

Биогенные амины – эндогенные модуляторы клеточной генерации активных форм кислорода

Представлены результаты исследования модулирующего влияния биогенных аминов дофамина, серотонина, гистамина, мелатонина и аминокислоты триптофан на генерацию активных форм кислорода (АФК) макрофагами по данным хемилюминесцентного анализа. Установлено, что изученные соединения в концентрациях выше 10^{-5} М подавляют спонтанную и индуцированную продукцию АФК, тогда как физиологические и субфизиологические концентрации дофамина (10^{-10} - 10^{-9} М), серотонина (10^{-9} М- 10^{-7} М) и триптофана (10^{-6} - 10^{-5} М) стимулируют преимущественно спонтанную продукцию оксидантов в тесте *in vitro*. Возможные механизмы и биологическое значение обнаруженного феномена обсуждаются. Ключевые слова: активные формы кислорода, фагоциты, хемилюминесценция, биогенные амины, дофамин, серотонин, гистамин, мелатонин, триптофан.

N.A. Bizunok Biogenic amines - endogenous modulators of the cellular reactive oxygen species generation.

The effects of the biogenic amines (dopamine, serotonin, histamine and melatonin) and the amino acid tryptophan on the reactive oxygen species (ROS) generation by macrophages were followed *in vitro* used chemiluminescence analysis. It is established, that the studied agents in the concentrations of above 10^{-5} M suppress the spontaneous and induced ROS production, whereas the physiological and lower concentrations of dopamine (10^{-10} - 10^{-9} M), serotonin (10^{-9} M- 10^{-7} M) and tryptophan (10^{-6} - 10^{-5} M) stimulate the primarily spontaneous production of oxidants *in vitro*. The possible mechanisms and the biological significance of the discovered phenomenon are discussed.

Key words: reactive oxygen species, phagocytes, chemiluminescence, biogenic amines, dopamine, serotonin, histamine, melatonin, tryptophan.

Научный поиск в области управления оксидантными процессами живых организмов убедительно доказал, что эндогенная генерация активных форм кислорода (АФК) и модификация “редокс-состояния” клеток не только патологическое явление, но и важный механизм ауторегуляции клеточного и тканевого гомеостаза. Результирующие эффекты определяются совокупностью локальных условий, химической природой и количеством генерируемых АФК [2, 3]. В экспериментах показано, что специфическим регуляторам биологических функций принадлежит важная роль в сохранении оксидантного баланса клеток и тканей. К соединениям данного класса относятся биогенные амины, антиоксидантные свойства которых обнаружены в модельных системах [5, 8, 10], и в то же время обсуждается их роль в реализации тканевых повреждений при патологических состояниях активации оксидантных процессов: нейродегенеративных заболеваниях ЦНС, ишемических и реперфузионных повреждениях, иммунных и воспалительных реакциях [3, 6, 7].

В настоящей работе проведено исследование модулирующего действия биогенных аминов дофамина, гистамина, серотонина, мелатонина и аминокислоты триптофан в отношении клеточной продукции оксидантов на модели спонтанной и индуцированной генерации АФК резидентными макрофагами.

Материал и методы

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 которых 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).

Испытывали следующие фармакологические агенты: дофамин (“Merck”, Швейцария), гистамин (“Calbiochem®”, США), серотонин (“Reanal”, Венгерская республика), мелатонин (“Serva”, Германия), триптофан (“ИФОХ НАН”, РБ), соталол (“Hexal”, Германия).

Генерацию АФК оценивали после 10-ти минутной инкубации клеток с изучаемым агентом (10-10-10-3 М) при температуре 20-25°C; контрольные пробы агентов не содержали. Каждый опыт проводился на клетках одного животного и включал группу проб, содержащих индуктор фагоцитоза, в которых оценивали ИХЛ, и группу проб, лишенных индуктора, для регистрации СХЛ. При исследовании ИХЛ проба содержала в 1 мл бесцветной среды Хенкса: 10⁶ жизнеспособных макрофагов, люминол (7·10⁻⁵ М), опсонизированный зимозан (5·10⁷ частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения, и изучаемое вещество (10-10-10-3 М), в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество среды. СХЛ оценивали в отсутствие индуктора.

