

УДК 577.1; 57.04; 616.8; 615.27

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ МЕТГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА *IN VIVO* И *IN VITRO*

М.Г. Маклецова^{1*}, Г.Т. Рихирева², В.В. Полещук¹, К.В. Грякалов², С.Л. Тимербаева¹, Т.Н. Федорова¹

¹Научный центр неврологии (НЦН),

125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80; тел.: 8(495)4902409; факс: 84954902408; эл. почта: mgm52@bk.ru

²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

Исследовали 16 больных с болезнью Паркинсона (БП, 3–4 стадии заболевания по шкале Hoehn-Yahr). Пациенты, находившиеся на базовом лечении леводопы препаратами (мадопар, наком), в течение 14 дней получали мексидол в дозе 100 мг/сутки (в/м). Контролем служила группа из 12 практически здоровых лиц. Определение содержания метгемоглобина в эритроцитах проводили с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) по интенсивности сигнала ЭПР с g-фактором в области 6.0. В эритроцитах больных с БП выявлено значительное повышение содержания метгемоглобина по сравнению с донорами. Комплексная терапия с мексидолом нормализовала содержание метгемоглобина в эритроцитах больных с БП. Инкубация *in vitro* эритроцитов доноров и пациентов с БП с акролеином приводила к увеличению содержания метгемоглобина. Введение карнозина в этих условиях нормализовало содержание метгемоглобина. “Профилактическое” (до акролеина) и “терапевтическое” введение карнозина в среду инкубации эритроцитов с акролеином способствовало снижению содержания метгемоглобина до исходного уровня. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности включения антиоксидантов (мексидола и карнозина) в базовую терапию БП с целью снижения побочных эффектов, связанных с образованием метгемоглобина.

Ключевые слова: метгемоглобин, болезнь Паркинсона, антиоксиданты, мексидол, карнозин, акролеин

DOI: 10.18097/PBMC20166202193

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных хронических системных и мультифакторных заболеваний, в патогенезе которого важную роль играет окислительный стресс (ОС) [1-3]. Актуальность поиска эффективных средств, подавляющих прогрессирование нейродегенеративных процессов, не вызывает сомнений. ОС создаётся в клеточной среде в результате нарушения баланса между скоростью образования активных форм кислорода (АФК) и азота и активностью антиокислительной системы клеток [3]. Для пациентов с БП характерно значительное нарушение антиоксидантного статуса организма и снижение его устойчивости к ОС, которое связано как с генетической предрасположенностью, так и с ДОФА-индуцированным ОС. К генетическим факторам риска развития БП относятся гены, продукты которых ответственны за образование АФК и NO [4-6]. В то же время рост АФК и NO связан с индукцией образования метгемоглобина в крови [7].

Для БП характерно увеличение содержания железа в дофаминергических нейронах чёрной субстанции, приводящее к их необратимой гибели. Ионы железа характеризуются высокой редокс-активностью в отношении образования АФК, что значительно усиливает окислительные процессы и способствует агрегации патологического белка БП – альфа-синуклеина [3]. Источники железа в структурах мозга до сих пор не выяснены. По мнению

Mohovic и соавторов [8], метгемоглобин может играть важную роль в развитии нейродегенеративного процесса и служить маркером нейродегенерации. В последнее время в литературе обсуждается вопрос о метгемоглобине как биомаркере и индукторе ОС при различных патологических состояниях [9]. Резкое увеличение содержания метгемоглобина, гемолиз эритроцитов и выход свободного железа вызывает такой индуктор ОС как акролеин, который образуется из продуктов окисления полиаминов и липидов [10]. Акролеин – высоко реакционноспособный альдегид, значительное увеличение содержания которого в определенных структурах мозга показано при всех нейродегенеративных заболеваниях, включая БП [11].

Целью данной работы явилось изучение влияния антиоксидантов на индукцию образования метгемоглобина в эритроцитах крови пациентов с БП как в клинко-биохимических исследованиях, так и в экспериментах *in vitro*.

