

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕПАРИНА С НЕКОТОРЫМИ АНТИГИСТАМИННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

К. Г. АЛАВЕРДЯН

НИИ медицинской радиологии МЗ Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Показано образование комплексов гепарина с антигистаминными препаратами (дипразином, аминазином, супрастином и димедролом) при физиологических значениях рН (7,3) и ионной силе среды, равной 0,01—0,15. Выявлено одновременное участие электростатических сил и гидрофобных взаимодействий в стабилизации устойчивой формы комплексов. Установлен экспоненциальный характер зависимости тепловых эффектов исследуемых реакций от ионной силы среды.

Անոտացիա — Տրույց է տրված հեպարինի և հակահիստամինային պրեպարատների (դիպրազինի, ամինազինի, սուպրաստինի և դիմեդրոլի) միջև կոմպլեքսի առաջացումը pH (7,3) ֆիզիոլոգիական արժեքի և իոնական ուժի 0,01—0,15 տիրույթի դիպրոմ: Հաշտեարբերված է էլեկտրաստատիկ ուժերի և հիդրոֆոր ֆորսազղեցությունների միաժամանակյա մասնակցությունը կոմպլեքսների կայուն ձևի ստարիդիզացման մեջ: Ցույց է տրված հետազոտվող ունակցիաների ջերմային էֆեկտների էքսպոնենցիալ բնույթը կախումը միջավայրի իոնական ուժից:

Abstract — Complexes of heparin with antihistamine agents (diprasin, aminasin, suprastin and dimedrol) were shown to be formed and survived in case of physiological values of pH (7,3) and medium ionic strength 0,01—0,15. The simultaneous participation of electrostatic strengths and hydrophobe interactions in the stabilization of constant form of complexes was revealed. The exponential character of dependence of temperature effects of the studied reactions on the medium ionic strength was established.

Ключевые слова: гепарин, антигистаминные препараты, комплексобразование

Молекула гепарина выделяется среди мукополисахаридов организма выраженной способностью образовывать комплексные соединения с различными низко- и высокомолекулярными соединениями, содержащими основные группы. Этому способствует высокая плотность отрицательного электростатического заряда и малая разветвленность его полимерной структуры. По данным ряда авторов [1, 8, 10, 11], реакционными центрами в молекуле гепарина являются отрицательно заряженные сульфо- и карбоксильные группы, взаимодействующие с положительно заряженными группами связываемого вещества. Кроме того, в ряде случаев было установлено участие в комплексобразовании, наряду с электростатическими силами, водородных связей и гидрофобных взаимодействий [2, 3, 7]. Участие слабых молекулярных сил обуславливает также комплексобразование гепарина с гистамином, его высокую лабильность ко всякого рода воздействиям и способность организма осуществлять регуляцию его распада на физиологически активные компоненты [5]. Переход гистамина из связанного состояния в свободное и повышение его содержания в организме приводит к резкому нарушению

процессов жизнедеятельности. Для предотвращения этих нарушений или их ослабления применяют антигистаминные препараты. Есть основания полагать, что наряду с их основным назначением, инактивацией свободного гистамина в организме, некоторые антигистаминные препараты обладают способностью высвобождать гистамин [4, 9]. В связи с этим представляет интерес изучение взаимодействия гепарина с некоторыми антигистаминными препаратами с целью выявления их способности конкурентно вытеснять гистамин из его комплекса с гепарином.

Материал и методика. Микрокалориметрические исследования взаимодействия гепарина с антигистаминными препаратами были проведены на проточном микрокалориметре 10700-1 Fl.AU фирмы LKB (Швеция). В процессе калориметрического титрования гепарина антигистаминными препаратами скорость прокачки реагентов выбиралась одинаковой и составляла 40 мл/час. Рабочая температура составляла 25°.

Использовались препараты гепарина фирмы «SPOFA» (ЧССР) и антигистаминные препараты для инъекций.

Растворы гепарина и антигистаминных препаратов готовили на фосфатном буфере с рН 7,3. Калориметрическое титрование реагентов проводили при ионной силе среды, равной 0,01. При изучении зависимости теплового эффекта реакции комплексообразования гепарина с антигистаминными препаратами от ионной силы среды последнюю варьировали в пределах 0,01—0,15.

