

ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ С ПОСТОЯННОЙ ВАЛЕНТНОСТЬЮ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА

© 2016 г. Т.В. Сирота

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: sirotatv@rambler.ru

Поступила в редакцию 24.08.15 г.

После доработки 06.10.15 г.

Показано, что физиологически активные ионы металлов с постоянной валентностью Ca^{2+} и Mg^{2+} ускоряют автоокисление адреналина в щелочной среде, происходящее по известному хиноидному пути окисления, сопровождающееся генерацией активных форм кислорода. Установлено, что более эффективными были ионы кальция по сравнению с ионами магния. Активация процесса автоокисления адреналина проявляется в укорочении времени инициации цепной реакции (лаг период реакции) и увеличении как скорости потребления кислорода, так и образования продукта реакции окисления адреналина адренохрома. Обнаруженное действие исследованных катионов, имеющих постоянную валентность, может указывать на их участие в свободнорадикальных процессах, связанных с окислительно-восстановительными реакциями в клетке, а также может модулировать действие адреналина в организме при хиноидном его окислении.

Ключевые слова: адреналин (эпинефрин), супероксид анион, ионы кальция и магния, прооксидантная активность.

Моделью хиноидного окисления адреналина является процесс его автоокисления в щелочных условиях. Этим же путем способны окисляться до соответствующих аминокхромов все известные природные катехоламины (биогенные амины) [1–5]. При низкой концентрации H^+ в результате внутримолекулярных перестроек иницируется цепной процесс автоокисления: происходит депротонизация, последующая циклизация и образование соединений хиноидной природы – аминокхромов. В случае с адреналином – адренохром. Образующиеся промежуточные продукты, семихинон или гидрохинон, в водных растворах в аэробных условиях, превращаясь в адреналинхинон и далее в адренохром, способны передавать высвобождающиеся электроны на растворенный в среде кислород и образовывать таким образом супероксид анион-радикалы [1–5]. Кроме супероксида, как нами показано, в модельной системе могут образовываться и другие радикальные соединения семейства карбонат–бикарбонат ионов: радикал диоксида углерода и бикарбонат иона [6]. Эта модельная система – реакция автоокисления адреналина – детально описана в литературе [1–5] и наших работах [6–10].

В организме хиноидное окисление адреналина относят к аномальному метаболизму катехоламинов, с которым связывают его нейротоксичность [5,11–15]. Причина токсичности, как предполагается, обусловлена не только накоплением токсичных аминокхромов [2,3], но и образующимися в этом процессе избыточным количеством активных форм кислорода [1,11–15]. Активные формы кислорода важны при выполнении нормальных физиологических функций, как вторичные мессенджеры во внутриклеточной сигнализации, однако избыточное их накопление, нарушение баланса между образованием и их утилизацией приводит к развитию патологических процессов [15]. Актуальность этой темы в настоящее время очевидна. В связи с чем важен вопрос о регуляции этого процесса как в модельной системе, так и в организме.

Ранее нами было обнаружено активирующее, прооксидантное, действие ионов Са, металла с постоянной валентностью, на реакцию автоокисления адреналина [16–18]. Тогда объяснить этот феномен не представлялось возможным. Механизм действия ионов с переменной валентностью Fe, Mn, Cu, Mo и др. известен: они участвуют в различных окислитель-

но-восстановительных реакциях, являясь непосредственными участниками каталитических процессов. Объяснимо их действие и в свободнорадикальных реакциях. Существует целый научный раздел «Биометаллорганическая химия», посвященный этому направлению исследований [19]. Участие ионов металлов с постоянной валентностью не понятен, и выявленный феномен не был объяснен. К этой теме мы вернулись вновь, поскольку появились работы А.В. Лебедева и соавт. [20,21]. Ими, на основании экспериментальных данных, был предложен механизм, объясняющий, как могут действовать «редокс-инертный Са и другие металлы II группы с постоянной валентностью на процесс хиноидного окисления дофамина и пирокатехина». Адреналин в работе этих авторов не исследовался. Используя методы спектроскопии, полярографии и ЭПР, авторы обосновали возможный механизм активирующего действия ионов кальция в процессе автоокисления катехолов дофамина и пирокатехина.

