

## ВЛИЯНИЕ ДОФАМИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ МЕТГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *in vitro*

© 2017 г. М.Г. Маклецова, Т.Н. Федорова, В.В. Полещук, Г.Т. Рихирева\*

Научный центр неврологии, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80

E-mail: mgm52@bk.ru

\*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991 Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: grikhireva@bk.ru

Поступила в редакцию 09.03.16 г.

Методом ЭПР изучено дозозависимое влияние дофамина на образование метгемоглобина в эритроцитах крови пациентов с болезнью Паркинсона в условиях активации окислительного стресса акролеином, а также возможности коррекции данного патологического процесса карнозином в опытах *in vitro*. Показано, что при инкубации эритроцитов с 1,5 мМ дофамина содержание метгемоглобина не изменялось, а с 15 мМ дофамина наблюдалось увеличение содержания метгемоглобина в два раза по сравнению с исходным уровнем. Акролеин в концентрации 10 мкМ вызывал увеличение образования метгемоглобина в три раза. Введение в инкубационную среду эритроцитов 15 мМ дофамина и спустя 1 ч 10 мкМ акролеина увеличивало образование метгемоглобина в 10 раз по сравнению с исходным уровнем. Предварительная инкубация эритроцитов с 5 мМ карнозина с последующим введением акролеина предотвращала увеличение содержания метгемоглобина, однако карнозин не влиял на вызванное дофамином образование метгемоглобина.

*Ключевые слова:* метгемоглобин, дофамин, акролеин, карнозин, болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных хронических системных мультифакторных нейродегенеративных заболеваний центральной нервной системы, в патогенезе которого важную роль играет окислительный стресс (ОС) [1–3]. В основе БП лежат необратимое повреждение и гибель нигростриатных дофаминсинтезирующих нейронов, приводящие к дефициту дофамина в стриатуме [4]. На основе патогенетических механизмов заболевания разработана ДОФА-замещающая терапия (ДОФА – L-диоксифенилаланин), позволяющая поддерживать концентрацию дофамина в организме. В физиологических концентрациях дофамин и ДОФА проявляют антиоксидантные свойства [5,6], однако в высоких концентрациях (более 50 мкМ) эти соединения являются индукторами ОС [7]. Для пациентов с БП характерно значительное нарушение антиоксидантного статуса организма и снижение его устойчивости к окислительным повреждениям, что связано как с генетической предрасположенно-

стью к развитию ОС, так и с ДОФА-индуцированным ОС. К генетическим факторам риска развития БП относятся гены, ответственные за образование активных форм кислорода (АФК) и NO-радикала [8–10]. В то же время избыточный рост АФК и NO является фактором, вызывающим образование метгемоглобина (MetHb) в крови [11]. Образование MetHb из гемоглобина возможно как за счет его прямого окисления, так и в результате снижения активности ферментов, участвующих в процессе восстановления гемоглобина.

В последнее время активно изучается роль MetHb в развитии нейродегенеративных заболеваний и при этом, что особенно важно отметить, роль MetHb в накоплении железа в определенных структурах мозга [12]. Ионы железа характеризуются высокой редокс-активностью в отношении образования АФК и способностью к активации окислительных процессов [13–15]. В литературе обсуждается вопрос о метгемоглобине не только как биомаркере ОС, но и как индукторе ОС при различных патологиях [16].

Ранее нами было показано, что в крови больных БП стадии 3–4 заболевания, длительно

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона, ОС – окислительный стресс, ДОФА – L-диоксифенилаланин, АФК – активные формы кислорода, MetHb – метгемоглобин, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

находящихся на ДОФА-терапии, наблюдалось увеличение содержания MetHb [17]. Возникает вопрос: влияет ли дофамин на образование MetHb? Чтобы ответить на поставленный вопрос, в данной работе нами исследовано влияние различных концентраций дофамина на образование MetHb в модельных опытах *in vitro*.

