

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ВЛИЯНИЕ ЛИТИЕВОЙ СОЛИ ТАУРИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Л.М. Овсепян*, Г.С. Казарян, А.В. Зангинян, Г.М. Захарян,
Р.М. Григорян, Н.К. Саркисян

Институт молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения

РЕЗЮМЕ. Изучено действие вновь синтезированного препарата, представляющего собой литиевую соль таурина, при экспериментальной болезни Паркинсона. Исследована цитотоксичность препарата (*in vitro*); проведено моделирование экспериментальной болезни Паркинсона (*in vivo*) введением МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрапиридин). Результаты исследования показали, что литиевая соль таурина не цитотоксична по отношению к клеткам человека K562 (хроническая миелоидная лейкемия человека). Показано, что введение литиевой соли таурина животным с экспериментальной болезнью Паркинсона в дозе 50 мг/кг уменьшает содержание перекисей и гидроперекисей липидов, а также окислительную модификацию белков. Полученные данные интерпретируются в связи с антиоксидантным свойством препарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, литий, таурин.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, проявляющееся двигательными, психическими и вегетативными расстройствами. Прогрессирующее течение, недостаточная эффективность терапии, тяжелая инвалидизация, наступающая у большинства больных, превращают БП в серьезную социальную проблему.

В основе двигательных нарушений при БП (тремора, ригидности, олигокинезии) лежит первичное поражение дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции, что приводит к снижению уровня дофамина в стриатуме (Крыжановский и др., 2002). В качестве основных патофизиологических механизмов БП рассматривают гиперактивацию глутаматных NMDA рецепторов, образование свободных радикалов и окислительный стресс, приводящий к нарушению дыхательной функции митохондрий и энергетическому дефициту, преждевременный апоптоз, иммунопатологические реакции (Navarro et al., 2009; Tsang et al., 2009).

ДОФА-содержащие препараты являются наиболее эффективным противопаркинсоническим средством и рассматриваются как базовая терапия БП. В то же время длительный прием приводит к возникновению серьезных побочных эффектов, поэтому в настоящее время большое внимание уделяется поискам препаратов, имеющих другой механизм действия.

Препараты лития применяют при различных нейродегенеративных заболеваниях. Ионы лития повышают чувствительность нейронов гиппокампа и других областей мозга к действию дофамина и направлены на нормализацию обмена медиаторов в центральной нервной системе (ЦНС). Литий конкурирует с ионами натрия, участвуя в регуляции работы кальциевых каналов в митохондриях, а также снижает активацию апоптозного каскада (Marmol, 2008; Perez-Martinez, 2009). Таурин является естественным продуктом обмена серосодержащих аминокислот: цистеина, цистеинамина, метионина. Он способствует нормализации функций клеточных мембран, активизации энергетических и обменных процессов, сохранению электролитного состава цитоплазмы за счет накопления K^+ и Ca^{2+} , улучшения условий проведения нервного импульса, обладает осморегуляторным и мембранопротекторным свойствами, положительно влияет на фосфолипидный состав мембран (El Idrissi, L'Amoreaux (eds.), 2012).

Исходя из этого, целью настоящего исследования явилось изучение влияния литиевой соли таурина на развитие свободнорадикальных процессов при экспериментальной болезни Паркинсона. Исследование влияния синтезированного авторами препарата проводили на клеточной культуре (*in vitro*) и на животных с экспериментально вызванной болезнью Паркинсона (*in vivo*).

* Адрес для переписки:

Овсепян Лаура Михайловна

E-mail: lhovsep@mail.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестирование цитотоксичности литиевой соли таурина. Клеточную линию KCL-22 (хроническая миелоидная лейкемия человека) культивировали в питательной среде RPMI-1640, с содержанием 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °С. Клетки KCL-22 в концентрации $0,5 \cdot 10^6$ кл./мл культивировали в 24-луночных планшетах в течение 24 ч, после чего к ним добавляли исследуемое вещество в различных концентрациях (1–1000 мг/мл). После 48 ч инкубации добавляли 0,4% красителя трипанового синего и определяли выживаемость клеток. Цитотоксичность препарата определяли с помощью значения IC_{50} – концентрации исследуемого соединения, вызывающего 50%-ное подавление жизнеспособности клеток. Результаты представлены в виде средних значений с обозначением стандартной ошибки. Статистическую достоверность между двумя измерениями определяли с помощью двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок. Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически достоверные.

Для оценки цитотоксичности исследуемого препарата использовали метод исключения витального красителя трипанового синего (Trypan Blue Exclusion Test Cell Viability) Этот метод использовали для подсчета числа живых/мертвых клеток с помощью водного раствора красителя. Метод основан на том принципе, что краситель не проникает в живые клетки, плазматическая мембрана которых не повреждена, тогда как мертвые клетки с поврежденной плазматической мембраной окрашиваются в синий цвет вследствие проникновения красителя в клетку (Dayle, 1998).

