

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КАТЕХОЛАМИНОВ, КАК ОДНО ИЗ ЗВЕНЬЕВ ИХ АНТИСТРЕССОРНОГО ЭФФЕКТА

УДК 615.03

© Г. Н. Шилов, В. А. Иванютин

Минский государственный медицинский университет, Минск, Белоруссия

Ключевые слова:

катехоламины; адреналин; норадреналин; дофамин; эмоксипин; апоморфин; галоперидол; перекисное окисление липидов; кора больших полушарий мозга; крысы.

Резюме

Исследовали антиоксидантную активность некоторых природных катехоламинов (адреналин, норадреналин, дофамин), водорастворимого антиоксиданта эмоксипина, агониста (апоморфин) и антагониста (галоперидол) рецепторов дофамина по их влиянию на скорость образования малонового диальдегида и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах и суспензии клеток коры больших полушарий мозга крыс. Все исследованные катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин) уже в концентрации 10^{-4} М и 10^{-5} М обладают хорошим (составимым с эмоксипином) антиоксидантным эффектом. Наибольший антиоксидантный эффект отмечен у апоморфина. Ингибирующее влияние апоморфина на ПОЛ в мембранах нейронов коры больших полушарий мозга может реализоваться как через рецепторы дофамина, так и посредством «прямой» антиоксидантной активности.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широко известно, что продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), изменяя конформацию белково-липидных структур, то есть их физико-химические свойства (в частности, повышая их полярность) могут влиять на активность мембранносвязанных ферментов и рецепторных комплексов как возбудимых, так и других типов мембран [1–4]. С другой стороны, соединения, тормозящие ПОЛ, т. е. антиоксиданты (АО), играют огромную роль в поддержании клеточного гомеостаза [5]. В то же время гомеостаз клетки обеспечивается в первую очередь собственными АО системами, выработанными в процессе эволюции. Таким образом, в первую очередь актуальным представляется изучение структуры именно натуральных эндогенных АО, а также поиск и синтез на их основе новых соединений с АО-активностью. В частности, к такого рода соединениям относятся катехоламины, имеющие в своей структуре пирокатехиновое кольцо с гидроксильными группами в орто-положении [6, 7].

Считается, что пирокатехиновые соединения могут предотвращать окисление не только полиненасыщенных жирных кислот (ЖК) в гидрофобном слое мембран, но и предотвращать свободно-радикальные реакции фрагментации глико- и фосфолипидов, протекающих в наружном гидрофильном слое [8].

В этой связи нами была изучена АО-активность (влияние на скорость образования малонового диальдегида — МДА и продуктов ПОЛ альдегидной и кетонной природы — ПОЛ АК в гомогенатах и суспензии клеток коры больших полушарий (КБП) мозга крыс некоторых природных катехоламинов (адреналин, норадреналин, дофамин), водорастворимого антиоксиданта эмоксипина, а также агониста рецепторов дофамина (ДА), содержащего в своей структуре пирокатехиновое кольцо — апоморфина, антагониста ДА-рецепторов галоперидола и их комбинаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биохимические опыты проведены на белых беспородных крысах самцах массой 160–200 г. После декапитации крыс, на холоду (0–4 °С), вскрывали черепную коробку, целиком извлекали мозг, освобождая его от сосудов, кровяных сгустков и готовили на воде 10%-й гомогенат ткани. Гомогенат целого мозга или коры больших полушарий (КБП) готовили вручную или на гомогенизаторе (стекло/стекло) на холоду (0–4 °С) во избежание возрастания концентрации продуктов ПОЛ, которое наблюдается при интенсивном гомогенизировании ткани, сопровождающемся повышением температуры гомогенатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Считается, что при протекании процессов ПОЛ в организме образуются альдегиды (в частности МДА), кетоны и другие продукты карбонильной природы, способные реагировать с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), тогда как при индукции ПОЛ в системах *in vitro*, в основном, образуется МДА. В этой связи, в опытах *in vitro* при инкубации гомогенатов и суспензии клеток мозга определялась главным обра-

