

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ
ИОННОГО ТРАНСПОРТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ
IN VITRO ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ПОСТОЯННОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ****А. И. Варакин, Ю. В. Серянов, Н. В. Архипова***Саратовский государственный технический университет,*

Поступила в редакцию 20.11.2012 г.

Аннотация. Предложена математическая модель переноса заряженных макромолекул, основанная на интерпретации классических уравнений электромиграционной диффузии Гельмгольца-Смолуховского, Гольдмана и Гольдмана-Ходжкина-Катца, которая подтверждается исследованиями, проведенными *in vitro*. Исследовано влияние постоянного электрического поля на перенос анионов антибиотиков через биомембрану. Из кинетических кривых определены параметры переноса: коэффициенты диффузии $(6.4 - 27.5) \cdot 10^{-6}$ см²/с и ускорения (1.9 - 5), потенциалы асимметрии мембраны (89-110 мВ), сдвиг этого потенциала под действием электрического поля (до 20 мВ), изменение энтальпии при вытеснении Cl⁻ из мембраны (8.43-10.49 кДж/моль).

Ключевые слова: математическая модель переноса заряженных макромолекул, биомембрана, постоянное электрическое поле, кинетические кривые, анионы антибиотиков, коэффициенты диффузии и ускорения, потенциалы асимметрии мембраны.

Abstract. The mathematical model of carrying over of the charged macromolecules, based on interpretation of the classical equations of electromigratory diffusion Gelmgoltsa-Smoluhovsky-Goldman and Goldman-Hodzhkin-Katz which is proved by the researches spent *in vitro* is offered. Influence of constant electric field on carrying over of antibiotics' anions through a biomembrane is investigated. The parameters of carrying over are defined from kinetic curves: diffusion $(6.4 - 27.5) \cdot 10^{-6}$ cm²/c and acceleration factors (1.9 - 5), potentials of membrane's asymmetry (89-110 mV), shift of this potential under the influence of electric field (< 20 mV), change of enthalpy at replacement Cl⁻ from a membrane (8.43-10.49 kJ/mol).

Keywords: mathematical model of carrying over of the charged macromolecules, a biomembrane, constant electric field, kinetic curves, antibiotics' anions, diffusion and acceleration factors, potentials of membranes' asymmetry.

Одним из важнейших направлений современной медицины является разработка методов лечения заболеваний, сочетающих химиотерапию и воздействие физических полей (физиотерапию). Несмотря на достаточно широкое применение лекарственного физиофореза и открытие форетических ускоряющих свойств электрических, магнитных, акустических полей, попыток определения механизмов и разработки теоретических основ переноса макромолекул лекарственных препаратов в биологических тканях под действием этих полей не производилось.

В данной работе представлены модели переноса макроионов антибиотиков через мышечные мембраны *in vitro* под воздействием постоянного электрического поля. Эти модели могут служить для теоретических основ лекарственной электрофоретической физиотерапии, современных методов лечения и разработки физиотерапевтических приборов, что и определяет актуальность предложенного исследования.

Электрофоретические свойства физических полей, т.е. свойства, влияющие на перенос молекул и ионов в тканях организма известны сравнительно давно.

Большой объем экспериментальных исследований влияния физических факторов на поступление лекарственных препаратов в отдельные органы и ткани выполнен в институте физиологии НАН Беларуси под руководством В. С. Улащика.

Авторами установлено, что электрические токи способствуют усиленному поступлению и сохранению лекарств в коже, находящейся в области расположения токонесущих электродов. При этом для всех исследованных препаратов под катодом их определялось на 20-30% больше, чем под анодом. На это различие некоторое влияние оказывала полярность (знак заряда) исследуемого лекарственного вещества: если оно имело положительный заряд, то различия в накоплении его на аноде и катоде возрастали, а для отрицательно заряженных веществ они, наоборот, сглаживались [1].

Полученные данные об усиленном поступлении лекарств в подвергшиеся гальванизации органы и ткани явились научным обоснованием метода внутритканевого электрофореза, который получил сегодня широкое распространение, и продемонстрировал высокую терапевтическую эффективность при многих заболеваниях [2]. Авторами предложены технологии и оригинальные устройства для исследования лекарственно-электрофореза. Большой объем трудоемких и дорогостоящих исследований позволил описать математически количественные закономерности электрофореза лекарств.

Несмотря на это представления о лекарственном электрофорезе являются достаточно общими, а исследования носят только эмпирический характер [3].

Биоэлектрохимические методы [4-5], «пэтч-кламп» [6-11], используемые плоские искусственные мембраны, исследования некоторых крупных клеток с помощью стеклянных микроэлектродов дают информацию о локальных процессах, протекающих на границах внутриклеточная жидкость / мембрана и мембрана / внешняя среда, но не учитывают процессов, протекающих в ткани, как системе клеток и структурированной межклеточной и внутриклеточной жидкости, а также соединительных волокон.

На данный момент отсутствуют работы, в которых описывается электрохимические процессы и процессы переноса на границе реальных биологических тканей.

Высокая эффективность применения в качестве объекта исследования переноса лекарствен-

ных препаратов реального биологического объекта - плацентарной мембраны и воздействия на него физических полей демонстрируется в работах, проведенных под руководством Ю. В. Серянова [12-14].

Целью нашей работы является создание теоретических моделей переноса макромолекул антибиотиков в биологических мембранах под действием постоянного электрического поля и сопоставление теоретических выводов с экспериментальными результатами.

Задачи исследования: выявить закономерности изменения количественных параметров молекулярно - ионного переноса в зависимости от времени, амплитуды воздействия электрического поля; создать теоретические модели, описывающие процессы переноса макроионов в биологических мембранах.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Механизм переноса в мышечных мембранах обусловлен их внутренним физико-химическим и электрохимическим строением.