В настоящей работе мы исследовали влияние биологически значимых ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на автоокисление именно адреналина, используя и другие подходы, а не только описанные ранее [16–18]. Полученные результаты и литературные данные позволили предположить механизм активирующего действия этих ионов с постоянной валентностью на супероксидгенирующую реакцию автоокисления адреналина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Процесс автоокисления адреналина в щелочной среде оценивали спектрофотометрически по накоплению продукта реакции адренохрома при фиксированной длине волны 347 нм по разработанному нами подходу [7,10,22], представляющему модификацию метода Misra and Fridovich [23]. Исследования проводили в 0,1 М карбонатном буфере, рН 10,55 в термостатированной кювете при температуре 22 и 25°C на спектрофотометре Unikon 923 (Италия) в режиме «time Driver» и Specord UV-VIS (Германия). Реакцию начинали с внесения 0,23 мМ адреналина гидрохлорида в буфер при постоянном его перемешивании в сантиметровую кювету. Растворы исследуемых солей металлов добавляли в буфер до внесения адреналина. Также в режиме «Wavelength Scan» регистрировали спектры в диапазоне 240–600 нм в процессе окисления добавленного адреналина. Время, в течение которого осуществляли регистрацию оптической плотности, составляло 2 мин, затем эту же пробу промеряли вновь; всего было сделано четыре последовательных измерения

оптической плотности раствора после одной добавки адреналина в процессе его окисления.

Представленные данные являются средними значениями, полученными из нескольких независимых экспериментов при четырех–шести параллельных измерениях в каждом опыте.

За процессом автоокисления адреналина также можно следить полярографически, регистрируя потребление кислорода, как описано в работе [9]. Поглощение кислорода измеряли с помощью закрытого платинового электрода Кларка в термостатированной (36°C) кювете объемом 1 мл при постоянной фиксированной скорости перемешивания в 0,2 М карбонатном буфере, рН 10,55, после внесения 0,23 мМ адреналина. Растворы CaCl_2 добавляли в буфер до внесения адреналина. После добавки адреналина наблюдается некоторый латентный период (лаг-период), соответствующий времени индукции. Этот этап характерен для цепных реакций, затем начинается потребление кислорода. Рассчитывали величину лаг-периода (в секундах) и скорость потребления кислорода на линейном участке кривой (нг/атом O_2 /мин).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (программа Microsoft Excel): определяли среднее значение (*M*), стандартное отклонение (*s.d.*) и достоверность результатов (*p*) по функции ТТЕСТ.

В работе использовали реактивы: 0,1% раствор адреналина (аптечная форма), Na_2CO_3 (Sigma, США), NaHCO_3 (J. T. Baker, Голландия), CaCl_2 и MgCl_2 (Merck, Германия). 0,2 М карбонатный буфер готовили добавлением к 0,2 М раствору Na_2CO_3 сухого NaHCO_3 до необходимой величины рН 10,55. В некоторых случаях буфер разводили водой 1:1, получая 0,1 М карбонатный буфер, и контролировали его рН. Добавление исследуемых веществ в буфер не изменяло значения рН. Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активация реакции автоокисления адреналина в щелочном карбонатном буфере при действии ионов металлов с постоянной валентностью (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+}) нами была обнаружена ранее [16–18]. Эти исследования проводили только при фиксированной длине волны в режиме «time Driver» [16–18]. Никаких предположений о механизме их действия не существовало. Возникал также вопрос о возможном взаимодействии ионов металлов с анионами карбонатного буфера, но визуально образова-

