

**К.И. Киенская**

канд. хим. наук, доцент, и. о. зав. кафедры технологии химико-фармацевтических и косметических средств РХТУ им. Д.И. Менделеева

**Е.В. Ильюшенко**

канд. хим. наук, ассистент технологии химико-фармацевтических и косметических средств РХТУ им. Д.И. Менделеева

**И.А. Белова**

канд. хим. наук, доцент кафедры коллоидной химии РХТУ им. Д.И. Менделеева

**М.В. Сардушкин**

канд. тех. наук, ассистент кафедры технологии химико-фармацевтических и косметических средств РХТУ им. Д.И. Менделеева

**Н.Ю. Гузнова**

врач-инфекционист, ООО «Поликлиника «Вирмед» (г. Тула)

**В.Д. Пискунова**

магистр, обучающийся на факультете естественных наук в РХТУ им. Д.И. Менделеева

**А.П. Дремук**

аспирант, обучающийся на кафедре технологии химико-фармацевтических и косметических средств РХТУ им. Д.И. Менделеева

**Р.Р. Ибрагимова**

аспирант, обучающийся на кафедре коллоидной химии РХТУ им. Д.И. Менделеева

**А.В. Кухаренко**

канд. хим. наук, доцент кафедры технологии химико-фармацевтических и косметических средств РХТУ им. Д.И. Менделеева

**K.I. Kienskaya**

Candidate of Chemical Sciences, Head of Department of Technology of Chemico-Pharmaceutical and Cosmetic Substances, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

**E.V. Ilyushenko**

Candidate of Chemical Sciences, Assistant, the Department of Technology of Chemico-Pharmaceutical and Cosmetic Substances, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

**I.A. Belova**

Candidate of Chemical Sciences, Assistan Professort, the Department of Colloid Chemistry, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

**M.V. Sardushkin**

Candidate of Technical Sciences, Assistant, the Department of Technology of Chemico-Pharmaceutical and Cosmetic Substances, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

**N.Yu. Guznova**

Infectionist, Polyclinic VIRMED (Tula)

**V.D. Piskunova**

Master-course student, the Faculty of Natural Sciences, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

**A.P. Dremuk**

Post-graduate student, the Department of Technology of Chemico-Pharmaceutical and Cosmetic Substances, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

**R.R. Ibragimova**

Post-graduate student, the Department of Colloid Chemistry, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

**A.V. Kukhareenko**

Candidate of Chemical Sciences, Assistant Professor, the Department of Technology of Chemico-Pharmaceutical and Cosmetic Substances, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

## СИНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В СМЕШАННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ РИБАВИРИН-ИНТЕРФЕРОН

### SYNERGY IN MIXED RIBAVIRIN-INTERFERON AQUEOS SOLUTIONS

**КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

**Киенская Карина Игоревна**, канд. хим. наук, доцент, и.о. зав. кафедрой технологии химико-фармацевтических и косметических средств РХТУ им. Д.И. Менделеева  
Адрес: 125 480, РФ, Москва, ул. Героев-Панфиловцев, д. 20  
Тел.: +7 903-116-60-17; e-mail: sonoio@mail.ru

**Статья поступила:** 06.06.2017

**Статья принята:** 29.09.2017

**Аннотация**

Скорректирована методика спектрофотометрического определения рибавирина в водных растворах. Показана возможность спектрофотометрического определения рибавирина в присутствии белка. Иссле-

**CONTACT INFORMATION**

**Karina Kienskaya**, Candidate of Chemical Sciences, Head of Department of Technology of Chemico-Pharmaceutical and Cosmetic Substances, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

Address: 125 480, Moscow, Geroyev Panfilovtsev, 20

Tel.: +7 903-116-60-17; e-mail: sonoio@mail.ru

**Article submitted:** 06.06.2017

**Article approved:** 29.09.2017

**Abstract**

Spectrophotometric method of ribavirin determination in aqueous solutions was improved. Feasibility of ribavirin determination in the presence of protein was confirmed. Colloid-chemistry behavior of ribavirin, interferon and their

довано коллоидно-химическое поведение рибавирина и интерферона альфа-2b, а также их смесей в водных средах. Показано, что данные вещества являются поверхностно-активными. Выявлено явления синергизма между интерфероном и рибавирином в водной среде. Установлены особенности адсорбции из водной фазы рибавирина и интерферона альфа-2b, определены параметры адсорбционных слоев рибавирина. Обнаружено влияние рибавирина на величину изоэлектрической точки интерферона и параметры ассоциации макромолекул интерферона.