Строение мышечной ткани подразумевает специфическую адсорбцию ионов из межклеточной жидкости по электростатическому или пространственно-гидрофобному механизму и фиксацию на соответствующих активных центрах. Адсорбируемые ионы образуют плоскость Гельмгольца. Заряд этих ионов компенсируется избытком противоионов в межклеточной жидкости, которые в зависимости от концентрации более или менее диффузно распределены в поверхностном слое электролита. Противоионы отделены от поверхности капилляров, находящихся между мышечными волокнами, внешней плоскостью Гельмгольца, и объемный заряд, располагающийся между этой плоскостью и глубинными слоями раствора, может перемещаться относительно поверхности вместе жидкостью. В результате между внешней плоскостью Гельмгольца и объемом раствора возникает электрокинетический потенциал ζ (рис. 1).

Если к электродам в электрохимической ячейке приложить разность потенциалов, то противоионы диффузного слоя, энергетически слабо связанные с поверхностью стенок капилляров мышечной ткани, будут перемещаться к соответствующему электроду и благодаря молекулярному трению увлекать за собой дисперсионную среду (водный раствор). Вполне естественно предположить, что чем больше потенциал и тол-

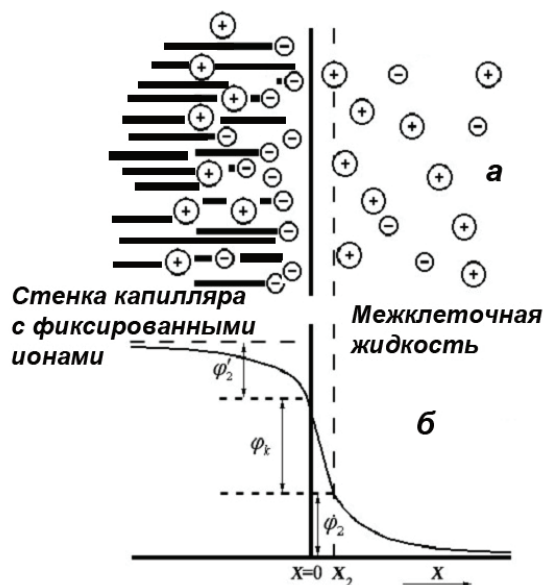


Рис. 1. Двойной электрический слой на границе раздела капилляры мышечной ткани – электролит: а - схематическое изображение распределения ионов; б - изменение электрохимического потенциала [15]

щина диффузного слоя, тем больше переносчиков зарядов, тем быстрее осуществляется перемещение жидкости в биомембране. Скорость течения жидкости и ее направление при постоянной напряженности электрического поля определяются свойствами мембраны и раствора. Диаметры извилистых каналов, образованных между мышечными волокнами, существенно превосходят толщину двойного слоя, поэтому можно применить электроосмотическую модель к переносу макроионов через мышечную биомембрану.

Используя уравнение Гельмгольца-Смолуховского в виде:

$$\zeta = \frac{\eta \chi Q}{\varepsilon \varepsilon_0 J} \quad (1)$$

и связывая электроосмотический перенос вещества с относительной скоростью роста выходной концентрации:

$$Q = \frac{m_0}{M} \cdot \frac{1}{C_0} \cdot \partial \left(\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} \right) / \partial \tau \quad (2)$$

где Q - объемная скорость течения электролита, л/с, m_0 - масса антибиотика, растворенного в 0.9 % NaCl, M - молекулярная масса переносимого вещества, C_0 - предметранная концентрация антибиотика, $C_\lambda(\tau)$ - выходная концентрация антибиотика, получаем модифицированное уравнение Гельмгольца-Смолуховского вида:

$$\zeta = \frac{\eta \cdot \chi \cdot Q}{\varepsilon \varepsilon_0 J} = \frac{\eta \cdot \chi \cdot m_0}{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 J} \cdot \partial \left(\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} \right) / \partial \tau, \quad (3)$$

где ζ - электрокинетический потенциал, В, η - коэффициент вязкости Па·с, χ - удельная электропроводность мембраны Ом⁻¹·м⁻¹, и ε - относительная диэлектрическая проницаемость электролита, J - сила тока, протекающего через биомембрану, А.

Если сила тока отвечает вольтамперным характеристикам мышечной биомембраны с толщиной λ_M в виде приближения Гольдмана [16-18]:

$$J = \frac{(U_{Na^+} + U_{Cl^-}) F V}{\lambda_M} \cdot \frac{C_{Na^+}(0) + C_{Cl^-}(0) - [C_{Na^+}(\lambda) + C_{Cl^-}(\lambda)] \cdot \exp\left(\frac{-FV}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{-FV}{RT}\right)}, \quad (4)$$

то кинетика ионно-молекулярного переноса при $\zeta_0(\tau) = \text{const}$ описывается модифицированным уравнением Гельмгольца – Смолуховского – Гольдмана вида:

$$\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 F V (U_{Na^+} + U_{Cl^-}) \cdot [C_{Na^+}(0) + C_{Cl^-}(0) - [C_{Na^+}(\lambda) + C_{Cl^-}(\lambda)] \cdot \exp\left(\frac{-FV}{RT}\right)] \zeta_0 \tau}{\eta \cdot \chi \cdot m_0 \lambda_M \cdot (1 - \exp\left(\frac{-FV}{RT}\right))}, \quad (5)$$

Здесь U_{Na^+} и U_{Cl^-} - подвижности Na⁺ и Cl⁻, $C_{Na^+}(0)$ и $C_{Cl^-}(0)$ - предметранные концентрации Na⁺ и Cl⁻, $C_{Na^+}(\lambda)$ и $C_{Cl^-}(\lambda)$ - внутримембранные концентрации Na⁺ и Cl⁻, T - абсолютная температура, V - рабочее напряжение на клеммах источника постоянного тока.

