

# ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

## ВЛИЯНИЕ АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА НАДФ-ОКСИДАЗНУЮ ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МАКРОФАГАХ

Н. А. Бизунок, Б. В. Дубовик<sup>1</sup>

Представлены результаты исследования модулирующего влияния адренергических агонистов (эпинефрин, норэпинефрин, изопреналин, сальбутамол, фенилэфрин, клонидин) и антагонистов (пропранолол, соталол, окспренолол, метопролол, атенолол) на генерацию активных форм кислорода (АФК) макрофагами (МФ) по данным хемилюминесцентного анализа. Установлено, что  $\beta$ -адреномиметики ингибируют, тогда как  $\alpha$ -адреномиметики стимулируют или не изменяют генерацию АФК в МФ.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, макрофаги, хемилюминесценция, адренергические агенты

### ВВЕДЕНИЕ

НАДФ-оксидазы — мембранные продуценты активных форм кислорода (АФК), еще недавно считавшиеся уникальными ферментами лейкоцитов, обнаружены в кардиомиоцитах, фибробластах, клетках сосудистого эндотелия и адвентиция, нейроэпителиальных тельцах, нейроглии, нейронах [8, 11 – 13]. Активностью НАДФ-оксидаз обеспечивается тонкая регуляция межклеточных коммуникаций, клеточного роста, деления и гибели [7, 11, 13]. С нарушением работы НАДФ-оксидаз связаны ключевые звенья процессов дегенерации и воспаления, репарации и регенерации, патологическая модификация тонуса сосудов и бронхов, синаптической передачи [1 – 3, 6, 7, 11, 13]. Поэтому изыскание способов управления НАДФ-оксидазной активностью — оригинальный подход к разработке новых средств лечения ряда сердечно-сосудистых, бронхолегочных, нейродегенеративных и дегенеративно-дистрофических заболеваний.

В этой связи изучение адренергической регуляции НАДФ-оксидазной активности и зависимых оксидантных процессов представляется перспективным по нескольким причинам. Во-первых, все клетки, способные к экспрессии НАДФ-оксидаз, включая лейкоциты, клетки соединительной ткани и эндотелия, имеют адренергические рецепторы, значение которых для реализации специфических функций этих клеток мало изучено [5, 11, 12]. Во-вторых, эндогенные адренергические агонисты участвуют в реализации тех же физиологических ответов и развитии тех же патологических состояний, что и НАДФ-оксидазы. И, наконец, адренергические лекарственные средства различного характера действия, рецепторной селективности ши-

роко используются в лечении подобных патологических состояний, однако их действие на активность НАДФ-оксидаз и зависимые оксидантные процессы не изучено или только начинает изучаться [10, 14]. Не исключено, что научный поиск в этом направлении поможет обосновать новые способы коррекции патологических состояний, зависимых от активности НАДФ-оксидаз.

Целью работы явилось изучение модулирующего действия адренергических агентов на НАДФ-зависимое образование АФК в клеточной модельной системе.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на изолированных перитонеальных макрофагах беспородных крыс-самцов массой 180 – 220 г. Клетки получали промыванием брюшной полости 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. Полученная суспензия содержала более 98 % жизнеспособных клеток по результатам теста с трипановым синим (0,1 %). При дифференцированном подсчете их в окрашенных мазках макрофаги составляли около 90 %.

Макрофагальную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в условиях спонтанной (СХЛ) и взрывной (ИХЛ) генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251 – 002 (Финляндия). Исследовали адренергические агонисты: эпинефрин (“Здоровье”, Украина), норэпинефрин (“Serva”, Германия),  $\alpha_1$ -адреномиметик фенилэфрин (ГНЦЛС, Украина),  $\alpha_2$ -адреномиметик клонидин (“Kalceks”, Латвия),  $\beta_1, \beta_2$ -адреномиметик изопреналин (“Serva”, Германия),  $\beta_2$ -адреномиметик сальбутамол (“Варшавский фармацевтический завод”, Польша); блокаторы  $\beta$ -адренорецепторов: *неселективные* — пропранолол (“ISIS Pharma GmbH”, Германия), окспренолол (“Reanal”, Венгрия), соталол (“KRKA”,

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. Б. В. Дубовик) Белорусского государственного медицинского университета, Беларусь, Минск, 220016, пр. Дзержинского, 83.

Словения);  $\beta_1$ -селективные — метопролол, атенолол (“Astra Zeneca”, Великобритания); а также циклический ди-бутирил цАМФ, изобутил-метил-ксантин (“Sigma”, Германия), теofilлин (“Новосибхмфарм”, Россия).

Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемым агентом в интервале концентраций  $10^{-9}$  –  $10^{-3}$  М при температуре 20 – 25 °С; контрольные пробы агентов не содержали. Каждый опыт проводили на клетках одного животного, опыт включал группу проб, содержащих индуктор фагоцитоза, в которых оценивали ИХЛ, и группу проб без индуктора для регистрации СХЛ. При исследовании ИХЛ проба содержала в 1 мл бесцветной среды Хенкса:  $10^6$  жизнеспособных макрофагов, изучаемое вещество ( $10^{-9}$  –  $10^{-3}$  М), люминол ( $7 \cdot 10^{-5}$  М), опсонизированный зимозан ( $5 \cdot 10^7$  частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения. В контрольные пробы вместо изучаемых агентов добавляли эквивалентное количество среды. СХЛ оценивали в отсутствие индуктора. Люминесценцию регистрировали поочередно в пробах, содержащих изучаемый агент, и контрольных при постоянной температуре (37 °С) в дискретном режиме с интервалом 2 – 3 мин на протяжении 30 мин. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC). Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые агенты, выражали в процентах к контрольным. Количество повторных опытов варьировало от 3 до 8.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного *t*-критерия. Различия считали достоверными при вероятности ошибки  $\leq 5\%$ . Эффективные концентрации агентов (ЕС) определяли методом регрессионного анализа в программе Statistica.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Действие адреноблокаторов.**  $\beta_1, \beta_2$ -Адреноблокаторы, обладающие внутренней симпатомиметической (окспренолол) или выраженной мембраностабилизирующей (пропранолол) активностью ингибировали ХЛ макрофагов, тогда как соталол, лишенный указанных свойств, не изменял генерацию фагоцитами АФК.

$\beta_1$ -Адренергический антагонист метопролол не оказывал влияния на спонтанную и индуцированную наработку оксидантов макрофагами, тогда как атенолол усиливал оба процесса (табл. 1).

**Действие адrenomиметиков.**  $\alpha$ -,  $\beta$ -Адренергический агонист эпинефрин стимулировал образование АФК в макрофагах. Эффект появлялся при концентрации  $0,7 \cdot 10^{-8}$  М и сохранялся в широком диапазоне ( $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  М), достигая 80 – 90 % (табл. 2). На спонтанную генерацию АФК эпинефрин заметного влияния не оказывал. Агонисты  $\beta$ -адренорецепторов ( $\beta$ -АР) ингибировали образование АФК в макрофагах. Ингибирующий эффект изопrenalина появлялся при  $10^{-7}$  М и нарастал с увеличением концентрации вплоть до полного подавления ХЛ клеток (табл. 2). Аналогичный эффект агониста  $\beta_2$ -АР салбутамола в отношении ИХЛ был менее выражен, однако салбутамол значительно подавлял СХЛ: эффект насыщения достигался уже при  $10^{-8}$  М (– 40 %). Ингибирующая активность салбутамола в отношении СХЛ коррелировала прямо с количеством АФК, генерируемым макрофагами без индукции ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,05$ ), и обратно — со способностью клеток отвечать на индуктор ( $r = -0,49$ ;  $p < 0,01$ ).

Уточнить природу модулирующего влияния изопrenalина и эпинефрина на фагоцитарную генерацию АФК позволило исследование в условиях оккупации  $\beta$ -АР соталолом и пропранололом. Ингибирующее действие изопrenalина ( $10^{-5}$  М) на спонтанную и индуцированную ХЛ макрофагов полностью нивелировалось после преинкубации фагоцитов с соталолом ( $10^{-3}$  М,  $p < 0,01$ ). Пропранолол ( $10^{-6}$  М) не изменял ингибирующий эффект изопrenalина, как и стимулирующий — эпинефрина ( $10^{-6}$  М) в отношении ИХЛ.