зом скорость образования МДА методом Т. Asakawa, S. Matushita [4] по приросту МДА в опытных пробах по сравнению с контрольными. Индукция неферментативного ПОЛ в биомембранах гомогенатов целого мозга и гомогенатах КБП проводили путем инкубации гомогенатов в 0,1 М растворе фосфатного буфера с pH 7,4 в присутствии индукционной смеси Fe²⁺ (10⁻⁶ М) и аскорбиновой кислоты: АК (10⁻⁴ М) или без нее в течение 15 мин при 37 °С. В конечном объеме инкубируемых проб (2,0 мл) содержалось 0,2 мл 10% гомогената мозга. Прекращалась индукция процессов ПОЛ добавлением в опытные пробы ЭДТА в концентрации 10⁻³ М. Измерение экстинкции проб проводили при длине 532 нм на спектрофотометре «Спекол» (Германия).

Суспензию клеток мозга крыс готовили на холоду (0–4 °С) путем продавливания навески ткани мозга, приготовленной на растворе Рингера-Локка (1:10), через шприц (без иглы, а затем с иглой: 0,15 × 30 мм). Полученную взвесь клеток на холоду центрифугировали 3 мин при 1000 g, надосадочную жидкость сливали и доводили осадок раствором Рингера-Локка до прежней концентрации. Подобную процедуру (т. е. отмывку клеток) повторяли трижды. Морфологический анализ суспензии клеток мозга показал, что она состоит в основном из целых конгломератов клеток. Определение скорости образования

МДА в суспензии клеток мозга проводили методом, описанным ранее для гомогенатов мозга, в растворе Рингера-Локка в присутствии Fe²⁺ (10⁻⁶ М) и АК (10⁻⁴ М), с периодической барботацией инкубата током воздуха. Инкубация суспензии клеток проводили при 37 °С в течение 15 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Было изучено влияние различных концентраций (10⁻⁷–10⁻³ М) дофамина, адреналина, норадреналина, водорастворимого АО эмоксипина, а также агониста рецепторов ДА — апоморфина и антагониста ДА-рецепторов — галоперидола и их сочетания на скорость образования МДА в гомогенатах КБП мозга крыс. Полученные данные представлены в таблице 1.

Из представленных данных видно, что галоперидол не влияет на процессы ПОЛ в гомогенате мозга крыс и в сочетании с апоморфином не влияет на его АО-эффект. Наибольшим АО-эффектом обладает апоморфин, который уже в концентрации 10⁻⁷ М достоверно снижает скорость образования МДА в гомогенатах КБП (см. табл. 1), тогда как адреналин, норадреналин, дофамин и эмоксипин обладают значительно меньшим ингибирующим

■ **Таблица 1.** Влияние различных концентраций некоторых катехоламинов, апоморфина, галоперидола и эмоксипина на скорость образования МДА (нмоль/г ткани*мин) в гомогенатах коры больших полушарий головного мозга крыс

Препараты	Статистические показатели	Скорость образования МДА					
		Контроль	Концентрация препаратов (М)				
			10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
Дофамин	M ± m	26,96 ± 0,65	25,44 ± 0,41	25,35 ± 0,51	22,75 ± 0,45	20,48 ± 0,43	17,50 ± 0,42
	p	–	<0,1	<0,1	<0,05	<0,01	<0,01
	%	100	94	94	84	76	65
Адреналин	M ± m	18,50 ± 0,49	18,35 ± 0,49	18,10 ± 0,47	17,32 ± 0,48	15,3 ± 0,23	12,90 ± 0,19
	p	–	<0,1	<0,1	<0,1	<0,05	<0,05
	%	100	99	98	94	83	70
Норадреналин	M ± m	19,31 ± 0,42	19,32 ± 0,42	19,34 ± 0,36	18,79 ± 0,65	16,11 ± 0,27	11,22 ± 0,45
	p	–	<0,1	<0,1	<0,1	<0,05	<0,05
	%	100	100	100	97	83	58
Апоморфин	M ± m	24,36 ± 0,42	16,34 ± 0,41	7,48 ± 0,45	1,81 ± 0,01	1,49 ± 0,01	1,16 ± 0,01
	p	–	<0,05	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
	%	100	67	31	7	6	5
Галоперидол	M ± m	15,20 ± 0,55	15,35 ± 0,41	14,90 ± 0,37	14,63 ± 0,44	15,10 ± 0,32	14,81 ± 0,29
	p	–	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	%	100	101	98	96	99	97
Эмоксипин	M ± m	15,29 ± 0,65	15,16 ± 0,12	14,64 ± 0,32	13,06 ± 0,42	8,78 ± 0,32	1,72 ± 0,02
	p	–	<0,1	<0,1	<0,05	<0,01	<0,001
	%	100	99	96	85	57	11
Апоморфин + галоперидол	M ± m	17,17 ± 0,34	10,93 ± 0,21	6,31 ± 0,63	1,95 ± 0,12	1,60 ± 0,34	1,02 ± 0,17
	p	–	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
	%	100	64	37	11	9	6

