

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.27.

© Коллектив авторов

ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС ЭРИТРОЦИТОВ И УРОВЕНЬ ГЕПСИДИНА В КРОВИ БОЛЬНЫХ С НАРУШЕНИЯМИ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА

С.П. Щербинина, А.А. Левина, И.Л. Лисовская, Ф.И. Атауллаханов*

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Гематологический научный центр” Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, д.4а;
эл. почта: irene_l@mail.ru

При многих заболеваниях, связанных с нарушением метаболизма железа, наблюдается повышенная чувствительность эритроцитов к окислительному стрессу. В настоящей работе изучали антиокислительный статус эритроцитов здоровых доноров и 12 больных с нарушениями гомеостаза железа путем измерения степени гемолиза, индуцированного *трет*-бутилгидропероксидом *in vitro*. Показано, что окислительный гемолиз у больных был достоверно выше, чем у здоровых доноров. После лечебных инфузий антиоксидантов мексидола и эмоксипина гемолиз у больных возвращался к нормальным значениям, а концентрация гепсидина в крови значительно увеличивалась по сравнению с исходным уровнем. Отмечена достоверная корреляция между концентрацией гепсидина после лечения и индуцированным окислительным гемолизом до лечения. Полученные данные позволяют предположить, что применение экзогенных антиоксидантов может оказывать положительный эффект при состояниях, связанных с риском перегрузки железом.

Ключевые слова: эритроциты, метаболизм железа, гепсидин, *трет*-бутилгидропероксид, антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ. В норме содержание железа в организме поддерживается в узком диапазоне значений, необходимых для выполнения различных жизненно важных функций, в том числе синтеза гемоглобина и других железосодержащих белков. Благодаря своей высокой реактивности железо очень токсично. Двухвалентное железо может быстро взаимодействовать с пероксидом водорода и молекулярным кислородом, образуя свободные радикалы и другие активные формы кислорода (АФК), что приводит к перекисному окислению липидов (ПОЛ), окислению белков и ДНК и, в конечном счёте, к гибели клеток. Поэтому клетки снабжены сложнейшими механизмами, регулирующими поглощение, хранение и экспорт железа. В норме эти механизмы обеспечивают состояние, при котором железо доступно для всех метаболических функций, но его участие в реакциях, генерирующих образование цитотоксических АФК, ограничено [1, 2].

* - адресат для переписки

Нарушения гомеостаза железа лежат в основе целого ряда широко распространенных патологических состояний. Железодефицитная анемия отмечается у четверти населения Земли. Анемии хронических заболеваний, наблюдаемые при воспалениях, аутоиммунных и онкологических патологиях, вызываются, в первую очередь, нарушениями эритропоэза в результате задержки железа в клетках ретикуло-эндотелиальной системы [3, 4]. Одна из наиболее распространенных наследственных патологий, характерная для жителей Северо-Западной Европы, – врожденный гемохроматоз – обусловлена повышенным накоплением железа в печени и других паренхиматозных органах и соответствующей дисфункцией этих органов [5, 6].

В большинстве случаев нарушения метаболизма железа связаны с неадекватным образованием гепсидина, ключевого гормона в регуляции метаболизма железа в организме. Исследования на мышинных моделях с недостатком или избытком гепсидина, а также на больных с мутацией гена *HAMP* показали, что гепсидин является отрицательным регулятором выхода клеточного железа. Связываясь с ферропортином, переносчиком железа в энтероцитах, макрофагах и плаценте, гепсидин индуцирует его интернализацию и быструю деградацию, предотвращая таким образом, выход железа в плазму. Например, большая часть случаев врожденного гемохроматоза может быть объяснена дефектным синтезом или дефектной активностью гепсидина и соответственно, потере его эффекторного действия на ферропортин [2, 7-10].

Обычно уровень гепсидина снижается в условиях гипоксии и повышается с ростом содержания железа в плазме и тканях. Однако механизмы регуляции его экспрессии еще не вполне понятны. Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1), и АФК принимают участие в регуляции гепсидина непосредственно или опосредованно через модуляцию оксигеназ, зависящих от 2-оксоглутарата [9-11].