Случай малых времен переноса и малых напряжений

При $V \ll RT / F$ линейная вольтамперная характеристика биомембраны описывается уравнением вида:

$$\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 R T (U_{Na^+} + U_{Cl^-}) \cdot [C_{Na^+}(0) + C_{Cl^-}(0) - [C_{Na^+}(\lambda) + C_{Cl^-}(\lambda)] \cdot \left(1 \mp \frac{FV}{RT}\right)] \zeta_0 \tau}{\eta \cdot \chi \cdot m_0 \lambda_M}, \quad (6)$$

где знак «-» соответствует $V > 0$ и знак «+» - $V < 0$.

Случай малых времен переноса и больших анодных напряжений

При $V \gg RT / F$ и $\exp(-FV / RT) \ll 1$ кинетика ионно-молекулярного переноса соответствует линейным зависимостям $C_\lambda / (C_0 - C_\lambda)$ от τ и V вида:

$$\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 F V (U_{Na^+} + U_{Cl^-}) \cdot [C_{Na^+}(0) + C_{Cl^-}(0)] \zeta_0 \tau}{\eta \cdot \chi \cdot m_0 \lambda_M}, \quad (7)$$

Влияние внутримембранных концентраций Na⁺ и Cl⁻ элиминируется.

Случай малых времен переноса и больших катодных напряжений

При $V \ll 0$ и $\exp(-FV / RT) \gg 1$ кинетика ионно-молекулярного переноса соответствует линейному росту $C_\lambda / (C_0 - C_\lambda)$ от τ и V и V вида:

$$\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 F V (U_{Na^+} + U_{Cl^-}) \cdot [C_{Na^+}(\lambda) + C_{Cl^-}(\lambda)] \zeta_0 \tau}{\eta \cdot \chi \cdot m_0 \lambda_M}, \quad (8)$$

Влияние предмембранных концентраций Na^+ и Cl^- элиминируется.

Итак, при малых временах переноса и больших или малых анодных и катодных напряжениях величина $C_\lambda / (C_0 - C_\lambda)$ должна расти пропорционально τ и линейно с V .

Для случая больших времен ионно-молекулярного переноса антибиотиков величина $\partial \left(\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} \right) / \partial \tau$ может быть аппроксимирована выражением модифицированной модели «рыхлого квазикристалла»:

$$\partial \left(\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} \right) / \partial \tau = \frac{\lambda_M^2}{2D_M \tau^2} \cdot \exp \left(\frac{-\lambda_M^2}{2D_M \tau} \right) \cdot \exp \left(\frac{-F\varphi_a}{RT} \right), \quad (9)$$

где D_M – эффективный коэффициент осмотической диффузии в биомембране и φ_a – потенциал электрической асимметрии мембраны.

Для вычисления величины φ_a можно воспользоваться приближением Гольдмана-Ходжкина-Катца с дополнительными допущениями о полном вытеснении Na^+ из мембраны и влиянии потенциалов Доннана:

$$\varphi_0 = -\frac{RT}{F} \ln \frac{C_{K^+}(0) \cdot C_{K^+}(\lambda)}{C_{Cl^-}^2(\lambda)} + \frac{2\Delta H_{Cl^-}^M}{F}, \quad (10)$$

где $C_{K^+}(0)$ и $C_{K^+}(\lambda)$ – предмембранная и мембранная концентрация K^+ , $\Delta H_{Cl^-}^M$ – изменение энтальпии при вытеснении Cl^- из мембраны.

Объединяя уравнения (9) и (10), имеем выражение:

$$\partial \left(\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} \right) / \partial \tau = \frac{\lambda_M^2 \cdot C_{K^+}(0) \cdot C_{K^+}(\lambda)}{2D_M \tau^2 C_{Cl^-}^2(\lambda)} \cdot \exp \left(\frac{-2\Delta H_{Cl^-}^M}{RT} \right) \cdot \exp \left(\frac{-\lambda_M^2}{2D_M \tau} \right), \quad (11)$$

согласно которому величины $\partial \left(\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} \right) / \partial \tau$ и ζ – потенциала являются быстро уменьшающимися с τ , вплоть до нуля, которому соответствует прекращение электроосмоса.

Для времени τ_∞ , которому соответствует некоторое усредненное значение

$\zeta_\infty \ll \varphi_a$, интегрирование выражений (3) и (11) дает модифицированное уравнение Гельмгольца-Смолуховского-Гольдмана-Ходжкина-Катца вида:

$$\frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 (U_{Na^+} + U_{Cl^-}) \cdot FV \cdot \left[C_{Na^+}(0) + C_{Cl^-}(0) - C_{Cl^-}(\lambda) \cdot \exp \left(\frac{-FV}{RT} \right) \right] C_{K^+}(0) \cdot C_{K^+}(\lambda) \cdot \zeta_\infty}{\eta \cdot \chi \cdot m_0 \lambda_M C_{Cl^-}^2(\lambda) \cdot \left(1 - \exp \left(\frac{-FV}{RT} \right) \right)} \cdot \exp \left(\frac{-\lambda_M^2}{2D_M \tau} \right) \cdot \exp \left(\frac{-2\Delta H_{Cl^-}^M}{RT} \right), \quad (12)$$