В процессе калориметрического титрования концентрация гепарина в растворе фиксировалась и составляла $6,5 \cdot 10^{-6}$ М. Перечень исследованных антигистаминных препаратов и их концентрации приведены в табл. 1.

Таблица 1. Антигистаминные препараты и их концентрации в процессе калориметрического титрования

Антигистаминные препараты	Концентрация C_0 , (моль л) $\cdot 10^4$
Дипразин	0,78; 1,56; 3,12; 6,24; 7,79; 9,35; 10,91; 12,45; 15,58; 24,93; 31,16
Аминазин	0,7; 1,41; 2,81; 5,63; 7,04; 8,4; 11,26; 14,1; 16,9; 11,51; 23,14
Димедрол	3,43; 6,85; 8,57; 13,71; 17,13; 21,42; 27,41; 34,27; 42,83; 55,67
Супрастин	1,5; 3,0; 6,0; 7,7; 12,3; 15,4; 24,6; 30,0; 40,2

Спектральные исследования выполнены на регистрирующем спектрофотометре «СПЕКОРД» (ГДР) в термостатированных при 25° сантиметровых кварцевых кюветах.

При изучении образования комплекса гепарин—антигистамин по исчезновению метакромазина толундилового синего (ТС) использовали растворы ТС ($1,81 \cdot 10^{-5}$ М), гепарина ($6,5 \cdot 10^{-7}$ М), аминазина ($2,8 \cdot 10^{-4}$ М), дипразина ($3,1 \cdot 10^{-4}$ М), супрастина ($1,6 \cdot 10^{-3}$ М) и димедрола ($6,9 \cdot 10^{-3}$ М).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены кривые калориметрического титрования, полученные путем последовательного добавления растворов антигистаминов, в порядке возрастания концентраций, к раствору гепарина фиксированной концентрации и соответствующей регистрацией теплового эффекта. При этом учитывались тепловые эффекты разбавления реагентов. На основании того, что кривые титрования имеют вид, подобный изотерме Ленгмюра, было сделано предположение о независимости и однородности активных центров гепарина.

Обсчет кривых титрования по способу, предложенному Марковичем с соавт. [6], позволил определять число активных центров (n) гепарина для каждого случая взаимодействия с антигистаминами, их энтальпию

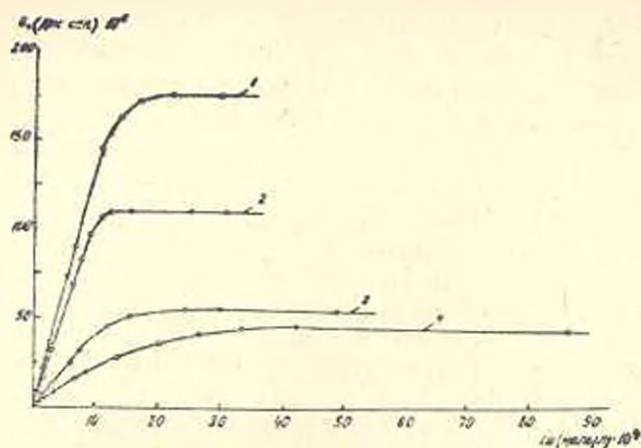


Рис. 1. Кривые калориметрического титрования гепарина аминазином (1) диниразином (2), супрастином (3) и димедролом (4), полученные при ионной силе среды 0,01 и значении рН 7,3.

взаимодействия (ΔH°) и константу связывания (K) диниразина, аминазина, супрастина и димедрола с активным центром молекулы гепарина. Исходя из полученных значений величин энтальпии взаимодействия и константы связывания, были вычислены изменения свободной энергии (ΔG°) и энтропии комплексообразования (ΔS°) для каждого из случаев взаимодействия гепарина с исследуемыми антигистаминными препаратами (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Термодинамические константы реакции комплексообразования гепарина с антигистаминными препаратами

Вещество	n	$K \cdot 10^{-4}$ М, л/моль	$-\Delta H^\circ$, кДж/моль	$-\Delta G^\circ$, кДж/моль	ΔS° , Дж/(К·моль)
Диниразин	165	67.0 ± 3.5	33.4 ± 0.13	9.24 ± 0.21	80.7 ± 0.4
Аминазин	218	15.5 ± 2.3	22.9 ± 0.38	11.2 ± 0.21	62.3 ± 0.5
Супрастин	191	3.18 ± 1.0	25.9 ± 0.63	3.97 ± 0.12	73.2 ± 1.7
Димедрол	267	0.76 ± 0.5	22.3 ± 0.17	2.42 ± 0.12	66.0 ± 0.8

Зависимость тепловых эффектов реакций комплексообразования от ионной силы среды при рН (7,3) и фиксированной концентрации реагентов носит в разной степени выраженный экспоненциальный характер (рис. 2).