Многие патологии, связанные с нарушением метаболизма железа, характеризуются изменением антиокислительного статуса эритроцитов [12, 13]. В настоящей работе оценивали антиокислительный статус эритроцитов здоровых доноров и больных с нарушениями метаболизма железа по степени гемолиза, индуцированного *in vitro* стандартным окислителем *трет*-бутил-гидропероксидом (t-BHP). Показано достоверное увеличение t-BHP-индуцированного окислительного гемолиза у больных по сравнению с нормой. После лечебных инфузий антиоксидантов мексидола и эмоксипина [14] наблюдались снижение окислительного гемолиза и корреляция между исходным уровнем гемолиза и концентрацией гепсидина в крови больных.

МЕТОДИКА. Мексидол (сукцинат оксиметилэтилпиридина) и эмоксипин (метилэтилпиридиноксид гидрохлорид) для внутривенных инфузий производились в России (Ellar MC). Все остальные реактивы закупали у фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Материалом исследования служили образцы венозной крови проинформированных здоровых доноров и 12 больных (8 мужчин и 4 женщины, средний возраст $47,4 \pm 14$ лет) с нарушениями регуляции метаболизма железа. Из них 5 больных содержали мутации гена *HFE*, в том числе одну гомозиготную (H 63D), 3 гетерозиготных (H 63D), 1 гетерозиготную (C282Y). Каждый больной получал курс из 10 внутривенных инфузий (в течение 3 недель) одного из двух антиоксидантов. За одну инфузию

вводили 2 мл 5% мексидола или 3 мл 1% эмоксипина, растворённых в 100 мл физиологического раствора. Скорость введения составляла около 36 капель в минуту. Больные хорошо переносили антиоксиданты: не наблюдалось аллергических реакций.

В таблице приведены усредненные параметры, характеризующие метаболизм железа в крови больных до лечения и после 10 внутривенных инфузий мексидола (n=7) или эмоксипина (n=5).

Таблица. Параметры красной крови и метаболизма железа здоровых доноров и больных, участвовавших в исследовании.

Исследованные группы	Гемоглобин, г/л	Количество эритроцитов $\times 10^{12}/л$	ФС мкг/л	ЖС мкМ/л	ОЖСС мкМ/л	НТЖ, %	Гепсидин пг/мл	HIF пг/мл
Здоровые доноры (норма)	М 130-160 Ж 120-140	М 4,0-5,0 Ж 3,9-4,7	М 80-200 Ж 40-90	М 14-26 Ж 12,5-25	40-70	М 30-35 Ж 25-30	60-80	<5
Больные до лечения	142±17,8	4,9±0,6	103,6±34,9	26,4±3,5	62,0±3,6	44,0±5,9	46,45±7,7	23,7±14,4
Больные после лечения	141,8±14,2	4,9±0,6	108,5±32,3	24,6±2,5	67,7±3,1	37,7±4,8	125,5±21,1	13,5±3,7
n	12	12	11	12	12	12	11	12
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,05

Измерение концентрации гепсидина, HIF и показателей метаболизма железа. Гепсидин и HIF-1 α определяли иммуноферментным методом, с применением моноспецифических антисывороток и моноклональных антител против соответствующих антигенов фирмы “Abcam” (США). Концентрацию ферритина в сыворотке (ФС) определяли радиоиммунным методом с использованием наборов “Immunotech” (Чехия). Концентрацию железа в сыворотке (ЖС) и общую железосвязывающую способность сыворотки (ОЖСС) измеряли колориметрическим методом с применением сульфогенилтриазина. Для определения ЖС вначале осаждали белки сыворотки и восстанавливали все железо, после чего добавляли раствор сульфогенилтриазина, образующего с восстановленным железом комплекс фиолетового цвета. При определении ОЖСС в сыворотку крови предварительно вносили определённое количество стандартного раствора трехвалентного хлорида железа для насыщения трансферрина железом (НТЖ). После инкубации избыток железа удаляли сорбентом – Ca(OH)₂, а связанное железо измеряли с помощью сульфогенилтриазина.