**Ключевые слова:** УФ-спектроскопия, рибавирин, интерферон, межмолекулярные комплексы, адсорбционные взаимодействия.

mixture were investigated. We found that these substances are surface active. The synergistic effect was revealed in ribavirin-interferon mixture in aqueous phase. Particular aspects of ribavirin and interferon adsorption from aqueous phase were specified and characteristics of adsorption layers were determined. We found the influence of ribavirin on isoelectric point and association parameters of interferon macromolecules.

**Keywords:** UV spectroscopy, ribavirin, interferon, intermolecular complexes, adsorption interactions.

## ВВЕДЕНИЕ

Исследование смесей белок–поверхностно-активное вещество (ПАВ) позволяет прогнозировать механизм протекания некоторых биохимических процессов [1], разрабатывать новые препараты медицинского и косметического назначения, является полезным для пищевой промышленности. В основном при выборе объектов для данных работ авторы базируются на модельных системах, когда, в частности, в качестве белка выступают альбумин или лизоцим, а в роли ПАВ — известные соединения — додецилсульфат натрия, твин и ряд других [2, 3].

В данной работе объектом исследования является пара интерферон–рибавирин, реально используемая при противовирусной терапии ряда заболеваний, например, гепатита С [4–6], вирус которого был обнаружен в конце XX в. и до конца не изучен до сих пор. Несмотря на достигнутые успехи противовирусной терапии при совместном использовании интерферонов и рибавирина, механизм их противовирусного действия однозначно не установлен [7, 8]. Подход к данной проблеме с позиций физической и коллоидной химии позволил бы глубже разобраться в протекающих взаимодействиях между рибавирином и интерфероном, количественно оценить параметры их взаимодействия на молекулярном уровне.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

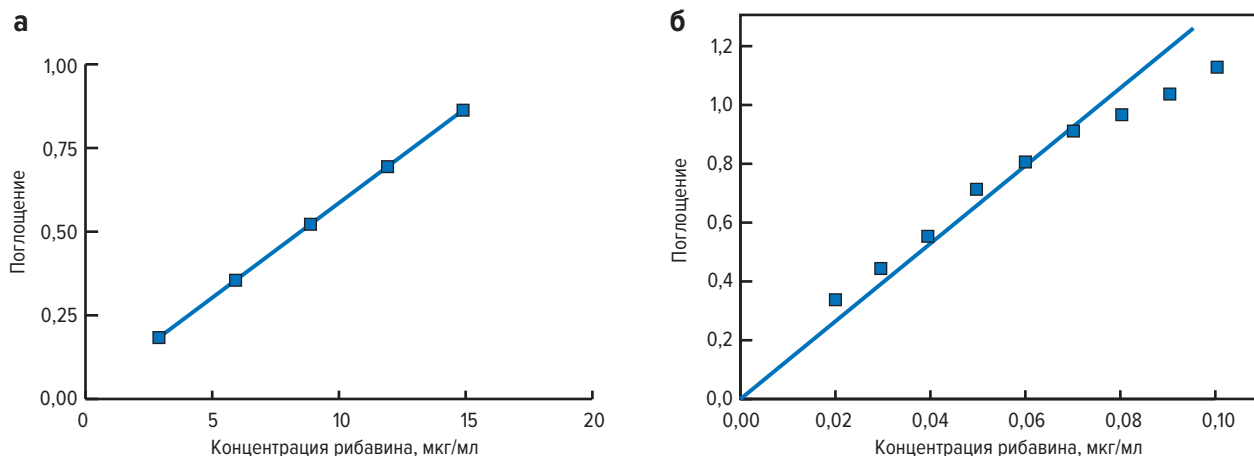
В качестве интерферона был использован интерферон альфа-2b (растворы в ацетатном буфере с концентрацией 1,8–2,0 мг/мл), являющийся основой отечественного препарата «Альгерон» (200 мкг, регистрационный номер № ЛП-002017, срок годности до 2022 г.), был предоставлен ком-

панией «Биокад» (Санкт-Петербург). Рибавирин (1-β-D — рибофуранозил-1,2,4 — триазол-3-карбоксамид) с содержанием основного вещества не менее 98 % (CAS [36791-04-5]), был заказан по каталогу Sigma (R 9644 — 50 mg).

