НЕЙРОХИМИЯ

т. 8, № 1, 1989

УДК 577.354.9

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА АКТИВНОСТЬ м-ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС

ХОХЛОВ А. П.

Научно-исследовательский институт урологии, Москва

Изучено влияние *in vivo* и *in vitro* синтетических водорастворимых антиоксидантов из класса экранированных фенолов на активность мускариновой холинергической (м-холинергической) системы головного мозга крыс. Обнаружено, что влияние антиоксидантов на передачу сигнала в указанной рецепторной системе реализуется не на уровне регуляции комплексообразования специфических лигандов с рецепторным центром связывания, а на уровне трансмембранного переноса информационного сигнала. Данное влияние, осуществляемое *in vitro* при концентрациях антиоксидантов выше 10 мкМ, связано, по-видимому, с их неспецифическим взаимодействием с клеточными мембранами и опосредовано изменением физико-химического состояния мембранных липидов. Эффективность действия *in vivo* фенольных антиоксидантов на активность м-холинергической системы головного мозга крыс в наномолярных концентрациях не может быть объяснена с помощью указанного механизма. Предположено, что подобная низкоконцентрационная эффективность объясняется наличием специфических мест связывания для синтетических водорастворимых антиоксидантов из класса экранированных фенолов, взаимодействием данных соединений с клеточными плазматическими мембранами по рецепторному механизму и опосредованным через такое взаимодействие влиянием антиоксидантов на активность различных функциональных систем клетки, в том числе и на активность других мембранных рецепторных систем.

В настоящее время считается не подлежащим сомнению тот факт, что регуляция многочисленных биохимических процессов в организме опосредуется через систему клеточных мембран и, в частности, через физико-химический статус последних. Важнейшую роль в определении направленности указанных процессов играют изменения в липидной фазе мембран клеточных органелл, например, изменения липидного состава, уровня окисленности мембранных липидов, их микровязкости, полярности и др. Изменения многочисленных физико-химических параметров липидной фазы не происходят в отрыве друг от друга, а тесно взаимосвязаны между собой. Вышесказанное нашло отражение в гипотезе о наличии в организме млекопитающих замкнутого самоподдерживающегося контура регуляции, основой которого являются изменения в уровне реакций ПОЛ кле-

точных мембран, в липидном составе и подвижности, регулирующих протекание биохимических реакций в клетке [1].

Ранее нами было показано, что направленное изменение в липидной фазе мембран уровня окислительных реакций (за счет введения животным синтетических антиоксидантов) приводило не только к изменению физико-химических характеристик липидов синаптосом головного мозга крыс, но и к изменению активности м-холинергической системы мозга, анализируемой *in vivo* с помощью ареколинового теста [2]. При анализе экспериментальных данных по изменению текучести и состава липидов синаптосом выяснилось, что после введения животным водорастворимый антиоксидант проявлял двуфазный характер своего действия на липидный бислой. Первоначально регистрировалось кратковременное изменение ряда липидных показателей в одну, а затем, на гораздо более продолжительный период времени, в другую, отличную от контроля, сторону, что послужило предпосылкой для гипотезы о существовании еще одного (кроме антирадикального) механизма действия синтетических антиоксидантов на клеточный метаболизм. Вероятно, антиоксидант, как биологически активное вещество, действует по типу рецепторного взаимодействия с мембраной. Такого рода действие антиоксидантов на клетку предполагает наличие специфических мест связывания для этих веществ на плазматической мембране клеток. Возможен также рецепторноподобный путь влияния синтетических антиоксидантов на клеточный метаболизм, опосредованный неспецифическим взаимодействием препарата с клеточной мембраной, когда подобное взаимодействие приводит к изменению структуры мембранного бислоя, а следовательно, и к изменению активности мембраносвязанных рецепторных комплексов, специфичных к другим биологически активным веществам.