Резкое увеличение содержания метгемоглобина, гемолиз эритроцитов и выход свободного железа вызывает такой индуктор ОС, как акролеин, который образуется из продуктов окисления полиаминов и липидов. Показано, что акролеин содержится в высоких концентрациях в области черной субстанции мозга пациентов с БП [18,19]. Обладая высокой нейротоксичностью, акролеин способен инициировать побочный круг патологических модификаций белков, устойчивых к протеолизу, вызывать тем самым гибель нейронов при болезни Паркинсона [20]. В соответствии с вышеизложенным, актуальность поиска соединений, способных влиять на механизмы запуска ОС в данных патологических условиях, не вызывает сомнения. Перспективным представляется использование природного антиоксиданта – карнозина [21].

С целью характеристики дозозависимого влияния дофамина на образование MetHb в условиях ОС, вызванного акролеином, и оценки эффективности коррекции данного патологического процесса карнозином, нами проведено исследование на эритроцитах крови пациентов с БП в опытах *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

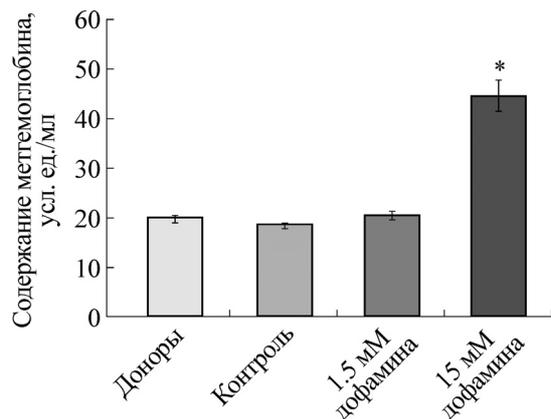
Были обследованы 15 больных с болезнью Паркинсона в возрасте от 50 до 73 лет со стадией 1–2 заболевания по функциональной шкале Hoehn–Yahr (М/Ж = 7/9), с длительностью заболевания  $2,2 \pm 0,6$  года. Все обследованные пациенты были с недавно установленным диагнозом БП и не получали ранее специфического лечения. Клинический диагноз БП был установлен в соответствии с критериями «включения–исключения» согласно UK Brain-BankCriteria. Степень выраженности двигательных нарушений оценивали по международной рейтинговой шкале UPDRS. При поступлении в стационар ФГБНУ НЦН пациенты оформляли информированное согласие на участие в исследовании и использовании их биоматериала.

Забор крови проводили утром натощак в первый день при поступлении больного в стационар в гепаринизированные пробирки, далее кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре и вы-

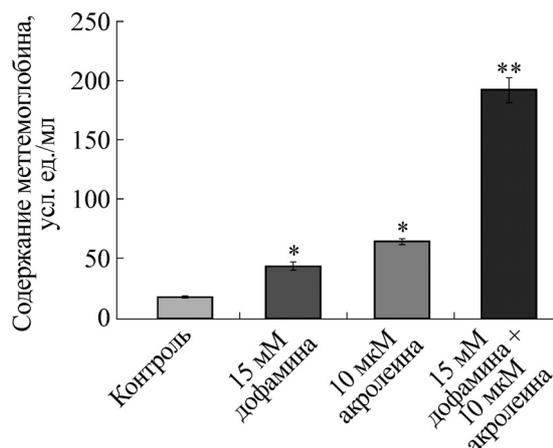
деляли эритроциты по общепринятому методу. Определение содержания MetHb в эритроцитах пациентов проводили с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) по интенсивности сигнала ЭПР с *g*-фактором в области 6.0. Спектры ЭПР измеряли при 77 К на радиоспектрометре ER-220D (Bruker, Германия) с использованием стандартной методики накопления и анализа спектров ЭПР на мини-ЭВМ Аспект-2000 [22]. Преимуществом метода ЭПР в определении MetHb в эритроцитах является его высокая чувствительность по сравнению с биохимическими методами.