Приведённые данные показывают, что средние значения ФС, ЖС и ОЖСС у больных находятся вблизи верхней границы нормы. Эти параметры, а также средние значения общего гемоглобина и количества эритроцитов в крови не изменялись после курса лечения больных антиоксидантами.

ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

В отличие от здоровых доноров больные имели сниженное содержание гепсидина, ключевого гормона, определяющего гемостаз железа, и повышенный уровень индуцируемого гипоксией фактора (HIF). После лечения антиоксидантами гипоксия существенно уменьшалась (снижался HIF), а уровень гепсидина возрастал в 2-3 раза.

Чувствительность эритроцитов к окислительному стрессу. Эритроциты (Э) осаждали путём центрифугирования цитратной крови в течение 5 мин при 1300 g, дважды отмывали их физиологическим раствором, каждый раз удаляя надосадочную жидкость и верхний слой осаждённых клеток, обогащённый тромбоцитами и лейкоцитами. Третий раз Э отмывали HEPES-буфером, содержащим: 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 1,5 mM CaCl₂, 5 mM глюкозу (U=300 мОсм/кг, pH 7,4). Отмытые Э ресуспендировали в HEPES-буфере до гематокрита 5%. Содержание лейкоцитов в полученной суспензии не превышало 0,5 на 1000 Э.

Исследуемые образцы 5% суспензии Э инкубировали при 37°C с 2 mM t-BHP (конечная концентрация) в присутствии или в отсутствие 10 мкМ клотримазола (конечная концентрация) при постоянном медленном перемешивании. Через 3 часа отбирали по 200 мкл суспензии, осаждали клетки в течение 5 мин при 3000 g и отбирали надосадок. К надосадку добавляли трансформирующий раствор Дабкина (1:2 или 1:5 в зависимости от степени гемолиза) и по 300 мкл смеси переносили в лунки планшета плащечного спектрофотометра Thermomax ("Molecular devices", США). Оптическую плотность измеряли при $\lambda=490$ нм. Оптическая плотность супернатанта, полученного после полного гемолиза эритроцитов (25 мкл суспензии + 975 мкл раствора Дабкина)×40, соответствовала 100% гемолизу.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Экспериментальные результаты представлены в виде средних значений величин ± ошибка средней (S.E.M.). Для сравнения средних значений использовали парный t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее нами было показано, что добавление в суспензию Э 10 мкМ клотримазола заметно и достоверно усиливает зависящий от концентрации пероксида t-BHP-индуцированный гемолиз [15]. Мы использовали инкубацию Э с t-BHP в присутствии клотримазола для сравнительной оценки эффективности различных антиоксидантов, включая мексидол и эмоксипин. Антиокислительную эффективность каждого препарата оценивали по концентрации, соответствующей 50% ингибированию гемолиза (IC₅₀). Из рисунка 1 видно, что в наших условиях мексидол и эмоксипин обладают выраженной антиокислительной активностью, хотя и меньшей, чем кверцетин и некоторые тетрациклиновые антибиотики.

На рисунке 2 показаны усреднённые значения гемолиза, индуцированного инкубацией Э с 2 mM t-BHP в присутствии 10 мкМ клотримазола и без него. Сравнение нормальных донорских Э и Э больных с нарушениями метаболизма железа показывает, что у больных до лечения t-BHP-индуцированный гемолиз достоверно выше, по сравнению с Э здоровых доноров и больных после курса инъекций мексидола или эмоксипина. По-видимому, это объясняется сниженным уровнем эндогенных антиоксидантов при перегрузке железом тканей нелеченых больных [13].

