

©Сирота

ДЕЙСТВИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ХИНОИДНЫЙ ПРОЦЕСС АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА; ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРЫ

Т.В. Сирота

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино, Московская область, ул. Институтская, 3; эл. почта: sirotatv@rambler.ru

Супероксидгенерирующая реакция автоокисления адреналина в щелочной среде, применяемая *in vitro* для изучения антиоксидантных свойств различных соединений, моделирует сложный многоступенчатый процесс хиноидного окисления катехоламинов (КА) в организме. Серосодержащие соединения цистеин (Cys) и восстановленный глутатион (GSH), а также, что следует особо отметить, окисленный глутатион (GSSG) ингибируют этот процесс. Исследуемые вещества рассматриваются как ингибиторы хиноидного окисления и оцениваются как антиоксиданты. IC₅₀ Cys и GSH близки и составляют 7,5 мкМ. Ингибирование GSSG выражено слабее, составляя приблизительно 50-70% относительно Cys и GSH. Другие серосодержащие соединения, отличающиеся химическим строением, аминокислоты таурин и метионин были неэффективны. Интерес к данной модели и поиск эффективных соединений, действующих на эту реакцию, связан с обсуждаемым в литературе одним из механизмов этиопатогенеза болезни Паркинсона (БП), который имеет место при нарушении биохимических превращений КА дофамина, а именно процесса его хиноидного окисления. Cys, GSH и GSSG в модельной системе ингибируют хиноидное окисление адреналина, вследствие чего тормозится и образование супероксида (O₂^{•-}). Эксперименты с супероксидгенерирующей ферментативной реакцией ксантин-ксантиноксидаза, химизм которой не связан с образованием хиноидных метаболитов, показали, что исследуемые вещества в данной модели не ингибировали образование O₂^{•-}. Таким образом, установлено, что биологически активные серосодержащие соединения Cys, GSH и GSSG являются специфическими ингибиторами хиноидного окисления КА, и, вероятно, смогут выполнять роль нейропротектора. Предлагается использовать эти вещества в лечении и профилактике БП путём активации их биосинтеза в организме.

Ключевые слова: катехоламины; болезнь Паркинсона; адреналин; аминохром; супероксид; цистеин; восстановленный и окисленный глутатион; таурин; метионин

DOI: 10.18097/PBMC20196504316

ВВЕДЕНИЕ

Супероксидгенерирующая реакция автоокисления адреналина в щелочной среде моделирует процесс хиноидного окисления катехоламинов (КА) в организме. В условиях *in vitro* при внесении адреналина в щелочной карбонатный буфер происходит его превращение до адренохрома по механизму цепной реакции; возможно и более глубокое окисление до адренолютина. Процесс происходит через ряд последовательных этапов с образованием промежуточных соединений (рис. 1А). Эти химические превращения, описанные в литературе [1-3] и в наших работах [4, 5], сопровождаются высвобождением электронов, которые реагируют с растворённым в среде кислородом, в результате чего, как продукт этой реакции, образуются супероксидные анионы (O₂^{•-}) (рис. 1Б). Ранее нами было показано, что в этой реакции могут образовываться и карбонатные радикалы [6].

Таким же образом способны окисляться до соответствующих аминохромов с образованием O₂^{•-} все известные природные катехоламины [1-3, 7, 8]. Этот неферментативный путь окисления КА происходит в организме наряду с основными метаболическими ферментативными превращениями КА [7-9]. При избыточном метаболизме КА, как известно, имеет место кардио- и нейротоксичность, связанные не только с образованием токсичных аминохромов, но и O₂^{•-},

которые при недостаточности антиоксидантной защиты вызывают окислительный стресс. Кардиотоксичность при высоких дозах адреналина объясняется образованием именно этих продуктов [10-11]. Метаболиты хиноидного окисления адреналина имеют отношение и к этиологии шизофрении: существует так называемая “адренохромная” гипотеза возникновения этого заболевания [12-14]. Эти вещества известны как адrenomиметики, обладающие галлюциногенными свойствами [12].

В настоящее время особенно активно обсуждается участие аминохрома катехоламина дофамина в этиопатогенезе болезни Паркинсона (БП) – прогрессирующего нейродегенеративного заболевания, приводящего к гибели (аутофагии) дофаминергических нейронов [7, 8, 14-20]. Дофамин – это нейротрансмиттер, который играет важную роль в осуществлении движений. При БП происходит неконтролируемое цитоплазматическое накопление продукта хиноидного окисления дофамина – вещества меланина (он же нейромеланин) – в КА-нейронах, отложение белка альфа-синуклеина, образование телец Леви, ингибирование протеасом, дисфункция митохондрий, а на ранних этапах заболевания – окислительный стресс и нейровоспаление [7, 8]. Нейромеланину приписывают роль нейротоксина, его избыточное образование вызывает описанные выше явления [8]. В работе Munoz и соавт. [8] детально представлена биохимия БП и химизм процесса хиноидного

