

УДК 615.275.4:612.35]577.352.335

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2022.4.4 EDN: NACFBQ

ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ ФЕРМЕНТАТИВНЫМИ И НЕФЕРМЕНТАТИВНЫМИ МЕХАНИЗМАМИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПРИСУТСТВИИ АГОНИСТОВ И АНТАГОНИСТОВ Н-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ© Тиханов В.И.¹, Шабанов П.Д.²¹Амурская государственная медицинская академия», 675006, Благовещенск, ул. Горького, 95²Институт экспериментальной медицины, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12*Резюме*

Цель. Оценка индукции перекисного окисления липидов (ПОЛ) микросом печени *in vitro* ферментативными (NADP•H-зависимыми) и неферментативными (аскорбат-зависимыми) механизмами в присутствии никотина и гексаметония, модулирующих Н-холинорецепторы ткани печени.

Методика. Ферментативные (NADP•H-зависимые) и неферментативные (аскорбат-зависимые) механизмы ПОЛ индуцировали *in vitro* добавлением в инкубационную среду суспензии микросом печени, 1 мМ NADP•H (в случае ферментативного ПОЛ) или 0,8 мМ аскорбиновой кислоты (в случае неферментативного ПОЛ). Окисление липидов микросом определяли по содержанию одного из ТБК-активных продуктов – малонового диальдегида. Молярная концентрация фармакологических веществ в инкубационной среде (никотин, гексаметоний бензосульфат, Sigma-Aldrich, США) соответствовала дозам фармакологических агентов, проявляющих специфическую активность *in vivo* в поведенческих экспериментах. Окислительную активность холинотропных фармакологических средств рассчитывали в процентах. Статистическую обработку результатов проводили методом дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса с применением парного критерия Манна-Уитни при $p < 0,05$.

Результаты. Присутствие никотина в инкубационной среде 10^{-4} - 10^{-6} М и индуцирование ферментативных механизмов ПОЛ уменьшало способность липидов мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов (МЭРГ) к окислению. Гексаметоний в инкубационной среде при активации ферментативных механизмов ПОЛ оказывал противоположный эффект – увеличивал способность липидов МЭРГ окисляться. С уменьшением молярной концентрации как никотина, так и гексаметония в инкубационной среде отмечали возрастание способности липидов МЭРГ к окислению. При индуцировании неферментативных (аскорбат-зависимых) механизмов ПОЛ никотин 10^{-4} - 10^{-6} М в инкубационной среде увеличивает, а гексаметоний в тех же условиях уменьшает окисление липидов МЭРГ.

Вывод. Агонисты (никотин) и антагонисты (гексаметоний) Н-холинорецепторов разнонаправленно изменяют ПОЛ МЭРГ. Одним из возможных механизмов влияния холинотропных веществ на ферментативное (NADP•H-зависимое) и неферментативное (аскорбат-зависимое) ПОЛ является изменение протон-активных потенциалов молекул веществ на принципах одноэлектронного окисления и восстановления липидов.

Ключевые слова: никотин, гексаметоний, липиды микросом печени, ферментативные (NADP•H-зависимые) механизмы окисления, неферментативные (аскорбат-зависимые) механизмы окисления

LIPID OXIDATION OF LIVER MICROSOMES BY ENZYMATIC AND NON-ENZYMATIC MECHANISMS OF LIPID PEROXIDATION IN THE PRESENCE OF H-CHOLINERGIC RECEPTOR AGONISTS AND ANTAGONISTSTikhanov V.I.¹, Shabanov P.D.²¹Amur State Medical Academy, 95, Gor'kogo St., 675006, Blagoveshchensk, Russia²Institute of Experimental Medicine, 12, Acad Pavlov St., 197022, St. Petersburg Russia*Abstract*

Objective. To evaluate the induction of lipid peroxidation (LPO) by liver microsomes *in vitro* by enzymatic (NADP•H-dependent) and non-enzymatic (ascorbate-dependent) mechanisms in the presence of nicotine and hexamethonium, modulating the H-cholinergic receptors of the liver tissue.

Methods. Enzymatic (NADP•H-dependent) and non-enzymatic (ascorbate-dependent) mechanisms of LPO were induced in vitro by adding to the incubation medium a suspension of liver microsomes, 1 mM NADP•H (in the case of enzymatic LPO) or 0.8 mM ascorbic acid (in the case of non-enzymatic LPO). Lipid oxidation of microsomes was determined by the content of one of the TBA-active products – malondialdehyde. The molar concentration of pharmacological substances in the incubation medium (nicotine, hexamethonium benzosulfonate, Sigma-Aldrich, USA) corresponded to the doses of pharmacological agents exhibiting specific activity in vivo in behavioral experiments. The oxidative activity of cholinotropic pharmacological agents was calculated as a percentage. Statistical processing of the results was carried out by the Kruskal-Wallis analysis of variance using the paired Mann-Whitney test at $p < 0.05$.