МЕТОДИКА

Обследовано 16 больных с БП (7 мужчин и 9 женщин в возрасте 50-73 лет) с 3-4 стадией болезни по функциональной шкале Hoehn-Yahr. Клинический диагноз БП был установлен в соответствии с критериями “включения-исключения”, согласно UK BrainBankCriteria. Степень выраженности двигательных нарушений оценивали по международной рейтинговой шкале UPDRS. Средний возраст больных составил 56,1±4,0 года с длительностью заболевания

* - адресат для переписки

7,6±2,0 года. Больные длительно получали препараты, содержащие леводопа. При поступлении в стационар НЦН все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании и использовании их биоматериала. Все больные получали базисную терапию препаратами, содержащими леводопа (наком, мадопар), не более 800 мг ДОФА в сутки, а также дополнительно синтетический антиоксидант мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) [12] по 50 мг 2 раза в сутки (в/м) в течение 14 дней. Контрольную группу составили 12 практически здоровых людей соответствующего возраста. Забор крови осуществляли утром в 1-й день натошак при поступлении и на 14-15-й день пребывания в стационаре.

Определение содержания метгемоглобина в эритроцитах крови проводили с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) по интенсивности сигнала ЭПР с g-фактором в области 6.0 [13]. Спектр ЭПР измеряли при 77 К на радиоспектрометре ER-220 D фирмы "Bruker" (Германия) с использованием стандартной методики накопления и анализа спектров ЭПР на мини ЭВМ Аспект-2000. Эритроцитарную массу выделяли из крови больных общепринятым методом. После 2-х кратного отмывания физиологическим раствором эритроциты от 3-х больных объединяли (V=30 мл), затем разбавляли физиологическим раствором (1:1) и инкубировали с исследуемыми соединениями по описанной ниже схеме. Для изучения влияния ОС на образование метгемоглобина в модельных опытах *in vitro* был использован индуктор – акролеин [10], а также природный антиоксидант – карнозин (β-аланил-L-гистидин) [14]. Схема эксперимента в модельных опытах *in vitro* включала следующие группы: (1) "контроль" – инкубация эритроцитов в течение 1 ч при комнатной температуре; (2) "акролеин" – инкубация эритроцитов с 100 мкМ акролеином в течение 1 ч; (3) "акролеин+карнозин" – инкубация эритроцитов с 100 мкМ акролеином (1 ч) с последующим добавлением 5 мМ карнозина (1 ч); (4) "карнозин+акролеин" – инкубация эритроцитов с 5 мМ карнозином (1 ч) с последующим добавлением 100 мкМ акролеина (1 ч); (5) "карнозин" – инкубация эритроцитов с 5 мМ карнозином (1 ч). После окончания инкубации эритроциты замораживали в жидком азоте (77 К) для измерения спектров ЭПР. Содержание метгемоглобина, оцениваемое по ЭПР-сигналу в эритроцитах, выражали в условных единицах на 1 мл эритроцитарной массы (усл. ед./мл).

Статистическая обработка результатов

Полученные результаты представлены в виде средней величины ± ошибка средней. Математическую обработку данных проводили с использованием программы "Statistica 6.0". Для оценки достоверности обнаруженных изменений применяли тесты Стьюдента (сопоставление двух независимых групп данных), различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание метгемоглобина в эритроцитах крови доноров и больных с БП

На рисунке 1 представлены результаты определения содержания метгемоглобина в эритроцитах крови доноров и пациентов с БП. Исходное содержание метгемоглобина в эритроцитах больных с БП в 5 раз ($p \leq 0,001$) превышало его значение по сравнению с донорами.