В качестве индуктора метгемоглобинообразования использовали раствор дофамина в концентрации 1,5 мМ и 15 мМ (препарат «Допмин», Орион Корпорейшн, Финляндия) и акролеина (Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ. В качестве протектора ОС и метгемоглобинообразования использовали природный антиоксидант – карнозин ( $\beta$ -аланил-L-гистидин) в концентрации 5 мМ в пробе [23].

Концентрацию дофамина, вводимого в инкубационную среду, рассчитывали исходя из суточной дозы приема леводопы на начальных этапах лечения – 300 мг на средний вес взрослого человека (75 кг), что соответствует 1,5 мМ дофамина. Поскольку прием леводопы варьирует в широком дозовом диапазоне и может составлять от 100 до 1000 мг сутки (в инструкции к леводопе указывается максимальная доза 8 г в сутки), нами был исследован эффект дофамина не только в низкой (1,5 мМ), но и в высокой концентрации, равной 15 мМ. Полученную после центрифугирования эритроцитарную массу разбавляли физиологическим раствором (1:1) и инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 1 ч при комнатной температуре по описанной схеме: контроль – интактные эритроциты (1); опыт – инкубация эритроцитов в присутствии 1,5 мМ дофамина (2); инкубация эритроцитов в присутствии 15 мМ дофамина (3); инкубация эритроцитов в присутствии 10 мкМ акролеина (4); инкубация эритроцитов в присутствии 15 мМ дофамина + 10 мкМ акролеина (5); инкубация эритроцитов в присутствии 5 мМ карнозина (6); инкубация эритроцитов в присутствии 5 мМ карнозина + 10 мкМ акролеина (7); инкубация эритроцитов в присутствии 5 мМ карнозина + 15 мМ дофамина (8). 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. Измерение MetHb в контрольной пробе, содержащей ин-



**Рис. 1.** Влияние 1,5 мМ и 15 мМ дофамина на содержание метгемоглобина в эритроцитах крови больных с БП в опытах *in vitro* (усл. ед./мл;  $M \pm m$ ; \* –  $p < 0,01$  к контролю).



**Рис. 2.** Влияние 15 мМ дофамина в условиях окислительного стресса, вызванного 10 мкМ акролеина, на содержание метгемоглобина в эритроцитах крови больных с БП в опытах *in vitro* (усл. ед./мл;  $M \pm m$ ; \* –  $p < 0,01$ ; \*\* –  $p < 0,001$  к контролю).

тактные эритроциты, проводили несколько раз в течение всего эксперимента для исключения его возможного аутоокисления.

**Статистическая обработка результатов.** Полученные результаты представлены в виде  $M \pm m$ . Математическую обработку данных проводили с использованием программы «Statistica 6.0». Для оценки достоверности обнаруженных изменений применяли тесты Стьюдента (сравнение двух независимых групп данных).

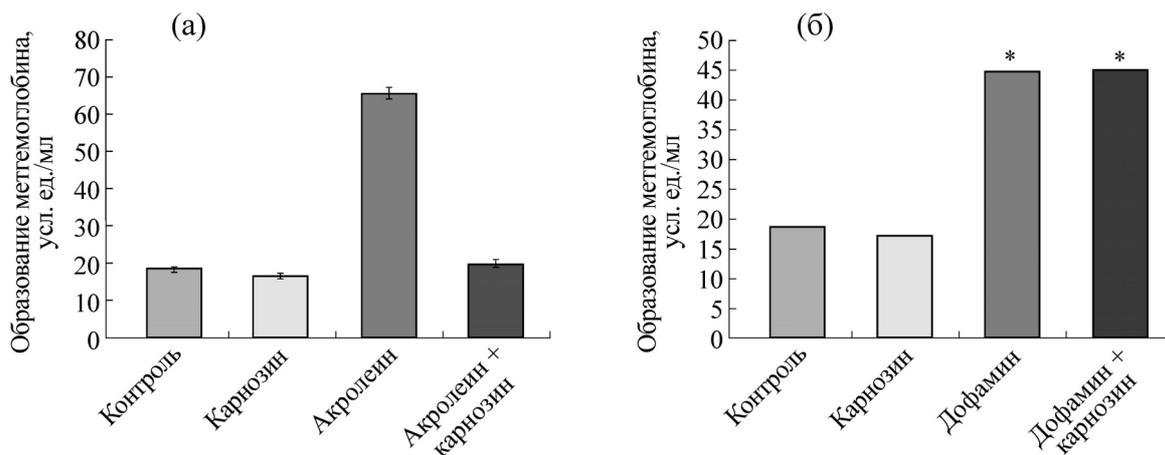
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние дофамина на содержание метгемоглобина в эритроцитах крови больных с болезнью Паркинсона.** На рис. 1 представлены результаты определения содержания метгемоглобина в эритроцитах крови пациентов с БП. В данной группе больных исходное содержание MetHb в эритроцитах не превышало его значения по сравнению с донорами. При инкубации эритроцитов с 1,5 мМ дофамина не наблюдалось изменений в содержании MetHb по сравнению с исходным уровнем, однако при увеличении концентрации дофамина в 10 раз (15 мМ) происходило увеличение содержания MetHb в два раза по сравнению с исходным уровнем.

