

Ниженковская И.В.

## ВЛИЯНИЕ КАРДИОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ С РАЗНОНАПРАВЛЕННОЙ ИНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА СТРУКТУРНО – ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ФОСФОЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м.Київ)

**Резюме.** В статье обсуждаются вопросы возможных механизмов неблагоприятного воздействия гормонзаместительной терапии на развитие и течение ишемической болезни сердца (ИБС). Данные основаны на наблюдении и обследовании 54 женщин с естественной и хирургической менопаузой, которым назначали гормонзаместительную терапию (ГЗТ) в различных дозировках для коррекции ранних вегетативно-эмоциональных проявлений менопаузы, остеопороза и после оофорэктомии. Подтверждена хорошая эффективность ГЗТ для коррекции ранних климактерических симптомов и остеопороза. Использование низких доз ГЗТ для контроля вегетативно-психических нарушений является не менее эффективным, чем высоких, однако при назначении больших доз ГЗТ эффект от лечения наступает быстрее. Эффект ГЗТ на проявления остеопороза является дозозависимым. Авторами также установлен провоспалительный эффект ГЗТ с повышением в крови уровней С-реактивного протеина и фибриногена. Сделано предположение о том, что данный момент может быть одним из патофизиологических механизмов неблагоприятного влияния ГЗТ на возникновение и течение ИБС. Использование низких доз ГЗТ позволяет в значительной мере уменьшить ее провоспалительное действие

**Ключові слова:** менопауза, гормонзамінна терапія, ранні клімактеричні симптоми, остеопороз, маркери системної запальної відповіді, С-реактивний протеїн, фібриноген.

Комплексообразование фосфолипидных бислоев *in vitro* с физиологически активным соединения (ФАС) может приводить к их структурной модификации [1-3], о чем свидетельствует изменение физико-химических и структурно – динамических параметров (микровязкость и заряд поверхностных мембран *д.р.*), структурных пертурбаций в белковых составляющих мембран, изменение в области белково-липидного контакта [4]. Кардиотоники оказывает возмущающее влияние на липидные составляющие мембран клеток [3,6], сердечные гликозиды изменяют микровязкость саркоплазматического ретикулаума миокарда кроликов [5].

Способность кардио – и вазотропных ФАС различной химической природы взаимодействовать с фосфолипидным (ФЛ) бислоем исследовалась в работе [7].

Для соединений с отрицательной инотропной активностью, относящихся к классам фенилалкиламинов (верапамил), дигидропиридинов (нифедипин), аналогов краун-эфиров (диол) показано доминирование в их механизме действия антирадикальной активности.

Задачей данного исследование было изучить структурную модификацию ФЛ-бислоев из нейтрального фосфатидилхолина (ФХ) и отрицательно заряженного кардиолипина

(КЛ) при взаимодействии с ними соединений с разнонаправленной инотропной активностью (агонисты и антагонистовы Са 2+).

### Материалы и методы.

В работе исследовали представителей класса фенилалкиламинов - (1) добутамин («Лилли Дойчланд», Германия), (2) верапамил («Польфа», Польша); производные дигидропиридинов – (3) ВАУ-К-8644 (Институт органической химии НАН Украины), (4) нифедипин («Польфа», Польша); производные краун-эфиров - (5) карбицил и (6) диол, синтезированные в Институте органической химии НАН Украины.

В качестве модели биомембран использовали липосомы из лецитина и кардиолипина (лецитин-стандарт (10% раствор в спирте), кардиолипин-стандарт (0,5 % раствор в спирте). Липосомы получали в соответствии с [8]. Ультразвуковую обработку проводили на диспергаторе УЗДН-2Т (22 кГц, 10 мин). Комплексообразование ФАС с липосомами из КЛ изучали методами микрокалориметрии и спектрофотометрии. Тепловой эффект реакции записывали во времени при 26<sup>0</sup> С в режиме смешения на микрокалориметре ЛКБ 2107 (Швеция).

Концентрация ФАС составляла 33 мкМ, фосфолипида – 0,66 мг/мл. Дифференциальные спектры поглощения в



области 210-300 нм определяли как изменения оптической плотности  $\Delta D\lambda$ :

$$\Delta D\lambda = D\lambda^{M+\text{ФАС}} - D\lambda^M - D\lambda^{\text{ФАС}}$$

где  $D\lambda^{M+\text{ФАС}}$ ,  $D\lambda^M$  и  $D\lambda^{\text{ФАС}}$  - оптическая плотность смеси липосом и ФАС, только липосом и только ФАС. Спектры поглощения записывали при 200 С на спектрофотометре Shimadzu MPS 5000 (Япония) в кварцевых кюветах 1 см. Соединения 3-6 вводили в суспензию липосом в виде их спиртовых растворов, концентрация спирта не превышала 1 %. Изменения микровязкости ФЛ-бислоев под воздействием ФАС изучали с помощью глубинного флуоресцентного зонда пирена как соотношения после его флуоресценции при 392 и 465 нм, соответствующих флуоресценции мономерной и энантиомерной форм пирена  $I_m/I_e$ , и характеризующее латеральную диффузию пирена в бислое [9].