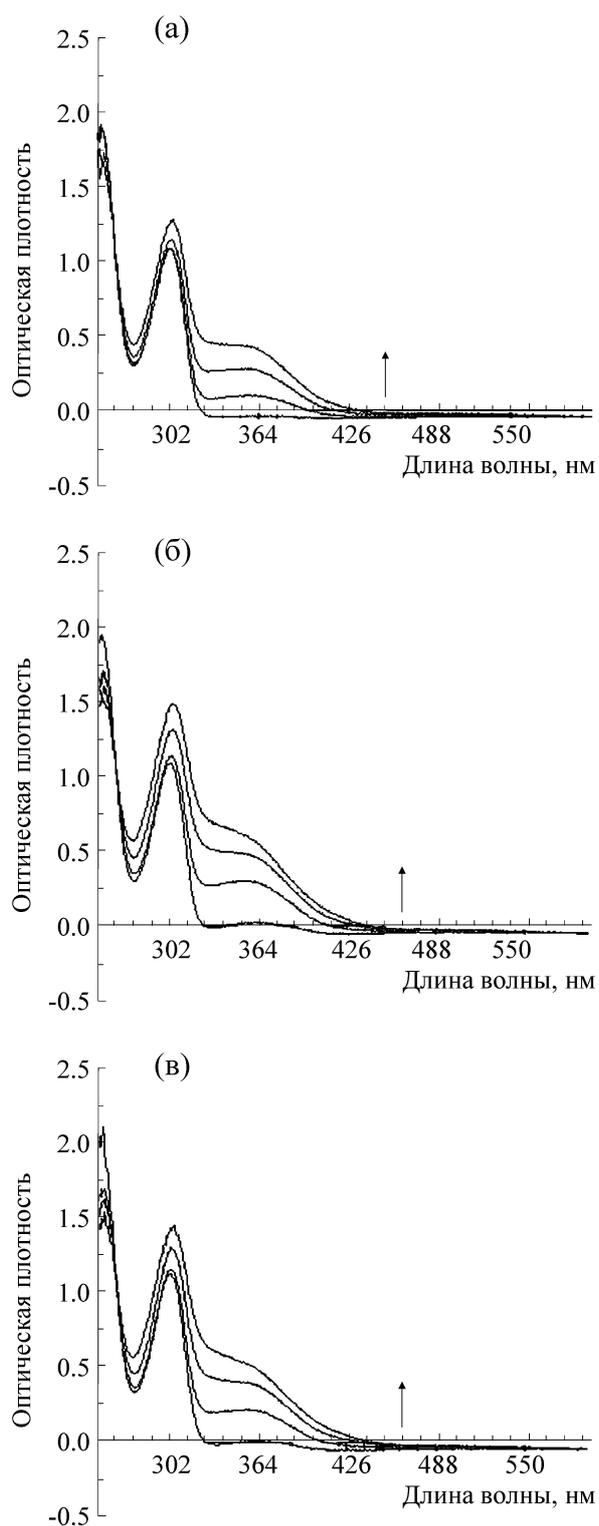


Рис. 1. Изменения спектров при автоокислении 0,23 мМ адреналина в 0,1 М карбонатном буфере, рН 10,55: (а) – в отсутствие ионов металлов; (б) – в присутствии 100 мкМ CaCl_2 ; (в) – в присутствии 100 мкМ MgCl_2 . Спектры регистрировали через равные промежутки времени в течение 9 мин при температуре 25°C. Стрелками указано нарастание изменений оптической плотности во времени.

ние нерастворимых осадков карбонатов кальция и магния не наблюдалось.

В настоящей работе представлены новые данные, доказывающие наличие этого феномена. На рис. 1,а–в показаны результаты исследования влияния ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на автоокисление адреналина, происходящее в карбонатном щелочном буфере, при регистрации спектров в диапазоне 240–600 нм. Кинетические кривые на рис. 1б,в наглядно демонстрируют, что в присутствии этих ионов происходит более интенсивное увеличение оптической плотности в сравнении с динамикой спектральных изменений на рис. 1а, где отсутствуют ионы металлов. Следует отметить, что особенно ярко эти изменения видны в области 330–365 нм. Именно этот диапазон спектра ранее был определен нами, и средняя величина этого «плеча» (shoulder), длина волны 347 нм, предложена для оценки интенсивности процесса автоокисления адреналина [7,10,22]. Из представленных на рис. 1б,в данных также следует, что действие ионов кальция более эффективно, чем ионов магния. Также очевидно, что наблюдаемому действию ионов металлов не мешают анионы карбонатного буфера, как можно было бы полагать, исходя из растворимости образующихся солей.

На рис. 2 и 3 представлены кинетики реакции автоокисления адреналина в присутствии соответственно разных концентраций ионов кальция и магния. Более эффективно действуют ионы Ca^{2+} : наблюдаемая активация имеет место при 25 мкМ, в то время как для ионов Mg^{2+} такой же эффект наблюдается только при 100 мкМ.