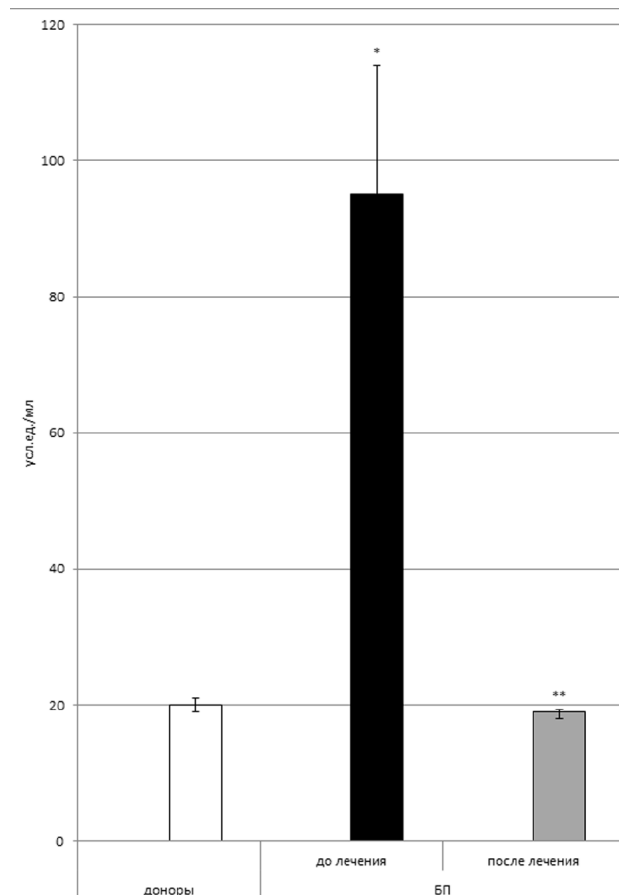


Рисунок 1. Влияние комплексной терапии с мексидолом на содержание метгемоглобина в эритроцитах крови пациентов с БП (усл. ед./мл; $n=12-16$). Достоверность различий по сравнению с контролем: * - $p \leq 0,0001$, ** - $p \leq 0,001$.

Влияние мексидола на образование метгемоглобина в эритроцитах крови пациентов с БП

Введение в базовую терапию антиоксидантного препарата мексидола способствовало нормализации содержания метгемоглобина в эритроцитах крови пациентов с БП (рис. 1). Возможно, механизм защитного действия мексидола в условиях повышенного содержания метгемоглобина при БП связан с его антиоксидантным действием [15, 16], а также предотвращением активации индуцибельной iNOS при БП [17]. Другим механизмом защитного действия мексидола является его способность стабилизировать мембранные структуры клеток крови, включая эритроциты [16], что препятствует проникновению окислителей внутрь клетки.

Влияние акролеина на содержание метгемоглобина в эритроцитах крови пациентов с БП на фоне базовой терапии с включением мексидола in vitro

В модельных опытах *in vitro* мы оценили влияние акролеина на образование метгемоглобина в эритроцитах пациентов с БП, а также потенциальную способность антиоксидантов препятствовать увеличению содержания метгемоглобина в данных экспериментальных условиях. Инкубация эритроцитов больных с БП в течение 1 ч с акролеином как на фоне базовой терапии, так и в условиях включения мексидола в схему лечения, индуцировала дальнейший значительный рост содержания метгемоглобина. Увеличение содержания метгемоглобина в 3 раза отмечено в обеих группах (рис. 2), что указывает на общность механизмов запуска образования метгемоглобина. Благодаря низкому исходному содержанию метгемоглобина (19 усл.ед./мл) в крови у пациентов, получавших дополнительно к базовой терапии мексидол, индуцированный акролеином метгемоглобин (65 усл.ед./мл) был ниже его уровня в крови больных с БП на фоне базовой терапии (95 усл.ед./мл). Таким образом, комплексная терапия, включающая мексидол, оказывала положительный регулирующий эффект на индуцированное акролеином увеличение содержания метгемоглобина.