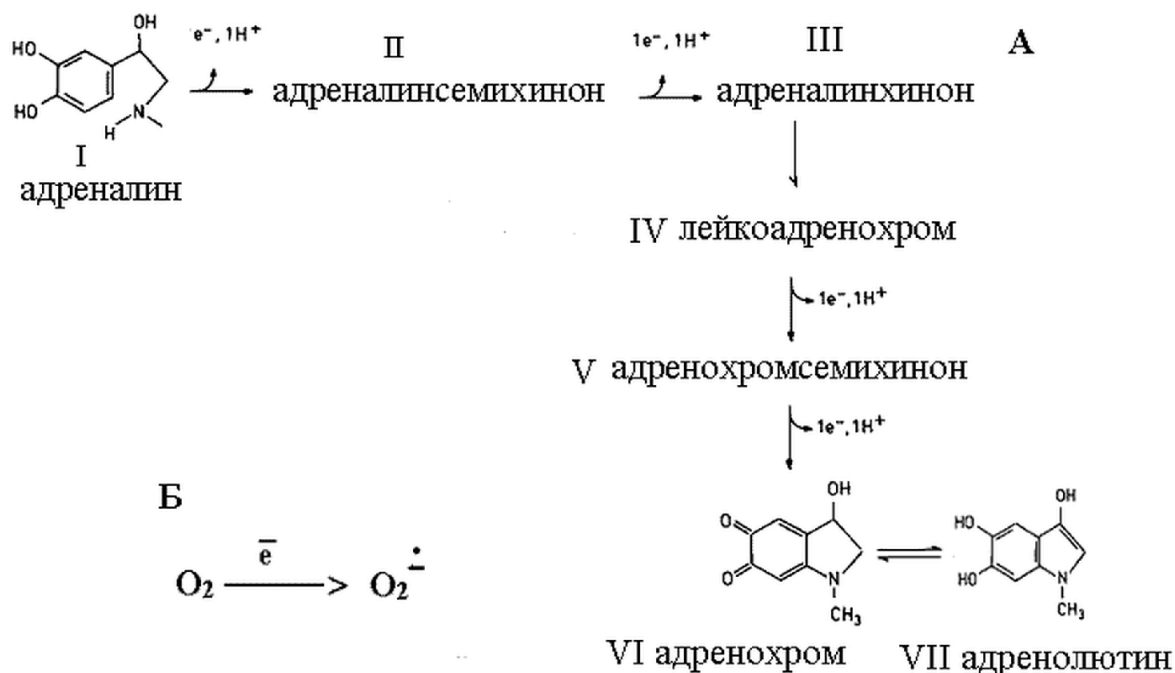


Рисунок 1. А – Схема хиноидного окисления адреналина до адренохрома (VI) и адренолютина (VII); Б – схема сопряжённого образования супероксид анионов, согласно [1, 2] с некоторыми изменениями и добавлениями [3, 4]. Обозначения II-VII – промежуточные и конечные продукты реакции.

окисления дофамина, объясняющий один из возможных молекулярных механизмов развития этой болезни. Нейромеланин возникает в результате химических превращений аминохрома дофамина в 5,6-дигидроксииндол (5,6-dihydroxyindole), который затем окисляется до 5,6-индолхинона (5,6-indolequinone) с последующей полимеризацией и образованием нейромеланина [8]. Процесс происходит в дофаминергических нейронах, а также астроцитах и микроглии в конкретных структурах мозга: *s. nigra*, *locus ceruleus*, *nucleus dorsalis n. vagus*. Первопричина возникновения БП не известна, болезнь прогрессирующая, биохимия сложная, необходим поиск путей её торможения. Хиноидный путь превращения КА описывается “как доклиническая модель БП для поиска нового фармакологического лечения, которое остановило бы развитие этого заболевания” [17, 18].

В литературе известна [21] и мы также применяем в нашей модификации реакцию автоокисления адреналина как методический приём, как супероксидгенирующую модель для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) и выявления про/антиоксидантных свойств различных материалов [4, 5, 22-24]. Однако, по-видимому, эту реакцию можно использовать и как модельную систему хиноидного окисления КА и провести поиск веществ, которые могли бы тормозить этот процесс. Анализ литературы по БП позволил нам поставить такую задачу и провести поиск соединений, которые претендовали бы на роль ингибиторов хиноидного окисления КА, то есть быть нейропротекторами. Важно, что в научном сообществе, как и ранее нами, эта реакция применялась исключительно только как супероксидгенирующая модель для идентификации антиоксидантных свойств

различных материалов. Мы же увидели иные её возможности и в настоящей работе используем как модель хиноидного окисления КА. Сложный многоступенчатый процесс окисления адреналина *in vitro* (рис. 1А) – это прежде всего хиноидное окисление, где процесс химического превращения адреналина сопряжён и с образованием $O_2^{\cdot -}$ (рис. 1Б). Испытание в этой модели выбранных нами соединений не случайно. В литературе обсуждается роль глутатиона в этиологии БП: в определённых отделах мозга при паркинсонизме отмечается его низкая концентрация и эту ситуацию связывают с предпосылкой развития болезни [20, 25-29]. Глутатион считается важнейшим антиоксидантом внутриклеточной среды, определяющим редокс-статус клетки и является кофактором антиоксидантных ферментов: глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы [20, 25-27]. Аминокислота цистеин (Cys) входит в состав глутатиона и необходима для его биосинтеза, а также имеет самостоятельную антиоксидантную активность (АОА).

Таким образом, используя модельную систему и ранее разработанные нами подходы, в настоящей работе были исследованы такие серосодержащие соединения как Cys, глутатион восстановленный (GSH) и окисленный (GSSG), таурин и метионин, предполагая, что, возможно, эти вещества могут быть ингибиторами хиноидного окисления КА и претендовать, таким образом, на роль нейропротектора. Известны антиоксидантные свойства некоторых из этих соединений, а именно Cys, GSH, но не GSSG, а также таурина, однако прямых экспериментальных данных в опытах *in vitro*, мы не обнаружили, а вопрос о способностях этих

соединений ингибировать хиноидные процессы вообще никогда не ставился. Интересно было исследовать и вещество с дисульфидной связью – окисленный глутатион, свойства которого в литературе не обсуждаются, кроме как о продукте окисления GSH. Поиск веществ, способных влиять на процесс хиноидного окисления КА, – актуален. Цель настоящей работы – выявить такие ингибиторы из ряда биологически активных веществ.

