

Б.Х.Ягмуров, Е.А.Острахович, А.А.Тимофеев, А.Г.Чучалин, С.К.Соодаева

ВЛИЯНИЕ ТРОВЕНТОЛА НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

THE EFFECT OF TROVENTOL ON FREE RADICAL PROCESSES

B.H.Yahgmurov, E.A.Ostrakhovich, A.A.Timofeyev, A.G.Chuchalin, S.K.Sohodaeva

Summary

The medication effect on oxidative metabolism of various phagocyte types was studied by the luminol dependant chemiluminescent (ChL) method for investigating the troventol action mechanism. Peroxide lipid oxidation (PLO) in liver, lung, and brain homogenates was investigated to compare the effects of atropine and atrovent.

It was found that troventol inhibited the ChL-response of alveolar macrophages (AM) in 50–60% in comparison with placebo. That effect is considered to be explained by its influence on generation mechanisms of reactive oxygen species (ROS) by certain cells. Moreover, troventol did not influenced on activation of peritoneal macrophages.

As well the generation inhibition of ROS by AM with troventol as the effect absence in peritoneal macrophages are considered to be depended on features of reception interaction with phagocytes.

It was shown by the model system of lipid autooxidation in the brain homogenate that troventol has a great antioxidant activity. Nevertheless, it was not found any essential inhibition of PLO processes by the drug during the PLO induction with ferrous ions in lung and liver homogenates.

It was suggested that the inhibition may be conditioned by the various lipid content and the antioxidant delivery of various tissues as well as by microsomal function of the detoxitizing system where this drug like the other xenobiotics is hydroxylized.

Резюме

С целью исследования механизма действия тровентола изучали влияние препарата на окислительный метаболизм различных типов фагоцитов методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ), а также перекисное окисление липидов (ПОЛ) в гомогенатах печени, легких и мозга в сравнительном аспекте с атропином и атровентом.

Было обнаружено, что тровентол в отличие от препаратов сравнения ингибирует ХЛ-ответ альвеолярных макрофагов на 50–60%. По-видимому, такой эффект препарата связан с влиянием его на механизмы генерации АФК данными клетками. В то же время тровентол не влияет на активацию перитонеальных макрофагов.

Ингибирование генерации АФК альвеолярными макрофагами тровентолом при действии активаторов, как и отсутствие эффекта на перитонеальные макрофаги связано, по всей видимости, с особенностями рецепторного взаимодействия с фагоцитирующими клетками.

На модельной системе автоокисление липидов в гомогенате мозга было показано, что тровентол обладает значительной антиоксидантной активностью. Тем не менее при индукции ПОЛ ионами железа в гомогенатах легких и печени не обнаружено существенного ингибирования процессов ПОЛ препаратом.

Мы предполагаем, что последнее может быть обусловлено разным липидным содержанием и антиоксидантной обеспеченностью различных тканей, а также функционированием микросомальной детоксицирующей системы, в которой препарат, как и все ксенобиотики, подвергается гидроксированию.

В настоящее время хорошо известно, что неотъемлемой частью патогенеза многих заболеваний легких является активация свободнорадикальных реакций. Из-за высокой реакционной способности свободные радикалы могут модифицировать белки, липиды, нуклеиновые кислоты [1], что приводит к резкому

нарушению функции органов и тканей. Помимо этого активные метаболиты кислорода в силу высокой токсичности сами по себе могут участвовать в первичных процессах запуска многих патологических состояний [3]. Так, введение ксантин—ксантинооксидазной системы генерации супероксидного радикала $O_2^{\cdot -}$ в просвет

бронхов приводит к бронхоспазму [9]. Известно, что активация фагоцитирующих клеток, в том числе и альвеолярных макрофагов, приводит к развитию "дыхательного взрыва". Одним из ключевых звеньев этого процесса является генерация НАДФН-оксидазным комплексом O_2^- . Избыточная продукция O_2^- и других радикалов (пероксид водорода, гидроксильные радикалы) способствует развитию как бронхоспастического синдрома, так и воспалительных процессов в легких. Таким образом, важная роль свободнорадикальных реакций в патогенезе легочных заболеваний указывает на целесообразность использования препаратов, обладающих ингибиторными свойствами по отношению к свободным радикалам в комплексной терапии заболеваний.