С целью выяснения правомочности последнего предположения и была выполнена настоящая работа, посвященная изучению влияния *in vivo* и *in vitro* синтетических водорастворимых антиоксидантов из класса экранированных фенолов на активность одной из важнейших рецепторных систем регуляции биологической активности организма—м-холинергической системы головного мозга крыс.

Материалы и методы

В работе были использованы крысы-самцы линии *Wistar*, массой 180—200 г, содержавшиеся на стандартном виварном рационе.

Синаптосомы изолировали из больших полушарий головного мозга крыс по методу, описанному ранее [3], чистоту препаратов синаптосом оценивали с помощью электронной микроскопии ультратонких срезов, после заливки препаратов в «Эпон-812», на электронном микроскопе «JEM-100 CX» (Япония). Полученные изображения для синаптосомной фракции существенно не отличались от тех, которые приведены в соответствующей методической работе [4].

Солюбилизацию м-холинорецепторов проводили при 40-минутной обработке фракции синаптосом головного мозга крыс 1%-ным раствором ди-

гитонина в среде, содержавшей 1 мМ Na_2ЭДТА, 1 М NaCl, 50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,4 [5].

При изучении влияния антиоксидантов на процесс комплексообразования лиганда с м-холинорецепторами использовали специфический антагонист этих рецепторов [^{3}H]хинуклидинилбензилат (ХНБ; «Amersham», Англия, удельная радиоактивность 12,3 Ки/ммоль). Синаптосомы (500 мкг белка/мл) инкубировали 60 мин при 25° с [^{3}H]ХНБ (10 нМ) в среде следующего состава (в мМ): N-2-оксиэтилпиперазин, N′-2-этансульфоновая кислота (HEPES)—5; KCl—125; $CaCl_2$—1; $MgCl_2$—1; KH_2PO_4—0,5; pH 7,4. Фракцию солюбилизированных м-холинорецепторов (250 мкг белка/мл) инкубировали с [^{3}H]ХНБ при тех же условиях в среде следующего содержания (в мМ): трис-HCl-буфер—50; Na_2ЭДТА—1; NaCl—1; полиэтиленгликоль-6000—7,5%; БСА—0,35%; pH 7.7. Специфическое связывание определяли как долю суммарного, блокируемого атропин-сульфатом (10 мкМ). Разделение связанного и свободного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования через фильтры GF («Whatman», Англия) [6]. Во всех случаях учитывалось неспецифическое связывание меченых препаратов с фильтрами.

При исследовании структурного состояния мембранного липидного бислоя методом ЭПР-спектроскопии использовали два гидрофобных спиновых зонда: доксильное производное стеариновой кислоты с нитроксидным кольцом при 5-м атоме углеродного скелета (5-доксилстеарат; «Sigma», США) и 2,2,6,6-тетраметил-4-пальмитоилоксипиперидин-1-оксил (15С). Конечная концентрация зондов в образцах составляла 100 мкМ; концентрация белка в исследуемых суспензиях синаптосом равнялась 5 мг/мл. Подвижность зонда 15С в липидном бислое оценивали по времени вращательной корреляции τ_c из уравнения для быстрого изотропного вращения спин-зондов [7]. В случае зонда 5-доксилстеарата, в качестве меры анизотропии вычисляли параметр упорядоченности S [7].

ПОЛ в синаптосомах оценивали по поглощению конъюгированных диеновых структур при 233 нм, после перевода экстрагированных липидов в гексан. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Hitachi-557» (Япония).

В качестве суммарной оценки отношения активности м-холинергической рецепторной системы ЦНС крыс к действию определенной дозы антиоксиданта использовали ареколиновый тест [8]. Последовательное введение растворов м-холиномиметика ареколина различной концентрации позволяет определить эффективную дозу, при которой у 50% животных выборки наблюдается тремор спинной мускулатуры (ED_{50}). Смещение этого показателя позволяет судить об изменении чувствительности ЦНС к действию той или иной дозы эффекторного вещества и характеризует изменение активности м-холинергической рецепторной системы.

Содержание в образцах cGMP определяли радиоиммунным методом с использованием стандартного набора реактивов фирмы «Amersham» (Англия) [9].