Люминесценцию регистрировали поочередно опрашивая пробы, содержащие изучаемый агент, и контрольные при постоянной температуре (37°C), в дискретном режиме с интервалом 2-3 мин., на протяжении 30-40 минут. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC). Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые агенты, выражали в % к контрольным. Количество повторных опытов для каждого фармакологического агента варьировало от 2 до 8.

Результаты обрабатывали статистически с использованием параметрических и непараметрических методов анализа. В контрольных пробах (n=38) ИХЛ примерно в 5 раз превышала СХЛ, стандартное отклонение для средних значений (SD) составило 80% и 55%, соответственно. Значительная индивидуальная вариабельность фагоцитарной генерации АФК обусловила использование для оценки достоверности различий опытных и контрольных показателей парного критерия Стьюдента и критерия Фишера (?0,05).

Результаты и обсуждение

Дофамин. Дофамин – агонист дофаминовых и адренергических рецепторов – в диапазоне низких концентраций (10^{-10} – 10^{-7} М) не оказывал модулирующего влияния на индуцированную наработку оксидантов, а при более высоких концентрациях ($>10^{-6}$ М), значительно ингибировал ИХЛ (табл. 1.).

Таблица 1.

Влияние биогенных аминов дофамина, гистамина, серотонина, мелатонина и аминокислоты триптофан на ИХЛ макрофагов (AUC ХЛ, % к контролю, $M \pm SD$, $n = 2-8$)

С, [М]	Дофамин	Гистамин	Серотонин	Триптофан	Мелатонин
10^{-10}	104,2±13,1	-	-	-	-
$3 \cdot 10^{-10}$	105,7±11,2	-	-	-	-
10^{-9}	110,2±4,4**	90,2±26,0	110,3±12,6	-	101,1±12,4
$3 \cdot 10^{-9}$	106,1±7,2	-	-	-	-
10^{-8}	102,3±8,4	97,8±27,1	108,0±12,5	101,4±7,8	107,8±21,0
$3 \cdot 10^{-8}$	98,6±12,7	-	-	-	-
10^{-7}	120,3±24,3	105,0±7,0	109,4±15,9	96,8±18,6	100,6±12,4
$3 \cdot 10^{-7}$	86,1±10,4*	-	-	-	-
10^{-6}	92,1±22,5	91,2±24,2	90,0±19,1	113,2±0,2*	102,3±14,6
$3 \cdot 10^{-6}$	71,1±16,3**	-	-	-	96,5±11,3
10^{-5}	64,6±15,3**	89,8±20,9	74,6±9,1**	94,6±20,7	84,5±7,5*
$3 \cdot 10^{-5}$	50,7±15,8**	-	-	-	80,2±15,3*
10^{-4}	48,1±17,5**	78,3±14,9 TM	38,1±9,9**	116,4±4,2	58,7±7,1**
10^{-3}	-	-	-	77,4±9,1	49,8±11,5**

Примечание. Здесь и далее * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по парному критерию Стьюдента, ТМ – $p < 0,05$ по критерию Фишера.

Изменение спонтанной генерации АФК в среде дофамина носило двойственный характер: при низких концентрациях (10^{-9} – 10^{-10} М) СХЛ значительно усиливалась, достигая 116% прироста продукции АФК по сравнению с контролем, тогда как высокие концентрации дофамина ингибировали спонтанную генерацию оксидантов (табл. 2.).

Таблица 2.