Настоящая работа посвящена исследованию некоторых физико-химических свойств и механизмов действия на свободнорадикальные процессы тровентола — отечественного бронхолитика, применяемого в клинике.

В работе использовали белых беспородных крыс-самцов линии Wistar массой 180—200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария.

Для получения бронхоальвеолярного смыва (БАС) в трахею наркотизированной (гексенал 34 мг/мл, 1 мл внутримышечно) крысы через канюлю вводили 10 мл раствора Хенкса. После медленного двукратного промывания жидкость набирали в шприц и фильтровали через двойной слой нейлоновой сеточки [7].

Альвеолярные макрофаги получали двукратным центрифугированием (центрифуга ОПН-3) бронхоальвеолярного смыва при $400\text{ g} \times 10\text{ мин}$ [7]. После двукратной отмывки осадок ресуспендировали в 10 mM NaCl — 1 mM трис HCl буфере с pH = 7,4 ("Sigma") и хранили при температуре тающего льда. Перитонеальные макрофаги получали по методике [8]. Жизнеспособность клеток определяли тестом с трипановым синим и использовали суспензии, содержащие не менее 80% живых клеток [2]. Подсчет клеток производили в камере Горяева.

После получения БАС и перитонеальной жидкости легкие и печень животных перфузировали изотоническим раствором хлорида натрия для отмывания от крови, ткань измельчали и гомогенизировали в растворе Хенкса. Далее к 1 мл гомогената ткани добавляли исследуемый препарат (тровентол, атропин, атровент), в контрольные пробы вводили такое же количество буфера, перемешивали и ставили на инкубацию при 37°C . Через 5 минут после этого в пробы, кроме холостой (как с препаратом, так и без него), добавляли раствор $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 10^{-6} M и инкубировали 60 минут. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) останавливали антиоксидантом ионолом ("Serva", Германия) в концентрации $5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$. Затем по общепринятой методике определяли уровень ТБК-активных продуктов [6, 12]. Конечные значения рассчитывали за вычетом значений соответствующих холостых проб.

Образование активных форм кислорода (АФК) клетками БАС и перитонеальными макрофагами определяли хемилюминесцентным методом на приборе LKB-1251 (Швеция) в режиме автоматического

управления и контроля за условиями и процессом измерения [5].

Антиоксидантная (АО) способность тровентола оценивалась по методике, описанной Стоксом [13], которая была нами незначительно модифицирована для гомогената мозга. Мозг крысы, отмытый от крови (2,5—3,0 г), гомогенизировали в 10 mM Трис-HCl буфере (15 мл, pH=7,4) при 5°C и центрифугировали 15 минут при 1000 g. Полученный супернатант был разведен в три раза в Трис-HCl буфере, 2 мл которого инкубировали при 37°C в течение 2 часов с постоянным перемешиванием. Через 2 часа к 0,25 мл инкубационной смеси были добавлены 3 мл 1,5% H_3PO_4 и 1 мл 0,5% раствора ТБК и содержимое инкубировали 45 минут при 100°C . После центрифугирования при 1800 g (для осаждения белка) содержание ТБК-активных продуктов определяли, измеряя поглощение при 532 нм.

Спектры поглощения препаратов измерялись на спектрофотометре ("Hewlett Packard 8451 A", США) по стандартной методике. При этом использовали водный раствор субстанции препаратов в концентрации 10^{-2} мг/мл .

Спектры флуоресценции измерялись в стандартных кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см на спектрофлуориметре MPF-44A "Perkin Elmer". Использовались водные растворы препаратов с концентрацией 10^{-3} мг/мл .