В качестве водорастворимых синтетических антиоксидантов в работе

были использованы препараты из класса экранированных фенолов: γ-(4 окси-3,5-дитрет.бутилфенол) пропионовая кислота (фенозан) и калиевая соль фенозана (K^+-фенозан). Автор благодарит сотрудников института химической физики АН СССР В. В. Ершова и Л. Г. Плеханову за антиоксиданты, предоставленные ими для проведения настоящей работы.

Результаты и обсуждение

На рис. 1, *а* представлена дозовая зависимость влияния антиоксидантов на активность *in vivo* м-холинергической системы ЦНС крыс, исследованная с помощью ареколинового теста. Можно видеть, что через 30 мин после внутрибрюшинного введения эффективными являются весьма низкие дозы фенозана и K^+-фенозана—до 1 мкг на кг веса животных; ука-

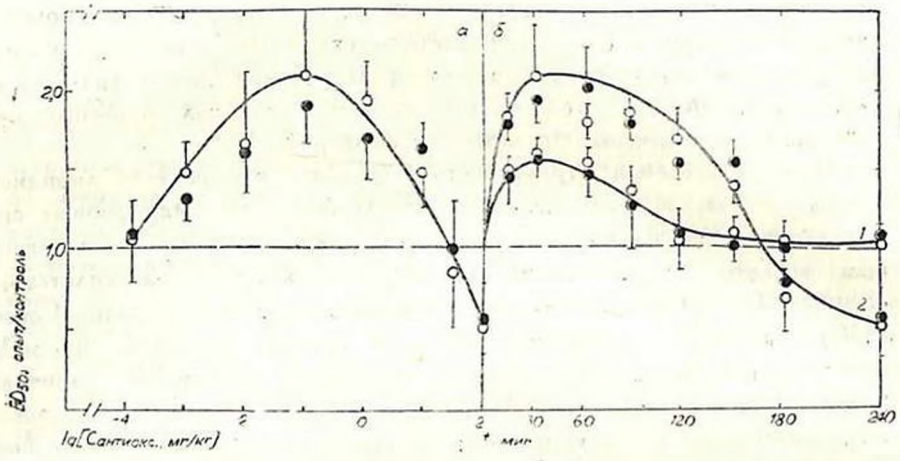

Рис. 1. Дозовая (*а*) и временная (*б*) зависимости эффективности тремор-ного действия ареколина при внутрибрюшинном введении крысам фенозана (●) и K^+-фенозана (○). *а*—время измерения—30 мин после введения антиоксидантов подопытным животным. *б*—дозы вводимых антиоксидантов: 10 мкг/кг (*1*) и 100 мкг/кг (*2*)

занная нижняя граница эффективных доз приблизительно соответствует наномолярным концентрациям данных препаратов в организме крысы при условии их равномерного распределения по органам. Различные дозы антиоксидантов в одно и то же время после введения вызывают неодинаковые по направленности изменения в активности м-холинергической системы крыс. Через 30 мин после внутрибрюшинного введения животным фенозан и K^+-фенозан в концентрационном диапазоне от 1 мкг до 10 мг/кг веса вызывали снижение чувствительности нейромедиаторной системы, в то время как дозы фенольных антиоксидантов выше 10 мг/кг ее повышали (рис. 1, *а*) Временная зависимость эффективности действия ареколина на активность м-холинергической системы ЦНС крыс (рис. 1, *б*) при внутрибрюшинном введении животным препарата в дозе 100 мкг/кг веса имеет сложную форму: первоначально наблюдается умень-

шение чувствительности ЦНС к действию ареколина, что особенно выражено через 30 мин действия антиоксидантов, а затем она возрастает, превышая контрольные значения. При введении крысам фенозана и К⁺-фенозана в дозе 10 мкг на кг веса тела ко второму часу наблюдается исчезновение эффекта, что, скорее всего, связано с выведением к этому времени малых доз препарата из организма. В то же время, более высокая доза антиоксидантов и по прошествии 2-х ч после введения продолжает оказывать влияние на активность м-холинергической системы ЦНС крыс (рис. 1. *б*).