Влияние ФАС на полярность окружения молекулы пирена при внедрении в бислой определяли по соотношению интенсивности (тонкой структуры) полос флуоресценции мономера  $I_{371}/I_{392}$  [9].

Изменения заряда поверхности бислоев из ФХ и КЛ при взаимодействии с ФАС 1-6 изучали методом ионного удара [9]. Концентрация ФЛ не превышала 0,1 мг/мл. Использовали 1,8 - анилинафталинсульфонат ( $\text{NH}_4^+$ ) фирмы Serva (Германия). Пирен перекристаллизовывали из бензола. Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония) в кварцевых кюветах 1 см при 200 С.

Исследования проводили в отделе биохимической фармакологии НИИ фармакологии и токсикологии АМН Украины (зав. отделом чл-кор НАМН Украины Губский Ю.И.).

#### Результаты и их обсуждение

Спектрофотометрическое изучение взаимодействия ФАС с липосомами из КЛ показало изменение в их спектрах поглощения в УФ - области 210-300 нм. На рис. 1 приведение дифференциальные спектры поглощения ФАС при их инкубации в среде липосом при 20° С ( $C_{\text{ФЛ}}=0,05$  мг/мл;  $C_{\text{ФАС}}=7,5 \cdot 10^{-5}$  М), свидетельствующие об их взаимодействии с ФЛ-бислоем. Для соединений 1, 3, 5, с положительной инотропной активностью наблюдается гиперхромный эффект взаимодействия с бислоем, в то время как антагонистов  $\text{Ca}^{2+}$  ФАС 2 и 6 (кроме нифедипина) - сни-

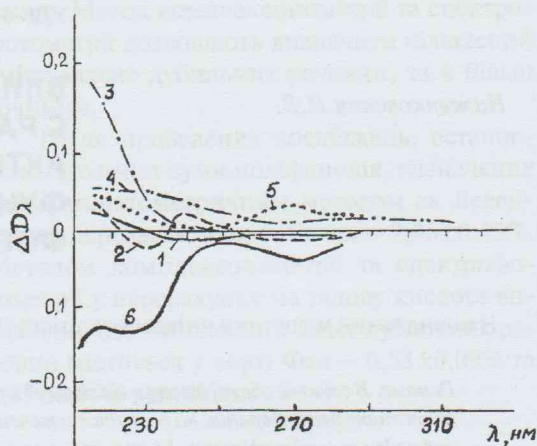


Рис. 1. Изменения оптической плотности ФАС при инкубации в среде суспензии липосом из КЛ в изотоническом буфере при 200 С ( $C_{\text{ФАС}}=7,5 \cdot 10^{-5}$  М;  $C_{\text{КЛ}}=0,5$  мг/мл).

1. - добутамин, 2 - верапамил, 3 - ВАУ-К-8644, 4 - нифедипин, 5 - карбацил, 6 - диол.

жения оптической плотности (гипохромный эффект).

Различия в знаке изменения оптической плотности ФАС-агонистов и антагонистов  $\text{Ca}^{2+}$  может указывать на различные места их локализации в бислое из отрицательно заряженного ФЛ.

Для ФАС с положительной и отрицательной инотропной активностью тоже наблюдают различия в кинетике тепловыделения при взаимодействии с бислоем в изотоническом буфере. Как видно из рис. 2, тепловой эффект взаимодействия ФАС 1-6 с бислоем из КЛ сопровождается экзотермическим эффектом, указывающим на электростатическое Ван-дер-ваальсовое взаимодействие либо образование комплексов с Н-связью [10]. Однако, максимум теплового эффекта реакции антагонистов  $\text{Ca}^{2+}$  ФАС 2, 4, 6 (рис 2б) наблюдается на 1-2 мин быстрее, чем у ФАС 1, 3, 5 (рис 2а), а тепловыделение пролонгировано во времени (30 мин. и больше). Большая скорость реакции антагонистов 2, 4, 6 в первые минуты после смешения может быть обусловлена их антирадикальной активностью [11], протеканием свободно-радикального взаимодействия ФАС с перекисными формами липида при их локализации в области жирно-кислотных остатков ФАС.