В нормальных физиологических условиях процесс образования MetHb в эритроцитах крови млекопитающих идет постоянно на низком стационарном уровне и является одним из источников АФК. В основе этого процесса лежит неферментативное окисление гемоглобина в метгемоглобин за счет перехода диамагнитного гемового  $Fe^{2+}$  в парамагнитный  $Fe^{3+}$ , что сопровождается образованием супероксидного анион-радикала. Очевидно, что дофамин в вы-

соких концентрациях стимулирует окисление гемоглобина в крови больных с БП и может являться фактором, оказывающим провокационное влияние на развитие ОС в организме больного БП. Можно полагать, что образование MetHb в этих условиях связано со спонтанным аутоокислением дофамина с образованием АФК и хинонов дофамина, которые способны ковалентно связываться с низкомолекулярными сульфгидрильными соединениями, такими как восстановленный глутатион, а также с цистеиновыми остатками белков, важными для нормального функционирования эритроцитов [24,25].

**Влияние акролеина на образование метгемоглобина в эритроцитах крови больных с болезнью Паркинсона.** Введение в эритроцитарную массу 10 мкМ акролеина приводило к увеличению образования MetHb в три раза относительно его исходного содержания в интактных эритроцитах (рис. 2). Показано, что акролеин обладает выраженным токсическим действием, причем общим механизмом его токсичности является окисление глутатиона, образование АФК и окислительная модификация липидов, а также конъюгирование с высокомолекулярными соединениями (белками и нуклеиновыми кислотами) [26]. По данным работы [27] минимальные токсические дозы (5 мкМ) акролеина вызывают необратимую гибель эритроцитов – «эритролиз» с участием каспаз. Накопление акролеина и его роль в патогенезе БП подтверждена в опытах *in vivo* и *in vitro* [20,28].



**Рис. 3.** Влияние 5 мМ карнозина на образование метгемоглобина, вызванного 15 мМ дофамина (а) и 10 мкМ акролеина (б) в эритроцитах крови больных с БП в опытах *in vitro* (усл. ед./мл;  $M \pm m$ ; \* –  $p < 0,01$  к контролю; \*\* –  $p < 0,001$  к контролю).

**Влияние дофамина на образование метгемоглобина в условиях окислительного стресса, вызванного акролеином в эритроцитах крови больных с болезнью Паркинсона.** Введение 15 мМ дофамина и последующее введение 10 мкМ акролеина в инкубационную среду вызывало десятикратное увеличение содержания MetHb в эритроцитах относительно контроля и пятикратное – относительно образования MetHb, вызванного 15 мМ дофамина (рис. 2). Следовательно, высокая концентрация дофамина в условиях ОС, индуцированного акролеином, приводит к значительному увеличению образования MetHb в эритроцитах и указывает на прооксидантные свойства дофамина; при этом сочетанное действие дофамина и акролеина является фактором, определяющим интенсивность образования АФК и развития ОС. Можно предполагать, что ДОФА-терапия, проводимая на фоне высокого содержания акролеина, связанного с экзогенными (курение, экология) и эндогенными (окисление липидов и полиаминов) факторами, играет значимую роль в развитии побочных эффектов при БП.