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Методом люминолзависимой ХЛ было обнаружено (рис. 1), что отечественный М-холинолитик тровентол при концентрации 10^{-3} мг/мл в суспензии клеток на 40—50% снижает форболмиристатацетат (ФМА) стимулированный, и на 50—70% стимулированный хризотил-асбестом ХЛ-ответ альвеолярных макрофагов в условиях *in vitro*. Это может быть связано с несколькими причинами:

1. Оптическим эффектом тушения (физико-химические свойства препарата), когда препарат поглощает в

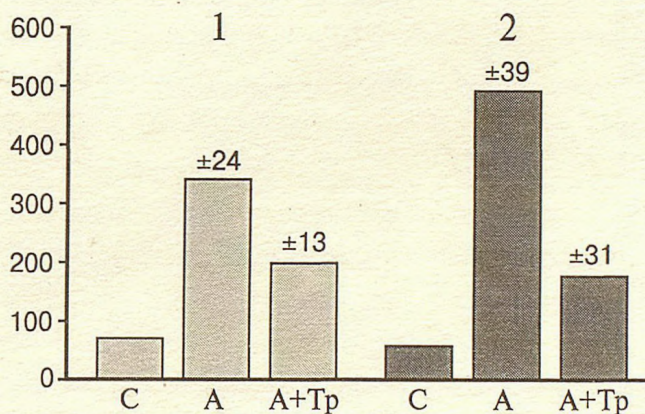


Рис. 1. Влияние тровентола на хемилюминесцентный (ХЛ) ответ стимулированных ФМА (1) и асбестом (2) альвеолярных макрофагов.

По оси абсцисс С и А — соответственно спонтанный и активированный ХЛ-ответ, А + Тр — активированный ХЛ-ответ в присутствии тровентола.
По оси ординат — интенсивность ХЛ (отн. ед.).

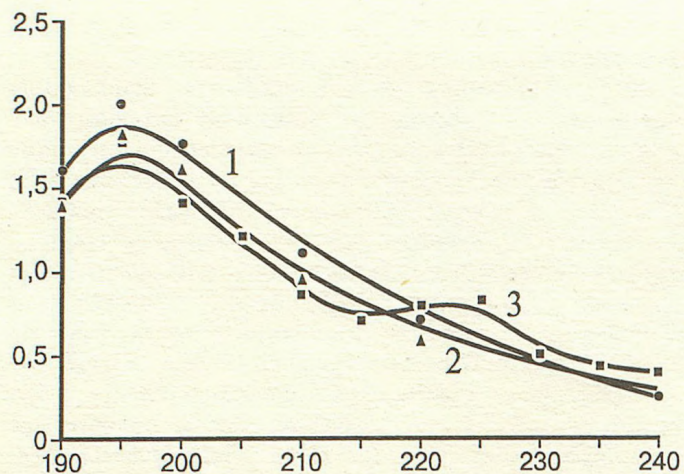


Рис.2. Спектры поглощения препаратов атропина (1), атровента (2) и тровентола (3).

По оси абсцисс — длина волны (нм).

По оси ординат — оптическая плотность (отн.ед.).

области испускания используемого нами сенсibilизатора, в данном случае люминола (*max* испускания 425 нм),

2. Препарат является ловушкой радикалов,

3. Препарат влияет на механизмы генерации АФК.

Для того, чтобы конкретизировать с какой именно причиной связан эффект ингибирования ХЛ-ответа макрофагов тровентолом, необходимо рассмотреть их по отдельности. Исходя из этого были проведены следующие исследования:

1) изучение спектров поглощения и флуоресценции тровентола и препаратов сравнения. Как видно (рис.2,3), максимумы флуоресценции препаратов находятся в области 300 нм, а поглощения — в 194 и 224 нм, которые не совпадают с максимумом флуоресценции люминола. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии физического эффекта тушения.

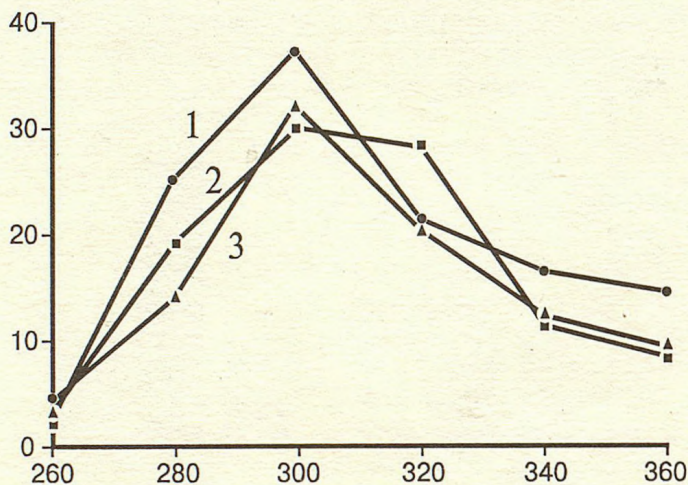


Рис.3. Спектры флуоресценции препаратов атровента (1), атропина (2) и тровентола (3).