Results. The presence of nicotine in the incubation medium 10^{-4} - 10^{-6} M and the induction of the enzymatic mechanisms of LPO reduced the ability of the lipids of the membranes of the endoplasmic reticulum of hepatocytes (MERH) to oxidize. Hexamethonium in the incubation medium, upon activation of the enzymatic mechanisms of LPO, had the opposite effect – it increased the ability of MERH lipids to oxidize. With a decrease in the molar concentration of both nicotine and hexamethonium in the incubation medium, an increase in the ability of MERH lipids to oxidize was noted. With the induction of non-enzymatic (ascorbate-dependent) mechanisms of LPO, nicotine 10^{-4} - 10^{-6} M in the incubation medium increases, and hexamethonium under the same conditions reduces the oxidation of MERH lipids.

Conclusion. Agonist (nicotine) and antagonist (hexamethonium) of H-cholinergic receptors in different directions change the lipid peroxidation of the MERH. One of the possible mechanisms of the influence of cholinotropic substances on enzymatic (NADP•H-dependent) and non-enzymatic (ascorbate-dependent) LPO is a change in the proton-active potentials of molecules of substances on the principles of one-electron oxidation and reduction of lipids.

Keywords: nicotine, hexamethonium, liver microsome lipids, enzymatic (NADP•H-dependent) oxidation mechanisms, non-enzymatic (ascorbate-dependent) oxidation mechanisms.

Введение

Печень представляет собой уникальный орган. С одной стороны, это типичный паренхиматозный орган, место синтеза основных белков крови и других протеинов, выполняющий функцию детоксикации поступающих в организм ядов. С другой стороны, это орган, который иннервируется, как все другие органы желудочно-кишечного тракта, блуждающим нервом, следовательно, на него можно воздействовать именно этим путем. С фармакологической точки зрения это весьма важно, поскольку блуждающий нерв холинергичен по своей природе. Окончания его заканчиваются в виде неких нейросекреторных образований, выделяя ацетилхолин. Следовательно, его можно рассматривать и как аналог медиаторной системы, и как орган не-нейрональный, поскольку ацетилхолин выделяется не в синаптическую щель, а в окологлобальное пространство вблизи гепатоцитов [5]. Более точно, речь идет об эфферентной иннервации печени, осуществляемой через блуждающий нерв. Преганглионарные волокна этого нерва оканчиваются в интрамуральных узлах в области ворот печени, постганглионарные – идут вместе с чувствительными волокнами в составе порталных каналов долевых, зональных и междольковых образований. Двигательные волокна (холинергические) заканчиваются на стенках венул и артериол междольковых образований. Выделяющийся ацетилхолин, вероятно, действует на рецепторные образования гепатоцитов как на их поверхности, так и внутри (например, на мембраны микросом), то есть на сугубо внутриклеточные процессы.

Экспериментальные работы, оценивающие влияние холинергических средств на перекисное (свободно-радикальное) окисление липидов (ПОЛ) печени при холодном воздействии у крыс, показывают, что фармакологические агенты, усиливающие или ослабляющие работу H-холинорецепторов ткани печени, меняют содержание продуктов и субстратов окисления липидов ПОЛ печени, как и условия, им способствующие [4]. Невыясненным остается вопрос о способности химических элементов фармакологических агентов, выполняющих роль агонистов и антагонистов H-холинорецепторов ткани печени (никотин и гексаметоний соответственно) оказывать влияние на ПОЛ печени.

Цель работы – оценка индукции ПОЛ микросом печени in vitro ферментативными (NADP•H-зависимыми) и неферментативными (аскорбат-зависимыми) механизмами в присутствии никотина и гексаметония, модулирующих H-холинорецепторы ткани печени.

Методика

Исследование выполнено на 86 крысах самцах Вистар массой 180-200 г, содержащихся в условиях вивария. В каждой отдельной серии опытов было по 10-12 животных в группе. Животных, прошедших карантин (10 дней) брали в опыт после 12-часового голодания в одно и то же время суток в 8-11 ч. утра при температуре окружающего воздуха +22-24°C. Их декапитуировали, выделяли печень, из которой готовили гомогенат [4], в котором изучали процессы ПОЛ. Исследование одобрено локальным комитетом по этике ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» МЗ РФ.