**Модуляторы циклазных каскадов.** Известно, что стимуляция  $\beta$ -АР сопровождается активацией аденилатциклазы и значительным (до  $10^{-3}$  М) увеличением содержания в клетке свободного цАМФ [5]. Дибутирил-цАМФ ингибировал индуцированную и спонтанную ХЛ макрофагов примерно на 40 % ( $10^{-4}$  М,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о высокой чувствительности макрофагальных механизмов генерации АФК к

Таблица 1. Влияние адренергических антагонистов на хемилюминесценцию (ХЛ) макрофагов

Вещество, (n)	Рецептор	ИДК	Индуцированная ХЛ			Спонтанная ХЛ		
			ЕС <sub>min</sub>	ЕС <sub>max</sub>	Е <sub>max</sub> , %	ЕС <sub>min</sub>	ЕС <sub>max</sub>	Е <sub>max</sub> , %
Пропранолол (5)	$\beta_1, \beta_2$	$10^{-7} - 3 \cdot 10^{-5}$	$10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$-33,3 \pm 2,1^{**}$	(-)	(-)	(-)
Соталол (3)	$\beta_1, \beta_2$	$10^{-8} - 10^{-3}$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Окспренолол (3)	$\beta_1, \beta_2$	$10^{-8} - 10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$-57,3 \pm 1,6^{**}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$-94,8 \pm 0,4^{**}$
Метопролол (3)	$\beta_1 > \beta_2$	$10^{-8} - 10^{-3}$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Атенолол (5)	$\beta_1 > \beta_2$	$10^{-8} - 3 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$+57,1 \pm 13,6^*$	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$+67,5 \pm 20,5^*$

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 время преинкубации макрофагов в присутствии изучаемых веществ — 10 мин; ИДК — исследованный диапазон концентраций, моль; ЕС<sub>min</sub>/ЕС<sub>max</sub> — минимальная/максимальная эффективные концентрации в молях ( $p < 0,05$ ); Е<sub>max</sub>, % — максимальный эффект (прирост или снижение АUC ХЛ в сравнении с контролем,  $M \pm m$ ); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

медиаторам аденилатциклазного каскада. С другой стороны, внутриклеточное содержание циклических нуклеотидов регулируется активностью фосфодиэстеразы (ФДЭ), которая в высоких концентрациях подавляется ксантинами, что приводит к увеличению содержания циклических нуклеотидов в клетке. Исследование в клеточном тесте теофиллина и изобутилметил-ксантина (ИБМК) показало, что оба агента при концентрациях выше  $10^{-5}$  М подавляют спонтанное и индуцированное образование оксидантов:  $EC_{50}$  теофиллина составила  $2 \cdot 10^{-4}$  М;  $EC_{50}$  ИБМК —  $3,6 \cdot 10^{-5}$  М ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, адренергические соединения модифицируют генерацию АФК в макрофагах. Действие  $\beta$ -АБ не зависит от селективности в отношении определенных подтипов  $\beta$ -АР и связано, скорее, с проявлением мембранотропных свойств или симпатомиметической активностью. Действие адреномиметиков, напротив, различалось в зависимости от рецепторной специфичности, селективности и наличия внутреннего оксидантного потенциала. Так, стимулирующее действие эпинефрина (адреналина) на ХЛ макрофагов может быть связано с образованием его семихинонового радикала — адренохрома, способного инициировать свободнорадикальные процессы [1, 4]. Предполагается, что прооксидантный потенциал адреналина реализуется *in vivo*, например, при стрессе, когда его уровень в плазме крови значительно возрастает, превышая базальный в десятки раз, и может достигать  $10^{-7} - 10^{-6}$  М [4]. Нами показано, что при этих же концентрациях адреналин усиливает генерацию АФК в клеточной системе (см. табл. 2).  $\beta$ -Адреномиметики изопреналин и сальбутамол ингибируют клеточную генерацию АФК. Предварительная инкубация клеток с  $\beta_1, \beta_2$ -АБ соталолом приводила к устранению модулирующих влияний изопреналина, что позволяет связать его действие с активацией  $\beta$ -АР макрофагов. Интересен тот факт, что пропранолол не изменял модулирующего действия эпинефрина или изопреналина в отношении ИХЛ. Известно, что пропранолол подавляет внутриклеточную передачу сигнала через фосфолипазу Д и протеинкиназу С [14, 16] — ферменты, необходимые для активации НАДФ-оксидаз [8, 9], что неизбежно приводит к снижению генерации АФК в таких