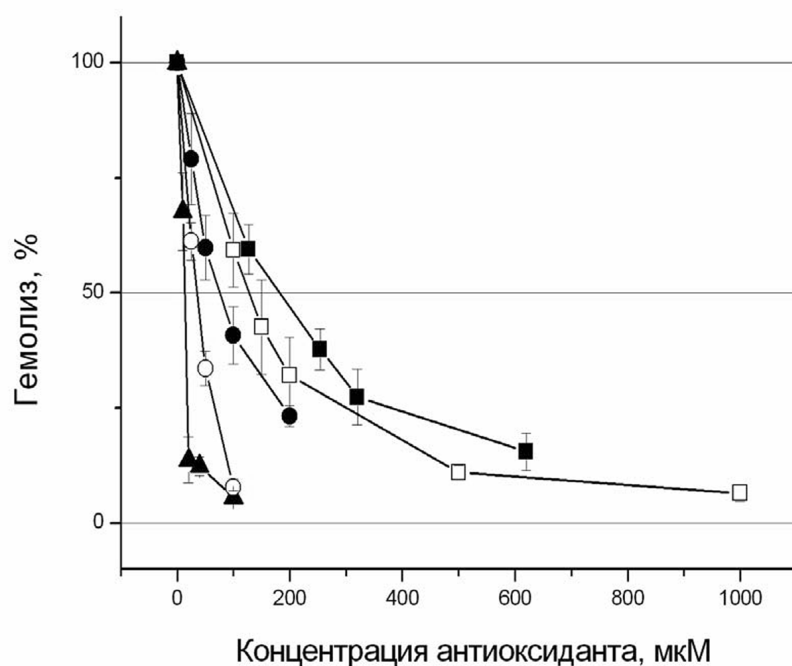


Рисунок 1.

Действие экзогенных антиоксидантов на гемолиз, индуцированный *in vitro* трет-бутил-гидропероксидом (t-BHP) в присутствии 10 мкМ клотримазола. Чёрные квадраты - эмоксипин (n=7), $IC_{50} = 186$ мкМ; белые квадраты - мексидол (n=6), $IC_{50} = 130$ мкМ; чёрные кружки - тетрациклин (n=7), $IC_{50} = 76$ мкМ; белые кружки - миноциклин (n=5), $IC_{50} = 36$ мкМ; чёрные треугольники - кверцитин (n=15), $IC_{50} = 13$ мкМ.

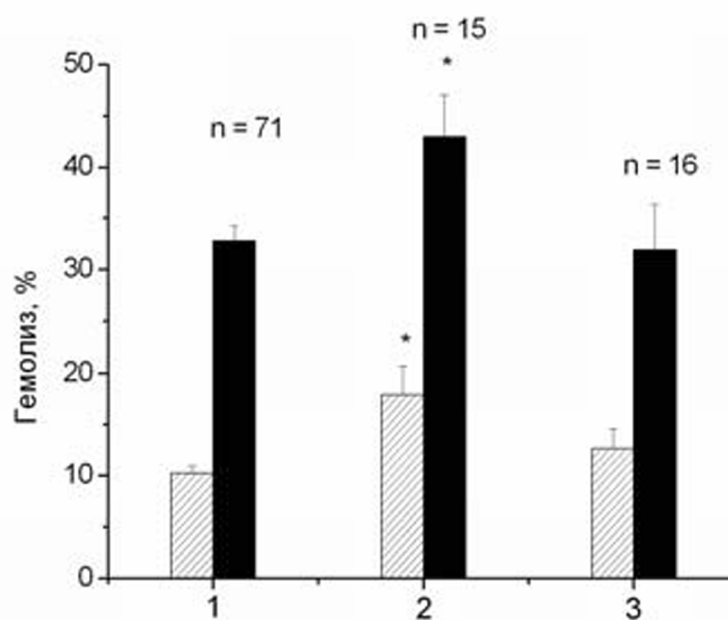


Рисунок 2.

Гемолиз эритроцитов, индуцированный *in vitro* трет-бутил-гидропероксидом (t-BHP) в присутствии (чёрные столбики) или в отсутствие (серые столбики) 10 мкМ клотримазола.

Образцы крови брали у здоровых доноров (1), у больных до лечения (2) и у больных после лечения мексидолом или эмоксипином (3).

Звёздочкой отмечены значения, достоверно ($p < 0,001$) отличающиеся от (1).

ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

На рисунке 3 представлена зависимость между уровнем гепсидина в крови больных до и после лечения и t-BHP-индуцированного гемолиза до лечения. Можно видеть, что у нелечёных больных отсутствует корреляция между уровнем гепсидина в крови и гемолизом, индуцированным *in vitro* t-BHP. В то же время после инфузии больным мексидола или эмоксипина уровень гепсидина существенно возрастает по сравнению с исходным (см. таблицу) и хорошо коррелирует с t-BHP-индуцированным гемолизом у этих больных до лечения.