По оси абсцисс — длина волны (нм).

По оси ординат — интенсивность ХЛ (отн.ед.).

2) ловушечные свойства препарата по отношению к свободным радикалам были оценены с использованием химических и ферментативных модельных систем генерации АФК, в частности ксантин—ксантиноксидазной (по восстановлению цитохрома С) системе генерации супероксидного радикала и в системе генерации гидроксильного радикала (реакция Фентона) [10], традиционно используемых при скрининге препаратов с возможными антирадикальными свойствами. Обнаружено, что препарат даже при высоких концентрациях (10^{-1} мг/мл) снижает генерацию радикалов всего на 10% в той и другой модельных системах. Таким образом, тровентол обладает слабыми ловушечными свойствами, которых недостаточно для объяснения вышесказанного — сильно выраженного эффекта ингибирования ХЛ-ответа альвеолярных макрофагов препаратом. По-видимому, тровентол влияет на механизмы генерации АФК альвеолярными макрофагами.

Помимо этого, исследование действия препарата на продукцию радикалов перитонеальными макрофагами при их активации ФМА и асбестом показало, что препарат не влияет на окислительный метаболизм этих клеток.

Одним из важнейших последствий токсического действия кислородных радикалов является пероксидация липидов. Безусловно, липиды — не единственная мишень для атаки свободных радикалов в живом организме, однако насыщенность клеток липидными мембранами, содержащими, в свою очередь, значительное количество остатков ненасыщенных жирных кислот, делает их наиболее вероятными субстратами свободнорадикальных процессов. ПОЛ в биологических мембранах приводит к изменениям в структурной целостности, ферментативной активности, рецепторной функции и ионном транспорте.

Т а б л и ц а

Антиоксидантная активность (АОА) препаратов: атропина, атровента и тровентола ($M \pm m$)

Препарат	Доза, мг/мл	АОА, ед.
Тровентол	10^{-9}	$0,30 \pm 0,13$
	10^{-6}	$0,45 \pm 0,10$
	10^{-3}	$0,60 \pm 0,09$
Атропин	10^{-9}	0
	10^{-6}	$0,20 \pm 0,06$
	10^{-3}	$0,40 \pm 0,08$
Атровент	10^{-9}	0
	10^{-6}	$0,30 \pm 0,07$
	10^{-3}	$0,40 \pm 0,10$

П р и м е ч а н и е. Достоверность различия $p < 0,05$.

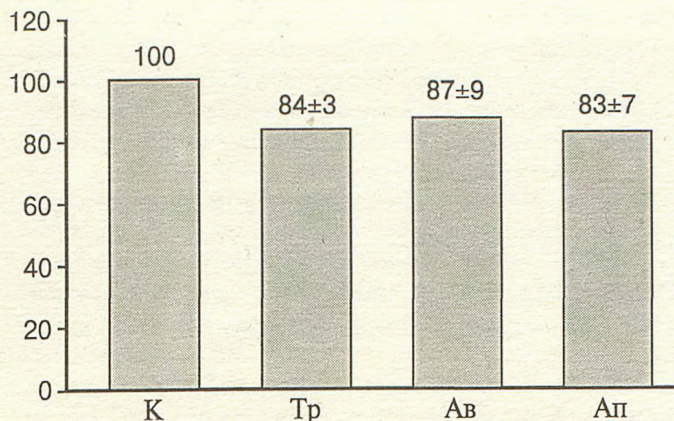


Рис.4. Влияние препаратов на перекисное окисление липидов в ткани легких.

По оси абсцисс: К — контроль, Тр — тровентол, Ав — атровент, Ап — атропин.

По оси ординат — процент от контроля.

Поэтому нами проведены исследования влияния препаратов на липидную перекисидацию в тканях печени, легких и мозга. ПОЛ в этих тканях зависит не только от интенсивности свободнорадикальных процессов, но и от мощности АО-защиты.