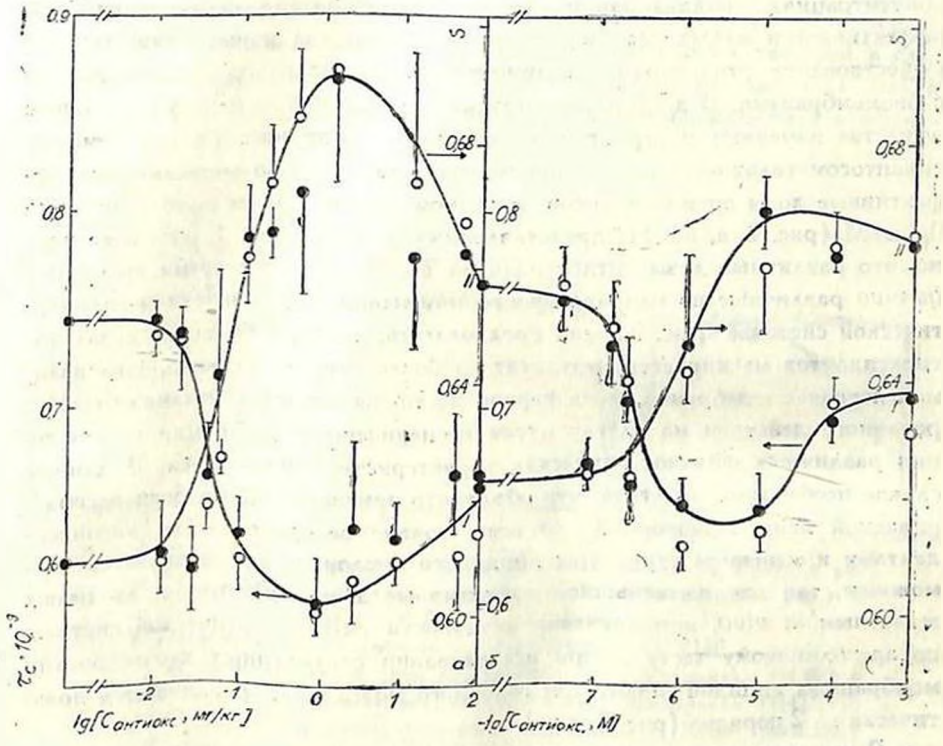

Рис. 2. Дозовые зависимости времени вращательной корреляции τ_c (*I*; спин-зонд 15С) и параметра упорядоченности липидной фазы S (*II*, спин-зонд 5-доксилстеарат) синаптосом головного мозга крыс при действии фенозана (●) и К+-фенозана (○) *in vivo* (*а*) и *in vitro* (*б*), $t^{\circ}_{измер.}$ 25°. *а*—через 30 мин после внутрибрюшинного введения антиоксидантов, *б*—время инкубации суспензии синаптосом с антиоксидантами—30 мин при 25°

Анализ структурного состояния липидной фазы синаптосом головного мозга крыс через 30 мин после действия *in vivo* антиоксидантов показал, что действие препаратов в дозах от 50 мкг до 100 мг на кг веса подопытных животных вызывало достоверное, по отношению к контролю, уменьшение микровязкости липидного бислоя (рис. 2, *а*). Упорядоченность липидной фазы мембран синаптосом, анализируемая с помощью

5-доксилстеарата, превышала контрольные значения в диапазоне исследованных концентраций фенозана и K^+-фенозана от 50 мкг до 100 мг/кг веса животных, с максимумом в области дозы 1 мг/кг (рис. 2, *а*). На рис. 2, *б* можно видеть аналогичный, в целом, ход кривых, описывающих зависимость структурных параметров липидного бислоя синаптосом от концентрации примененных антиоксидантов при инкубации *in vitro* в течение 30 мин.