Спектральные исследования проводили на спектрофотометрах Shimadzu IRAffinity-1 (Япония). Для изучения взаимодействий между молекулами рибавирина и интерферона в смешанных растворах были выбраны методы тензиометрии (тензиометр DSA 20E KRUSS (Германия), метод висячей капли) и кондуктометрии (кондуктометр Suntex SC-170, Тайвань). Выбор данных методов обусловлен тем, что их совокупность позволяет выявлять наличие межмолекулярных взаимодействий в растворах, а также оценивать поведение индивидуальных соединений и их смесей на различных границах раздела фаз. В свою очередь, знание поведения белковых молекул в средах различной полярности дает возможность моделировать ряд биологических и биохимических процессов, протекающих в живых организмах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее простым и информативным способом контроля концентрации органических соединений является спектроскопия в ультрафиолетовой (УФ) области. Наличие в молекуле рибавирина триазольного кольца позволяло предполагать наличие максимума поглощения в УФ-области спектра, что и было подтверждено авторами в работе [9]. Однако этот спектр воспроизвести не удалось, так же как и найти аналогичный спектр в других источниках. Видимо, поэтому многочисленные исследования предоставляют косвенные способы контроля концентрации рибавирина в водной фазе [10–12].



**РИС. 1.** Калибровочный график по данным работы [10] при 610 нм (а); калибровочный график при длине волны 610 нм, полученный авторами настоящей работы (б)

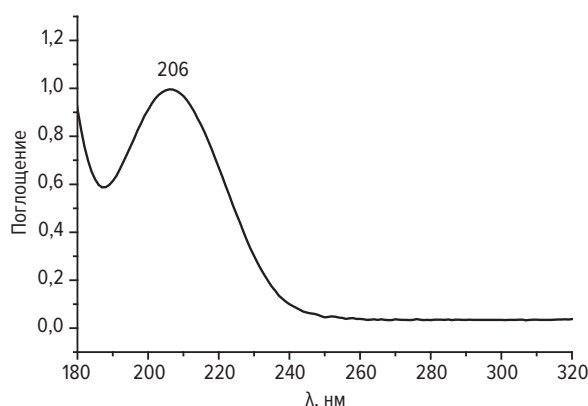
Воспроизведение методики, описанной в работе [10], основанной на окислении рибавирина перманганатом калия, показало, что область соблюдения закона Бугера—Ламберта—Беера лежит в несколько другой области концентраций, чем установили авторы этой работы (рис. 1).

Существенным недостатком этой и большинства других описанных методик, базирующихся на окислительно-восстановительных реакциях, является невозможность определения рибавирина в присутствии белка, в частности, интерферона, поскольку он также вступает во взаимодействие с любым окислителем.

Дальнейшие исследования водных растворов рибавирина показали возможность записи спектра с четким максимумом поглощения в УФ-области (рис. 2). Максимум поглощения рибавирина соответствует 206 нм, а не 280 нм, как указано в работе [9]. Необходимо отметить, что полученный результат косвенно подтверждается авторами работ [13, 14], в которых приведены спектры производных триазолов и аналогов рибавирина. Наличие максимума поглощения в области 206 нм дает возможность контроля концентрации рибавирина в присутствии белков, поскольку большинство из них содержит ароматические кольца, поглощающие в более далекой области — 280 нм.

Помимо спектральных методов исследования межмолекулярных взаимодействий, достаточно информативным методом является тензиометрия, позволяющая оценивать поведение поверхностно-активных соединений как на границе раздела раствор—воздух, так и на границе жидкость—жидкость.