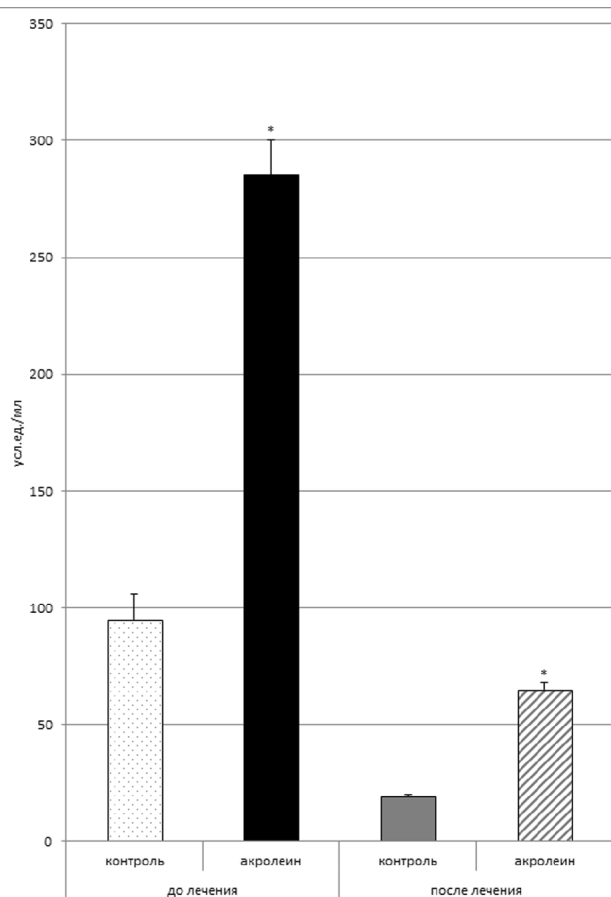


Рисунок 2. Влияние акролеина *in vitro* на содержание метгемоглобина в эритроцитах крови больных с БП до и после введения мексидола в комплексную терапию (усл. ед./мл; n=16). Достоверность различий по сравнению с контролем * - $p \leq 0,001$.

Влияние карнозина на акролеин-индуцированное образование метгемоглобина в эритроцитах крови пациентов с БП in vitro

В следующей серии экспериментов *in vitro* было изучено влияние природного антиоксиданта карнозина на образование метгемоглобина, индуцированное акролеином в эритроцитах крови больных с БП, находившихся на базовой терапии. Инкубация эритроцитов больных с БП с 5 мМ карнозином резко (в 5 раз) снижала содержание метгемоглобина до уровня здоровых доноров. Как показано выше, инкубация эритроцитов больных с БП с акролеином (100 мкМ) вызывала 3-х кратное увеличение содержания метгемоглобина по сравнению с его исходным уровнем. Предварительное или последующее введение карнозина в инкубационную среду эритроцитов больных с БП с акролеином способствовало снижению содержания метгемоглобина до исходного уровня (рис. 3).

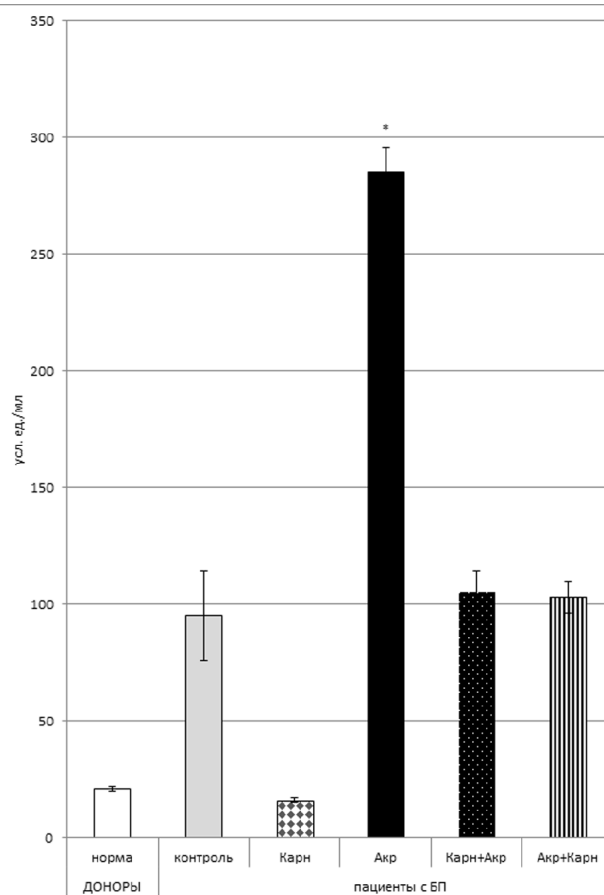


Рисунок 3. Содержание метгемоглобина в эритроцитах крови доноров (клиническая норма) и пациентов с БП после инкубации *in vitro* с карнозином (Карн), с акролеином (Акр), с предварительным введением карнозина до инкубации с акролеином (Карн + Акр), с акролеином и последующим добавлением карнозина (Акр+Карн), (в усл. ед./мл; n=12-16). Достоверность различий по сравнению с контролем * - $p \leq 0,001$.