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что фенолсодержащие синтетические антиоксиданты могут оказывать *in vivo* эффективное влияние на активность м-холинергической системы ЦНС в крайне низких концентрациях, порядка наномолярных. На наш взгляд, наличие подобной эффективности малых доз синтетического вещества может указывать на существование рецепторного взаимодействия фенольных антиоксидантов с биомембранами. В достаточно низких дозах *in vivo* и *in vitro* данные вещества изменяют и структурное состояние липидного бислоя мембран синаптосом головного мозга подопытных животных, но минимальные эффективные дозы антиоксидантов в данном случае равны приблизительно 0,2 мкМ (рис. 2, *а, б*). Из представленных данных (рис. 1, *а*) также видно, что различные дозы антиоксидантов в одно и то же время вызывают *in vivo* различные по направленности изменения в активности м-холинергической системы крыс. Можно предполагать, что при больших дозах антиоксидантов маскируется результат их более тонкого рецепторного взаимодействия с мембраной, и на первое место выдвигается механизм массированного действия на клетку путем неспецифической сорбции и изменения различных физико-химических характеристик биомембран. В данном случае необходимо отметить, что объяснить изменение активности рассматриваемой нейромедиаторной системы только опосредованным антиоксидантами изменением структуры липидного бислоя не представляется возможным, так как наименьшие эффективные дозы препаратов, вводимых животным *in vivo*, при изучении активности м-холинергической системы по ареколиновому тесту и при исследовании структурных характеристик мембранных липидов синаптосом головного мозга крыс, различаются практически на 2 порядка (рис. 1, *а* и 2, *а*).

В последние годы появились работы, в которых показана роль фосфолипидов и, в частности, продуктов их пероксидации в связывании специфических лигандов с рецепторами в ЦНС [10]. При инкубации *in vitro* в течение 1 ч при 37° суспензии синаптосом мы наблюдали индукцию образования первичных продуктов ПОЛ, причем накопление конъюгированных диеновых структур ингибировалось внесением в среду инкубации фенольных антиоксидантов в концентрациях, превышающих 10 мкМ (рис. 3). Исходя из сказанного, можно было бы ожидать эффективного действия в этих дозах ингибиторов ПОЛ на процесс специфического комплексообразования лигандов с м-холинорецепторами; однако такого влияния обнаружено не было. Ни фенозан, ни K^+-фенозан не влияли *in vitro* на специфическое связывание [^{3}H]ХНБ с м-холинорецепторами синаптосом головного мозга крыс в дозах ниже 1 мМ; при весьма значительных концентра-

циях антиоксидантов (выше 1 мМ) указанное связывание ингибировалось (рис. 4). Ранее нами было обнаружено, что при солюбилизации опиоидных рецепторов головного мозга крыс дигитонином увеличивалась эффективность влияния синтетического фенольного антиоксиданта на процесс комплексообразования специфического лиганда [^{3}H]налоксона с этими рецепторами, что мы объясняли увеличением доступности гидрофобной, мембраносвязанной части опиоидного рецептора для гидрофильного эффекторного вещества [11]. В случае м-холинорецепторов головного мозга крыс, при их солюбилизации дигитонином, не было обнаружено достоверного увеличения эффективности действия фенозана и К$^+$-фенозана на процесс комплексообразования с ними [^{3}H]ХНБ при сравнении с таковым в случае мембраносвязанных рецепторов. На основании этого нами был сделан вывод, что фенолсодержащие водорастворимые антиоксиданты в концент-