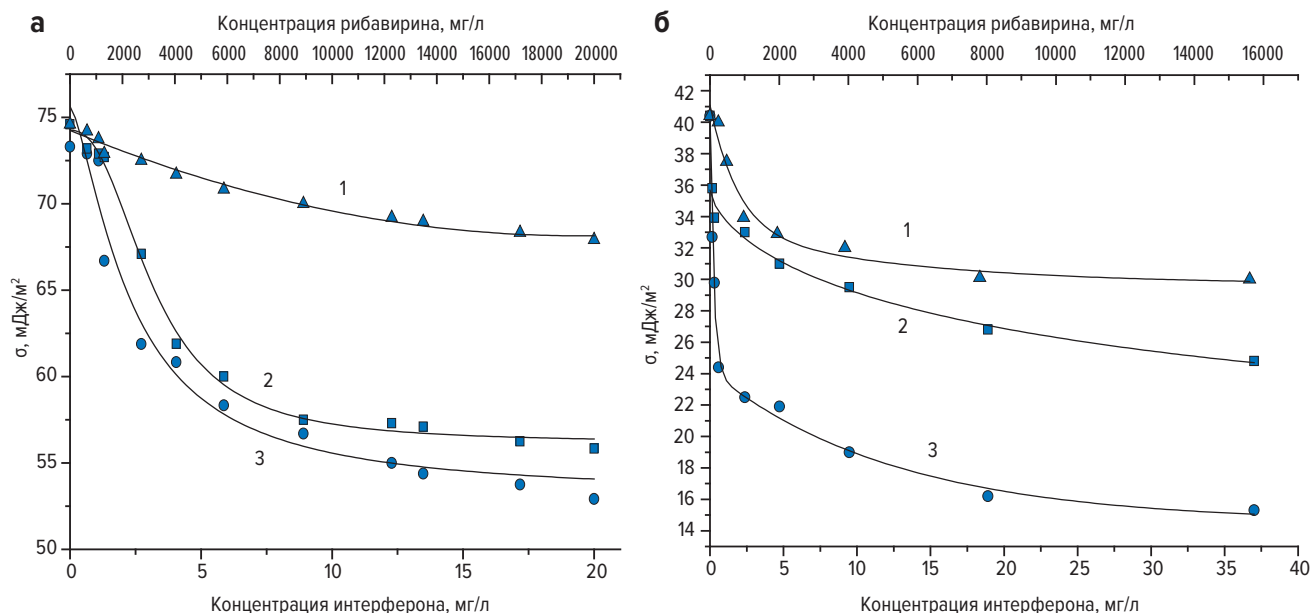
На рис. 3 представлены изотермы поверхностного натяжения и межфазного натяжения (на границе с деканом) водных растворов интерферона, рибавирина, а также их смеси. Снижение поверхностного и межфазного натяжения с ростом концентрации свидетельствует о проявлении поверхностно-актив-



**РИС. 2.** УФ-спектр рибавирина, полученный авторами настоящей работы

ных свойств, как у индивидуальных соединений, так и их смеси, что обусловлено строением молекул рибавирина и интерферона. В каждой из них имеется полярная и неполярная часть, что позволяет отнести их к классу поверхностно-активных.

Обработка изотерм поверхностного натяжения в рамках уравнения Шишковского позволила оценить некоторые количественные характеристики адсорбционных слоев (табл. 1). Обладая более выраженной поверхностной активностью, чем рибавирин, молекула интерферона лучше адсорбируется на межфазной поверхности, т. е. значительно сильнее снижает поверхностное натяжение водных растворов. Отсутствие надежных данных о молекулярной массе используемого в данном исследовании образца интерферона не позволяет рассчитать параметры его адсорбционного слоя. Довольно большая величина посадочной площадки молекулы рибавирина обусловлена, по-видимому, стерическими затруднениями на поверхности, как на границе раствор—воздух, так и на границе жидкость—жидкость.



**РИС. 3.** Изотермы поверхностного натяжения рибавирина (1), интерферона (2) и смеси интерферона и рибавирина (3) (а); изотермы межфазного натяжения рибавирина (1), интерферона (2) и смеси интерферона и рибавирина (3) на границе вода—декан (б)

**Таблица 1**

**Параметры адсорбционных слоев рибавирина на различных границах раздела фаз**

| Вещество                         | Поверхностная активность<br>г, мДж × м/моль | Предельная адсорбция<br>Гтах; мкмоль/м <sup>2</sup> | Посадочная площадка<br>So, нм <sup>2</sup> | Толщина адсорбционного слоя б, нм |
|----------------------------------|---|---|--|-----------------------------------|
| на границе водный раствор—воздух |   |   |  |                                   |
| Рибавирин                        | 2,25  | 1,38  | 1,20                                       | 0,16                              |
| на границе вода—декан            |   |   |  |                                   |
| Рибавирин                        | 2,50  | 1,52  | 1,15                                       | 0,15                              |

Интересно отметить, что параметры адсорбционных слоев рибавирина практически постоянны на разных границах раздела фаз.