или в логарифмической форме:

$$\ln \frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} = \ln \left[\frac{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 F V \zeta_\infty (U_{Na^+} + U_{Cl^-}) \cdot \left[C_{Na^+}(0) + C_{Cl^-}(0) - C_{Cl^-}(\lambda) \exp \left(\frac{-FV}{RT} \right) \right] C_{K^+}(0) \cdot C_{K^+}(\lambda)}{\eta \cdot \chi \cdot m_0 \lambda_M C_{Cl^-}^2(\lambda) \cdot \left(1 - \exp \left(\frac{-FV}{RT} \right) \right)} \right] - \frac{2\Delta H_{Cl^-}^M}{RT} - \frac{\lambda_M^2}{2D_M \tau}, \quad (13)$$

Случай больших времен переноса и больших анодных напряжений

При $V \gg (RT/F)$ и $\exp(-FV/RT) \ll 1$ уравнение (13) принимает вид:

$$\ln \frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} = \ln \left[\frac{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 F V \zeta_\infty (U_{Na^+} + U_{Cl^-}) \cdot C_{Na^+}(0) \cdot C_{Cl^-}(0) \cdot C_{K^+}(\lambda)}{\eta \cdot \chi \cdot m_0 \lambda_M C_{Cl^-}^2(0)} \right] - \frac{2\Delta H_{Cl^-}^M}{RT} - \frac{\lambda_M^2}{2D_M \tau}, \quad (14)$$

из которого следует, что зависимости $C_\lambda / (C_0 - C_\lambda) - \tau$ должны выпрямляться в координатах $\ln(C_\lambda / (C_0 - C_\lambda)) - \tau^{-1}$ и при известной толщине λ_j мембраны из угловых коэффициентов, получаемых прямых вычисляется величина D_M . При $\Delta H_{Cl^-}^M > 0$ наблюдается линейная зависимость $\ln(C_\lambda / (C_0 - C_\lambda)) - T^{-1}$, из углового коэффициента которой определяется абсолютная величина $\Delta H_{Cl^-}^M$ и, наконец, теоретическая зависимость $\ln(C_\lambda / (C_0 - C_\lambda)) - \ln V$ также линейна. Влияние внутримембранной концентрации Cl^- элиминируется.

Случай больших времен переноса и больших катодных напряжений

При $V \ll 0$ и $\exp(-FV/RT) \gg 1$ уравнение (13) принимает вид:

$$\ln \frac{C_\lambda}{C_0 - C_\lambda} = \ln \left[\frac{\varepsilon \varepsilon_0 M C_0 F V \zeta_\infty (U_{Na^+} + U_{Cl^-}) \cdot C_{Cl^-}(\lambda) \cdot C_{K^+}(0) \cdot C_{K^+}(\lambda)}{\eta \cdot \chi \cdot m_0 \lambda_M C_{Cl^-}^2(\lambda)} \right] - \frac{2\Delta H_{Cl^-}^M}{RT} - \frac{\lambda_M^2}{2D_M \tau}, \quad (15)$$

Аналогично изложенному выше теоретические зависимости $\ln(C_\lambda / (C_0 - C_\lambda))$ от τ^{-1} , T^{-1} (при $\Delta H_{Cl^-}^M > 0$) и $\ln V$ представляют собой прямые линии. Влияние предмембранных концентраций ионов Na^+ и Cl^- элиминировано. Величины ζ_∞ представляет собой константу теории, подлежащую экспериментальному определению.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для оценки влияния физических полей на транспорт антибиотиков нами была разработана методика с применением мышечных мембран *in vitro*, имитирующих биологические защитные барьеры тканей организма. Такая методика позволяет оценивать не только форетические свойства полей по отношению к антибиотикам, но и общую эффективность стимуляции обменных процессов.

В качестве имитации мышечного барьера применялись продольные срезы поперечно-полосатых скелетных мышц коровы. Исследовались образцы биомембран со средней толщиной 2 мм, определенной лазерным интерферометром, и площадью соприкосновения 12 см². Большая толщина и площадь соприкосновения мышечных мембран с раствором позволяет усреднять ее свойства по толщине, что дает возможность получать максимальную воспроизводимость экспериментальных данных. Следует отметить сохранение некоторых важных биоэлектрохимических характеристик, характерных для объектов *in vivo* [19], например, концентрационных потенциалов (потенциалов покоя).

Выбор антибиотиков (левомицитина, бензилпенициллина и оксациллина) связан с их минимальным разрушающим действием на иммунную систему по сравнению с современными синтетическими антибиотиками. Перечисленные антибиотики также хорошо устойчивы в водных растворах, их заметный гидролиз начинается только через несколько суток, что позволяет готовить большие объемы растворов. Максимумы спектральных характеристик лежат в пределах от 190 до 315 нм, что очень удобно при использовании спектрофотометрического количественного анализа, при этом влияние компонентов клеток, разрушаемых в процессе получения мембран, отсутствует.

Моделирование процессов транспорта антибиотиков через биомембраны, а также использование дополнительной аппаратуры (термостаты, излучатели физических полей, потенциостаты) потребовало создания ряда электрохимических ячеек оригинальной конструкции. За время нашей работы экспериментальные ячейки претерпели ряд существенных изменений [20] в сторону повышения производительности и получения наибольшего числа параллельных опытов, повышающих достоверность результатов. Экспериментальная установка позволяет получить до 30 кинетических кривых за день работы, так как для такой сложной биохимической системы требуется большое количество параллельных экспериментов.

Кинетические зависимости строились по трем (реже пяти) параллельным измерениям. Несмотря на хорошую воспроизводимость кинетических кривых для разных мембран, для проведения исследований влияния физических полей старались использовать одну мембрану, что являлось необ-

ходимым условием для получения количественных оценок.