Флуоресцентное зондирование фосфолипидных бислоев из фосфатилхолина и кардиолипина, инкубированных в среде ФАС 1-6, показало (рис. 3), что в зависимости от концентрации добавленных ФАС



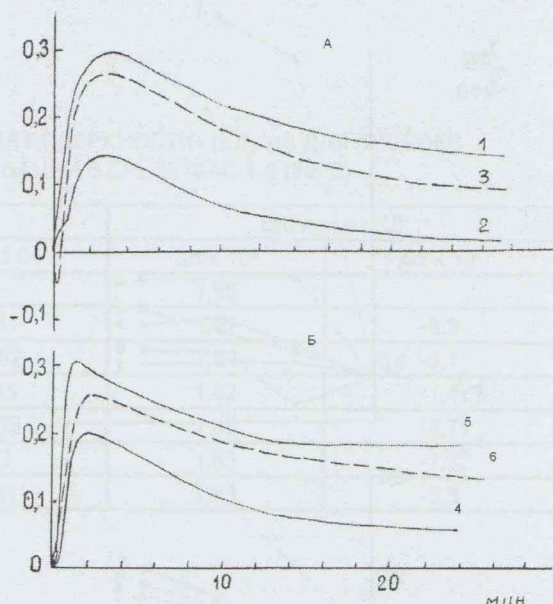
изменяется параметр флуоресценции пирена  $I_m/I_0$ , характеризующий микровязкости ФЛ-бислоев. Для бислоя нейтрального ФХ и отрицательно заряженных КЛ ФАС (за исключением аналогов краун-эфиров: ФАС-6 при малой концентрации  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М и ФАС-5) при взаимодействии имеет место повышение микровязкости. При флуоресцентном зондировании бислоев пиреном в присутствии нифедипина наблюдалось тушение флуоресценции пирена в результате поглощения возбуждающего света ( $\lambda_{\text{возб}}$  пирена 334 нм), которое перекрывается с полосой переноса заряда в спектре нифедипина ( $\lambda \approx 340$  нм), что не позволяло конкретно определять параметр  $I_m/I_0$ . Однако для бислоя из ФХ ранее [11] с помощью полиметиленового красителя 4501у было показано незначительное повышение микровязкости в присутствии нифедипина.

Возмущения, которые претерпевает молекула пирена при внедрении в ФЛ-бислой, сказываются на интенсивности флуоресценции мономера: изменение полярности окружения пирена приводит к перераспределению интенсивности флуоресценции полос  $I_{371}$  и  $I_{392}$ . На рис. 4 приведены соотношения  $I_{371}/I_{392}$  флуоресценции пирена в бислоях из ФХ и КЛ в зависимости от концентрации добавленных ФАС. Как видно для нейтрального фосфолипида, взаимодействие с ФАС 1-4 приводит к возрастанию полярности, тогда как соединения – аналоги краун-эфиров не изменяют параметр  $I_{371}/I_{392}$ , и только с повышением концентрации наблюдается незначительное снижение полярности для ФАС 2 и 3 и повышение для 6.

Для бислоя из кардиолипина, напротив, взаимодействие с ФАС (антагонистами 2, 4, 6), а с повышением концентрации и с ФАС 1, 5, снижает параметр  $I_{371}/I_{392}$ , и только ФАС 3 при концентрации  $7,5 \cdot 10^{-5}$  М усиливает полярность окружения пирена.

То есть, структурная модификация бислоев из ФХ и КЛ соединениями с разнонаправленным инотропным действием способствует изменению степени поляризации в гидрофобных участках бислоев где локализован пирен [9].

Для оценки влияния ФАС 1-6 на свойства поверхности бислоев из ФХ и КЛ определяли заряд  $(\text{Кл/м}^2)$  электрического поля поверхности бислоя до и после модификации ФАС 1-6 в соответствии с методикой „ионного удара” [9].



**Рис.2.** Термокинетические кривые взаимодействия ФАС с положительной (А) и отрицательной (Б) инотропной активностью с фосфолипидным бислоем из КЛ.

1 – добутамин, 2 – ВАУ-К-8644, 3 – карбицил, 4 – верапамил, 5 – нифедипин, 6 – диол.

В таблице приведены значения  $\sigma$  и  $\Delta\sigma$  для липосом из ФХ и КЛ в отсутствие ФАС и с добавлением ФАС в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М ( $\Delta\sigma = \sigma^{\text{М+ФАВ}} - \sigma^{\text{МВ}}$ ). Из приведенных данных видно, что заряд электрического поля поверхности бислоя из ФХ почти в 2 раза ниже, чем для бислоя из КЛ.