■ Таблица 2. Влияние различных концентраций апоморфина, галоперидола и их сочетаний на скорость образования МДА (нмоль/г ткани*мин) в суспензии клеток КБП головного мозга крыс

Препарат	Статистические показатели	Скорость образования МДА				
		Контроль	концентрация препаратов (М)			
			10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
Апоморфин	M ± m	11,76 ± 0,32	9,82 ± 0,23	6,09 ± 0,23	2,46 ± 0,23	1,91 ± 0,10
	p	–	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001
	%	100	84	52	21	16
Галоперидол	M ± m	11,76 ± 0,32	11,60 ± 0,42	12,31 ± 0,32	12,18 ± 0,32	12,51 ± 0,52
	p	–	>0,5	<0,2	<0,2	<0,2
	%	100	99	105	104	106
Апоморфин + галоперидол	M ± m	11,76 ± 0,32	11,44 ± 0,42	8,13 ± 0,26		
	p	–	>0,2	<0,001		
	%	100	97	70		

эффектом на ПОЛ (10⁻⁴ М, 10⁻⁴ М, 10⁻⁵ М и 10⁻⁵ М соответственно), что обусловлено, очевидно, содержанием в структуре апоморфина большого числа гидрофобных фенольных колец, способствующих лучшему внедрению пирокатехиновых гидроксильных групп в липидный бислой нейромембран, и, следовательно, более эффективной реализации АО-эффекта.

Для того чтобы выяснить в какой мере угнетающее действие апоморфина на процессы ПОЛ может реализовываться через ДА-рецепторы нами было изучено его влияние на скорость образования МДА в суспензии клеток нейронов КБП (где сохраняется определенная целостность клеточных структур и межнейрональных взаимодействий), а также влияние его антагониста — галоперидола и их сочетания. Полученные данные приведены в таблице 2. Из представленных данных видно, что апоморфин в суспензии клеток нейронов КБП (также как и в гомогенатах) достоверно снижает скорость образования МДА в концентрации 10⁻⁷ М, тогда как галоперидол во всех исследованных концентрациях (10⁻⁷–10⁻⁴ М) достоверно ее не изменяет. В то же время сочетание апоморфина (10⁻⁷ М) и галоперидола (10⁻⁷ М) приводит к устранению угнетающего действия апоморфина на ПОЛ в этой концентрации, а сочетание этих препаратов в концентрации 10⁻⁶ М также значительно ослабляет ингибирующее действие апоморфина на скорость образования МДА (см. табл. 2). Из полученных данных следует, что ингибирующее влияние апоморфина на ПОЛ в мембранах нейронов КБП в определенной степени может реализоваться и через ДА-рецепторы, для чего требуется целостность клеточных структур и сохранность межнейрональных взаимодействий. Однако даже в разрушенных клетках мозга (т. е. в его гомогенатах) АО-действие апоморфина по-прежнему сохраняется, т. е. имеет место «прямая» антиоксидантная активность (АОА), которая реализуется без участия ДА-рецепторов и поэтому не ослабляется галоперидолом. Под-

тверждением представления о прямой АО активности апоморфина в механизме ингибирования ПОЛ являются также данные о способности препарата ингибировать скорость образования МДА в гомогенатах мозжечка крыс, в котором не обнаружено ДА-рецепторов [3].