Ферментативные (NADP•H-зависимые) и неферментативные (аскорбат-зависимые) механизмы ПОЛ индуцировали *in vitro* добавлением в инкубационную среду суспензии микросом печени, 1 мМ NADP•H (в случае ферментативного ПОЛ) или 0,8 мМ аскорбиновой кислоты (в случае неферментативного ПОЛ). Активацию ферментативного окисления липидов достигали внесением в инкубационную среду раствора гексоцианферата – (K₃ [Fe (CN)₆]) [9], неферментативного механизма окисления липидов – внесением в инкубационную среду раствора соли Мора – Fe [NH₄]₂ (SO₄)₂ × 6 H₂O [1]. Окисление липидов микросом определяли по содержанию одного из ТБК-активных продуктов – малонового диальдегида (МДА) [3, 7, 8].

Молярная концентрация фармакологических веществ в инкубационной среде (никотин, гексаметония бензосульфат, Sigma-Aldrich, США) соответствовала дозам фармакологических агентов, проявляющих специфическую активность *in vivo* в поведенческих экспериментах [5]. Окислительную активность холинотропных фармакологических средств рассчитывали в процентах [2].

Статистическую обработку результатов проводили методом дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса с применением парного критерия Манна-Уитни, что входит в концепцию статистической обработки цифрового материала методом ANOVA (ANAlisis Of VARIans)]. Статистически значимые результаты считались при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные работы показали, что никотин молярной концентрации 10⁻⁴ М; 10⁻⁵ М; 10⁻⁶ М в инкубационной среде и индуцировании ферментативных (NADP•H-зависимых) механизмов ПОЛ уменьшал окисление липидов микросом печени, причем с уменьшением молярной концентрации никотина в инкубационной среде способность липидов мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов (МЭРГ) к окислению возрастала (табл. 1).

Таблица 1. Окислительная активность никотина и гексаметония бензосульфата при индуцировании ферментативных (NADP•H-зависимых) механизмов окисления липидов

Агонист/концентрация	Никотин		
	10 ⁻⁴ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁶ М
Окислительная активность никотина	+34,5% [+26,5 ÷ +38,1]*	+20,3% [+15,6 ÷ +27,6]*	+16,0% [+11,6 ÷ +20,4]*
Антагонист/концентрация	Гексаметоний		
	10 ⁻⁴ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁶ М
Окислительная активность гексаметония	-4,62% [-0,75 ÷ -10,7]*	-8,76% [-4,43 ÷ -16,5]**	-12,2% [-4,9 ÷ -22,4]*

Примечание: Уменьшение окислительной активности исследуемых фармакологических агентов отмечали знаком (+); увеличение окислительной активности – знаком (-). Количественные значения представлены в виде медианы и перцентилей (5-й и 95-й перцентили). * $p < 0,05$ к исходным значениям до индукции ПОЛ

Присутствие гексаметония в инкубационной среде (10⁻⁴ М; 10⁻⁵ М; 10⁻⁶ М), в отличие от никотина, приводило к противоположному эффекту – увеличению способности липидов МЭРГ к окислению при активации ферментативных механизмов ПОЛ, причем с уменьшением молярной концентрации гексаметония в инкубационной среде окисление липидов МЭРГ также возрастало.

Следовательно, присутствие никотина в инкубационной среде и индуцирование ферментативных механизмов ПОЛ уменьшало способность липидов МЭРГ к окислению. Гексаметоний в инкубационной среде при активации ферментативных механизмов ПОЛ оказывал противоположный эффект – увеличивал способность липидов МЭРГ окисляться. С уменьшением

молярной концентрации как никотина, так и гексаметония в инкубационной среде отмечали возрастание способности липидов МЭРГ к окислению.

Суммируя результаты экспериментов, можно отметить, что раздельное присутствие фармакологических агентов (никотина или гексаметония) в инкубационной среде при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ приводит к разнонаправленным изменениям окисления липидов, но с уменьшением молярной концентрации и никотина, и гексаметония в инкубационной среде отмечается увеличение способности окисления липидов МЭРГ.

Индуцирование неферментативных (аскорбат-зависимых) механизмов ПОЛ *in vitro* в присутствии никотина или гексаметония приводило к противоположным результатам в сравнении с ферментативным механизмом окисления липидов). Добавление никотина в инкубационную среду (10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М) активировало окисление липидов МЭРГ, при этом с уменьшением молярной концентрации никотина в инкубационной среде отмечали уменьшение способности липидов МЭРГ к окислению (табл. 2).