Влияние биогенных аминов дофамина, гистамина, серотонина, мелатонина и аминокислоты триптофан на СХЛ макрофагов (AUC ХЛ, % к контролю; $M \pm SD$; $n = 2-8$)

C, [M]	Дофамин	Гистамин	Серотонин	Триптофан	Мелатонин
10 ⁻¹⁰	118,0±7,1 ^m	-	-	-	-
3·10 ⁻¹⁰	203,4±45,1 ^m	-	-	-	-
10 ⁻⁹	215,7±88,5 ^m	90,2±9,1	131,0±49,7	-	109,6±37,4
3·10 ⁻⁹	135,7±89,6	-	-	-	-
10 ⁻⁸	125,3±41,8	93,6±12,7	122,6±51,0	156,3±17,2	97,8±48,7
3·10 ⁻⁸	101,5±15,7	-	-	-	-
10 ⁻⁷	101,8±10,7	103,4±6,4	113,9±41,9	112,4±3,4	100,8±40,4
3·10 ⁻⁷	113,6±47,1	-	-	-	-
10 ⁻⁶	99,2±30,9	90,1±11,0	112,2±35,1	149,9±6,6 ^m	123,5±36,0
3·10 ⁻⁶	73,5±13,7 ^m	-	-	-	77,0±26,0
10 ⁻⁵	69,1±20,6 ^m	86,5±11,4	75,3±23,1	157,9±4,8 ^m	117,2±19,0
3·10 ⁻⁵	53,1±9,9 ^m	-	-	-	92,4±42,4
10 ⁻⁴	44,3±7,4 ^m	80,7±9,4	47,0±10,8 ^m	75,3±2,1 ^m	86,0±39,6
10 ⁻³	-	-	-	57,5±9,0 TM	65,6±17,6 ^m

Изучение природы модулирующего действия дофамина было проведено после блокады α -адренорецепторов соталолом, не оказывавшим в предварительном эксперименте существенного влияния на фагоцитарную генерацию АФК. Макрофаги преинкубировали с соталолом (10⁻³ M) в течение 10 минут, затем вносили дофамин и через 10 минут начинали исследование ХЛ. При таком дизайне эксперимента нивелировалось ингибирующее действие высокой концентрации (10⁻⁵ M) дофамина на спонтанную и индуцированную генерацию АФК, одновременно соталол усиливал стимулирующий эффект низких концентраций дофамина (10⁻⁹ M) на макрофагальное образование радикалов кислорода (рис.). Подавление ингибирующего действия дофамина на макрофагальную генерацию АФК может быть связано как с проявлением прооксидантных свойств соталола, способного, благодаря наличию в молекуле свободной гидроксильной группы, вступать в окислительно-восстановительные реакции, так и со взаимным усилением специфических эффектов дофамина и адреноблокатора. Ранее нами показано, что α -адренергические агонисты дозозависимо ингибируют ХЛ макрофагов *in vitro*, а α -адреноблокирующие агенты устраняют этот эффект [1]. Учитывая аналогичное действие соталола по отношению к ингибирующему эффекту дофамина в клеточном тесте, есть основания объяснять последний активацией макрофагальных адренорецепторов. В то же время агонисты дофаминовых рецепторов индуцируют инозитолтрифосфатный каскад внутриклеточной сигнализации, благодаря которому усиливается взрывная генерация АФК в фагоцитах [4]. Таким образом, усиление дофамин-индуцированной (10⁻⁹ M) генерации АФК в макрофагах при блокаде α -адренорецепторов позволяет предполагать наличие у макрофагов сайтов специфического связывания дофамина. С другой стороны на различных моделях показано, что свободный дофамин может при подходящих условиях

метаболизироваться в лейкоаминохром-о-семихинон – высокоактивный кислородсодержащий радикал, способный индуцировать повреждение клеточных структур и усиливать генерацию других АФК. Подобные метаболические превращения дофамина происходят в отдельных участках ЦНС и предположительно являются причиной повреждения нервных клеток при болезни Паркинсона и иных нейродегенеративных процессах [7]. Образование лейкоаминохром-о-семихинона в нейронах требует активации ферментов НАДФ-цитохром Р450-редуктазы (ЕС 1.6.2.4) или ДТ-диафоразы (ЕС 1.6.99.2), учитывая структурно-функциональное подобие последнего с НАДФН-оксидазой фагоцитов (ЕС 1.6.99.6), высока вероятность описанных выше превращений дофамина в культуре фагоцитарных клеток, что может являться причиной усиления люминесценции макрофагов в среде дофамина.

Гистамин. Исследование показало, что гистамин (b-имидазоллил-этиламин) ингибирует индуцированную и спонтанную хемилюминесценцию суспензии резидентных макрофагов примерно на 20% при концентрации 10^{-4} М, не оказывая влияния на генерацию АФК при более низком содержании в клеточной системе.