Как известно, в процессе окисления катехоламинов продуктами реакции являются аминохромы и супероксид-радикалы, которые образуются в результате восстановления растворенного в среде кислорода. Электроны высвобождаются в процессе внутримолекулярных перестроек окисляющегося адреналина, поступают на молекулярный кислород и, таким образом, наблюдается поглощение кислорода, регистрируемое полярографически [9]. В таблице приведены данные влияния разных концентраций ионов кальция на потребление кислорода в процессе автоокисления адреналина. Очевидно, что Ca^{2+} активирует автоокисление адреналина: лаг-период в присутствии Ca^{2+} существенно уменьшается (при концентрации 100 мкМ на 55,1%, а при 200 мкМ – на 34,8% от контроля), а скорость потребления кислорода достоверно увеличивается (при 100 мкМ на 24,4% и при 200 мкМ – на 13,3%). Следует отметить, что при дальнейшем увеличении кон-

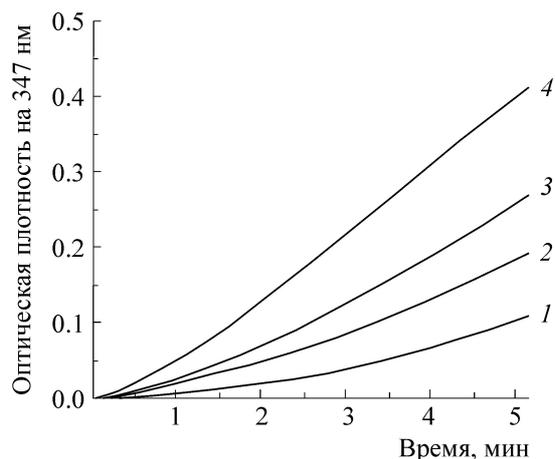


Рис. 2. Влияние ионов кальция на автоокисление адреналина: 1 – без CaCl_2 , 2–4 – в присутствии 25, 50 и 500 мМ CaCl_2 соответственно. Условия проведения реакции, как на рис. 1, температура в кювете 22°C .

центрации Ca^{2+} до 500 мкМ активирующий эффект не нарастает.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленные в работе данные показали, что ионы металлов с постоянной валентностью вызывают дозозависимое активирующее действие на реакцию автоокисления адреналина, в результате чего увеличивается образование адrenoхрома и генерация O_2^{\bullet} . Объяснение этого явления было найдено в работе [20], где исследовался механизм этого процесса. Авторы изучали Ca^{2+} -индуцированное ускорение автоокисления пирокатехина и дофамина. Оба вещества по своей природе относятся к катехолам. Пирокатехин (или катехин) по химической структуре является *орто*-диоксибензолом $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$, дофамин относится к пирокатехоламинам, т.е. содержит еще аминогруппу. Подобно известным катехоламинам, эти вещества автоокисляются в щелочных условиях по хиноидному пути с образованием соответствующих аминохромов

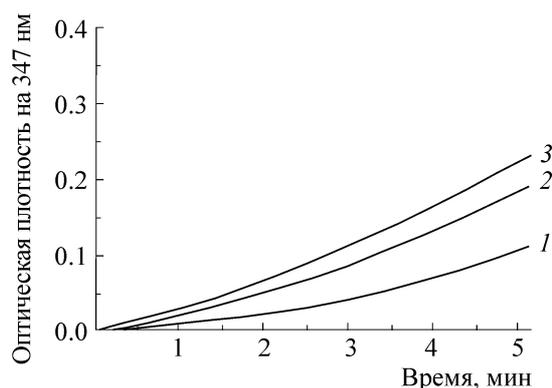


Рис. 3. Влияние ионов магния на автоокисление адреналина: 1 – без MgCl_2 , 2 и 3 – в присутствии 100 и 200 мМ MgCl_2 соответственно. Условия проведения реакции, как на рис. 1, 2.

и активных форм кислорода. Авторы заключили, что ионы Ca^{2+} активируют процесс автоокисления пирокатехина и дофамина за счет дополнительного депротонирования при образовании комплексов с Ca^{2+} , что и ускоряет перенос электронов на кислород, а также за счет образования комплексов Ca^{2+} с семихиноном, промежуточным продуктом автоокисления катехоламинов, продолжая, таким образом, процесс окисления [20]. Таким образом, причина исследуемого феномена – комплексообразование с кальцием, приводящее к изменению кислотно-основных свойств с ускорением переноса электронов на кислород и ростом концентрации *орто*-семихиноната кальция в реакции окисления [20]. Вероятно, такой механизм «работает» и в процессе автоокисления катехоламина адреналина.

