{ж})$.

дущих исследованиях [5–7], в воде с пониженным содержанием дейтерия обнаружено снижение токсичности ксенобиотиков по сравнению с бидистиллиро-

ванной водой. Скорость гибели инфузорий в растворах, приготовленных на DDW, примерно в 2 раза ниже.

Для расчёта энергии активации лиганд-индуцированного клеточного перехода полученные результаты представляли в аррениусовских координатах: “логарифм скорости гибели клетки $y = \ln 1/t_{ж}$, — обратное значение температуры $x = 1/T$ ” (рис. 2).

По тангенсам угла наклона прямых (см. рис. 2) в соответствии с интегральной формой уравнения Аррениуса:

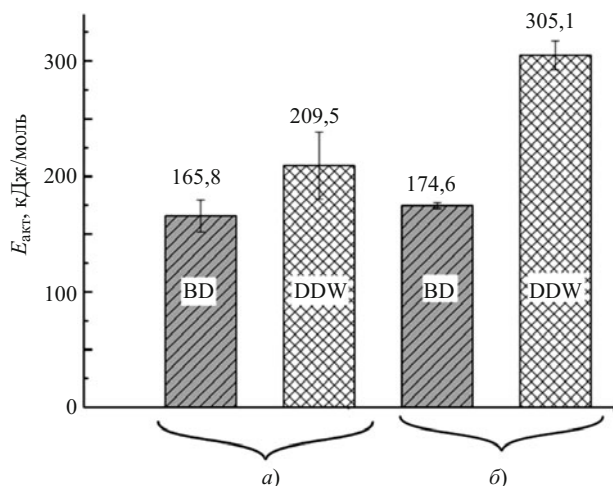


Рис. 3. Значения энергии активации лиганд-индуцируемой гибели *S. ambigua* в растворах субстанций: соли I (а), соли II (б) в бидистиллированной воде (BD) и в воде, обедненной по дейтерию (DDW).

Таблица 1
Энергии активации лиганд-индуцируемой гибели *S. ambigua* в растворах солей I и II

Фармацевтическая субстанция	Тангенс угла наклона прямых в аррениусовских координатах: $\operatorname{tg}\alpha = -E_d/R$		$E_a,$ кДж/моль	
	DDW	BD	DDW	BD
Соль I (гидрохлорид)	– 25,2	– 20,0	209,5	165,8
Соль II (сукцинат)	– 36,7	– 21,0	305,1	174,6

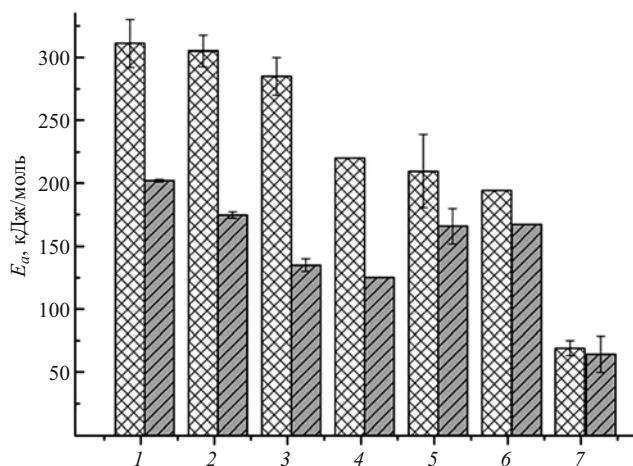


Рис. 4. Ранжирование ксенобиотиков в соответствии со значениями E_a в DDW — 6 ppm (левые столбцы) в сравнении с бидистиллированной водой — 140 ppm (правые столбцы): 1 — Na_2SO_3 , 2 — соль II, 3 — аскорбиновая кислота, 4 — $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 5 — соль I, 6 — ZnSO_4 , 7 — NaCl .

$$\ln(1/t) = \ln A - E_a/R \cdot 1/T,$$

были получены значения множителя $-E_a/R$ в уравнении прямой и рассчитаны энергии активации E_a (табл. 1).

Полученные результаты позволяют сравнить биоактивность солей метилэтилпиридинола-3 в каждой используемой воде (рис. 3). Для воды разного изотопного состава получены статистически достоверные различия значений энергии активации лиганд-индуцированной клеточной гибели. При этом, как и предполагалось, вода с пониженным содержанием дейтерия проявляла антидотные свойства, что нашло отражение в значениях энергии активации — снижение содержания тяжелого изотопа водорода приводило к увеличению выживаемости инфузорий. Количественно это отражалось в увеличении значений E_a . Отношение $E_a(\text{DDW})/E_a(\text{BD})$ для соли I равно 1,3, для соли II — 1,8.

Полученные результаты согласуются с данными по всему спектру ФАС и ВВ (рис. 4).