МЕТОДИКА

Реакцию автоокисления адреналина в щелочной среде проводили по протоколу, описанному ранее [5, 22-24]. Использовали два разработанных нами подхода: определяли накопление адrenoхрома, – конечного продукта реакции окисления адреналина, – при длине волны 347 нм [22-24] и регистрировали при 560 нм образование диформаза, – продукта восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) супероксид анионами [5, 24]. Применяя тот или другой подход, выявляли способность исследуемых веществ ингибировать процесс хиноидного окисления и проявлять АОА. Спектральные исследования проводили в 0,2 М карбонатном буфере (pH 10,55) на спектрофотометре Unikon 923 (Италия) в режиме “time Driver” при комнатной температуре (19-23°C). При регистрации образования адrenoхрома добавка в реакционную среду адреналина составляла 0,23 мМ, при измерении накопления диформаза вносили 25 мкМ НСТ и затем 29 мкМ адреналина. Такая постановка экспериментов детально описана в наших предыдущих работах [5, 24]. В специальных экспериментах с НСТ для выявления потенциальной возможности ингибирующего действия исследуемых веществ добавлялась заведомо высокая концентрация адреналина – 0,23 мМ. Интенсивная скорость реакции в этом случае ингибировалась более высокими концентрациями исследуемых веществ, иллюстрируя, таким образом, их эффективность. Время регистрации во всех измерениях составило 3-4 мин. Скорость реакции образования адrenoхрома и диформаза оценивали по изменению оптической плотности в единицу времени и рассчитывали по формуле:

$$\Delta E/\Delta t = (E_t - E_1)/\Delta t,$$

где E_1 – регистрируемая оптическая плотность при длине волны 347 или 560 нм сразу же после внесения адреналина, E_t – оптическая плотность через время Δt , в течение которого регистрируется автоокисление адреналина. АОА выражали в условных единицах: 1% ингибирования = 1 усл.ед. В опытах с НСТ, где использовались высокие концентрации адреналина, $\Delta t = 1$ мин.

В экспериментах с супероксидгенирующей ферментативной системой ксантин-ксантиноксидаза использовали метод [30]: 50 мМ Na_2CO_3 буфер (pH 10,2) с 0,4 мМ ЭДТА; в пробе 100 мкМ ксантина, 25 мкМ НСТ и коммерческий препарат ксантиноксидазы 11 мкг белка/мл. Реакцию начинали внесением субстрата ксантина.

Навески исследуемых веществ Cys, GSH и GSSG, таурина, метионина растворяли или в 0,2 М карбонатном буфере (pH 10,55) или в буфере для опытов с ксантин-ксантиноксидазой. Препараты использовались в день приготовления. При необходимости корректировали pH.

В работе использовались реактивы: Na_2CO_3 , нитросиний тетразолий, L-цистеин, восстановленный и окисленный глутатион, таурин, DL-метионин, ксантин, ксантиноксидаза и супероксиддисмутаза “Sigma” (США); NaHCO_3 “J.T. Baker” (Нидерланды). Фармакопейная форма адреналина гидрохлорида от Московского эндокринного завода (Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента (программы Microsoft Excel): определяли среднее значение (M), стандартное отклонение (SD). Представленные данные являются средними значениями, полученными в независимых экспериментах при 4-6 параллельных измерениях в каждом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что Cys в микромолярных концентрациях ингибирует образование адrenoхрома [22, 23]. На рисунке 2А представлены результаты экспериментов, проведенных в присутствии НСТ, где регистрируется накопление диформаза, продукта восстановления НСТ супероксидными радикалами, образующимися в реакции автоокисления адреналина. Показано дозозависимое ингибирующее действие исследуемого соединения. На рисунке 2Б – рассчитанная на основании этих данных АОА. Эффективное действие Cys проявлялось в диапазоне фармакологически значимых концентраций и даже ниже 1 мкМ. В многочисленных публикациях цистеин рассматривают в качестве антиоксиданта, однако экспериментальных данных *in vitro*, иллюстрирующих эти свойства, мы не обнаружили. В используемой модели химические превращения адреналина неразрывно связаны с образованием $\text{O}_2^{\cdot-}$, и потому однозначно утверждается, что ингибиторы этой реакции проявляют антиоксидантные свойства независимо от того, какой продукт реакции измеряется – адrenoхром или супероксид. Как и ранее полученные результаты [22, 23], так и результаты настоящего исследования (рис. 2А,Б) показывают ингибирующее действие Cys.

Cys входит в состав трипептида глутатиона, в значительном количестве присутствует в составе таких белков, как тиоредоксины, специфические белки-антиоксиданты пероксиредоксины [26, 27, 20] и другие; и именно этой аминокислотой обеспечиваются их антиоксидантные свойства.

На рисунке 3 сравниваются эффекты действия Cys и GSH: демонстрируются кинетика измерения накопления диформаза в присутствии разных концентраций Cys (10 мкМ и 100 мкМ) и 100 мкМ GSH. Постановка этого эксперимента отличается от всех, ранее проводимых [5, 24], и на рисунке 2: для инициации реакции вносилась заведомо высокая, в 8 раз большая, концентрация адреналина,