Тензиометрическое исследование смешанных водных растворов интерферона и рибавирина показало, что при концентрации рибавирина в смеси 15,6 г/л возможно проявление синергетического эффекта (кривые 3 рис. 4). Кривая расположена существенно ниже изотерм индивидуальных растворов. Дальнейшее увеличение содержания рибавирина в смеси не приводит к более заметному падению поверхностного и межфазного натяжения, поэтому для дальнейших исследований была использована эта концентрация. Выявление синергетического эффекта в данной смеси подтверждает немногочисленные исследования [15–17], в частности, результаты авторов работы [16], в которой на основании изоболографического анализа было доказано усиление совместного ингибирующего воздействия интерферона и рибавирина на вирус гепатита С.

В данной работе для предварительной оценки межмолекулярных взаимодействий рибавирина—интерферон выбрана наиболее простая и доступная теория, представленная термодинамическими подходами Рубина и Розена [18, 19]. Данные подходы успешно используются для выявления синергетических и антагонистических эффектов в смесях ПАВ, однако в настоящей работе в качестве второго ПАВ выступает молекула поверхностно-активного интерферона.

В основе данного подхода лежит применение теории регулярных растворов к смешанным мицеллам и расчет параметра взаимодействия  $\beta^m$ . В данном случае предполагается, что синергетические взаимодействия приводят к образованию межмолекулярного комплекса рибавирина—интерферон. Отрицательные значения этого параметра свидетельствуют о сильном межмолекулярном взаимодействии, т. е. о наличии синергетического эффекта в рассматриваемых парах соединений.

В основе расчета лежит уравнение, связывающее величины критических концентраций мицеллообразования (ККМ) индивидуальных компонентов и ККМ смеси.

$$\frac{x_1^2 \ln(\alpha_1 C_{12} / C_1 x_1)}{(1-x_1)^2 \ln(\alpha_2 C_1) / C_2 (1-x_1)} = 1, \quad (1)$$

где:  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  — мольные доли компонентов в смеси;  $x_1$  и  $x_2 = 1-x_1$  — мольные доли компонентов в мицелле;  $C_{12}$  — ККМ смеси;  $C_1$  и  $C_2$  — ККМ каждого компонента.

Учитывая специфичность химического строения исследуемой пары соединений, вместо значений ККМ для расчетов были взяты значения критической концентрации ассоциации (ККА). При этом предполагалось образование каких-либо ассоциатов рибавирина и интерферона, которые, строго говоря, мицеллами назвать нельзя. Для рибавирина такая концентрация определялась по изотерме поверхностного натяжения, построенной в полулогарифмических координатах  $\sigma = f(\ln C)$ , при выходе кривой на плато (как для неионного ПАВ), что составило 16,9 г/л. Для интерферона величина ККА определялась кондуктометрически, по излому на зависимости удельной электропроводности ( $\kappa$ ) от концентрации белка.

Зная значения величин ККА при различных соотношениях компонентов, оказалось возможным оценить параметр  $\beta^m$  (табл. 2).

$$\beta^m = \frac{\ln[\alpha_1 C_{12} / (x_1 C_1)]}{(1-x_1)^2}. \quad (2)$$

О синергизме можно говорить при соблюдении двух условий:

$$\beta^m < 0; |\beta^m| > |\ln(C_1 / C_2)|. \quad (3)$$

Отрицательное значение коэффициента  $\beta^m$  свидетельствует о межмолекулярном притяжении в исследуемой паре соединений.

На рис. 4 приведены типичные зависимости  $\kappa = f(C)$  для индивидуального раствора интерферона, а также его растворов в присутствии рибавирина. Присутствие рибавирина в растворе заметно изменяет величину ККА интерферона, что свидетельствует о межмолекулярных взаимодействиях не только на межфазных границах раздела, но и в объеме раствора (табл. 2). Таким образом, результаты тензиометрических и кондуктометрических исследований согласуются между собой.