**Влияние карнозина на образование метгемоглобина, вызванное дофамином или акролеином в эритроцитах крови больных с болезнью Паркинсона.** В следующей серии экспериментов было изучено влияние природного антиоксиданта карнозина на индукцию образования MetHb, вызванную дофамином или акролеином, в эритроцитах крови больных БП. Как представлено на рис. 3а, предварительное введение 5 мМ карнозина в инкубационную среду, содержащую 15 мМ дофамина, не оказывало влияния на образование MetHb. В то же время пред-

варительное введение карнозина в инкубационную среду, содержащую 10 мкМ акролеина, предотвращало избыточное образование MetHb до уровня контрольных значений (рис. 3в). Очевидно, что защитное действие карнозина в присутствии акролеина связано с его способностью влиять на механизмы запуска ОС, вызванного акролеином. Механизм антиоксидантного действия карнозина в условиях развития ОС заключается в снижении образования АФК, активации супероксиддисмутазы, в регуляции каскада реакций, запускающих перекисное окисление липидов, и др. [29]. Кроме того, отличительной чертой защитного действия карнозина от других антиоксидантов является его способность связывать более 80% акролеина за счет прямого взаимодействия с ним [30]. В опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что карнозин способен существенно влиять на содержание акролеин-индуцированных модифицированных белков (включая такие белки, как альфа-синуклеин, нейрофиламент-L и др. [31].

Способность карнозина предотвращать акролеин-индуцированное образование MetHb позволяет предполагать целесообразность его включения в комплексную терапию лечения БП. По-видимому, повышение содержания MetHb в присутствии дофамина связано с синтезом хинонов при аутоокислении последнего, на образование которых карнозин не влияет. В то же время образование MetHb, обусловленное дофамином, требует дальнейшего поиска соединений, способных корригировать эти процессы.

## ВЫВОДЫ

1. При инкубации эритроцитов с 1,5 мМ дофамина содержание MetHb не изменялось, а при инкубации эритроцитов с 15 мМ дофамина наблюдалось увеличение содержания MetHb в два раза по сравнению с исходным уровнем.

2. Акролеин в концентрации 10 мкМ вызывал увеличение образования MetHb в три раза по сравнению с контролем. Введение в инкубационную среду эритроцитов, содержащую 15 мМ дофамина, 10 мкМ акролеина увеличивало образование MetHb в 10 раз по сравнению с исходным уровнем.