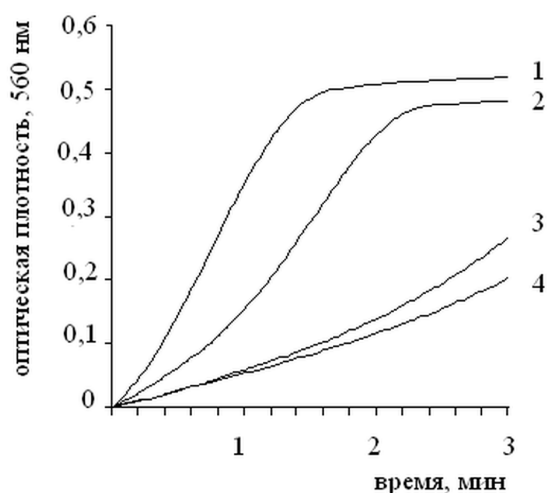
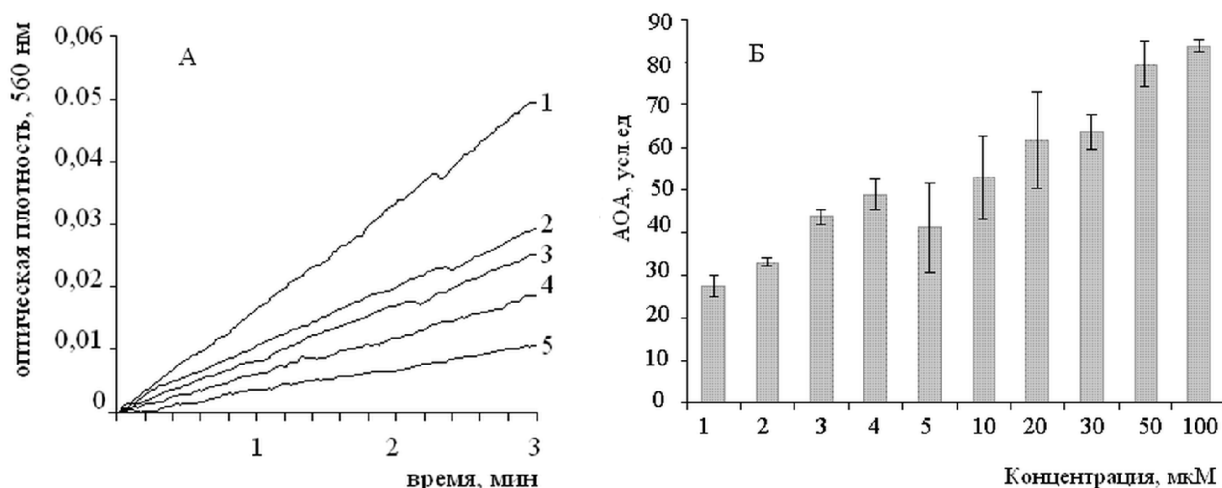


Рисунок 3. Сравнение действия Cys и GSH на образование диформаза при внесении высокой концентрации адреналина (0,23 мМ): 1 – контроль, 2 – 10 мкМ Cys, 3 – 100 мкМ Cys, 4 – 100 мкМ GSH. Условия проведения реакции: 0,2 М карбонатный буфер, pH 10,55; 25 мкМ НСТ. Температура 22°C.

чем требуется по протоколу [24]: – вместо 29 мкМ добавляли 230 мкМ адреналина. Добавленный адреналин окисляется очень быстро и приблизительно через 1,5 мин реакция выходит на плато (рис. 3, кривая 1). В присутствии исследуемых веществ наблюдается их ингибирующее действие: практически одинаковое торможение реакции происходит в присутствии 100 мкМ Cys и 100 мкМ GSH (рис. 3, кривые 3 и 4) и более слабое при 10 мкМ Cys (рис. 3, кривая 2). Рассчитанные величины IC_{50} на основании данных, полученных для Cys и GSH в условиях измерения как на рисунке 2, сходны и составляют 7,5 мкМ. Ингибирующее действие GSH наблюдается и при регистрации образования адренохрома (рис. 4А).

Особое внимание заслуживают результаты с GSSG: обнаружено и его ингибирующее действие

при измерении накопления адренохрома (рис. 4Б), но при более высоких концентрациях, чем Cys и GSH. В литературе не найдены сведения об антиоксидантных свойствах дисульфида, обсуждаются исключительно только свойства GSH. При тех же высоких концентрациях GSSG тормозит и образование O_2^- (рис. 5, кривая 3). 10 мкМ GSSG (рис. 5, кривая 2) в отличие от Cys (рис. 3, кривая 2), был не эффективен. Полученные результаты показывают, что не только Cys и GSH, содержащие сульфгидрильную группу, но и вещество с дисульфидной функциональной группой, GSSG, ингибируют хиноидное окисление адреналина.

На рисунке 6 сравнивается кинетика реакций в присутствии GSH, GSSG и коммерческой СОД. Показано, что действие GSSG (кривая 3) соизмеримо с действием СОД (кривая 2) при данной концентрации фермента, и что ингибирующее действие GSH (рис. 6, кривая 4) сильнее, чем GSSG (рис. 6, кривая 3).

Таким образом, впервые в опытах *in vitro* показано, что вещества как с сульфгидрильной функциональной группой, так и с дисульфидной, могут быть ингибиторами хиноидного окисления адреналина и антиоксидантами. Исследованные другие серосодержащие соединения – аминокислоты таурин (рис. 7) и метионин (данные не представлены) – были не эффективны. Следует отметить, что таурин даже в миллимолярных концентрациях (2 мМ, 5 мМ и 10 мМ) не оказал ингибирующего действия (рис. 7, кривые 2, 3 и 4). В аптечной сети глазные капли “Тауфон”, содержащие это вещество, представляются как антиоксидантное средство. Мы предполагали и в данной модельной системе выявить его ингибирующее действие, подобно тому, как ранее мы исследовали свойства соединения из группы витаминов *пара*-аминобензойной кислоты (ПАБК) и её Na-соли [31]. Однако полученные результаты показывают, что таурин не влиял на хиноидное окисление и не проявлял антиоксидантных свойств. Таурин был не эффективен и в другой модельной супероксидгенирующей