Следует отметить, что в работе [20] условия проведения экспериментов существенно отличаются от наших. Используются очень высокие концентрации Ca^{2+} – от 10 до 100 мМ; иной буфер, а именно HEPES-трис, pH до 9,5 и даже с более низкими значениями; высокие концентрации катехолов – от 1 до 5 мМ; отсутствуют данные о наличии лаг-периода. Величина ско-

Влияние ионов кальция на поглощение кислорода при автоокислении адреналина

Добавка CaCl_2 , мкМ	Лаг период, с	Скорость потребления кислорода, нг·атом O_2 /мин
–	$42,5 \pm 9,8$	$123,6 \pm 16,4$
100	$23,4 \pm 3,1^*$	$153,8 \pm 4,3^*$
200	$14,8 \pm 1,5^*$	$140,0 \pm 18,2^* \#$
500	$13,0 \pm 0,8^*$	$142,3 \pm 20,0^* \#$

Примечание.* – $p < 0,005$ – достоверное различие относительно контроля (отсутствие ионов кальция); # – $p > 0,005$ – недостоверно относительно пробы 100 мкМ CaCl_2 .

рости потребления кислорода существенно ниже, чем в наших экспериментах. Однако, на наш взгляд, это не вносит какие-либо существенные изменения в химизм происходящего процесса автоокисления катехоламинов по хиноидному пути превращения. Условия проведения реакции могут влиять на интенсивность реакции, на кинетические параметры реакции, но никак не на суть самого процесса.

Следует отметить, что в настоящей работе кинетические кривые спектральных исследований при фиксированной длине волны в присутствии исследуемых ионов металлов несколько отличаются от ранее представленных [16–18]. И это связано, как оказалось, с исходно заданной более высокой скоростью реакции автоокисления адреналина в предыдущих исследованиях [16–18].

Важнейший результат А.В. Лебедева с соавторами – это данные ЭПР-спектроскопии, показывающие непосредственное участие металл-ионов в образовании комплекса с *o*-семихиноном дофамина [20,21]. Следует отметить, что и последующие работы этих авторов связаны также с изучением взаимодействия ионов кальция уже с продуктами автоокисления катехолов [24,25].

Как и в работах А.В. Лебедева с соавторами [20,21], где использовали пирокатехин и дофамин, в нашей настоящей работе, где мы смотрели автоокисление адреналина, показано, что именно на процесс хиноидного окисления этих катехоламинов оказывают влияние ионы металлов с постоянной валентностью. Известно, что Ca^{2+} и Mg^{2+} участвуют в регуляции генерации O_2^{\bullet} клетками крови – нейтрофилами, моноцитами, эозинофилами, макрофагами и др. [26–29]. Однако в данных супероксидгенерирующих системах иной механизм действия: эти ионы необходимы для формирования и функционирования NADPH-оксидазного комплекса посредством кальмодулин-зависимых реакций [28] и при участии системы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена [29]. Особая роль отводится Mg^{2+} [26].

Исследованное действие ионов металлов на систему генерации супероксидных радикалов может иметь место в организме в случае окисления адреналина по хиноидному пути превращения. Также установлено, что ферменты NADPH-цитохром P450-редуктаза и DT-диафараза могут восстанавливать продукт окисления адреналина адренохром до семихинона или гидрохинона с образованием супероксидных радикалов и пероксида водорода [30]. Свободнорадикальные процессы, происходящие при окислении катехоламинов и восстановлении амино-

хромов, сопровождающиеся образованием активных форм кислорода, имеют место при патогенезе многих заболеваний: болезни Паркинсона, различных форм шизофрении, кардиологических и онкологических заболеваний [2,5,14,15,31–33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что ионы металлов с постоянной валентностью Ca^{2+} и Mg^{2+} могут регулировать цепную реакцию хиноидного окисления адреналина и связанный с ним процесс генерации супероксидных радикалов. Обнаружено их дозозависимое активирующее влияние. Физиологически активные Ca^{2+} и Mg^{2+} могут, таким образом, модулировать действие адреналина в организме.