Изучение АО-активности тровентола и препаратов сравнения атропина и атровента в модельной системе автоокисления липидов гомогената мозга показало, что тровентол ингибирует ПОЛ на 60% концентрации 10^{-3} мг/мл, в то время как атровент и атропин в той же концентрации ингибировали этот процесс на 40% (таблица). При изучении действия этих препаратов на Fe^{2+} -индуцированное ПОЛ в гомогенате легких (рис.4) было обнаружено слабое подавление липидной перекисидации, а в гомогенате печени их эффект отсутствовал.

Исходя из полученных данных следует, что субстанция препарата тровентол не обладает антирадикальной активностью в ферментативных и неферментативных модельных системах генерации супероксидных и гидроксильных радикалов.

В то же время препарат обладает высокими АО-свойствами в ПОЛ, изученными в модельной системе автоокисления липидов гомогената мозга, характеризующейся, с одной стороны, высоким содержанием остатков ненасыщенных жирных кислот, основным субстратом окисления и низкой АО-защитой, с другой. По-видимому, действие тровентола, как и α -токоферола — классического ингибитора липидных радикалов, связано с его способностью подавлять образование липидных радикалов в системе.

Отсутствие влияния на Fe^{2+} -индуцированное ПОЛ гомогената печени и слабый эффект в гомогенате легких может объясняться функционированием микросо-

мальной детоксицирующей системы, в которой препарат, как и все ксенобиотики, подвергается гидроксильрованию, а образующиеся метаболиты не способны взаимодействовать с липидными радикалами. Кроме этого в данном случае может вносить свой вклад мощная АО система защиты, а также относительно малое содержание субстратов окисления — ненасыщенных жирных кислот в данных тканях.

Выявленное снижение тровентолом генерации радикалов альвеолярными макрофагами при их активации как ФМА, так и хризотил-асбестом не связано с его способностью инактивировать кислородные радикалы и с оптическим эффектом тушения. Более сильное подавление ХЛ-ответа в случае стимуляции хризотил-асбестом мы относим за счет электростатических взаимодействий препарата с мембраной клеток [4], поскольку активация асбестом происходит в результате поверхностных электростатических взаимодействий с плазматической мембраной клеток [11].

Ингибирование генерации АФК альвеолярными макрофагами тровентолом при действии упомянутых активаторов, как и отсутствие эффекта на перитонеальных макрофагах, связано, по всей видимости, с особенностями рецепторного взаимодействия с фагоцитирующими клетками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Потанин А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. — М.: Высшая школа, 1989. — С.170—179.
2. Клаус Д. Лимфоциты: Методы. — М.: Медицина, 1987.
3. Коркина Л.Г., Величковский Б.Т. Роль свободных радикалов кислорода в пылевой патологии легких // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. — Рига: РМИ, 1988. — С.153—163.
4. Ситарчук И.А., Ягмуров Б.Х., Соодаева С.К., Чучалин А.Г. // Бюл. экспер. биол. — 1994. — № 11. — С.476—478.
5. Ягмуров Б.Х., Тимофеев А.А., Соодаева С.К., Чучалин А.Г. // Там же. — № 6. — С.619—621.
6. Asakawa T., Matsushita S. // Lipids. — 1980. — Vol.15, № 3. — P.137—140.
7. Bechard D.E., Fisher B.J., Kessler F.K. et al. // J. Clin. Lab. Immunol. — 1988. — Vol.26. — P.67—71.
8. Berton G., Bellanite P., Dri P. et al. // J. Pathol. — 1982. — Vol.136. — P.273—276.
9. Giri S.N., Hyde D.M., Emau P., Misra H.P. // J. Exp. Mol. Pathol. — 1988. — Vol.49, № 3. — P.395—409.
10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. // Free Radicals in Biology and Medicine. — Oxford: Clarendon Press, 1989. — P.28—31; 71—79.
11. Kamp D.W., Graceffa P., Pryor W.A., Weitzman S.A. // Free Radical. Biol. Med. — 1992. — Vol.12. — P.293—315.
12. Linseman K.L., Larson P., Braughler G.M., McCall G.M. // Biochem. Pharmacol. — 1993. — Vol.45, № 7. — P.1477—1482.
13. Stocks I., Gutteridge J.M.C., Sharp R.I., Dormandy T.L. // Clin. Sci. — 1974. — Vol.47, № 3. — P.215—222.

Поступила 26.12.94.