Полученные биологические мембраны закрепляли с помощью специальных рамок в плексигласовых электрохимических ячейках различных видов, позволяющих реализовать исследование трансмембранного ионно-молекулярного переноса антибиотиков в постоянном электрическом поле.

Мембраны в ячейках (рис.2) разделяют объем раствора на две части, с одной стороны перегородки находится раствор 0.9% NaCl, с другой – раствор 0.9% NaCl с 0.2% антибиотиков левомицитина, бензилпенициллина или оксациллина.

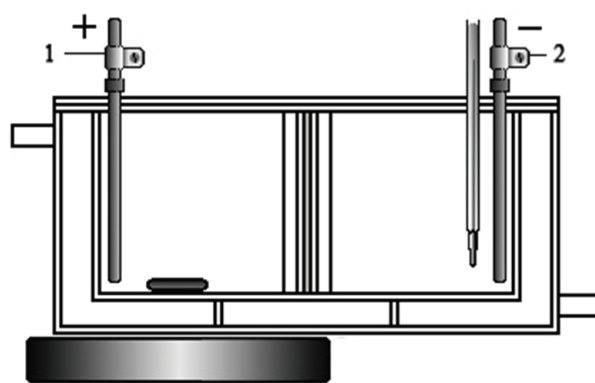


Рис. 2. Ячейка для исследования вольтамперных характеристик мышечных мембран в модельном физиологическом растворе, в присутствии 0.2 % антибиотика

Изменение концентраций растворов определялось методом спектрофотометрического анализа, который позволяет в реальном времени отслеживать изменение концентраций растворов. Проверка правильности разработанной экспресс-методики проверялась вольтамперометрическим методом с применением ионоселективных электродов.

Современные однолучевые биохимические спектрофотометры обладают высокой чувствительностью и устойчивостью сигнала с постоянным контролем системы и галогеновой лампы по эталону, а также возможностью прямой передачи записи на компьютер. Оптические плотности растворов измерялись с помощью спектрофотометра Genesys 2 (Gamry Instrument, USA).

Все исследования проводились при температуре растворов 36.6⁰С, которая поддерживалась с помощью термостата TWL-5.

В качестве источника напряжения использовались приборы Б5-47 и Щ 300, вольтамперные характеристики были получены с помощью комплексного потенциометра G750 (Gamry Instrument, USA). Методика и техника эксперимента очень подробно рассмотрена в нашей работе [20].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вольтамперные характеристики мышечных мембран имеют выпукло-вогнутый вид (рис.3) и отвечают приближению Гольдмана (4), дающему резкий рост тока при наложении как катодного, так и анодного электрических напряжений.

Накопление ионов K^+ в А-дисках миофибрилл, т.е. влияние потенциалопределяющего иона K^+ , позволяет для описания потенциала асимметрии мышечной биомембраны применить приближение Гольдмана-Ходжкина-Катца с дополнительными допущениями о полном вытеснении катионов Na^+ из мышечной ткани и влиянии потенциалов Доннана.

Используя выражение (10) для характерных для мышечных тканей концентрациях ионов $C_{K^+}(\lambda)=0.066$ М $C_{K^+}(0)=0.001$ М, определенных методом пламенной фотометрии, и для $\Delta H_{CF}^M=0.72$ кДж/моль и $T=310$ К имеем величину потенциала асимметрии $\varphi_a=94.4$ мВ, отвечающую экспериментальным значениям.

На кинетических кривых (рис.4 а) при наложении как анодных, так и катодных напряжений наблюдается изменение хода кривых. При $\tau \leq 15$ мин перенос антибиотиков идет с наибольшей скоростью по линейному закону. При

$\tau \geq 15$ мин перенос антибиотиков идет по параболическому закону. Закон движения фронта электромиграционной диффузии на начальных стадиях переноса отличается от параболического, он близок к линейному.

При малых временах τ (до 15 мин) перенос анионов антибиотиков через мышечные мембраны по механизму электроосмоса величины относительных выходных концентраций $C_\lambda/(C_0 - C_\lambda)$ растут пропорционально электрическому напряжению V и времени аппликации τ , что подтверждается экспериментом *in vitro* (рис. 4, а) и согласуется с уравнениями (7) и (8).

При больших временах $\tau \geq 15$ мин, для которого $\zeta = \zeta_\infty = \text{const}$, кинетика переноса антибиотиков через мышечные мембраны хорошо опи-

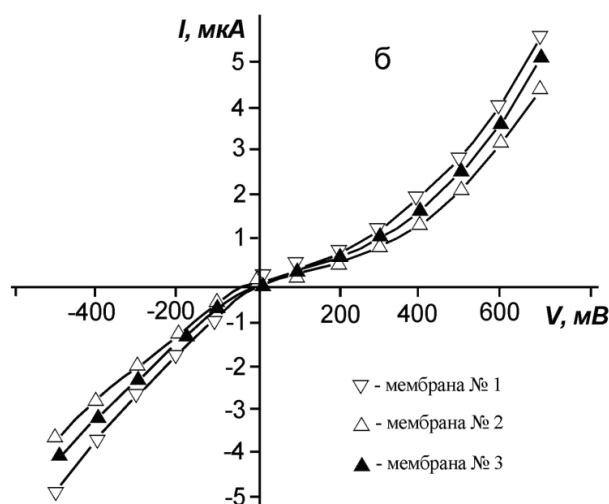


Рис.3. Вольтамперные характеристики мышечных мембран в 0.9 % NaCl

сывается электроосмотическим уравнением (13), в котором приняты дополнительные допущения о влиянии потенциалов Доннана при $C_{Na^+}(\lambda)=0$ и удерживании ионов K^+ в барьере за счет существования связывающих центров на молекулах миозина мышц.