Влияние рибавирина на процессы ассоциации интерферона косвенно подтверждается и изменением изоэлектрической точки (ИЭТ) интерферона в присутствии рибавирина (рис. 5), что согласуется с результатами, полученными в работе [20].

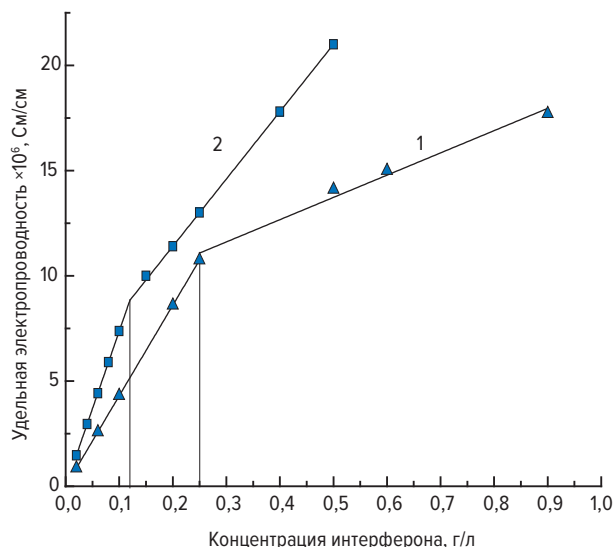


РИС. 4. Кондуктометрическое определение ККА чистого интерферона (1) и смеси с рибавирином (2)

Таблица 2

Значение критических концентраций ассоциации и параметра взаимодействия для смешанных систем интерферон–рибавирин

| Система                    | ККА, г/л | $\beta^m$ |
|----------------------------|----------|-----------|
| Интерферон                 | 0,25     | —         |
| Рибавирин                  | 16,95    | —         |
| Интерферон/Рибавирин (1:1) | 0,16     | -30,3     |
| Интерферон/Рибавирин (1:2) | 0,13     | -32,2     |
| Интерферон/Рибавирин (1:5) | 0,02     | -38,6     |

ККА — критическая концентрация ассоциаций.

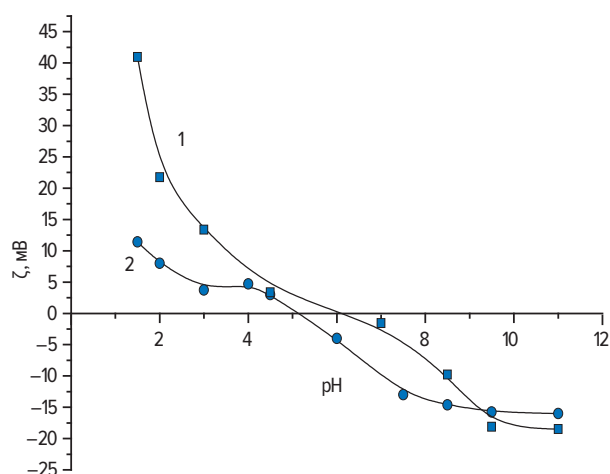


РИС. 5. Зависимость  $\zeta$ -потенциала макромолекул интерферона от pH:

1 — водный раствор интерферона (0,5 г/л);  
2 — смешанный раствор интерферон (0,5 г/л)–рибавирин (0,015 М)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования позволили уточнить уже известные методики определения концентрации рибавирина в водной фазе, а также исследовать смешанные растворы рибавирин–интерферон и выявить наличие межмолекулярных взаимодействий между указанными соединениями. Для установления механизма межмолекулярных взаимодействий между исследованной парой соединений будут проведены квантово-химические расчеты, позволяющие рассчитать энергетические параметры взаимодействия, выявить оптимальные конформации молекул и установить взаимосвязь между конформационными превращениями и биологической активностью аналогов рибавирина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Раменская Г.В., Шохин И.Е., Кулинич Ю.И. Биофармацевтическая классификация лекарственных веществ. Сеченовский вестник. 2011; 1(3)-2(4): 57–60.  
[Ramenskaya G.V., Shokhin I.E., Kulinich Yu.I. The biopharmaceutical classification of medicinal substances. Sechenovskiy Vestnik. 2011; 1(3)-2(4): 57–60] (in Russian).
2. Stanimirova R.D., Marinova K.G., Danov K.D. et al. Competitive adsorption of the protein hydrophobin and an ionic surfactant: Parallel vs sequential adsorption and dilatational rheology. *Colloids Surf. A*. 2014; 457: 307–317.
3. Narayanan J., Abdul Rasheed A.S., Bellare J.R. A small-angle X-ray scattering study of the structure of lysozyme–sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Colloid Interface Sci.* 2008; 328(1): 67–72.
4. Samsó M., Dabah J., Hansen S., Jones G.R. Evidence for sodium dodecyl sulfate/protein complexes adopting a necklace structure. *Eur. J. Biochem.* 1995; 232 (3): 818–824.
5. Ghany M.G., Nelson D.R., Strader D.B. et al. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011; 54(4): 1433–1444.
6. Ferenci P., Laferl H., Scherzer T.M. et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 24 weeks in hepatitis C type 1 and 4 patients with rapid virological response. *Gastroenterology*. 2008; 135(2): 451–458.
7. Jacobson I.M., McHutchison J.G., Dusheiko G. et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(25): 2405–2416.
8. Marukian S. et al. Hepatitis C virus induces interferon- $\lambda$  and interferon-stimulated genes in primary liver cultures. *Hepatology*. 2011; 54(6): 1913–1923.
9. Dusheiko G., Nelson D., Reddy K. Ribavirin considerations in treatment optimization. *Antiviral Therapy*. 2008; 13(1): 23–30.
10. Stryjek-Kaminska D., Ochsendorf F., Róder C. Photoallergic skin reaction to ribavirin. *Am. J. Gastroenterol.* 1999; 94(6): 1686–1688.
11. El-Brashy A.M., Sheribah Z.A., Sharaf El-Din M.K., El-Gamal R.M. Kinetic determination of ribavirin in drug formulations. *Int. J. Biomed. Sci.* 2007; 3(1): 65–71.
12. Austin R.K., Trefts P.E., Hintz M. et al. Sensitive radioimmunoassay for the broad-spectrum antiviral agent ribavirin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983; 24(5): 696–701.
13. Sastry C.S.P., Naidu P.I., Lakshmi C.S.R. et al. Application of sodium metaperiodate for the determination of ribavirin in pharmaceutical formulations. *Talanta*. 1998; 47(1): 85–93.
14. Константинова И.Д., Чудинов М.В., Фатеев И.В. и др. Нуклеозиды 1,2,4-триазола: возможности и ограничения химико-ферментативного способа получения. *Биоорганическая химия*, 2013; 39(1): 61–80.  
[Konstantinova I.D., Chudinov M.V., Fateev I.V. et al. Chemoenzymatic method of 1,2,4-triazole nucleoside synthesis: Possibilities and limitations. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2013; 39(1): 53–71] (in Russian).
15. Георгиевский Г.В. Разработка комплекса физико-химических методик, обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных препаратов, производных 1,2,4-триазола. *Запорожский медицинский журнал*. 2011; 13(1): 58–69.  
[Georgievskiy G.V. Development of the complex of physico-chemical methods providing the creation and control of quality of original drugs preparations, derivatives of 1,2,4-triazole. *Zaporozhye Medical Journal*. 2011; 13(1): 58–69] (in Russian).
16. Arnheiter H., Thomas R.M., Leist T. et al. Physicochemical and antigenic properties of synthetic fragments of human leukocyte interferon. *Nature*. 1981; 294(5838): 278–280.
17. Anantapadmanabhan K.P. Interactions of surfactants with polymers and proteins. Boca Raton, FL: CRC Press. 1993. 427 p.
18. Li F., Rosen M.J., Sulthana S.B. Surface properties of cationic gemini surfactants and their interaction with alkylglucoside or -maltoside surfactants. *Langmuir*. 2001; 17(4): 1037–1042.
19. Rosen M.J., Zhu Z.H., Gao T. Synergism in binary mixture of surfactants: 11. Mixtures containing mono- and disulfonated alkyl- and dialkyldiphenylethers. *J. Coll. Interf. Sci.* 1993; 157(1): 254–258.
20. Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Банкаина А.Н., Бриллиантова Е.Ю. Изучение взаимодействия белков с биологически активными азотсодержащими гетероциклическими соединениями при различных значениях pH. *Бутлеровские сообщения*. 2013; 34(5): 91–99.