Таким образом, карнозин не только препятствовал увеличению содержания метгемоглобина, но и снижал его уровень в условиях индукции ОС акролеином.

Учитывая нарушения обмена эндогенного карнозина в организме больных с БП [18], можно полагать, что введение карнозина в комплексную терапию БП позволит восполнить его дефицит в организме и предотвратить развитие нейротоксических процессов, обусловленных акролеином.

В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что природный антиоксидант карнозин препятствует развитию нейродегенеративных процессов, вызванных акролеином [19, 20]. Так, введение карнозина в культуру клеток РС-12, дифференцированных по нейрональному типу, предотвращало развитие ОС и рост АФК, а также снижало долю погибших клеток в присутствии акролеина [20]. Механизм защитного антиоксидантного действия карнозина и родственных гистидин-содержащих дипептидов в условиях развития ОС при БП заключается в снижении избыточного образования АФК, активации СОД, в регуляции каскада реакций, запускающих ПОЛ, и др. [14]. Отличительной чертой защитного действия карнозина является его способность прямо взаимодействовать и связывать более 80% акролеина [21]. В опытах *in vitro* и *in vivo* карнозин регулировал не только уровень акролеина, но и содержание индуцированных акролеином модифицированных белков, таких как альфа-синуклеин, нейрофеламент- L , амилоид и др. [20, 22]. Все вышеперечисленные эффекты, по-видимому, объясняют высокую эффективность карнозина в комплексной терапии БП, продемонстрированной в пилотном исследовании [23]. Включение карнозина в схему лечения приводило к снижению неврологической симптоматики у больных БП на фоне значительного улучшения антиоксидантного статуса организма [23], а введение мексидола способствовало снижению частоты выявляемых побочных эффектов терапии леводопы [15].

Очевидно, что высокое содержание метгемоглобина в крови больных с БП является фактором, который провоцирует развитие ОС в организме больного. Следствием увеличения метгемоглобина является рост АФК, а также модификация молекулы ДОФА за счёт её декарбоксилирования при взаимодействии с метгемоглобином [24]. Учитывая тот факт, что периферический гемоглобин и его модификации могут влиять на содержание железа в мозге больных с БП, можно предположить участие метгемоглобина в процессах нейродегенерации [25]. Полученные результаты указывают на целесообразность применения антиоксидантов для контроля уровня метгемоглобина в крови пациентов с БП.

Работа поддержана грантом РФФИ №14-04-00829.