В случае больших анодных ($V \gg RT/F$) и катодных ($V \ll 0$) напряжений получаем линейную зависимость $\ln[C_\lambda/(C_0 - C_\lambda)] \cdot \tau^{-1}$ и $\ln V$, что подтверждается экспериментом (рис. 4, б) и согласуется с уравнениями (14 и 15) соответственно.

Итак, при больших временах переноса анионов антибиотиков через мышечные биомембраны по механизму электроосмоса логарифмы величин относительных концентраций $C_\lambda/(C_0 - C_\lambda)$ возрастают пропорционально логарифму приложенного напряжения $\ln V$ и линейно уменьшаются с обратным временем аппликации τ^{-1} , что хорошо подтверждается экспериментом *in vitro*.

Эффективные коэффициенты диффузии анионов антибиотиков D в биомембранах модели «рыхлого квазикристалла» при больших временах определяются из угловых коэффициентов получаемых прямых:

$$D = -\frac{\lambda^2}{2} \left[\partial \ln(C_\lambda / (C_0 - C_\lambda)) / \partial \tau^{-1} \right]^{-1}, \quad (16)$$

их расчетные значения составляют $(6.4 - 27.5) \cdot 10^{-6}$ см²/с. В таблице 1 представлены параметры переноса анионов левомицитина в срезах мышечных тканей при разной температуре [21].

Величины φ_a определяется выражением:

$$\varphi_a = -\frac{RT}{F} \ln[C_\lambda \cdot (C_0 - C_\lambda)^{-1}]_{\tau=\infty}, \quad (17)$$

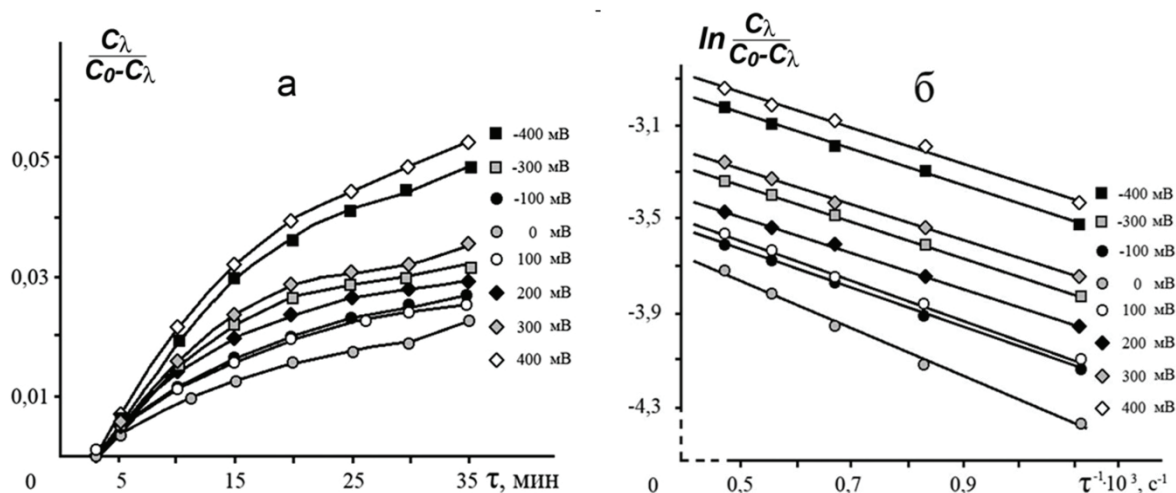


Рис. 4. Кинетика проницаемости мышечных мембран по анионам левомицетина (а) и бензилпенициллина (б) в постоянном электрическом поле в координатах $C_\lambda / (C_0 - C_\lambda)$ - τ и $\ln(C_\lambda / (C_0 - C_\lambda))$ - τ^{-1}

их расчетные значения составляют $\varphi_a = 89-110$ мВ.

Коэффициенты электроосмотического ускорения переноса антибиотиков в мышечных биомембранах K_y линейно нарастают с модулем приложенного электрического напряжения и удовлетворительно описываются эмпирическим соотношением (рис.5):

$$\ln K_y = 1 + a \cdot \text{mod} V \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta \varphi_{ac}}{RT}}, \quad (18)$$

где константа $a = 5 \text{ В}^{-1}$ и $\Delta \varphi_{ac}$ – сдвиг собственного потенциала асимметрии мышечной мембраны под влиянием внешнего электрического поля, равный $\Delta \varphi_{ac} = \varphi_a - \varphi_{ac}$.

В случае водорастворимых антибиотиков при использовании постоянного электрического тока полярность электродов-аппликаторов не имеет решающего значения.

Полученные величины коэффициентов электроускорения переноса антибиотиков в мышечных биомембранах *in vitro* $K_y = 1.9-5$ имеют большое фармакокинетическое значение для лекарственной гальвано-ионотерапии *in vivo*.

Значение эмпирической константы a уменьшается до $a = 1,6 \text{ В}^{-1}$ - для аниона бензилпенициллина и до $a = 1,2 \text{ В}^{-1}$ - для аниона оксациллина величины.

Таблица 1.