Таблица 2. Окислительная активность никотина и гексаметония бензосульфоната при индуцировании неферментативных (аскорбат-зависимых) механизмов окисления липидов

Агонист/концентрация	Никотин		
	10^{-4} М	10^{-5} М	10^{-6} М
Окислительная активность никотина	- 40,8% [-76,5 ÷ +3,6]*	- 12,8% [-24,6 ÷ - 0,36]*	- 0,352% [-9,64 ÷ +6,15]*
Антагонист/концентрация	Гексаметоний		
	10^{-4} М	10^{-5} М	10^{-6} М
Окислительная активность гексаметония	+ 6,15% [+4,8 ÷ + 7,4]*	+ 9,47% [+7,47 ÷ +10,4]*	+18,4% [+15,4 ÷ + 21,8]*

Примечание: Уменьшение окислительной активности исследуемых фармакологических агентов отмечали знаком (+); увеличение окислительной активности – знаком (-). Количественные значения представлены в виде медианы и перцентилей (5-й и 95-й перцентили). * $p < 0,05$ к исходным значениям до индукции ПОЛ

Присутствие гексаметония в инкубационной среде и индуцирование неферментативных механизмов ПОЛ уменьшало способность липидов МЭРГ к окислению. Снижение молярной концентрации гексаметония в инкубационной среде приводило к уменьшению окисления липидов. Следовательно, никотин в инкубационной среде при индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ увеличивает, а гексаметоний в тех же условиях уменьшает окисление липидов МЭРГ.

Обобщая результаты проведенных экспериментов следует подчеркнуть, что никотин в инкубационной среде при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ уменьшает окисление липидов МЭРГ, а гексаметоний увеличивает окисления липидов. При активации неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* никотин, напротив, увеличивает окисление липидов МЭРГ, а гексаметоний препятствует этому процессу. Таким образом, никотин и гексаметоний в инкубационной среде при индуцировании ферментативных и неферментативных механизмов ПОЛ разнонаправленно влияют на окисление липидов МЭРГ.

Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленности эффектов окисления липидов МЭРГ инкубационной среды в присутствии никотина (агонист Н-холинорецепторов) и гексаметония (антагонист Н-холинорецепторов). Активация ферментативных (NADP•Н-зависимых) механизмов ПОЛ, модулируя движение протон-активных потенциалов, способствует окислению липидов МЭРГ в инкубационной среде [6, 10]. Перераспределение плотности электронов в пиридиновом кольце молекулы никотина (рис. 1) приводит к созданию условий не только для удержания пирролидинового образования структуры никотина, но и как бы «обнажает» атом азота пиридинового кольца, что, возможно, создаёт препятствие для движения протон-активных потенциалов в инкубационной среде при активации ферментативных механизмов ПОЛ. Этим, на наш взгляд, и объясняется уменьшение окисления липидов микросом печени инкубационной среды в присутствии никотина и индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ. С уменьшением молярной концентрации никотина в инкубационной среде увеличивается возможность окисления липидов МЭРГ протон-активными потенциалами.

Дипольные формирования ароматических структур бензосульфоната гексаметония создают условия для движения протон-активных потенциалов в инкубационной среде при активации

ферментативных механизмов, что, по всей видимости, способствует увеличению окисления липидов микросом печени в присутствии гексаметония (рис. 2).

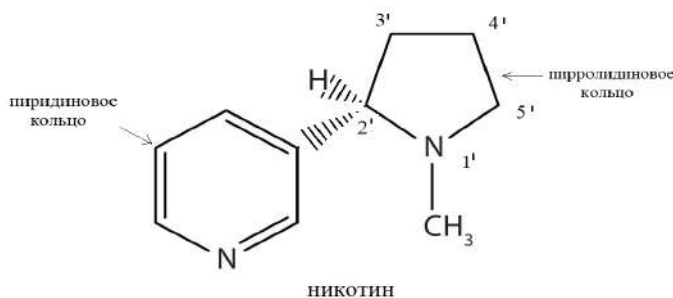


Рис. 1. Перераспределение плотности электронов в пиридиновом кольце молекулы никотина

Уменьшение молярной концентрации гексаметония бензосульфоната в инкубационной среде, возможно, не препятствует росту окисления липидов микросом печени при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ.