Эксперименты на животных. Модель экспериментальной болезни Паркинсона осуществляли ежедневным внутривнутренним введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрапиридина (МФТП) в дозе 25 мг/кг в течение 6 дней (Kryzhanovsky et al., 1997). Поведенческие характеристики (координация движений, тремор, ригидность мышц, олигокинезия) служили критерием развития болезни. Животные были распределены на три группы по 10 животных в каждой: 1-я – интактные; 2-я – животные с экспериментальной БП; 3-я – животные с экспериментальной БП, получавшие исследуемый препарат в дозе 50 мг/кг. Исследуемое вещество вводили с 6-го по 15-й дни эксперимента, через 1 ч после введения МФТП. Животных забивали на 15-й день эксперимента через 1 ч после введения литиевой соли таурина.

Об активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по количеству образования гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА). Гидроперекиси определяли по цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм; МДА – по реакции с тиобарбитуровой кислотой (Арутюнян и др., 2000); количество белка – по Лоури (Lowry et al., 1951).

Для количественного определения продуктов окислительной модификации белков был применен метод, основанный на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков и 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, количество которых определяли спектрофотометрически. Оптическую плотность образовавшихся карбонильных производных динитрофенилгидразонов регистрировали при различных длинах волн: 356 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального характера; 370 нм – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) нейтрального характера; 430 нм – алифатические КДНФГ основного характера; 530 нм – алифатические АДНФГ основного характера (Levine et al., 1990). Белок определяли по Лоури (Lowry et al., 1951).

Полученные в ходе исследования результаты обрабатывали статистически по *t*-критерию Стьюдента

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследования, литиевая соль таурина не цитотоксична по отношению к клеткам человека KCL-22 (рис. 1). Уровень выживаемости клеток начал достоверно снижаться, начиная с концентрации 10 мг/мл, однако даже при максимальной исследованной концентрации (1000 мг/мл) выживаемость клеток составила 75%.

Исследования, проведенные на интактных крысах, позволили обнаружить определенный стационарный уровень интенсивности свободно-радикальных реакций; развитие экспериментальной БП сопровождалось активированием процесса ПОЛ, что выражалось в увеличении содержания ГП и МДА (см. таблицу).

Увеличению содержания перекисей в головном мозге способствует высокое содержание в нем легкоокисляемых субстратов, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, катехоламины, сравнительно низкий уровень антиоксидантов – глутатиона и витамина Е, фермента супероксиддисмутазы, а также наличие негеминового железа, которое является активатором ПОЛ (Hirsch, 2009; Friedman et al., 2009).

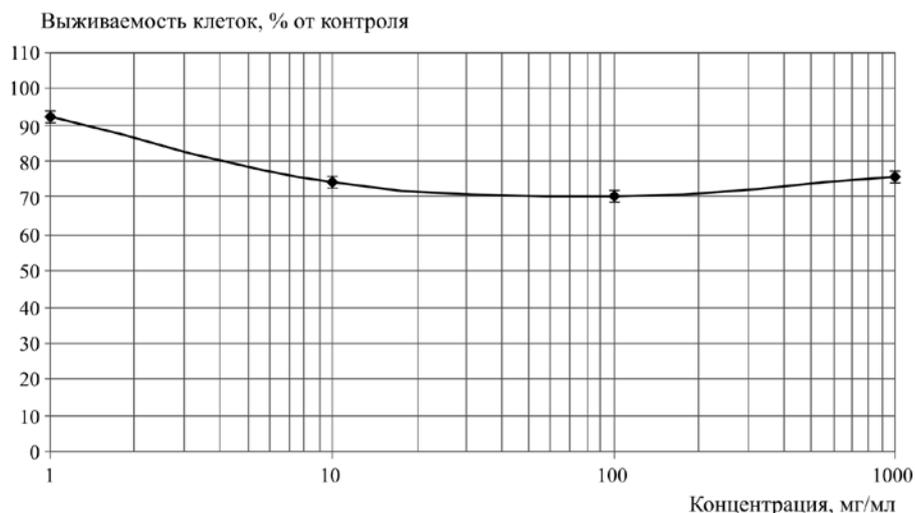


Рис. 1. Кривая выживаемости клеточной линии человека KCL-22 после воздействия Li-таурина