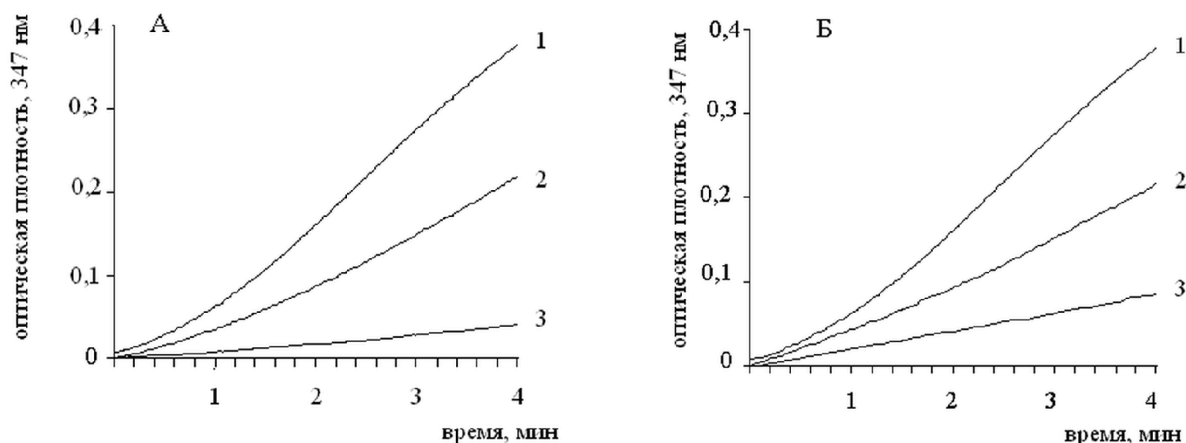


Рисунок 4. Кинетика образования адренохрома в присутствии GSH (А) и GSSG (Б); А: 1 – контроль, 2 – 20 мкМ GSH, 3 – 50 мкМ GSH; Б: 1 – контроль, 2 – 50 мкМ GSSG, 3 – 100 мкМ GSSG. Условия проведения реакции: 0,2 М карбонатный буфер, pH 10,55; 0,23 мМ адрениалин. Температура 20°C.

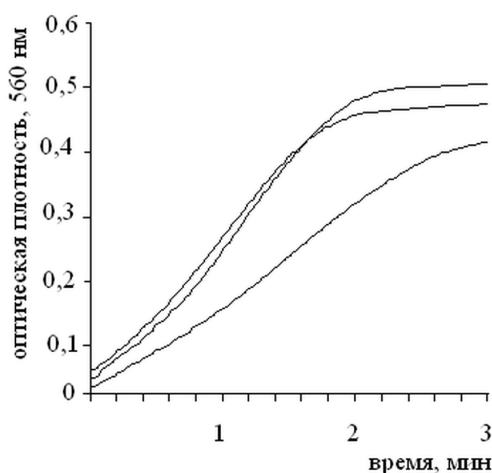


Рисунок 5. Действие GSSG на образование супероксид анионов в реакции автоокисления адрениалина: 1 – контроль, 2 – 10 мкМ, 3 – 100 мкМ. Условия проведения реакции: 0,2 М карбонатный буфер, pH 10,55; 0,23 мМ НСТ, внесена высокая концентрация адрениалина (0,23 мМ). Температура 20°C.

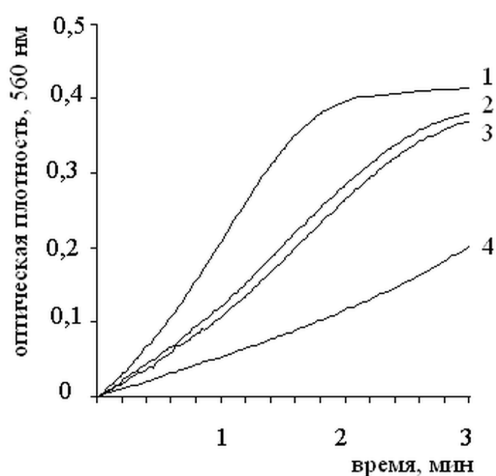


Рисунок 6. Кинетика образования супероксид анионов в присутствии СОД (кривая 2), 100 мкМ GSSG (кривая 3) и 100 мкМ GSH (кривая 4). Контроль – кривая 1. Концентрация – СОД 0,165 мкг белка/мл или 0,635 Ед./мл. Условия проведения реакции: 0,2 М карбонатный буфер, pH 10,55; 25 мкМ НСТ. Температура 19°C.

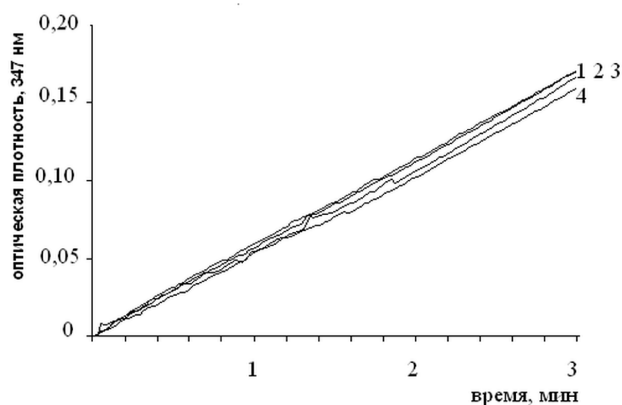


Рисунок 7. Действие таурина (кривые 2, 3 и 4) на образование адренохрома в реакции автоокисления адрениалина: 1 – контроль; таурин: 2 – 2 мМ, 3 – 5 мМ, 4 – 10 мМ. Условия проведения реакции: 0,2 М карбонатный буфер, pH 10,55; 0,23 мМ адрениалин. Температура 19°C.