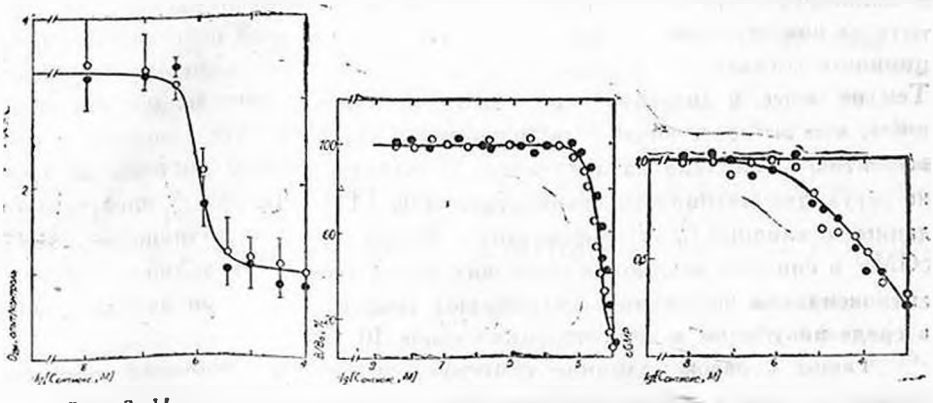

Рис. 3. Изменение содержания конъюгированных диенов во фракции синаптосом головного мозга крыс при действии *in vitro* фенозана (●) и К$^+$-фенозана (○). Инкубация 15 мин при 37°

Рис. 4. Ингибирование специфического связывания [^{3}H]ХНБ с фракцией синаптосом головного мозга крыс при действии *in vitro* фенозана (●) и К$^+$-фенозана (○). B_0—величина специфического связывания [^{3}H]ХНБ (расп/мин). B—величина специфического связывания [^{3}H]ХНБ (расп/мин) в присутствии различных концентраций антиоксидантов.

Рис. 5. Влияние фенозана (●) и К$^+$-фенозана (○) на активность синтеза cGMP (пмоль/мг белка·мин, опыт/контроль) во фракции синаптосом головного мозга крыс *in vitro*. Время инкубации 60 мин при 37°

рациях ниже 1 мМ практически не оказывают влияния на проведение сигнала в м-холинергической системе на уровне комплексообразования специфического лиганда (в данном случае [^{3}H]ХНБ) с рецепторными центрами связывания. Следует сделать допущение, что отсутствующие в данном случае эффекты антиоксидантов могут быть обнаружены при комплексообразовании с м-холинорецепторами специфических лигандов другого, чем ХНБ, химического строения.

Рассматривая трансмембранный перенос сигнала в м-холинергической системе, необходимо сказать о вторичном мессенджере данной рецепторной системы—cGMP и ферменте, регулирующим его уровень в клетке—

гуанилатциклазе. До недавнего времени существовало общепринятое представление о непосредственной активации гуанилатциклазы путем рецепторного комплексообразования специфических лигандов с м-холинорецептором. К настоящему моменту появились многочисленные данные о том, что влияние мускариновых агонистов на активность гуанилатциклазы носит весьма сложный, опосредованный характер. Вероятными механизмами активации гуанилатциклазы через м-холинорецепторы является вход в клетки Ca^{2+} и накопление перекисных продуктов, а также механизм, связанный с функционированием клеточных липоксигеназ [12, 13]. Еще более усложняет вопрос о путях регуляции гуанилатциклазы тот факт, что через м-холинергическую рецепторную систему осуществляется взаимодействие с другими клеточными рецепторами ,связанными с активацией аденилатциклазы [14] и обменом фосфоинозитидов [15]. Такая сложная система регуляции активности гуанилатциклазы, связанной с активацией м-холинорецепторов, как правило, не дает возможности однозначно ответить на вопрос о том, на какое звено трансмембранной передачи информационного сигнала от рецептора к ферменту действует вещество-эффектор? Тем не менее, в литературе существуют данные, позволяющие предположить, что антиоксиданты, как ингибиторы ПОЛ, могут оказывать свое эффективное влияние на активность м-холинергической системы на уровне регуляции активности гуанилатциклазы [13]. На рис. 5 представлены данные о влиянии *in vitro* фенозана и K^+-фенозана на активность синтеза cGMP в синаптосомах коры головного мозга крыс. Как видно из рисунка, антиоксиданты эффективно ингибируют синтез cGMP при их содержании в среде инкубации в концентрациях выше 10 мкМ.