ЛИТЕРАТУРА

- Hwang O. (2013) Exp. Neurobiol., **22**, 11-17.
- Danielson S.R., Andersen J.K. (2008) Free Radic. Biol. Med., **44**, 1787-1794.
- Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M. (2010) Mol. Cell Biochem., **345**, 91-104.
- Иллариошкин С.Н., Загоровская И.А., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. (2002) Неврол. журн., №5, 47-51.
- Загоровская Т.Б., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Иллариошкин С.Н., Брис А. (2001) Неврол. журн., №4, 13-18.
- Иллариошкин С.Н., Шадрин М.И., Багыева Г.Х., Загоровская Т.Б., Маркова Е.Д., Карабанов А.В., Полежук В.В., Полевая Е.В., Федорова Н.В., Лимборская С.А., Иванова-Смоленская И.А. (2007) Анналы клинической и экспериментальной неврологии, **1**, 23-31.
- Рейтов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. (1998) Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих, Наука, М., 156 с.
- Mohorovic L., Lavezzi A.M., Stifter S., Perry G., Malatestinic D., Micovic V., Materijan E., Haller H., Petrovic O. (2014) Advances in Bioscience and Biotechnology. DOI:10.4236/abb.2014.51003.
- Hare G.M.T., Tsui A.K.Y., Crawford J. H., Patel R.P. (2013) Redox Biology, **1**(10), 65-69.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. (1997) FEBS letters, **416**(2), 123-129.
- Dang T.N., Arseneault M., Murthy V., Ramassamy C. (2010) Curr. Mol. Pharmacol., **3**, 66-78.
- Воронина Т.А. (2012) Журн. неврол. и психиат. им. С.С. Корсакова, №12, 86-90.
- Пулаторова М.К., Рихирева Г.Т., Куроптева З.В. (1989) Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии, Энергоатомиздат, М., 232 с.
- Болдырев А.А. (2012) Биохимия, **77**, 405-420.
- Федорова Т.Н., Багыева Г.Х., Добровольская И.С., Степанова М.С., Полевая Е.В., Иванова-Смоленская И.А., Иллариошкин С.Н. (2012) Эксп. клин. фармакол., **75**(6), 23-26.
- Катунина Е.А., Малыхина Н.В., Кузнецов Г.Н., Авакян Е.И., Гусев Л.Н., Воронина Т.А., Барсков И.В. (2006) Журн. неврол. и психиат. им. С.С. Корсакова, № 9, 22-28.
- Шульгин А.В. (2012). Журн. неврол. и психиат. им. С.С. Корсакова, №2, 35-39.
- Licker V., Cote M., Lobrinus J.A., Rodrigo N., Kovari E., Hochstrasser D.F., Turck N., Sanchez J.C., Burkhard P.R. (2012) J. Proteomics, **75**, 4656-4667.
- Kang J.H. (2008) Bull. Korean Chem. Soc., **29**(9), 1732-1736.
- Коновалова Е.В., Федорова Т.Н., Маклецова М.Г., Березов Т.Т. (2013) Вopr. биол., мед. и фарм. химии, №6, 43-48.
- Carini M., Aldini G., Beretta G., Arlandini E., Facino R.M. (2003) J. Mass Spectrom., **38**(9), 996-1006.
- Aldini G., Facino R.M., Beretta G., Carini M. (2005) Biofactors, **24**, 77-87.
- Boldyrev A., Fedorova T., Stepanova M., Dobrotvorskaya I., Kozlova E., Boldanova N., Bagyeva G., Ivanova-Smolenskaya I., Illarioshkin S. (2008) Rejuvenation Res., **11**, 821-827.
- Tate S.S., Orlando J., Meister A. (1972) PNAS, **69**, 2505.
- Mariani S., Ventriglia M., Simonelli I., Spalletta G., Bucossi S., Siotto M., Assogna F., Melgari J.M., Vernieri F., Squitti R. (2013) Front. Aging Neurosci., **5**(37), 1-7.

Поступила: 05. 05. 2015.
Принята к печати: 17. 09. 2015.

**THE EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON *IN VIVO* AND *IN VITRO* METHEMOGLOBIN FORMATION
IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE**

M.G. Makletsova¹, G.T. Rikhireva², V.V. Poleshuk¹, K.V. Grjakalov², S.L. Timerbaeva¹, T.N. Fedorova¹

¹Research Center of Neurology,

80 Volokolamskoye sh, Moscow, 125367 Russia; tel: +7(495)4902409; fax: +7 495 4902408; e-mail: mgm52@bk.ru

²Semenov Institute of Chemical Physics of the Russian Academy Sciences, Moscow, Russia

Methemoglobin formation was examined in erythrocytes of 16 patients with Parkinson's disease (PD) (stage 3-4 by the Hoehn and Yahr scale). The patients receiving levodopa-containing drugs (madopar, nakom) were also treated with intramuscular injections of mexidol (daily dose 100 mg/day) for 14 days. Control group included 12 clinically healthy persons. The erythrocyte methemoglobin content was determined by electronic paramagnetic resonance (EPR) using the EPR signal intensity with g-factor 6.0. The methemoglobin content was significantly higher in erythrocytes of PD patients than in healthy donors. The complex therapy with mexidol normalized the methemoglobin content in erythrocytes of PD patients. Incubation *in vitro* of erythrocytes of donors and PD patients with acrolein increased the methemoglobin content, while incubation with carnosine normalized the methemoglobin content in erythrocytes of PD patients. Prophylactic (i.e. before acrolein addition) and therapeutic administration of carnosine to the incubation system with acrolein decreased the methemoglobin content to its initial level. Results of this study suggest that inclusion of the antioxidants mexidol and carnosine in the scheme of basic therapy of PD may reduce side effects associated with methemoglobinemia.

Key words: methemoglobin, Parkinson's disease, antioxidants, mexidol, carnosine, acrolein