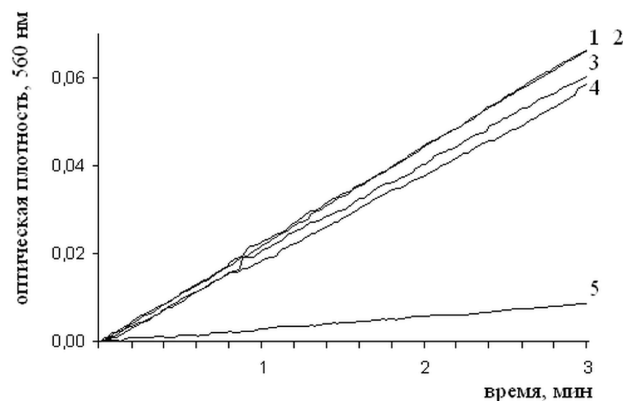


Рисунок 8. Кинетика образования диформаза в супероксидгенерирующей реакции ксантиноксидазы в присутствии СОД (кривая 5) и исследуемых веществ: 1 – 100 мкМ GSSG, 2 – 500 мкМ GSSG, 3 – 200 мкМ Cys, 4 – контроль. СОД – 0,165 мкг белка/мл. Условия измерения: 50 мМ карбонатный буфер и 0,4 мМ ЭДТА, pH 10,2; 100 мкМ ксантин, 25 мкМ НСТ, ксантиноксидазы 11 мкг белка/мл. Температура 20°C.

реакции ксантин-ксантиоксидаза (см. далее). Полученные нами результаты ставят под сомнение наличие антиоксидантных свойств таурина.

О специфичности действия Cys, GSH, GSSG именно на процесс хиноидного окисления указывают эксперименты с использованием другой модельной системы супероксигенирующей ферментативной реакции ксантин-ксантиоксидаза, которая, как методический приём, применяется для выявления антиоксидантных свойств. Эта реакция одноэтапная, характерная для всего класса оксидаз: под действием фермента субстрат ксантин окисляется до мочевой кислоты с образованием $O_2^{\cdot-}$. Ингибирование реакции в присутствии исследуемых веществ рассматривается как проявление антиоксидантной активности [30]. Cys, GSH, GSSG (рис. 8, кривые 1, 2, 3), а также и таурин (данные не приводятся), в отличие от СОД (рис. 8, кривая 5), не ингибировали эту реакцию.

Таким образом, полученные результаты показывают, что Cys, GSH, GSSG влияют именно на хиноидное окисление, вероятно, взаимодействуя с промежуточными интермедиатами этой реакции в процессе превращения адреналин → адренохром (рис. 1А). Подобный механизм действия обсуждался нами в работе [32], где описана активация процесса хиноидного окисления адреналина ионами металлов постоянной валентности Ca^{2+} и Mg^{2+} . Наши заключения были сделаны на основе данных работы Лебедева и соавт. [33], экспериментально показавших взаимодействие ионов металлов с промежуточными продуктами реакции автоокисления катехоламинов пирокатехина и дофамина. Считается, что ионы металлов переменной валентности (марганец, железо), участвуют в патогенезе БП [8, 20, 34]. Возможно, что и ионы металлов постоянной валентности Ca^{2+} и Mg^{2+} , которые активируют процесс хиноидного окисления КА [32, 33], также могут принимать участие в этих событиях, особенно ионы кальция, поскольку непосредственно задействованы в синаптической передаче.

Таким образом, установлено, что биологически активные серосодержащие соединения Cys, GSH и GSSG являются специфическими ингибиторами хиноидного окисления КА и, вероятно, могут выполнять в организме роль нейропротектора в дофаминергических нейронах мозга, нарушение функционирования которых, как известно, связано с этиологией БП. В развитие БП вовлечены различные ферментативные системы: моноаминоксидаза (MAO), катехол-О-метилтрансфераза (COMT), DT-диафараза и другие [8, 15, 35-37]. И, как отмечалось во введении, особое место принадлежит неферментативному хиноидному окислению дофамина, при нарушении метаболизма которого происходит избыточное образование нейротоксина нейромеланина [8, 15, 17, 20, 35, 36]. В настоящей работе показано, что нейропротекторами и антиоксидантами могут быть вещества, содержащие сульфгидрильную и дисульфидную группы. В литературе обсуждается протекторная роль тиоловых соединений и применение их как лекарственных

форм [37]. Существуют препараты цистеина и глутатиона: “Цистеин”, “N-ацетил-L-цистеин” (NAC) и “Цистин” – окисленная форма цистеина, а также “Глутатион” и “N-ацетил-глутатион”. Они используются как терапевтические препараты различного назначения, в том числе и при БП [37]. Глутатион предлагается исключительно в восстановленной форме – GSH. Эффективность их действия при БП сложно оценить. Так, в работе [37] NAC рассматривается не как антиоксидант, а как предшественник для синтеза глутатиона в глутатион-дефицитных клетках; авторы считают, что NAC будет неэффективен в клетках с достаточным уровнем глутатиона. В то же время сообщается, что приём NAC совместно со специальными лекарственными препаратами, назначаемыми при БП, оказывал благотворное действие [38]. Эффективное действие NAC отмечено и в культуре клеток, где было исследовано взаимодействие MAO с хиноидным окислением дофамина [39]. Несмотря на важность и значимость гомеостаза тиолов при БП, на наличие положительных аннотаций этих препаратов, существует проблема низкой биодоступности при приеме *per os* как NAC [40], так и глутатиона [41]. По этой же причине считается нецелесообразным использовать глутатион и для внутримышечного и внутривенного применения, кроме того, препарат этот очень дорогой [41]. Перспективно, на наш взгляд, вести поиск путей воздействия на систему антиоксидантной защиты в нейронах путём активации синтеза тиоловых соединений, которые могут предотвращать хиноидное окисление. Поскольку биодоступность аптечных форм этих препаратов низка и приём *per os* – это исключительно для микрофлоры ЖКТ, следует активировать внутриклеточный синтез этих соединений. Подобный подход был предложен ещё ранее и не был связан с БП [25]. Современные знания дают возможность пытаться это делать на уровне генетических и молекулярно-клеточных действий, а именно, через активацию пути Nrf2-ARE (ARE-редокс-чувствительная сигнальная система), что может быть эффективным средством предотвращения гибели нейронов [42-45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

1. Сделана переоценка использования реакции автоокисления адреналина и представлено её более широкое применение – как модель хиноидного окисления КА в организме, а не только как антиоксидантная система.