Взаимодействие гепарина с антигистаминными препаратами исследовалось также методом спектрофотометрии в видимой области (рис. 3) Максимум спектра поглощения ТС находится в области 650 нм, а смеси ТС-гепарин смещен в коротковолновую область. При введении в систему ТС—гепарин антигистаминных препаратов происходит восстановление максимума поглощения красителя как по длине волны, так и по интенсивности. По этому показателю диниразин, аминазин и супрастин на-

много превосходят димедрол. При ионной силе среды, равной 0,15, димедрол практически не восстанавливает спектр поглощения ТС.

В качестве контроля изучали взаимодействие всех антигистаминных препаратов и ТС. В этом случае не обнаружено изменений в спектре поглощения ТС, что вместе с полученными выше результатами свидетельствует об образовании комплексов гепарина с исследуемыми антигистаминными препаратами.

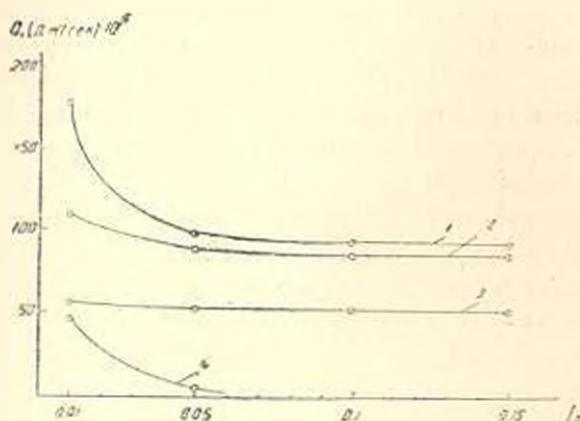


Рис. 2. Кривые зависимости теплового эффекта образования комплексов гепарина с аминазином (1), дипразином (2), супрастином (3) и димедролом (4) от ионной силы, полученные при значении рН 7,3 растворов.

Результаты проведенных исследований показали, что все изучаемые антигистаминные препараты при физиологических значениях рН (7,3) и ионной силе среды 0,04—0,15 способны вступать во взаимодействие с гепарином и образовывать с ним комплексы.

Анализ термодинамических параметров, для равновесного состояния реакций, показывает наличие нековалентных слабых связей между молекулами гепарина и антигистаминнов. Отрицательная величина свободной энергии показывает, что процесс комплексообразования гепарина с дипразином, аминазином, супрастином и димедролом является самопроизвольным.

Экзотермический эффект реакций обусловлен сближением противоположно заряженных групп гепарина и антигистаминнов с образованием связей между ними. Как известно, последнее должно приводить к некоторому уменьшению энтропии, из-за понижения числа степеней свободы взаимодействующих групп. Однако положительная величина энтропии (66,0 Дж/(К·моль)) свидетельствует о том, что преимущественный вклад в этот показатель вносят факторы, вызывающие рост энтропии. К ним можно отнести эффект высвобождения молекул воды из областей связывания, вследствие взаимной нейтрализации положительных зарядов антигистаминнов и отрицательных—гепарина. Кроме того, возрастание энтропии в ходе реакции может быть обусловлено и гидрофобными взаимодействиями между хромофорными группами исследуемых соединений.

Сопоставляя результаты микрокалориметрических и спектральных исследований, можно заключить, что реакция взаимодействия димедро-

ла с гепарином носит экзотермический характер; повышение ионной силы среды резко сказывается на их комплексообразующей способности. По всей видимости, комплексообразование гепарина с димедролом обуславливается в основном электростатическими взаимодействиями между положительно и отрицательно заряженными группами исследуемых соединений.