ВЫВОДЫ

1. Все исследованные катехоламины: адреналин, норадреналин, дофамин уже в концентрации 10⁻⁴ М и 10⁻⁵ М обладают хорошим (сопоставимым с эмоксипином) АО-эффектом. Это предполагает, что антистрессовый эффект катехоламинов реализуется не только через их гормональные эффекты, но и через их АО-активность, т. е. мембраностабилизирующий эффект.
2. Наибольший АО-эффект апоморфина обусловлен, очевидно, содержанием в его структуре большого числа гидрофобных фенольных колец, способствующих лучшему внедрению пирокатехиновых гидроксильных групп в липидный бислой нейромембраны.
3. Ингибирующее влияние апоморфина на ПОЛ в мембранах нейронов КБП в определенной степени может реализоваться и через ДА-рецепторы, однако в значительной степени у препарата также имеет место быть «прямая» антиоксидантная активность (АОА), которая реализуется без участия ДА-рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаклеевский А. И. и др. Мембранные и фосфолипидные механизмы действия нейромедиаторов и медиаторных взаимодействий в мозге // Интегративная деятельность нейрона: молекулярные основы. Тез. докл. — М., 1988. — С. 11.
2. Балаклеевский А. И. и др. Регуляция процессов перекисного окисления липидов в мембранах мозга

медиаторами и неротропными соединениями // Физиология и биохимия медиаторных процессов: Тез. докл. 4-й Всесоюз. конф. — М., 1985. — Т. 1. — С. 32.

3. Шилов Г.Н. Состояние процессов перекисного окисления липидов при экспериментальном судорожном синдроме и действии противосудорожных препаратов: Дис. ... канд. мед. наук. — Минск, 1989. — 192 с.
4. Asakawa T., Matushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // *Lipids*. — 1980. — Vol. 15, № 1. — P. 137–140.
5. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. — Oxford: Clarendon Press, 1999.
6. Denisov E. T. *Handbook of Antioxidants*. — Boca Raton: CRC Press, 1995.
7. Wright J. S., Johnson E. R., DiLabio G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2001. — Vol. 123. — P. 1173–1183.
8. Shadyro O. I. Radiation-induced free radical fragmentation of cell membrane components and the respective model compounds/Ed. By F. Minisci // *Free Radicals in Biology and Environment*. — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. — P. 317–329.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CATECHOLAMINES AS A CHANE OF THEM ANTISTRESS EFFECT

G. N. Shilov, V. A. Ivanyutin

◆ **Summary:** The antioxidant activity of some native catecholamines (adrenaline, noradrenaline, dopamine), water-soluble antioxidant emoxipine, agonist (apomorphine) and antagonist (haloperidol) of dopamine receptors was assessed as their influence on malonic dialdehyde content and products of lipid peroxidation in homogenates and suspension of the rat cortical brain cells. All catecholamines (adrenaline, noradrenaline, dopamine in concentrations of 10^{-4} M and 10^{-5} M) possessed a high (compartable with emoxipine) antioxidant activity. The most antioxidant effect was registered in apomorphine. The inhibitory action of apomorphine on lipid peroxidation in the brain cortex can be a result from both dopamine receptor activation and “direct” antioxidant mechanism.

◆ **Key words:** catecholamines; adrenaline; noradrenaline; dopamine; emoxipine; apomorphine; haloperidol; lipid peroxidation; brain cortex; rats.

◆ Информация об авторах

Шилов Георгий Нолианович — кандидат медицинских наук. Международный государственный экологический университет имени А. Д. Сахарова. Ул. Долгобродская, 23, Минск, 220070, Республика Беларусь. E-mail: George-Shilau@mail.ru

Иванютин Владислав Адамович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник. Институт биохимии и фармакологии НАН Белоруссии. пр. Дзержинского, 83, г. Минск, 220116, Республика Беларусь. E-mail: u.ivaniutsin@gmail.com

Shilov Georgii Nolianovich — PhD, dozent, Dept. Of Neurology, Minsk State Medical University. Dolgobrodskaya st., 23, Minsk, 220070, Belorussia. E-mail: George-Shilau@mail.ru

Ivanyutin Vladislav Adamovich — PhD, Senior Researcher, Institute of Biochemistry and Pharmacology, National Academy of Belorussia. Dzerzhinskogo, 83, Minsk, 220116, Belorussia. E-mail: u.ivaniutsin@gmail.com