Ранее проведенные исследования позволили установить, что гистамин ингибирует генерацию АФК в нейтрофилах и цельной крови, однако эффект лишь частично обусловлен активацией специфических рецепторов, в то же время установлена способность АФК стимулировать выделение гистамина из мастоцитов [5]. Совокупность полученных результатов дает основание рассматривать гистамин как эндогенный модулятор оксидантного статуса очагов иммунного воспаления.

Серотонин. Серотонин (5-гидрокситриптамин) дозозависимо ингибировал макрофагальную продукцию АФК; эффект достиг в пределе 60% подавления индуцированной и 50% подавления спонтанной генерации оксидантов при концентрации 10^{-4} М. Концентрации серотонина ниже 10^{-6} М не влияли на ИХЛ, в то же время отмечалась тенденция к усилению СХЛ при таких низких концентрациях серотонина, как 10^{-9} - 10^{-7} М ($<0,1$ для 10^{-7} М).

Прототип серотонина – аминокислота триптофан – качественно аналогично модулировал макрофагальную генерацию АФК: при концентрациях 10^{-6} - 10^{-5} М отмечалось 50% усиление СХЛ, сменявшееся ингибированием при концентрациях выше 10^{-4} М, достигавшим в пределе 42% (10^{-3} М) (см. табл. 1. и табл. 2.).

Мелатонин. Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), обладающий высокой антиоксидантной активностью в модельных химических системах [10], в клеточном тесте (10^{-9} - 10^{-3} М) подавлял индуцированную генерацию АФК в макрофагах при концентрациях, превышающих 10^{-5} М, а максимальное ингибирование отмечалось при концентрации 10^{-3} М и составляло 50% от контрольных значений. Спонтанную генерацию АФК мелатонин угнетал в меньшей степени (см. табл. 1. и табл. 2.).

Структурно подобные и метаболически связанные соединения триптофан, серотонин и мелатонин сходным образом модифицировали генерацию АФК в клеточной системе. Учитывая, что резидентные макрофаги при подходящей стимуляции способны поглощать триптофан и метаболизировать его в серотонин

и мелатонин [9], модулирующие эффекты триптофана в клеточном тесте могут быть обусловлены метаболическими превращениями индоламинов.

Индукция макрофагальной генерации оксидантов физиологическими концентрациями триптофана и серотонина может рассматриваться как подтверждение регуляторной роли этих соединений в процессах АФК-зависимого межклеточного взаимодействия. Механизмы реализации указанного эффекта на клеточном уровне пока не ясны, а полученные результаты позволяют предполагать как наличие у макрофагов участков специфического связывания биогенных индолов, так и образование активных метаболитов, возможно, усиливающих эффекты АФК. Существование подобных метаболитов показано, по крайней мере, для серотонина, а их роль в развитии клеточных повреждений дискутируется в научной периодике [8]. Несмотря на то, что концентрации серотонина и мелатонина в биологических средах невысоки и в норме колеблются от пико- до наномолярных, при патологических состояниях содержание обоих индоламинов может существенно возрастать, достигая уровней 10^{-5} - 10^{-4} М, что позволяет надеяться на реализацию антиоксидантных свойств серотонина, мелатонина и, возможно, триптофана не только на клеточной модели, но и в зонах тканевого повреждения при воспалении и аллергическом отеке, ишемических и реперфузионных повреждениях, дегенеративных, деструктивных и демиелинизирующих процессах, в развитии и прогрессировании которых доказана патологическая роль агрессивных радикалов кислорода [3, 6, 7].

Заключение

В итоге проведенного исследования установлено, что биогенные амины являются эффективными модуляторами клеточной генерации АФК. Физиологические и субфизиологические концентрации дофамина, серотонина и триптофана стимулируют фагоцитарную генерацию АФК в пробирке, тогда как высокие концентрации дофамина, гистамина, серотонина и мелатонина подавляют этот процесс.