Взаимодействие дипразина и аминазина с гепарином, как и в предыдущем случае, также сопровождается выделением тепла. Однако повышение ионной силы среды мало влияет на их способность образовывать комплексы с гепарином. Наблюдаемое уменьшение теплового эффекта реакции взаимодействия при повышении ионной силы среды можно объяснить некоторым уменьшением вклада электростатических сил в комплексообразование.

Термодинамические параметры и результаты спектральных измерений указывают на то, что комплексообразование гепарина с дипразином и аминазином обуславливается не только электростатическими взаимодействиями, но и другими, обеспечивающими стабильность комплексов при варьировании ионной силы среды. К ним можно отнести гидрофобные взаимодействия между хромофорными группами исследуемых соединений. Положительная величина энтропии в случае взаимодействия гепарина с дипразином и аминазином (80,7 и 62,3 Дж/(К·моль) соответственно) и восстановление максимума поглощения ТС, вызванного этими соединениями при рН (7,3) и ионной силе среды 0,15, подтверждают данные суждения.

Взаимодействие супрастина с гепарином осуществляется несколько иначе. Экзотермический эффект реакции можно объяснить электростатическими взаимодействиями между положительно и отрицательно заряженными группами этих соединений. Однако зависимость его от ионной силы растворов выражена очень слабо. Можно предположить, что немалый вклад в комплексообразование гепарина с супрастином вносят гидрофобные взаимодействия между хромофорными группами этих соединений. Согласно теории гидрофобных взаимодействий, движущей силой связывания является положительное изменение величины энтропии в этом процессе (в данном случае 73,2 Дж/(К·моль). Но гидрофобные взаимодействия всегда эндотермичны. Экзотермичность теплового эффекта реакции в данном случае можно объяснить превалированием изменения энтальпии ионного связывания над эндотермичностью гидрофобного взаимодействия. Однако величина (ΔH°) вносит незначительный вклад (порядка 15%) в изменение свободной энергии комплексообразования (ΔG°).

В качестве подтверждения результатов микрокалориметрических исследований служат спектральные данные о комплексообразовании гепарина с супрастином. Супрастин одинаково хорошо восстанавливает спектр поглощения красителя при обеих величинах ионной силы раствора (0,01 и 0,15).

Полученные большие значения числа активных центров (n) при взаимодействии гепарина с исследуемыми антигистаминными препаратами можно объяснить следующим образом. Поскольку все исследо-

важные антигистаминные препараты являются поверхностно активными веществами, можно предположить, что они взаимодействуют с молекулой гепарина в мицеллярной форме. Вследствие этого рассчитанные значения величин (n) показывают не число активных центров на молекуле гепарина, а число молекул антигистамина, принимающих участие во взаимодействии.

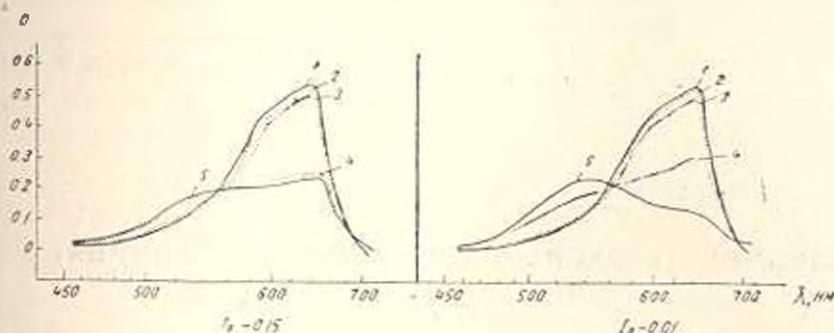


Рис. 3. Спектры поглощения ТС—кривая 1; ТС—гепарин—кривая 5; ТС—гепарин—аминазин и ТС—гепарин—дипразин—кривая 2; ТС—супрастин—кривая 3; ТС—димедрол—кривая 4; рН 7,3; ионная сила (I_0) растворов 0,01 и 0,15.