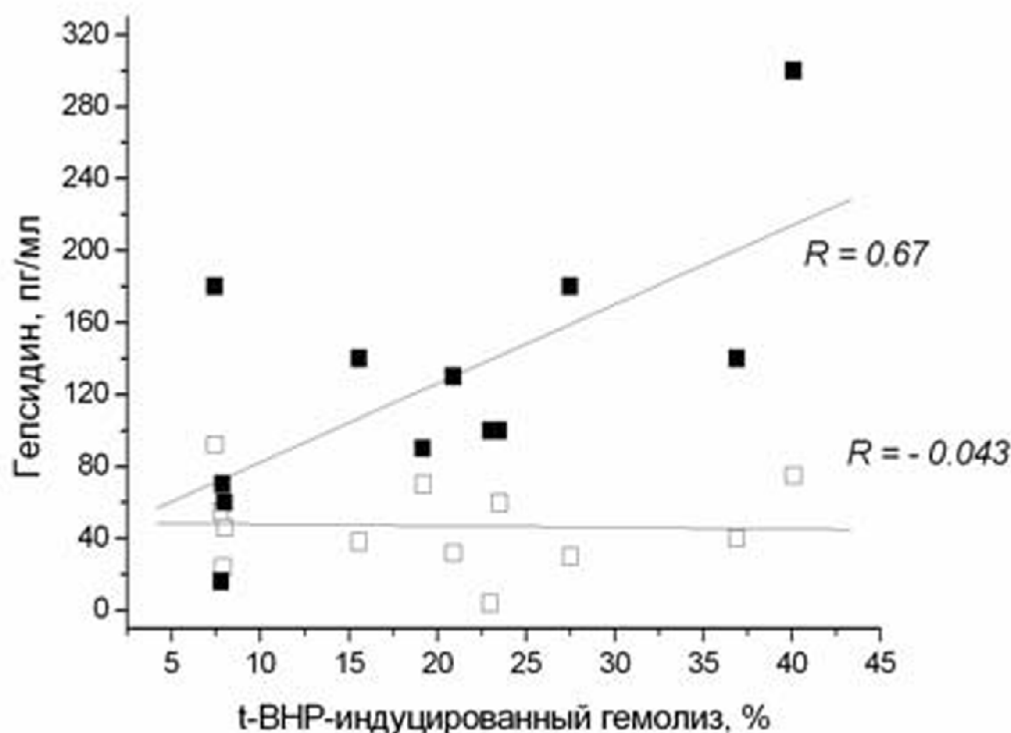


Рисунок 3.

Корреляция между концентрацией гепсидина в крови до (белые квадраты) и после (чёрные квадраты) лечения антиоксидантами и исходными значениями t-BHP-индуцированного гемолиза эритроцитов больных *in vitro*. R - коэффициент корреляции.

Железо играет важнейшую роль во всех аэробных организмах, действуя как кофактор белков, связывающих кислород. При этом известно, что перегрузка организма железом способствует развитию окислительного стресса вследствие избыточного образования АФК. С другой стороны, дефицит железа приводит к анемии или задержке роста. Поэтому гомеостаз железа в организме жёстко зарегулирован путём модулирования его поглощения в кишечнике и высвобождения из макрофагов и гепатоцитов [1, 9, 10].

Наблюдаемая при некоторых патологиях повышенная чувствительность Э к индуцированному *in vitro* окислительному стрессу, может использоваться для оценки антиокислительного статуса больного, который, в свою очередь, может иметь диагностическое и прогностическое значение [16-18].

Как следует из рисунка 1, инкубация донорских Э с мексидолом и эмоксипином *in vitro* существенно снижает гемолиз, индуцированный 2 mM t-BHP. Результаты, представленные на рисунка 2, показывают, что у больных с нарушениями метаболизма железа чувствительность Э

к индуцированному *in vitro* окислительному стрессу достоверно повышена по сравнению с нормой (антиокислительный статус понижен). Лечебные инфузии антиоксидантов мексидола и эмоксипина возвращают антиокислительный статус к норме.

Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов. Исследования *in vivo* показали, что под действием прооксидантов у нагруженных железо-декстрановым комплексом крыс Э обнаруживали значительно больший уровень ПОЛ по сравнению с контрольными животными. Обработка α -токоферолом предотвращала этот эффект [19]. У мышей, получавших одновременно с железо-декстрановым комплексом флавоноиды байкалин и кверцетин (1% w/w), были значительно снижены проявления окислительного стресса: перегрузка железом, ПОЛ и окисление белков в печени [20].

Ряд данных свидетельствует о положительном влиянии лечебного применения антиоксидантов на состояние больных миелодиспластическим синдромом [16], талассемией [17, 21], врожденным сфероцитозом [22] и пароксизмальной ночной гемоглобинурией [23], для которых характерны перегрузка железом и наличие окислительного стресса. Имеются указания на то, что при врожденном гемохроматозе полифенолы и оксалаты, содержащиеся в чёрном чае и нецитрусовых фруктах, могут ингибировать адсорбцию негемового железа, способствуя повышению уровня гепсидина [24-27].

Таким образом, полученные нами и литературные данные свидетельствуют о том, что окислительный стресс, характерный для многих патологических состояний, провоцирует снижение уровня гепсидина в крови. Соответственно действие экзогенных антиоксидантов способствует повышению уровня гепсидина и нормализации метаболизма железа.

Одним из возможных объяснений положительных эффектов экзогенных антиоксидантов при заболеваниях, связанных с перегрузкой железом, может служить сделанное корейскими авторами предположение, согласно которому АФК подавляют экспрессию гена гепсидина, препятствуя связыванию факторов транскрипции C/EBP α или STAT-3 с промотором гепсидина [28].

В настоящей работе показано, что у больных с нарушениями метаболизма железа чувствительность Э к окислительному стрессу, индуцированному t-BHP, достоверно выше по сравнению с Э здоровых доноров. Окислительный гемолиз Э больных возвращался к нормальным значениям после терапевтических инфузий антиоксидантов мексидола и эмоксипина. Концентрация гепсидина в крови больных после лечения антиоксидантами достоверно возрастала по сравнению с исходным уровнем. Впервые показана достоверная корреляция между индуцированным *in vitro* окислительным гемолизом у больных до лечения и уровнем гепсидина в крови этих больных после лечения (рис. 3). Полученные данные являются дополнительным свидетельством положительного эффекта терапии экзогенными антиоксидантами при нарушениях регуляции метаболизма железа.

ЛИТЕРАТУРА

1. McCord J.M. (2008) J. Hepatol., **48**, 801-810.
2. Andrews N.C. (2008) Blood, **112**, 219-230.
3. MacKenzie E.L., Iwasaki K., Tsuji Y. (2008) Antiox. Red. Sign., **10**, 997-1030.
4. Grotto H.Z. (2008) Med. Oncol., **25**, 12-21.