Автор благодарит Н.Е. Лямину за техническую помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-01234а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. W. Bors, C. Michel, M. Saran, and E. Längfelder, *Biochim. Biophys. Acta* **540** (1), 162 (1978).
2. A. Bindoli, M. P. Rigobello, and L. Galzigna, *Toxicol. Lett.* **48** (1), 3 (1989).
3. F. Marques, R. O. Duarte, J. J. Moura, and M. P. Bicho, *Biopl. Signals* **5**, 275 (1996).
4. R. Alhasan and D. Njus, *Anal. Biochem.* **381** (1), 142 (2008).
5. P. Mucoz, S. Huenchuguala, I. Paris, and J. Segura-Aguilar, *Parkinsons Dis.* 2012:920953 (2012). DOI: 10.1155/2012/920953.
6. Т. В. Сирота, *Биомед. химия* **61** (1), 115 (2015).
7. Т. В. Сирота, *Вопр. мед. химии* **45** (3), 263 (1999).
8. Т. В. Сирота, Патент РФ на изобретение № 2144674, Б.И. № 2 (2000).
9. Т. В. Сирота, *Биомед. химия* **58** (1), 77 (2012).
10. Т. В. Сирота, *Биомед. химия* **59** (4), 399 (2013).
11. Y. Fu, L. Buryanovskyy, and Z. Zhang, *J. Biol. Chem.* **283** (35), 23829 (2008).
12. A. F. Rump, J. Schierholz, R. Rösen, et al., *Arzneimittelforschung* **51** (12), 964 (2001).
13. V. M. Costa, R. Silva, L. M. Ferreira, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **20** (8), 1183 (2007).
14. J. Smythies, A. De Iulius, L. Zanatta and L. Galzigna, *Neurotox. Res.* **4** (1), 77 (2002).
15. K. Jomova and M. Valko, *Toxicology* **283** (2–3), 65 (2011).
16. Т. В. Сирота, N. V. Lange, N. K. Kosjakova, et al., *Curr. Topics Biophys.* **24**, 185 (2000).

17. Т. В. Сирота, в сб. *Материалы Всероссийского рабочего совещания «Митохондрии в патологии»* (Пушино, 2001), сс. 113–115.
18. T. V. Sirota, N. V. Khunderyakova, and M. N. Kondrashova, in *Proc. 7th Internat. Symp. «Metal Ions in Biology and Medicine»* (Saint Peterburg, 2002), pp. 495–497.
19. *Биометаллоорганическая химия*, под ред. Ж. Жауэн и Ж. Фонтесийе-Кэмп (Бином. Лаборатория знаний, М., 2010).
20. А. В. Лебедев, М. В. Иванова, А. А. Тимошин и Э. К. Рууге, *Биомед. химия* **54** (6), 687 (2008).
21. A. V. Lebedev, M. V. Ivanova, A. A. Timoshin, and E. K. Ruuge, *Chem. Phys. Chem.* **8** (12), 1863 (2007).
22. Т. В. Сирота, А. И. Мирошников и К. Н. Новиков, *Биофизика* **55** (6), 990 (2010).
23. H. P. Misra and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **247**, 3170 (1972).
24. А. В. Лебедев, М. В. Иванова и Э. К. Рууге, *Биофизика* **56** (2), 205 (2011).
25. А. В. Лебедев, М. В. Иванова, А. А. Тимошин и Э. К. Рууге, *Биофизика* **58** (1), 47 (2013).
26. W. L. Gabler, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **70** (2), 213 (1990).
27. H. Suzuki, M. J. Pabst and R. B. Johnston Jr., *J. Biol. Chem.* **260** (6), 3635 (1985).
28. T. Yamashita and A. Someya, *Biochim. Biophys. Acta* **927** (3), 359 (1987).
29. L. Simchowitz, M. A. Foy and E. J. Cragoe Jr., *J. Biol. Chem.* **265** (23), 13449 (1990).
30. S. Baez and J. Segura-Aguilar, *J. Biochem. Mol. Med.* **56** (1), 37 (1995).
31. J. Smythies, *Neurotox. Res.* **4** (2), 147 (2002).
32. В. Г. Колпаков, *Журн. невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* **74** (8), 1254 (1974).
33. G. S. Behonick, M. J. Novak, E. W. Nealley, and S. L. Baskin, *J. Appl. Toxicol.* **21** (1) 15 (2001).

Effect of Metal Ions with Fixed Valence on Free Radical Process of Adrenaline Autooxidation

T.V. Sirota

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

It has been shown that physiologically active metal ions with fixed valence, Ca^{2+} and Mg^{2+} , accelerate the adrenaline autooxidation in alkaline medium, which proceeds via the quinoid pathway and is accompanied by the generation of reactive oxygen species. It has been found that calcium ions were more effective than magnesium ions. The activation of adrenaline autooxidation manifests itself as a decrease in the time of the initiation of the chain reaction (lag period of the reaction) and an increase in the rate of both oxygen uptake and the formation of adrenochrome, a product of adrenaline oxidation. The effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} cations, observed in the present work, may indicate that they are involved in free radical processes associated with redox reactions in the cell and can also modulate the effect of adrenaline in the organism during its oxidation via the quinoid pathway.

Key words: adrenaline (epinephrine), superoxide anion, calcium and magnesium ions, prooxidant activity