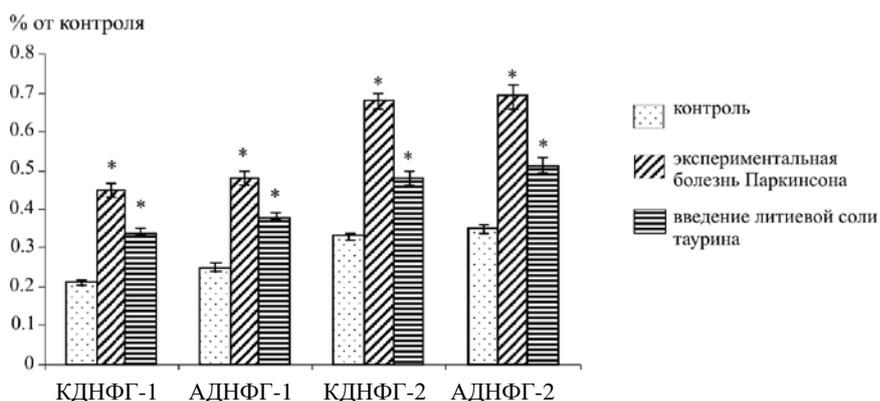


Рис. 2. Исследование окислительной модификации белков в общем гомогенате головного мозга при экспериментальной болезни Паркинсона и при лечении (n = 20): 1 – 356 нм, 370 нм – нейтрального характера, 2 – 430 нм, 530 нм – основного характера); * – p < 0,01

Исследование гидроперекисей и перекисей липидов, в общем гомогенате головного мозга при экспериментальной болезни Паркинсона и при лечении (n = 20)

Показатель	Контроль	Экспериментальная болезнь Паркинсона	Введение литиевой соли таурина животным с БП
Гидроперекиси, нмоль /мг белка	0,58 ± 0 05	1,23 ±0,04*	0, 77 ± 0,03*
МДА, нмоль/мгбелка	7,65 ± 0,9	12,42 ± 0,6*	8,04 ± 0,8*

Примечание: * – p < 0,001.

Активные формы кислорода (АФК) вызывают также окислительную модификацию белков, в результате чего усугубляются повреждения. Считают, что в состоянии окислительного стресса атаке АФК в первую очередь подвергаются не липиды, а белки мембран (Дубинина, 2006). Анализ уровней окислительной модификации белков в общем гомогенате головного мозга у животных с

болезнью Паркинсона (рис. 2) показал, что по сравнению с интактными животными статистически значимо увеличивается уровень алифатических альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов нейтрального и кислого характера, регистрируемых при длинах волн 356, 370, 430 и 530 нм. Данный факт свидетельствует об увеличении интенсивности процесса окислительной деструкции

белков. Фактически все аминокислотные остатки белков способны к окислению, что приводит к изменению их функций. Окислению подвергаются сульфо- и аминокислотные группы аминокислот, что приводит к образованию поперечных сшивок между белками или между белком и другой молекулой, содержащей NH_2 -группу. Наиболее распространенным пусковым механизмом окислительного повреждения мембранных белков является реакция сульфгидрильных (SH) групп аминокислот со свободными радикалами.

При этом образуются радикалы с локализацией неспаренного электрона около атома серы ($-\text{S}^\bullet$), которые затем взаимодействуют друг с другом с образованием дисульфидов. Результатом окисления аминокислот может быть нарушение вторичной и третичной структуры белков, облегчающее дальнейшее окисление аминокислотных остатков, и денатурация белковых молекул, в результате чего нарушаются их функции, в частности, инактивируются ферменты (Bagyeva et al., 2004).

Из литературных данных известно, что при БП в черной субстанции, в противоположность другим отделам мозга, снижено число глиальных клеток, содержащих естественный антиоксидант – глутатионпероксидазу, а также отмечен низкий уровень глутатиона (Thiruchelvam et al., 2005; Ноеркен et al., 2007).

Низкий уровень антиоксидантов сопровождается высоким уровнем активных форм кислорода, обладающих свойствами ингибировать сульфгидрильные группы ферментов и повреждать NH_2 -группы мембранных белков. В этих условиях целесообразно использование препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами.

В этой связи проведено исследование по изучению влияния синтезированного авторами препарата на содержание активных метаболитов кислорода в головном мозге животных с экспериментальной БП. Введение литиевой соли таурина животным с экспериментальной БП приводит к уменьшению содержания перекисей липидов и окислительной модификации белков, приближая их к показателям контрольных животных, что может являться доказательством способности препарата оказывать антиоксидантное действие (см. таблицу). Механизм нейропротекторного действия синтезированного авторами вещества связан с тем, что в его структуру входит таурин, который принимает участие в синтезе глутатиона. Глутатион – трипептид, образованный аминокислотами цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. Его основной антиоксидантный эффект реализуется посредством участия в работе антиоксидантных ферментов глу-