5. Clark P.L., Britton J., Powel L.W. (2010) Clin. Biochem. Rev., **31**, 3–8.
6. Limdi J.K., Crampton J.R. (2004) QJM, **97**, 315-324.
7. Piperno A., Mariani R., Trombini P., Girelli D. (2009) J. Gastroenter., **15**, 538-551.
8. Tsvetaeva N.V., Levina A.A., Mamukova U.I. (2010) Clin. Onco-Hematol., **3**, 278-283.
9. Sullivan J.L. (2007) Exp. Biol. Med., **32**, 1014–1020.
10. Darshan D., Anderson G.J. (2009) Biomet., **22**, 77–87.
11. Braliou G.G., Falzacappa V., Chachami G., Casanovas G, Muckenthaler M., Simos G. (2008) J. Hepatol., **48**, 801-810.
12. Young I.S., Trouton T.G., Torney J.J., McMaster D., Callender M.E., Trimble E.R. (1994) Free Rad. Biol. Med., **16**, 393-397.
13. Amer J., Goldfarb A., Fibach E. (2004) Cytometry Part A, **60A**, 73–80.
14. Клебанов Г.И., Любицкий О.Б., Васильева О.В., Климов Ю.В., Пензулаева О.Б., Тепляшин А.С., Толстых М.П., Проморенко В.К., Владимиров Ю.А. (2001) Вопр. мед. химии, №3, 288-300.
15. Lisovskaya I.L., Shcherbachenko I.M., Volkova R.I., Ataullakhanov F.I. (2009) Chem-Biol. Inter., **180**, 433-439.
16. Ghoti H., Amer J., Winder A., Rachmilewitz E., Fibach E. (2007) Eur. J. Haematol., **79**, 463-467.
17. Fibach E., Rachmilewitz E.A. (2010) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **1202**, 10-16.
18. Lucchi L., Bergamini S., Iannone A., Perrone S., Stipo L., Olmeda F, Caruso F, Tomasi A., Albertazzi A. (2005) Artif. Org., **29**, 67-72.
19. Galleano M., Puntarulo S. (1995) Biochim. Biophys. Acta, **1271**, 321-326.
20. Zhang Yan, Li Hailing, Zhao Yuling, Gao Zhonghong (2006) Eur. J. Pharmacol., **535**, 263-269.
21. Rachmilewitz E.A., Weizer-Stern O., Adamsky K., Amariglio K.Y.N., Rechavi G, Breda L., Rivella S., Cabantchik Z.I. (2005) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **1054**, 118-123.
22. Ghoti H., Fibach E., Dana M., Abu Shaban M., Jead H., Braester A., Matas Z., Rachmilewitz E. (2011) Ann. Hematol., **90**, 509-513.
23. Ghoti H., Rosenbaum H., Fibach E., Rachmilewitz E.A. (2010) Ann. Hematol., **89**, 429-430.
24. Asare G.A., Kew M.C., Mossanda K.S., Paterson A.C., Siziba K., Kahler-Venter C.P. (2009) J. Clin. Biochem. Nutr., **44**, 85-94.
25. McCune C.A. (2008) Mayo Clin. Proc., **83**, 526-528.
26. Milward E.A., Baines S.K., Knuiman M.W., Bartholomew H.C., Divitini M.L., Ravine D.G., Bruce D.G., Olynyk J. (2008) Mayo Clin. Proc., **83**, 543-549.
27. Kaltwasser J.P., Werner E., Schalk K., Hansen C., Gottschalk R., Seidl C. (1998) Gut, **43**, 699-704.
28. Choi S.-O., Cho Y.-S., Kim H.-L., Park J.-W. (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun., **356**, 312-317.

Поступила: 06. 05. 2011.

THE EFFECT OF EXOGENOUS ANTIOXIDANTS ON THE ANTIOXIDANT STATUS OF ERYTHROCYTES AND HEPcidIN CONTENT IN BLOOD OF PATIENTS WITH DISORDERS OF IRON METABOLISM REGULATION

S.P. Scherbinina, A.A. Levina, I.L. Lisovskaya, F.I. Ataullakhanov

National Scientific Center for Hematology, Novyi Zыkovsky pr., 4a, Moscow, 125167 Russia;
e-mail: irene_l@mail.ru

In many diseases associated with impairments in iron metabolism, erythrocytes exhibit an increased sensitivity to oxidative stress induced in vitro. In this study, we have examined the antioxidant status of erythrocytes from healthy donors and from 12 patients with disorders of iron homeostasis by measuring the extent of t-BHP-induced hemolysis in vitro. The extent of hemolysis observed with patient erythrocytes was significantly higher than that observed in experiment with normal cells. After therapeutic infusions of the antioxidants mexidol or emoxypin, oxidative hemolysis in patients was restored to normal values and blood hepcidin content increased significantly. A significant correlation was observed between hepcidin concentration after treatment and t-BHP-induced hemolysis before treatment. These data suggest that antioxidants may exert a favorable effect under pathological conditions associated with iron overload disease.

Key words: erythrocytes, iron metabolism, hepcidin, *tret*-butyl-hydroperoxide, antioxidants.