Таким образом, влияние синтетических водорастворимых антиоксидантов из класса экранированных фенолов *in vitro* на передачу сигнала в м-холинергической системе головного мозга крыс менее чем в миллимолярных концентрациях реализуется не на уровне регуляции комплексообразования специфических лигандов с рецептором, а, скорее всего, на уровне трансмембранного переноса сигнала (например, на уровне регуляции синтеза вторичного мессенджера—cGMP). Такая регуляция опосредована, видимо, изменением структуры липидного бислоя мембран при неспецифическом взаимодействии антиоксидантов с клетками. При этом следует отметить, что эффективное действие антиоксидантов в наномолярных концентрациях на активность нейромедиаторных систем может быть объяснено возможным специфическим взаимодействием этих веществ с плазматическими мембранами нервных клеток.

THE EFFECT OF SYNTHETIC WATER-SOLUBLE PHENOL ANTIOXIDANTS ON THE m-CHOLINERGIC RECEPTOR SYSTEM OF THE RAT

KHOKHLOV A. P.
Institute of Urology, Moscow

We studied *in vivo* and *in vitro* effects of low doses of synthetic water-soluble antioxidant: gamma-(4-oxi-3,5-ditretbutylphenol) propionate

(phenozan) and its potassium salt on the activity of M-cholinergic system of rat CNS. These compounds in micromolar concentrations act at the level of signal transduction across the plasma membrane rather than at the level of ligand-receptor complex formation. The effect of the antioxidants, which inhibit free-radical reactions, is due to the alteration of physico-chemical properties of membrane lipids. *In vivo* the antioxidants in nanomolar concentrations effectively modified the activity of M-cholinergic system of the rat CNS (assayed with arecoline). The action mechanism of the phenol antioxidant drugs is associated with their specific binding to cell plasma membranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Burlakova E. B., Arkhipova G. V., Djalyabova M. I., Molotchkina E. M., Khokhlov A. P.*—In: Biophysical and Biochemical Information Transfer in Recognition, p. 583—594, N. Y., Plenum Press, 1979.
2. *Бурлакова Е. Б., Хохлов А. П.* Биол. мембраны, т. 1, № 2, с. 117—122, 1984.
3. *Hajos F.* Brain Res., v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
4. *Jones D., Matus A.* Biochim. et biophys. acta v. 356, № 1, p. 276—287, 1974.
5. *Howells R. D., Gioannini T. L., Hiller J. M., Simon E. J.* J. Pharm. and Exper. Therap., v. 222, № 3, p. 629—634, 1982.
6. *Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 70, p. 1947—1949, 1973.
7. *Кольтовер В. К.* Итоги науки и техн. ВИНИТИ, Биофизика, № 11, с. 10—100, 1979.
8. *Аничков С. В.* Избирательное действие медиаторных средств. Л., Медицина, 1974.
9. *Steiner A. L., Wehmann R. E., Parker C. W., Kipnis D. M.*—In: Advances in cyclic nucleotide research (eds. P. Greengard, G. A. Robison), v. 2, p. 51—61, N. Y. Raven Press, 1972.
10. *Abe K., Kogure K., Arai H., Nakano M.* Biochem. Int., v. 11, № 3, p. 341—348, 1985.
11. *Хохлов А. П., Ярыгин К. Н., Юрченко Н. Н.* Биол. мембраны, т. 3, № 3, с. 261—265, 1986.
12. *Lad P. M., Glovsky M. M., Richards J. H., Smiley P. A., Backstrom B.* Mol. Immunol., v. 22, № 7, p. 731—739, 1985.
13. *Snider R. M., Mc Kinney M., Forray C., Richelson E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 81, № 12, p. 3905—3909, 1984.
14. *Smith M., Harden T. K.* J. Cycl. Nucleotide and Protein Phosphorylat. Res., v. 10, № 2, p. 197—210, 1985.
15. *Brown E., Kendall D. A., Nahorski S. R.* J. Neurochem., v. 42, № 5, p. 1379—1387, 1984.

Поступила 18. III 1988