татионпероксидазы и глутатионредуктазы. Глутатион, как и другие SH-содержащие белки, является акцептором активных форм кислорода и тем самым ингибирует свободнорадикальное окисление. Кроме того, таурин в своей структуре содержит серу, а как известно, серосодержащие аминокислоты обладают антиоксидантными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Как показали результаты, введение литиевой соли таурина приводит к уменьшению образования свободнорадикальных продуктов окисления липидов и белков при экспериментальной БП.
2. Механизм нейропротекторного действия использованного авторами вещества связан с тем, что в его структуру входит таурин, содержащий SH-группу, являющиеся акцептором активных форм кислорода, и тем самым ингибирует свободнорадикальное окисление.
3. Синтезированный препарат может быть эффективен при различных патологических состояниях, характеризующихся нарушением окислительных процессов, и в связи с этим представляет определенный научно-практический интерес.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб.: Фолиант, 2000. 104 с.
(Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. [Methods for evaluation of free radical oxidation and antioxidant system in the body]. Saint Petersburg: Foliant, 2000 [in Russ]).
- Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, создание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические процессы. СПб., 2006. 397 с.
(Dubinina E.E. [Oxygen metabolism products in functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinic-biochemical processes]. Saint Petersburg, 2006 [in Russ]).
- Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В. Болезнь Паркинсона. М.: Медицина, 2002. 336 с.
(Kryzhanovsky G.N., Karaban I.N. Magaeva S.V. [Parkinson's disease]. Moscow: Meditsina, 2002 [in Russ]).
- Bagyeva G.K., Fedorova T.N., Stvolinsky S.L. Oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2004, 19(9):266.
- Dayle A. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. Chichester: John Wiley Sons, 1998. 354 p.
- El Idrissi A., L'Amoreaux W. (eds.) Taurine in health and disease. Kerala: Transworld Research Network, 2012.
- Friedman A., Galazka-Friedman J., Koziorowski D. Iron as a cause of Parkinson disease – a myth or a well established hypothesis? *Parkinsonism Relat Disord.* 2009, 15(3):212–214.

Hirsch E.C. Iron transport in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009, 3:209–211.

Hoepken H.H., Gispert S., Morales B., Wingerter O., Del Turco D., Mulsch A., Nussbaum R.L., Muller K., Drose S., Brandt U., Deller T., Wirth B., Kudin A.P., Kunz W.S., Auburger G. Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. *Neurobiol Dis.* 2007, 25(2):401–411.

Kryzhanovsky G.N., Kucheryanu V.G., Pozdnyakov O.M. Effects of fibroblast growth factors on MPTP-induced parkinsonian syndrome in mice. *Pathophysiology.* 1997, 4:59–67.

Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990, 186:464–478.

Lowry N.J., Rosenbogh A.J., Farr A.L. Protein measurement with folinphenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193:265–275.

Marmol G. Lithium: bipolar disorder and neurodegenerative diseases. Possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008, 12(32):1761–1771.

EFFECT OF LITHIUM SALT OF TAURINE AT EXPERIMENTAL PARKINSON'S DISEASE

**L.M. Hovsepyan, G.S. Kazaryan, H.V. Zanginyan, G.V. Zakaryan,
R.M. Grigoryan, N.K. Sarkisyan**

Institute of Molecular Biology, Armenian National Academy of Sciences, Hasratyan str. 7, Yerevan, 0014, Armenia

ABSTRACT. The aim of this work was to study the effect of a newly synthesized drug, the lithium salt of taurine, at experimental Parkinson's disease. Drug cytotoxicity (*in vitro*) was investigated; experimental Parkinson's disease (*in vivo*) was simulated by administration of MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrapiridin) at a dose of 25 mg/kg. The results showed that the lithium salt of taurine was not cytotoxic towards KCL-22 cells (human chronic myeloid leukemia). The level of cell viability began to decrease significantly starting at the concentration of 10 mg/ml, but even at the maximum investigated concentration (1000 mg/ml), the cell viability was 75%. In experiments on animals with experimental Parkinson's disease the oxidation processes were investigated. There was observed an increase of the reactions of free radical lipid oxidation (hydroperoxide, malondialdehyde) as well as the accumulation of the products of protein oxidative modification in rat brain when modeling Parkinson's disease. When administering the study drug to the experimental animals at 50 mg/kg, a normalizing effect was found manifested by a decrease in the content of lipid peroxides and oxidative modification of proteins in rat brain. The protective effect of the drug was suggested to be due to the presence of taurine in the drug structure, which is involved in metabolism of glutathione. The obtained data were interpreted with regard to the antioxidant properties of the drug.

KEYWORDS: lipid peroxidation, protein oxidative modification, taurine, lithium.