2. Показано, что тиоловые соединения, Cys и GSH, а также и дисульфид GSSG дозозависимо ингибируют хиноидное окисление адреналина, что предполагает использование этих соединений как нейропротекторов в лечении и профилактике БП путём направленного воздействия на систему синтеза этих соединений в организме. Такой подход может быть одним из способов защиты клетки от токсического действия продуктов хиноидного окисления КА и окислительного стресса.

3. Cys, GSH, GSSG не влияли на генерацию супероксид анионов в реакции ксантиноксанидазы, что указывает на их специфичное действие именно на хиноидное окисление КА.

4. В экспериментах *in vitro* не выявлены антиоксидантные свойства аминокислоты таурин.

Таким образом, впервые *in vitro* показано, что вещества как с сульфгидрильной функциональной группой, так и с дисульфидной, могут быть ингибиторами хиноидного окисления адреналина и антиоксидантами.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа частично поддержана Договором 03/2018-АКС от 2 февраля 2018.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА

- Bindoli A., Rigobello M.P., Galzigna L. (1989) Toxicol. Lett., **48**, 3-20.
- Marques F., Duarte R.O., Moura J.J., Bicho M.P. (1996) Biopl. Signals, **5**, 275-282.
- Bindoli A., Rigobello M.P., Deeble D.J. (1992) Free Radic. Biol. Med., **13**, 391-405.
- Cupoma T.B. (2012) Биомед. химия, **58**(1), 77-87. [Sirota T.V. (2012) Biomed. khimiya, **58**(1), 77-87.]
- Cupoma T.B. (2013) Биомед. химия, **59**(4), 399-410. [Sirota T.V. (2013) Biomed. khimiya, **59**(4), 399-410.]
- Cupoma T.B. (2015) Биомед. химия, **61**(1), 115-124. [Sirota T.V. (2015) Biomed. khimiya, **61**(1), 115-124.]
- Smythies J., Galzigna L. (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1380**, 159-162.
- Muñoz P., Huenchuguala S., Paris I., Segura-Aguilar J. (2012) Parkinson's Dis., **2012**, 920953. DOI: 10.1155/2012/920953.
- Меньшиков В.В., Большакова Т.Д. (1964) В кн. Адреналин и норадреналин. М.: Наука, сс. 284-293. [Men'shikov V.V., Bol'shakova T.D. (1964) In: Adrenaline and norepinephrine. M.: Science, pp. 284-293.]
- Rump A.F., Schierholz J., Rösen R., Güttler K., Klaus W. (2001) Arzneimittelforschung, **51**, 964-970.
- Costa V.M., Silva R., Ferreira L.M., Branco P.S., Carvalho F., Bastos M.L., Carvalho R.A., Carvalho M., Remião F. (2007) Chem. Res. Toxicol., **20**, 1183-1191.
- Колпак В.Г. (1974) Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, **74**, 1254-1263. [Kolpakov V.G. (1974) Korsakov J. Neuropathology Psychiatry, **74**, 1254-1263.]
- Smythies J. (2002) Neurotox. Res., **4**(2), 147-150.
- Smythies J. (2000) Antioxid. Redox. Signal., **2**(3), 575-583.
- Segura-Aguilar J., Paris I., Muñoz P., Ferrari E., Zecca L., Zucca F.A. (2014) J. Neurochem., **129**(6), 898-915.
- Smythies J., De Iuliis A., Zanatta L., Galzigna L. (2002) Neurotox. Res., **4**(1), 77-81.
- Santos C.C., Araújo F.M., Ferreira R.S., Silva V.B., Silva J.H.C., Grangeiro M.S., Soares É.N., Pereira L., Souza C.S., Costa S.L., Segura-Aguilar J., Silva V.D.A. (2017) Toxicology In Vitro, **42**, 54-60.
- Segura-Aguilar J., Huenchuguala S. (2018) Front Neurosci., **12**, 106.
- Jenner P., Dexter D.T., Sian J., Schapira A.H.V., Marsden F.R.S. (1992) Ann. Neurol., **32**, 82-87.
- Дубинина Е.Е. (2006) Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток, Санкт-Петербург, сс. 111-135. [Dubinina E.E. (2006) Produkti metabolisma kisloroda v funkzional'noi aktivnosti kletok, St. Petersburg, pp. 111-135.]
- Misra H.P., Fridovich I. (1972) Biol. Chem., **247**, 3170-3175.
- Cupoma T.B. (1999) Патент РФ на изобретение № 214674. Бюлл. Изобретений № 2, 20.01.2000. [Sirota T.V. (1999) Patent RF No. 214674, Bull. Isobretenii No. 2, 20.01.2000.]
- Cupoma T.B. (1999) Вopr. мед. химии, **45**(3), 263-272. [Sirota T.V. (1999) Vopr. med. khimii, **45**(3), 263-272.]
- Cupoma T.B. (2016) Биомед. химия, **62**(6), 650-655. [Sirota T.V. (2016) Biomed. khimiya, **62**(6), 650-655.]
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1990) Успехи биол. химии, **31**, 157-179. [Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. (1990) Uspechi biol. khimii, **31**, 157-179.]
- Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. (2001) Окислительный стресс, Из-во: Маик Наука / Интерпериодика, сс. 154-158. [Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shchikova E.B. (2001) Okislitelny stress, Maik Nauka / Interperiodica, pp. 154-158.]
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. (2006) Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. Из-во: Фирма Слово Москва, сс. 393-414. [Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovich N.F., Trufakin V.A. (2006) Okislitelny stress. Prooxidanty i antioxidanty. Firma Slovo, Moscow, pp. 393-414.]
- Bannon N.J., Goedert M., Williams B. (1984) Biochem. Pharmacol., **33**(17), 2697-2698.
- Perry T.L., Godin D.V., Hansen S. (1982) Neurosci. Lett., **33**(3), 305-310.
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Anal. Biochem., **44**, 276-287.
- Cupoma T.B., Лямина Н.Е., Вайсфельд Л.И. (2017) Биофизика, **62**(45), 846-851. [Sirota T.V., Lyamina N.E., Weisfeld L.I. (2017) Biofizika, **62**(45), 846-851.]
- Cupoma T.B. (2016) Биофизика, **61**(1), 22-27. [Sirota T.V. (2016) Biofizika, **61**(1), 22-27.]
- Лебедев А.В., Иванова М.В., Тимошин А.А., Руузе Э.К. (2008) Биомед. химия, **54**(6), 687-695. [Lebedev A.V., Ivanova M.V., Timoshin A.A., Ruuge E.K. (2008) Biomed. khimiya, **54**(6), 687-695.]
- Jomova K., Valko M. (2011) Toxicology, **283**(2-3), 65-87.
- Herrera-Soto A., Díaz-Veliz G., Mora S., Muñoz P., Henny P., Steinbusch H.W.M., Segura-Aguilar J. (2017) Neurotox. Res., **32**(1), 134-140.
- Huenchuguala S., Muñoz P., Graumann R., Paris I., Segura-Aguilar J. (2016) Neurotoxicology, **55**, 10-12.
- Rushworth G.F., Megson I.L. (2014) Pharmacol. Ther., **141**(2), 150-159.
- Martínez-Banaclocha M.A. (2012) Med. Hypotheses, **79**(1), 8-12.
- Goldstein D.S., Jinsmaa Y., Sullivan P., Sharabi Y. (2017) Neurochem. Res., **42**(11), 3289-3295.