Как следует из полученных значений  $\Delta\sigma$  для бислоя из ФХ, соединения с положительной инотропной активностью вызывают возрастание заряда электрического поля поверхности, тогда как для антагонистов  $\text{Ca}^{2+}$ , кроме диола (нифедипин, верапамил), имеет место снижение заряда  $\sigma$ .

Характер изменения полярности по данным зондирования пиреном для бислоев из ФХ под влиянием ФАС зависит от их концентрации в бислое: при физиологических концентрациях ( $C_{\text{ФАС}} 5 \cdot 10^{-5}$  М) усиливается полярность окружения пирена (параметр  $I_{372}/I_{393}$ ) и возрастает заряд поверхности электронного поля (по данным метода ионного удара,  $C_{\text{ФАС}} 2,42 \cdot 10^{-5}$  М).

С повышением концентрации ФАВ ( $C > 5 \cdot 10^{-5}$  М) полярность среды (за исключением диола) в зонах погружения пирена снижается.



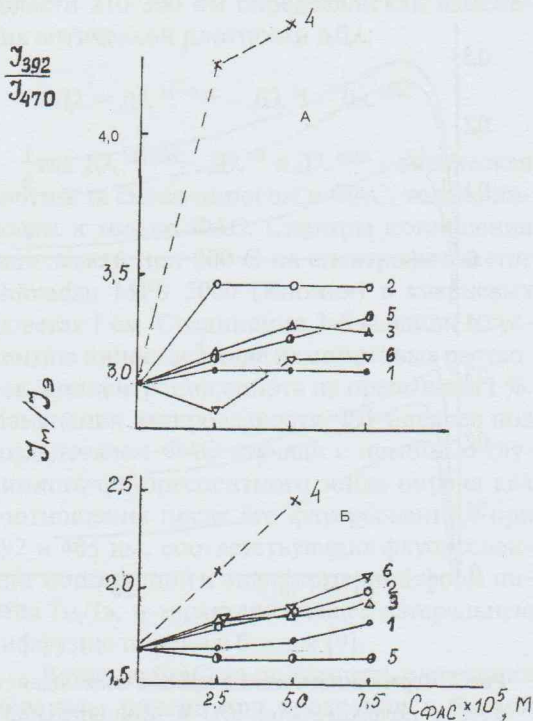


Рис. 3 Параметри флуоресценції пірена ( $I_m/I_0$ ) при взаємодії ФАС з фосфоліпидним бісломом із фосфадіети́лхоліна (А) і кардіоліпіна (Б). Обозначення см. рис. 1.

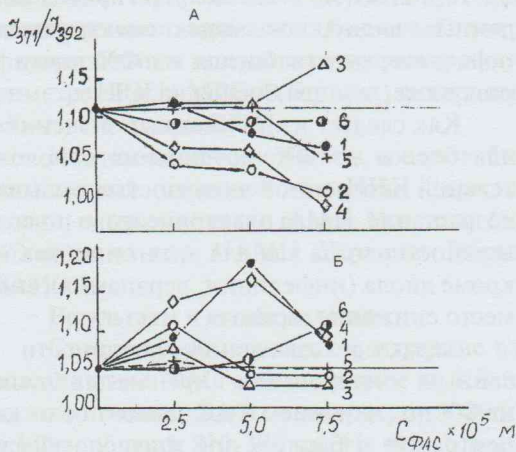


Рис. 4. Соотношение  $I_{371}/I_{392}$  флуоресценції пірена в фосфоліпидних бісломом із ФХ (А) і КЛ (Б) в залежності від концентрації доданих ФАС. Обозначення см. на рис. 1.

Снижение величины заряда  $\sigma$  ФХ бислоя под влиянием нифедипина или верапамила обусловлено, по-видимому, структурной модификацией поверхности бислоя вследствие громоздкости заместителей в молекулах ФАС, они не способны внедряться в гидрофобные зоны, где локализуется пирен.

В случае бислоя из отрицательно заряженного кардиолипина наблюдается снижение заряда поверхности в присутствии всех исследуемых ФАС. Анализ изменения показателей  $\Delta\sigma$  и результатов исследования полярности среды методом флуоресцентного зондирования пиреном позволил выделить общую тенденцию снижения заряда поверхности электрического поля и полярности окружения пирена в гидрофобных зонах, где он локализован, под воздействием исследуемых соединений.