На основании проведенных исследований и аналогичных данных проведенных ранее работ [5] по изучению комплексообразования гепарина с гистамином можно сделать следующий вывод. Гепарин способен вступать во взаимодействие как с гистамином, так и с антигистаминными препаратами дипразином, аминазином, супрастином и димедролом и образовывать с ними комплексные соединения. Сравнение термодинамических параметров реакций, в частности, констант связывания ($0,7 \cdot 10^{11}$ л/моль в случае комплексообразования гепарина с гистамином при рН 7,3 и ионной силе среды 0,01), а также результатов спектральных измерений указывает на то, что антигистаминные препараты дипразин, аминазин и супрастин лучше связываются с гепарином, чем гистамин.

В заключение следует отметить, что антигистаминные препараты дипразин, аминазин и супрастин, за счет лучшего, чем гистамин, связывания с гепарином, способны конкурентно вытеснять его из комплекса с гепарином. Не исключается, что именно в этом и заключается молекулярный механизм гистаминвысвобождающего действия антигистаминных препаратов, относящихся к неизбирательным либераторам гистамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бычков С. М. Успехи совр. биол., 56, 3, 105, 1963.
2. Бычков С. М., Харламова В. И. В кн.: Биоконплексы и их значение в обмене веществ. М., 1966.
3. Губерничева Л. М., Силова А. В. Биохимия, 29, 5, 1964.
4. Гушин И. С., Дерюгин И. Л., Каминка М. Э. Бюлл. exper. биол., 3, 329, 1978.
5. Ермишкин К. Л., Алавердян К. Г., Нишней С. В., Пирюзян Л. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 6, 813, 1977.

6. Маркович М. И., Ландау М. А., Рудзит Э. А. Хим. фарм. ж., 8, 16, 1976.
7. Розенфельд М. А., Ерзичьян К. Л., Пирюзян Л. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 419, 1975.
8. Розенфельд М. А., Петросян М. Т., Пирюзян Л. А. Тез. докл. II Всесоюзн. конф. по спектроскопии биополимеров 85, Харьков, 1974.
9. Friisk-Holmberg M. Acta physiol. scand., 84, 376, 36, 1972.
10. Gorter E., Vanninga L. Disc. Farad. Soc., 13, 205, 1953.
11. Lindahl U., Roden L. J. Biol. Chem., 240, 2821, 1965.

Поступило 28 VII 1986 г.

Биол. ж. Армении, т. 40, № 3, 200—204, 1987

УДК 577.352.2

ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Т. Г. АМБАРЦУМЯН, С. Я. АДАМЯН, Г. Г. МАРИКЯН, Л. С. ПЕТРОСЯН

Ереванский филиальный институт ГКАЭ

Аннотация — Показано, что смешанные липосомы, образованные молекулами яичного лецитина и дезоксихолата натрия, имеют более высокую ионную проницаемость по сравнению с бездетергентными липосомами, в то же время проницаемость для глюкозы у них практически не зависит от концентрации детергента. Дезоксихолат натрия оказывает влияние на проницаемость липосомальной мембраны при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования.

Անոտացիա — Ծույց է տրված, որ միջ լեցիտինի և նատրիումի զեզօքսիխոլատի ձայկույնների կազմավորված խառը լիպոսոմների թափանցելիությունը իոնների համար ավելի բարձր է՝ համեմատած առանց զետերգենտի կազմավորված լիպոսոմների հետ: Միևնույն ժամանակ գլյուկոզայի համար թափանցելիությունը կախված չէ զետերգենտի կոնցենտրացիայից: Նատրիումի զեզօքսիխոլատը ազդեցություն է գործում լիպոսոմային թաղանթների թափանցելիության վրա միջէլիակազմավորման կոնցենտրացիայից բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում:

Abstract — It is shown that mixed liposomes egg lecithin and sodium deoxycholate are more permeable to ions than those without detergents, whereas the liposome permeability to glucose practically does not depend on detergent concentration. The sodium deoxycholate influences on the liposome membrane permeability above the critical micellization concentration.

Ключевые слова: липосомальная мембрана, ионная проницаемость, детергент.

Известно, что детергенты в высоких концентрациях используются для солюбилизации биологических мембран. При более низких концентрациях они включаются в белой с образованием смешанных белоев [14]. Соотношение детергент:липид, при котором происходит включение детергента в белой с сохранением липидной белойной структуры, зависит как от природы детергента и липида, так и от ионной силы и температуры раствора, причем в большинстве случаев это соотношение не