40. Coles L.D., Tuite P.J., Öz G., Mishra U.R., Kartha R.V., Sullivan K.M., Cloyd J.C., Terpstra M. (2018) J. Clin. Pharmacol., **58**(2), 158-167.
41. <https://natureweight.ru/glutation/>
42. Izumi Y. (2013) Yakugaku Zasshi, **133**(9), 983-988.
43. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. (2013) Биохимия, **78** (1), 27-47. [Zenkov N.K., Men'shchikova E.B., Tkachev V.O. (2013) Biochemistry, **78**(1), 27-47.]
44. Lee J.A., Son H.J., Choi J.W., Kim J., Han S.H., Shin N., Kim J.H., Kim S.J., Heo J.Y., Kim D.J., Park K.D., Hwang O. (2018) Neurochem. Int., **112**, 96-107.
45. Tarazi F.I., Sahli Z.T., Wolny M., Mousa S.A. (2014) Pharmacol. Ther., **144**(2), 123-133.

Поступила в редакцию: 16. 11. 2018.
После доработки: 27. 04. 2019.
Принята к печати: 29. 04. 2019.

EFFECT OF THE SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS ON THE QUINOID PROCESS OF ADRENALINE AUTOXIDATION; POTENTIAL NEUROPROTECTORS

T.V. Sirota

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290 Russia; e-mail: sirotatv@rambler.ru

The superoxide-generating reaction of adrenaline autoxidation in an alkaline medium, used *in vitro* to identify the antioxidant properties of various compounds, simulates the complex multistep process of quinoid oxidation of catecholamines (CA) in the body. Sulfur-containing cysteine (Cys) and reduced glutathione (GSH), as well as oxidized glutathione (GSSG), have been shown to inhibit this process. The studied substances were considered as inhibitors of quinoid oxidation and are evaluated as antioxidants. The IC₅₀ values for Cys and GSH were close to 7.5 mM. Inhibition by GSSG was weaker; represented approximately 50-70% of Cys and GSH. Other sulfur-containing compounds that differ in chemical structure, the amino acids taurine and methionine were ineffective. The interest in this model and the search for effective compounds acting on this reaction is associated with one of the mechanisms of the etiopathogenesis of Parkinson's disease (PD) discussed in the literature, which occurs when the biochemical transformations of dopamine CA and its quinoid oxidation process are violated. Cys, GSH and GSSG in the model system inhibit quinoid oxidation of adrenaline, as a result of which the formation of superoxide (O₂^{•-}) is also inhibited. Experiments with the superoxide-generating enzymatic reaction xanthine xanthioxidase, the chemistry of which is different and not related to formation of quinoid metabolites, showed that the studied substances did not inhibit O₂^{•-} formation in this model. Thus, it was established that the biologically active sulfur-containing compounds Cys, GSH and GSSG are specific inhibitors of quinoid oxidation of CA, and are likely to be able to play the role of a neuroprotector. It is proposed to use these compounds in the treatment and prevention of PD by activating their biosynthesis in the body.

Key words: catecholamines; Parkinson's disease; adrenaline (epinephrine); aminochrome; superoxide; cysteine; reduced and oxidized glutathione; taurine; methionine

Funding. The study was partly funded by grant 03/2018-AKS from 02.02.2018.

Received: 16.11.2018, revised: 27.04.2019, accepted: 29.04.2019.