Таким образом, исследования взаимодействия кардиотропных ФАС с положительной и отрицательной инотропной активностью с фосфолипидными бислоями из ФХ и КЛ свидетельствуют о их мембранотропности. Однако, их действие в значительной мере определяется характером инотропной активности. Микрокалориметрические исследования показали, что кинетика их реакций с отрицательно заряженным ФЛ бислоем из КЛ различна: наблюдаемый максимум теплового эффекта реакций наступал быстрее для антагонистов  $Ca^{2+}$ , чем у агонистов (примерно на 2-3 мин).

Наблюдаются различия во взаимодействии ФАС с бислоями из фосфолипидов ФХ и КЛ.

Разнонаправленность в изменении дифференциальных спектров поглощения ФАС при инкубации в бислое из ФХ и КЛ указывает на различие в местах их локализации на поверхности бислоев, что сказывается на структурной модификации их поверхности и последующих возмущениях в глубинных гидрофобных участках мембран. Установлена общая тенденция в изменении заряда поверхности и полярности в гидрофобной области бислоях из ФХ и КЛ под воздействием исследуемых ФАС. Влияние ФАС на глубокие участки ФХ бислоя определяется их химической структурой и свойствами заместителей в их молекулах.



ТАБЛИЦА 1

ВЕЛИЧИНА ЗАРЯДА ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ ПОВЕРХНОСТИ - (КЛ/м<sup>2</sup>) ДЛЯ БИСЛОЕВ ИЗ ФХ И КЛ ДО И ПОСЛЕ ИХ ИНКУБАЦИИ В СРЕДЕ ФАС 1-6 (20° С)

Характер опыта	Бислои из ФХ		Бислои из КЛ	
	$\Delta\sigma \times 10^4$	$\Delta\sigma \times 10^4$	$\Delta\sigma \times 10^3$	$\Delta\sigma \times 10^4$
Липосомы	9,29	-	1,96	-
Липосомы + 1	1·0,6	1,31	1,07	-8,9
Липосомы + 2	0,653	-8,62	1,89	-0,7
Липосомы + 3	9,44	0,15	1,82	-1,4
Липосомы + 4	8,06	-1,23	1,49	-4,7
Липосомы + 5	9,62	3,3	1,83	-1,3
Липосомы + 6	1·0,8	1,51	1,43	-5,3

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Чекман И.С., Горчакова Н.А., Самарский В.А., Ниженковская И.В. и др. Взаимодействие модуляторов кальциевых каналов с компонентами биомембран. // Доп. НАН України. – 1995. – № 5. – С.114-116.
2. Губский Ю.И., Горчакова Н.А., Шнурко-Табакова Э.В. Изучение взаимодействия фенольных антиоксидантов и 1,4 дигидропиридинов с мембранами фракций микросом печени крыс. // Укр. Біохім. Журн. – 1997. – Т 69, № 9. – С.60-65.
3. Чекман И.С. Биохимическая фармакодинамика. – К.:Здоров'я, 1991. – 200с.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.:Наука, 1972. – 252 с.
5. Chekman I.S., Nizhenkovskaya I.V., Gorchakova N.A., Radchenko N. Ph. Cardiovascular drugs and microviscosity of sarcolemma. // Eur. J. Pharmacol. – 1990. – V 183/2, № 7. – P.336.
6. Чекман І., Горчакова Н., Олійник С., та ін. Взаємодія суфану із фосфоліпідними мембарами, їх компонентами та іншими біолігандами in vitro. // Галицький лікарський вісник. – 2000. – Т.7, № 1. – С. 66-68.
7. Ниженковская И.В., Губский Ю.И., Чекман И.С., и др. Антирадикальная активность и мембранотропное действие кардио- и вазотропных соединений различной химической природы. // Укр. біохім. журн. – 1998. – Т. 70, № 4. – С. 51-58.
8. Лебедь О.И., Стефанов А.В., Примак Р.Г. Влияние условий ультразвуковой обработки на характеристики формирующихся липосом. // Укр. біохім. журн., - 1989. – Т.61, № 3. – С. 96-101.
9. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран, липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 435 с.
10. Ландау М.А. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений. – М.: Наука, 1981. – 262 с.
11. Губский Ю.И., Горюшко А.Г., Шнурко Э.В., Саченко Л.Г. Взаимодействие антиоксидантов различной химической структуры с фосфолипидным бислоем. // укр. біохім. журн. – 1994. –Т. 66, № 2. – С. 61-66.
12. Губский Ю.И., Долго-Сабуров В.Б., Храпак В.В. Химические катастрофы и экология. – К.: Здоров'- 1993. – 224 с.