клетках. Стимуляция  $\beta$ -АР клеток активирует аденилатциклазы, что приводит к увеличению внутриклеточного уровня цАМФ [5]. Изучение дибутирил-цАМФ и ингибиторов ФДЭ показало их ингибирующее действие на ХЛ макрофагов, что подтверждает возможность специфического действия  $\beta$ -АМ на фагоцитарную генерацию АФК. Интересно, что эффективность изопреналина и сальбутамола в отношении индуцированной и спонтанной продукции АФК различна. Это может быть обусловлено, на наш взгляд, особенностями лиганд-рецепторных взаимодействий при различных состояниях фагоцитов. Ингибирующее действие сальбутамола более выражено в отношении спонтанной ХЛ, коррелирует прямо с исходным уровнем спонтанной продукции АФК и обратно — со способностью клеток отвечать на индуктор. Известно, что адренорецепторы некоторых клеток при определенных условиях способны переходить в неактивное состояние, что проявляется снижением чувствительности к адреномиметическим влияниям [5]. Возможно, при индукции респираторного взрыва происходит переход  $\beta_2$ -АР в неактивное состояние, приводя к уменьшению модулирующего действия  $\beta_2$ -АМ на генерацию АФК. Можно предположить, что отдельные типы и подтипы  $\beta$ -АР в различной степени подвергаются рецепторной трансформации, благодаря чему эффекты селективных адренергических агонистов могут значительно отличаться.

При исследовании  $\alpha$ -АМ установлено, что фенилэфрин, стимулирующий преимущественно  $\alpha_1$ -АР, усиливал индуцированную генерацию АФК в макрофагах. Стимуляция  $\alpha_1$ -АР увеличивает проницаемость клеточных мембран для ионов  $Ca^{2+}$  [5], который необходим для сборки и активации НАДФ-оксидаз [9]. Возможно, из-за низкой потребности нестимулированных клеток в свободном  $Ca^{2+}$ , спонтанное образование АФК в присутствии фенилэфрина не изменялось. Стимуляция  $\alpha_2$ -АР сопровождается снижением активности аденилатциклазного каскада [5] без существенной модификации иных путей внутриклеточной сигнализации, возможно, поэтому преинкубация макрофагов с клонидином не изменяла ни спонтанную, ни индуцированную генерацию АФК. Активация адренорецепторов различных типов норэпинефрином приводит к

Таблица 2. Влияние адренергических агонистов на хемилюминесценцию (ХЛ) фагоцитов

Вещество, (n)	Рецептор	ИДК	Индукцированная ХЛ			Спонтанная ХЛ		
			$EC_{min}$	$EC_{max}$	$E_{max, \%}$	$EC_{min}$	$EC_{max}$	$E_{max, \%}$
Эпинефрин (8)	$\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$	$10^{-8} - 10^{-5}$	$10^{-7}$	$10^{-5}$	$+ 86,5 \pm 39,0^*$	(-)	(-)	(-)
Норэпинефрин (5)	$\alpha_1, \alpha_2, \beta_1$	$10^{-10} - 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$10^{-5}$	$- 18,6 \pm 3,8^*$	$3 \cdot 10^{-6}$	$10^{-5}$	$- 20,4 \pm 1,9^*$
Фенилэфрин (4)	$\alpha_1 > \alpha_2$	$10^{-8} - 10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$+ 48,8 \pm 18,2^*$	(-)	(-)	(-)
Клонидин (7)	$\alpha_2 > \alpha_1$	$10^{-9} - 10^{-6}$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Изопреналин (4)	$\beta_1, \beta_2$	$10^{-9} - 10^{-4}$	$10^{-6}$	$10^{-4}$	$- 74,0 \pm 2,3^{**}$	$10^{-6}$	$10^{-4}$	$- 61,2 \pm 9,0^{**}$
Сальбутамол (5)	$\beta_2 > \beta_1$	$10^{-8} - 10^{-3}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$- 23,3 \pm 6,3^*$	$10^{-8}$	$10^{-5}$	$- 49,9 \pm 8,4^*$

сложным взаимодействиям различных путей внутриклеточной передачи сигнала, что проявлялось в нашем эксперименте незначительной модификацией генерации оксидантов.

Таким образом, модулирующее действие адренергических соединений в отношении клеточной генерации АФК обеспечивается их специфической активностью, регуляцией внутриклеточных процессов, а также собственным оксидантным потенциалом. Большинство исследованных соединений действует в концентрациях, близких к фармакологическим, что свидетельствует о возможности использования адренергических средств для управления генерацией АФК *in vivo*. С другой стороны, относительная резистентность индуцированной и особенно спонтанной генерации оксидантов к адренергическим влияниям, может являться эволюционно закрепленным способом сохранения окислительного гомеостаза при значительных колебаниях концентрации эндогенных адреномиметиков, ограничивая развитие стресс-ассоциированной патологии.