Рассматривая клетку как биохимический реактор, механизмы токсичности ксенобиотиков можно трактовать по аналогии с аррениусовской кинетикой электродных процессов. Согласно температурно-кинетическому методу [8] процессы, контролируемые диффузией вещества к электроду, имеют энергию активации 8–25 кДж/моль. Кинетически контролируемые процессы, связанные с протеканием предшествующих простых и сложных реакций или химической абсорбцией вещества, имеют значительно более высокие значения энергии активации — 40–120 кДж/моль. Полученные значения E_a лиганд-индуцируемой гибели одноклеточного организма в интервале от 64 до 305 кДж/моль свидетельствуют о кинетических ограничениях воздействия ФАС и ВВ на клетку (рис. 5).

Подтверждением правильности такой трактовки является, в частности, тот факт, что для натрия хлорида,

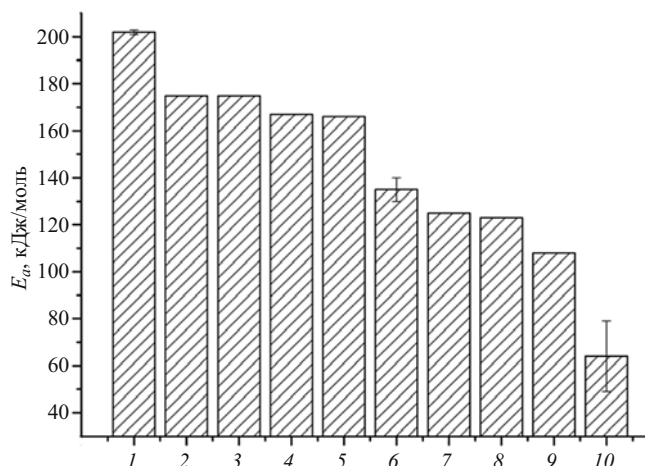


Рис. 5. Убыль значений энергии активации лиганд-индуцируемой гибели клетки в бидистиллированной воде (140 ppm) для субстанций: 1 — Na_2SO_3 , 2 — гликолевая кислота, 3 — соль II, 4 — цинка сульфат, 5 — соль I, 6 — аскорбиновая кислота, 7 — $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 8 — трихлоруксусная кислота, 9 — фенол, 10 — NaCl .

ФАС и ВВ, размеры ионных форм которого обеспечивают практически беспрепятственный транспорт внутрь клетки, значение E_a оказалось минимальным в рассматриваемом ряду субстанций — 69 кДж/моль. Напротив, для более крупных ионов и молекул органических соединений E_a значительно превышает это значение, иногда в 4–5 раз. В особую группу следует выделить вещества, обладающие окислительно-восстановительной активностью, к которым относятся аскорбиновая кислота и натрия сульфит. Для них характерны наибольшие значения E_a , что может быть связано с участием их в сложных окислительно-восстановительных процессах, влияющих на кинетику лиганд-индуцируемой гибели клетки.

Таким образом, предложена методика оценки биологической активности/токсичности ФАС и ВВ в воде разного изотопного состава методом биотестирования с использованием закономерностей аррениусовской кинетики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. К. Будников, С. Ю. Гармонов (ред.), *Фармацевтический анализ. Проблемы аналитической химии*, Т. 16, Аргамак-медиа, Москва (2013).
2. Ю. А. Ершов, В. В. Котин, *Ж. физ. химии*, **84**(10), 1964–1979 (2010).
3. С. Н. Быканова, А. В. Сыроешкин, О. Б. Серегина и др., *Электронный журнал "Исследовано в России"*, № 98, 1114–1129 (2003); <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/0098.pdf>.
4. А. В. Сыроешкин, *Дис. докт. биол. наук*, Москва (2001).
5. Т. Н. Бурдейная, О. Ю. Зрелов, Т. В. Максимова и др., *Вестник РУДН, Сер. Мед.*, № 2, 5–9 (2013).
6. О. В. Титорович, Е. Б. Люлина, Т. В. Плетенева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **48**(12), 68–70 (2014).
7. WO2006019327 A2, Alexandria: Hershkovitz & Associates (2008).
8. Б. Н. Михайлов, О. В. Немыкина, *Ползуновский вестник*, № 3, 135–137 (2009).

Поступила 30.01.15

ARRHENIUS KINETICS: CRITERION FOR EVALUATION OF THE BIOACTIVITY OF ACTIVE AND AUXILIARY PHARMACEUTICAL SUBSTANCES

O. V. Levitskaya, A. V. Syroeshkin, and T. V. Pleteneva

Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia

* e-mail: titorovicholga@gmail.com

The present article describes methodological development of bioassay (Spirotox) based on the Arrhenius kinetics (characterized by activation energy E_a) of pharmaceutical substances and excipients for estimating their biological activity in aqueous solutions with various D/H ratios. The obtained E_a values show evidence of a decrease in the toxicity and biological activity of solutions with decreasing content of heavy hydrogen isotope (deuterium).

Keywords: pharmaceutical substances; excipients; deuterium-depleted water (DDW); Arrhenius kinetics; activation energy.