Параметры переноса анионов левомицетина в срезах мышечных тканей при разной температуре

Параметр	Температура, °С			
	31	35	40	42
$\varphi_a, \text{ мВ}$	- 94.8	- 89.5	-98.8	- 101.5
$D \cdot 10^6, \text{ см}^2/\text{с}$	12.1	9.01	6.55	6.25

В нашей работе [22] рассматриваются результаты квантово-химического моделирования влияния химического строения анионов антибиотиков на их перенос в биологических мембранах. Константируется, что наименьшими размерами и высокой гидрофильностью обладает анион левомицетина, анион бензилпенициллина обладает выгодной для диффузии полусферической формой. Напротив, анион оксациллина имеет наибольшие размеры, высокую гидрофобность и почти плоское строение, что затрудняет его диффузию в биомембранах.

Полученные результаты могут быть интерпретированы следствием влияния области пространственного заряда, возникающей при электродиффузионном инжектировании анионов антибиотиков в межфибриллярные каналы.

При $V < 0$ величины D слабо изменяются с V , а при $V > 0$ значения D нарастают с V по эмпири-

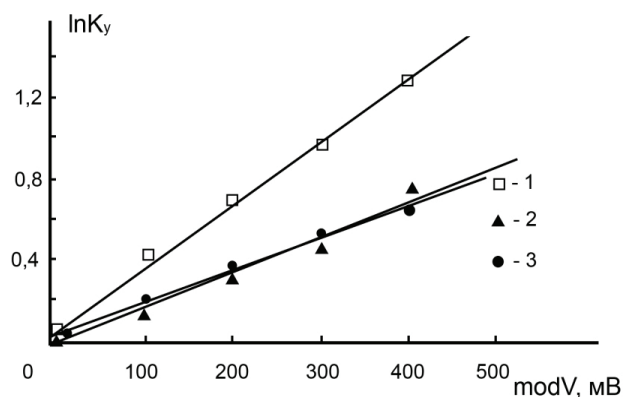


Рис. 5. Зависимости $\ln K_y$ – $\text{mod} V$ проницаемости мышечных мембран в постоянном электрическом поле для анионов: 1 - левомицетин, 2 - оксациллин, 3 – бензилпенициллин

ческой зависимости: $D \approx D_0 \exp \sqrt{bV}$, (где $D_0 = 8.2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ и константа $b = 2.8 \text{ В}^{-1}$), а отрицательный заряд ОПЗ – способствует симметричному уменьшению изменения энтальпии ионообмена при втягивании K^+ в барьер и вытеснении Cl^- из барьера, что сопровождается почти симметричными зависимостями $\ln K_y$ от $\text{mod} V$ и $\Delta\varphi_{\text{ae}}$ от V (рис. 5 и 6).

Из углового коэффициента линейной зависимости $\ln(C_\lambda/(C_0 - C_\lambda)) - T^{-1}$ определены величины $\Delta H_{\text{Cl}^-}^M$, представленные в таблице 2.

Перенос в мышечных мембранах обусловлен миграцией через заряженные межфибрилярные каналы с отрицательной энергией активации диффузии, объясняемой изменением структуры мышечных волокон и затратами тепловой энергии на вытеснение Cl^- из стенок каналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложенная нами модель стимулированной электромиграционной диффузии и осмотической миграции анионов антибиотиков через мышечные барьеры *in vitro*, основанная на интерпретации классических уравнений Гельмгольца-Смолуховского, Гольдмана и Голь-

дмана-Ходжкина-Катца, с учетом потенциалов Доннана при больших временах переноса подтверждается исследованиями, проведенными *in vitro*.

Перенос в мышечных барьерах обусловлен миграцией через заряженные межфибрилярные каналы посредством замещения дефектов Френкеля в хлоридной анионной подрешетке «рыхлого квазикристалла» при сосредоточении калиевой катионной подрешетки на внутриканальных «толстых» нитях миозина, образующих двойной электрический слой, что сопровождается аномальным снижением скорости диффузии с ростом температуры, объясняемой изменением структуры мышечных волокон и затратами тепловой энергии на вытеснение Cl^- из стенок каналов, при коэффициентах диффузии $D = (6,4-27,5) \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ и потенциалах асимметрии $\varphi_a = 89-110 \text{ мВ}$;

Показано, что вольт-амперные характеристики биологических мышечных барьеров в изотоническом электролите (NaCl), содержащем 0.2 масс. % левомицетина, бензилпенициллина и оксациллина отвечают приближению Гольдмана при коэффициентах электроускорения ($K_y = 1.9 - 5$) миграции анионов антибиотиков линейно нарастающих с модулем приложенного электрического напряжения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Улащик В. С. Физические факторы как модуляторы действия лекарственных средств / В.С. Улащик // Наука и инновации. — 2008. — №1. — С. 59.
2. Улащик В. С. О влиянии гальванизации на фармакинетику и фармадинамику лекарств (к проблеме «внутриканального» электрофореза) / В.С. Улащик // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. — 1991. — №1. — С. 1-6.
3. Улащик В. С. Внутриканальный лекарственный электрофорез: обоснование, особенности и опыт клинического применения / В.С. Улащик // Здравоохранение. — 1996. — № 7. — С. 54-56.
4. Антонов В. Ф. Биофизика мембран / В. Ф. Антонов // Сорос. образ. жур. — 1996. — №6. — С. 4-12.
5. Чизмаджев Ю. А. Мембранная биология: от липидных бислоев до молекулярных машин / Ю. А. Чизмаджев // Сорос. образ. жур. — 2000. — Т. 6. — С. 12-17.
6. Катц Б. Нерв, мышца и синапс / Б. Катц; пер. с англ. Ю.И.Лашкевича; под ред. В.С. Гурфинкеля. М.: Мир, 1968. 220 с.
7. Биологические мембраны. Двенадцать очер-

Таблица 2.