## ВЫВОДЫ

1.  $\beta$ -Адренергические антагонисты, не обладающие внутренней симпатомиметической или мембранотропной активностью (соталол, метопролол) не влияли на макрофагальную генерацию оксидантов в диапазоне концентраций ( $10^{-8}$  –  $10^{-3}$  М). Модифицирующее действие пропранолола, окспренолола, атенолола, вероятно, обусловлено их неспецифическим действием на внутриклеточные механизмы реализации сигнала.

2. Действие  $\beta$ -адреномиметиков различалось в зависимости от их рецепторной специфичности и внутреннего оксидантного потенциала. Стимулирующим влиянием на макрофагальную генерацию АФК обладали неселективный адренергический агонист эпинефрин ( $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  М) и специфический  $\alpha_1$ -агонист фенилэфрин ( $10^{-6}$  М). Ингибирующее действие оказывали неизбирательный  $\beta$ -адренергический агонист

изопреналин ( $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  М) и селективный  $\beta_2$ -адреномиметик сальбутамол ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  М).

3. Изучение механизмов ингибирующего действия  $\beta$ -адреномиметиков показало, что эффект обусловлен их специфической активностью в отношении  $\beta$ -адренорецепторов, стимуляция которых индуцирует аденилатциклазный каскад внутриклеточной сигнализации и дальнейшую передачу сигнала через цАМФ. Испытание различных агентов, повышающих концентрацию цАМФ в клетке (дибутирил-цАМФ, теofilлина, ИБМК) обнаружило эффективное подавление клеточной продукции оксидантов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Н. И. Бахов, Ю. Ф. Майчук, А. В. Корнев, *Усп. совр. биол.*, **120**(1), 23 – 35 (2000).
2. А. А. Болдырев, М. Л. Куклей, *Нейрохимия*, № 13, 271 – 278 (1996).
3. М. С. Волин, К. А. Дэвидсон, П. М. Каминская и др., *Биохимия*, **63**(7), 958 – 965 (1998).
4. Ю. А. Зозуля, В. А. Барабой, Д. А. Сутковой, *Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга*, Знание, Москва (2000).
5. Г. А. Козлов, *Адренергическая регуляция: молекулярные механизмы*, Техника, Киев (1993).
6. А. В. Пескин, *Биохимия*, **62**(12), 1571 – 1579 (1997).
7. В. П. Скулачев, *Биохимия*, **66**(10), 1425 – 1429 (2001).
8. В. М. Babior, *Blood*, **93**(5), 1464 – 1476 (1999).
9. G. M. Bokoch and B. A. Diebold, *Blood*, **100**(8), 1464 – 1476 (2002).
10. J. C. Gay and J. J. Murray, *Biochim. Biophys. Acta*, **1095**(3), 2692 – 2696 (1991).
11. K. K. Griendling, D. Sorescu, and M. Uschio-Fukai, *Circ. Res.*, **86**, 494 – 501 (2000).
12. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, J. I. Gallin, I. M. Goldstein, R. Snyderman eds., Raven Press, New York, 1186 (1992) p. 510 – 680.
13. H. Ischiropoulos and J. S. Beckman, *J. Clin. Invest.*, **111**(2), 163 – 169 (2003).
14. C. P. Nielson and N. E. Hadjokas, *Am. J. Respir. Crit. Care Medicine*, **157**, 184 – 191 (1998).
15. Pathology, E. Rubin, J. L. Farber eds., with 39 contributors, *Lippincott company*, **1578**(1994), p. 16 – 62.
16. C. S. Sozzani, D. E. Agwu, C. E. Mc Call, et al., *J. Biol. Chem.*, **267**(28), 20481 – 20488 (1992).

Поступила 19.01.06

## INFLUENCE OF ADRENERGIC DRUGS ON NADPH OXYDASE EVOKED PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN BY MACROPHAGES

N. A. Bizunok and B. V. Dubovik

Belarusian State Medical University, ul Dzerzhinskogo 83, Minsk, 220016 Belarus

The effects of adrenergic agonists (epinephrine, norepinephrine, isoprenaline, salbutamol, phenylephrine, clonidine) and antagonists (propranolol, sotalol, oxprenolol, methoprolol, atenolol) on the production of reactive oxygen (RO) by macrophages (MFs) were studied *in vitro* using chemiluminescence techniques. It was established that  $\beta$ -adrenomimetics suppressed, whereas  $\alpha$ -adrenomimetics enhanced or did not change the RO, production by MFs. Possible mechanisms and the biological significance of the adrenergic modulation NADPH-dependent RO, generation are discussed.