Полученные результаты делают актуальным поиск фармакологических средств регуляции клеточной выработки АФК среди прототипов, аналогов и производных биогенных аминов.

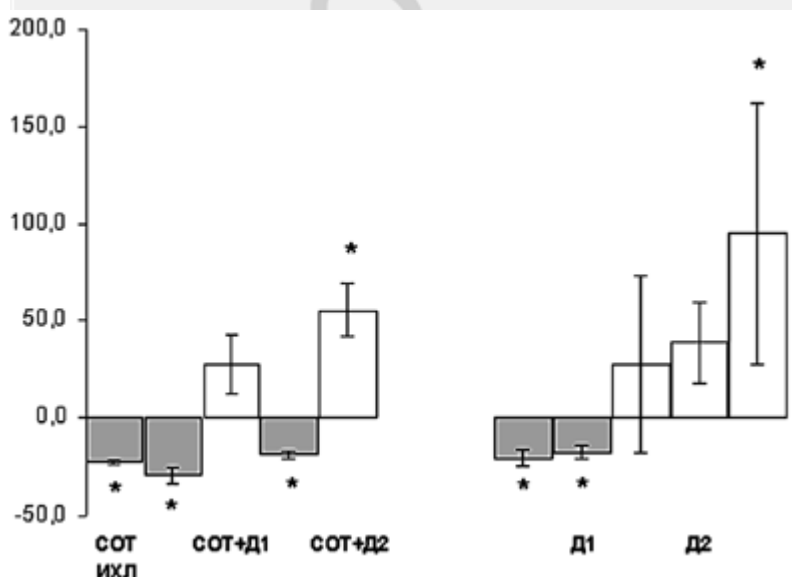


Рис. Влияние дофамина на ХЛ макрофагов при блокаде α -адренорецепторов соталолом

(? АУС ХЛ, % к контролю, $M \pm$ доверительный интервал, $n=3$)

Макрофаги преинкубировали с соталолом 10 мин., затем вносили дофамин и через 10 мин. начинали исследование ХЛ в обычном режиме; СОТ – соталол (10^{-3} М); Д1 – дофамин (10^{-5} М); Д2 – дофамин (10^{-9} М);* – $p < 0,05$ по парному критерию Стьюдента.

Литература

1. Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. Оценка антиоксидантных и прооксидантных свойств адренергических средств на модели респираторного взрыва макрофагов // Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника: Тез. докл. международной научной конференции / ОАО “Белмедпрепараты”. – Минск, 2001. – С. 12-13.
2. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса. // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т.47, №6. – С. 561-581.
3. Зозуля Ю.А., Барабой В.А., Сутковой Д.А. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. – М.: Знание - М, 2000. – 344 с.
4. Bokoch G.M. Chemoattractant signaling and leucocyte activation. // Journal of American Society of Hematology. – 1995. – Vol.86., № 5. – P. 1649-1660.
5. Ching TL., Koelemij JG., Bast A. The effect of histamine on the oxidative burst of HL60 cells before and after exposure to reactive oxygen species. // Inflammatory Research. – 1995. – Vol. 44, № 3. – P. 99-104.
6. Giulian D., Robertson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduced ischemic injury in the spinal cord. // Annalitical Neurology. – 1990. – Vol. 27. – P. 33-42.
7. Graumann R., Paris I., Martinez-Alvarado P. et al. Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease possible neuroprotective role of DT-diaphorase (review). // Polish Journal of Pharmacology. – 2002. – Vol. 54. – P. 573-579.
8. Huether G., Fetztkutter I., Keilhoff G., Wolf G. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimmer during the respiratory burst of activated microglia. // Journal of Neurochemistry. – 1997. – Vol. 69. – P. 2096-2101.
9. Martins E., Ferreira A.C.F., Skorupa A.L. e.a. Tryptophan consumption and indolamines production by peritoneal cavity macrophages. // J. Leucocyte Biology. – 2004. – 10.1189/jlb.1203614. (published online before print February, 24)
10. Reiter R.J., Dun-xian Tan, Mayo J.C. e.a. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans (review). // Acta Biochimica Polonica. – 2003. – Vol. 50, № 4. – P. 1129-1146.