Величины $\Delta H_{\text{Cl}^-}^M$ термостимулированного переноса анионов антибиотиков через мышечную биомембрану *in vitro* ($t^0 = 37^\circ\text{C}$)

Антибиотик	$\Delta H_{\text{Cl}^-}^M$, кДж/моль,
Левомецетин	8.43
Бензилпенициллин	9.07
Оксациллин	10.49

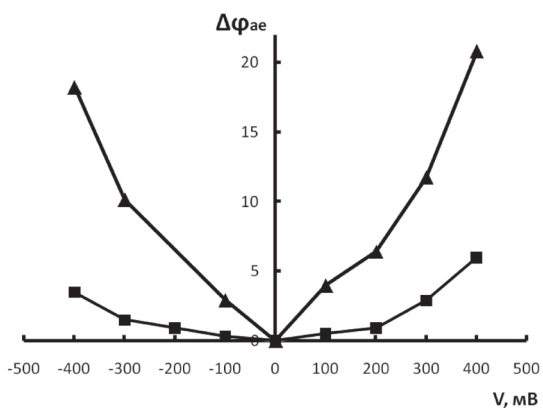


Рис. 6. Зависимости $\Delta\varphi_{\text{ae}}$ - V проницаемости мышечных мембран в постоянном электрическом поле для анионов: ■ - левомицетин ▲ - бензилпенициллин

ков о структуре, свойствах и функциях мембран / под ред. Д. Парсона. — М.: Атомиздат, 1978. — 400 с.

8. Монахов Н.К. Применение стеклянных электродов для изучения распределения ионов K^+ и Na^+ между митохондриями различных типов и средой / Н.К. Монахов, А.А. Лев, Э.П. Бужинский // Молекулярная биология. — 1967. — Т. 1. — С. 264-270.

9. Белюстин А.А. Применение стеклянных электродов с натриевой и калиевой функцией в биологии медицины и почвоведении / А.А. Белюстин, А.А. Лев // Химия в естественных науках: сб. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1965. — С. 32 – 39.

10. Регистрация одиночных каналов / под ред. Б. Сакмана, Э. Неера. — М.: Мир, 1987. — 448 с.

11. Hamill O. P. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher // Pflügers Archiv European Journal of Physiology. — 1981. — № 391 (2): — P. 85 - 100.

12. Райгородский Ю.М. Форетические свойства физических полей и приборы для оптимальной физиотерапии в урологии, стоматологии и офтальмологии / Ю.М. Райгородский, Ю.В. Серянов, А.В. Лепилин. — Саратов: Изд-во Саратовского университета, — 2000. — С. 11-103.

13. Иваненко А.В. Магнитостимулированный трансмембранный перенос нейротрофика милдроната // А. В. Иваненко, Т. Г. Каменских, Ю. В. Серянов // Изв. вузов. Сер. Химия и химическая технология. — 2007. — Т. 50. — №. 8. — С. 111 - 114.

14. Каменских Т. Г. Исследование транспорта лекарственных препаратов, используемых в лечении частичной атрофии зрительного нерва, под

влиянием физиовоздействий / Т. Г. Каменских, Е. А. Егоров, Ю. В. Серянов // Клиническая офтальмология. — 2007. — Т. 8. — № 2. — С. 45 - 47.

15. Корыта И. Электрохимия / И. Корыта, И. Дворжак, В. Богачкова — М.: Мир, 1977. — 472 с.

16. Фидлей Дж. С. Биологические мембраны / Дж. С. Фидлей, В. Х. Эванс. — М.: Мир, 1990. — 560 с.

17. Николаев Н. И. Диффузия в мембранах / Н. И. Николаев. — М.: Химия, 1980. — 232 с.

18. Маркин В. С. Индуцированный ионный транспорт / В. С. Маркин, Ю. А. Чизманджев. — М.: Химия, 1974. — 251 с.

19. Elliott G.F. Donnan and osmotic effects in muscle fibres without membranes / G.F. Elliott // J. Mechanochem. Cell Motil. — 1973. — №2. — P. 83-89.

20. Варакин А. И. Методы моделирования в биофизической фармакокинетике / А. И. Варакин, В., Ю. В. Серянов, Н. В. Архипова // Медицинская техника. — 2007. № 3. — С. 8-13.

21. Варакин А.И. Исследование проницаемости срезов мышечных тканей по отношению к анионам оксациллина бензилпенициллина и левомицетина при различной температуре / А. И. Варакин, В., В.Н. Лясников // Изв. Вузов. Химия и химическая технология — 2003. Т.46. — вып.8. — С. 130-134.

22. Варакин А.И., Серянов Ю.В., Архипова Н.В. Квантово-химическое моделирование молекули анионов антибиотиков и характер их переноса в биологических мембранах / А.И. Варакин, Ю.В. Серянов, Н.В. Архипова // Башкирский химический журнал. — 2011. — Т.18. — № 3. — С. 65-72.

Варакин Антон Игоревич — к.х.н., докторант, кафедры химии Саратовского государственного технического университета; e-mail: tehinf@renet.ru.

Varakin Anton I. — PhD (Chemistry), department of chemistry, Saratov State Technical University; e-mail: tehinf@renet.ru.

Серянов Юрий Владимирович — д.х.н., профессор кафедры химии Саратовского государственного технического университета

Serjanov Jyuri V. — PhD (Chemistry), Full professor of chemistry department, Saratov State Technical University

Архипова Наталия Викторовна — д.х.н., профессор кафедры химии Саратовского государственного технического университета; e-mail: tehinf@renet.ru.

Arhipova Nataliya V. — PhD (Chemistry), Full professor of chemistry department, Saratov State Technical University; e-mail: tehinf@renet.ru.