Рис. 2. Дипольные формирования ароматических структур бензосульфоната гексаметония

Следовательно, распределением электронной плотности в структурах никотина и гексаметония бензосульфоната можно объяснить изменение возможности окисления липидов микросом печени и при индуцировании неферментативных (аскорбат-зависимых) механизмов ПОЛ инкубационной среды, принимая во внимание способность аскорбиновой кислоты акцептировать электронный потенциал с Fe^{2+} соли Мора.

Таким образом, все полученные и обсуждаемые эффекты, то есть результат взаимодействия Н-холинотропных веществ (никотин и гексаметоний) с липидами МЭРГ в инкубационной среде, в значительной степени построены на принципах одноэлектронного окисления и восстановления липидов.

Выводы

1. При индуцировании ферментативных (NADP•H-зависимых) механизмов ПОЛ никотин в концентрациях 10^{-4} - 10^{-6} М уменьшает, а его антагонист гексаметоний в тех же концентрациях увеличивает способность липидов мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов окисляться, причем с уменьшением концентрации фармакологических агентов окислительная способность холинотропных веществ возрастает.
2. При индуцировании неферментативных (аскорбат-зависимых) механизмов ПОЛ никотин в концентрациях 10^{-4} - 10^{-6} М, напротив, увеличивает, а его антагонист гексаметоний в тех же концентрациях уменьшает способность липидов мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов окисляться, при этом снижение молярной концентрации холинотропных веществ в инкубационной среде уменьшает окисления липидов.

3. Агонисты (никотин) и антагонисты (гексаметоний) Н-холинорецепторов разнонаправленно изменяют ПОЛ мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов. Одним из возможных механизмов влияния холинотропных веществ на ферментативное (NADP•H-зависимое) и неферментативное (аскорбат-зависимое) ПОЛ является изменение протон-активных потенциалов молекул веществ на принципах одноэлектронного окисления и восстановления липидов.

Литература (references)

1. Бородин Е.А. Инактивация цитохрома Р-450 в мембранах микросом повреждённых Fe^{2+} -аскорбат-зависимым перекисным окислением липидов // Биологические науки. – 1986. – №5. – С.30-34. [Borodin E.A. *Biologicheskie nauki*. Biological Sciences. – 1986. – N5. – P.30-34 (in Russian)]
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 250 с. [Vladimirov Y.A., Archakov A.I. *Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranah*. Lipid peroxidation in biological membranes. – Moscow: Nauka, 1972. – 250 p. (in Russian)]
3. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68. [Stal'naya I.D., Garishvili T. G. *Sovremennye metody v biohimii*. Modern Methods in Biochemistry / Ed. by V.N. Orekhovich. – Moscow: Medicina, 1977. – P. 66-68 (in Russian)]
4. Тиханов В.И. Сопоставление результатов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов печени на фоне введения гексаметония и 3-часового охлаждения животных с результатами индуцированного перекисного окисления липидов микросом печени в присутствии гексаметония in vitro // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – №1. – С. 86-88. [Tihanov V.I. *Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal*. Far East Medical Journal. – 2016. – N1. – P. 86-88 (in Russian)]
5. Тиханов В.И., Шабанов П.Д. Не-нейрональный ацетилхолин печени. – М.: РАН, 2020. – 260 с. [Tikhanov V.I., Shabanov P.D. *Ne-nejronal'nyj acetilholin pecheni*. Non-neuronal acetylcholine of the liver. – Moscow: Russian Academy of Sciences, 2020. – 260 p. (in Russian)]
6. Barry B.A. Reaction dynamics and proton coupled electron transfer: studies of tyrosine-based charge transfer in natural and biomimetic systems // *Biochemistry and Biophysics Acta*. – 2015. – V.1847, N1. – P. 46-54.
7. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress // *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*. – 2005. – V.15. – P. 316-328.
8. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jügens G. Chemistry and biochemistry of 1,4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // *Free Radicals in Biology and Medicine*. – 1991. – V.11. – P.81-128.
9. Minotti G., Aust S.D. Redox cycling of iron and lipid peroxidation // *Lipids*. – 1992. – V.27, N3. – P. 219-226.
10. Offenbacher A.R., Burus L.A., Sherrill C.D., Barry B.A. Redox-linked conformational control of proton-coupled electron transfer : Y 122 in the ribonucleotide reductase в 2 subunit // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2013. – V.117, N28. – P.8457-8468.

Информация об авторах

Тиханов Виктор Иванович – доктор медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава России. E-mail: viktor.tihkanov@mail.ru

Шабанов Петр Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Минобрнауки России. E-mail: pdshabanov@mail.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.