3. Предварительная инкубация эритроцитов с 5 мМ карнозина с последующим введением акролеина предотвращала увеличение содержания MetHb, в то же время карнозин не влиял на метгемоглобинообразование, вызванное дофамином.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-01416).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. H. Kim, J. E. Kim, S. J. Rhie, and S. Yoon, *Exp. Neurobiol.* **24** (4), 325 (2015).
- J. Blesa, I. Trigo-Damas, A. Quiroga-Varela, et al., *Front Neuroanat.* **9**, 91 (2015).
- О. М. Бунеева и А. Е. Медведев, *Биомед. химия* **57** (3), 246 (2011).
- О. Hwang, *Exp. Neurobiol.* **22** (1), 11 (2013).
- K. Jodko-Podrecka and G. Litwinienko, *Postepy Biochem.* **56** (3), 248 (2010).
- M. Asanuma, I. Miyazaki, and N. Ogawa, *Redox Biol.* **2**, 82 (2013).
- K. Jodko-Podrecka and G. Litwinienko, *Free Radic. Biol.* **83**, 1 (2015).
- С. Н. Иллариошкин, И. А. Загоровская, И. А. Иванова-Смоленская и Е.Д. Маркова, *Неврол. журн.* **5**, 47 (2002).
- З. А. Суслина, С. Н. Иллариошкин и М. А. Пирадов, *Анналы клин. и эксперим. неврологии* **1**, 5 (2007).
- С. Н. Иллариошкин, М. И. Шадрин, Г. Х. Багыева и др., *Анналы клин. и эксперим. неврологии* **1**, 23 (2007).
- В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин и Н.С. Косицын, *Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих* (Наука, М., 1998).
- L. Mohorovic, A. M. Lavezzi, S. Stifter, et al., *Adv. Biosci. Biotechnol.* DOI:10.4236/abb.2014.51003 (2014).
- M. S. Medeiros, A. Schumacher-Schuh, A. M. Cardoso, et al., *PLoS One* **11** (1): e0146129 (2016).
- K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, et al., *Mol. Cell Biochem.* **345** (1–2), 91 (2010).
- D. Jiang, S. Shi, L. Zhang, et al., *ACS Chem. Neurosci.* **4** (9), 1305 (2013).
- G. M. T. Hare, A. K. Y. Tsui, J. H. Crawford, and R. P. Patel, *Redox Biol.* **1** (10), 65 (2013).
- М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, В. В. Полещук и др., в сб. *Мат. III Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений* (М., 2014), с. 336.
- L. Ciccoli, C. Signorini, C. Alessandrini, et al., *Exp. Mol. Pathol.* **60** (2), 108 (1994).
- A. Moghe, S. Ghare, B. Lamoreau, et al., *Toxicol. Sci.* **143** (2), 242 (2015).
- M. Shamoto-Nagai, W. Maruyama, Y. Hashizume, et al., *J. Neural. Transm.* **114** (12), 1559 (2007).
- Т. Н. Федорова, Г. Х. Багыева, И. С. Добротворская и др., *Эксперим. клин. фармакол.* **75** (6), 23 (2012).
- М. К. Пулатова, Г. Т. Рихирева и З. В. Куроптева, *Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии* (Энергоатомиздат, М., 1989).
- Z. Xie, S. P. Baba, B. R. Sweeney, and O. A. Barski, *Chem. Biol. Interact.* **202** (1–3), 288 (2013).
- Y. Segura-Agnilar, I. Paris, P. Manoz, et al., *J. Neurochem.* **129**, 898 (2014).
- C. Voshavar, M. Shah, L. Xu, and A. K. Dutta, *Neurotox. Res.* **28** (4), 302 (2015).
- C. B. Pocernich, A. L. Cardin, C. L. Racine, et al., *Neurochem. Int.* **39** (2), 141 (2001).
- M. S. E. Ahmed, H. Langer, M. Abed, et al., *Kidney Blood Press. R.* **37** (2–3), 158 (2013).
- T. N. Dang, M. Arseneault, V. Murthy, and C. Ramassamy, *Curr. Mol. Pharmacol.* **3** (2), 66 (2010).
- А. А. Болдырев, *Биохимия* **77** (4), 405 (2012).
- M. Carini, G. Aldini, G. Beretta, et al., *J. Mass Spectrom.* **38** (9), 996 (2003).
- G. Aldini, R. M. Facino, G. Beretta, and M. Carini, *Biofactors* **24**, 77 (2005).

## **Effect of Dopamine on *in vitro* Methemoglobin Formation in Erythrocytes of Patients with Parkinson's Disease under Oxidative Stress**

**M.G. Makletsova\*, T.N. Fedorova\*, V.V. Poleschuk\*, and G.T. Rihireva\*\***

*\*Research Center of Neurology, Volokolamskoe shosse 80, Moscow, 125367 Russia*

*\*\*Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

By electronic paramagnetic resonance the dose-dependent effect of dopamine on methemoglobin formation in erythrocytes of patients with Parkinson's disease under activation of oxidative stress induced by acrolein, and possibilities of correction of this pathological process using carnosine *in vitro* experiments were examined. It is shown that incubation of erythrocytes with 1.5 mM dopamine, did not change the methemoglobin content, while incubation with 15 mM dopamine caused a two-fold increase in the methemoglobin content compared to its initial level. 10  $\mu$ M acrolein increased methemoglobin formation threefold. Administration of 15 mM dopamine and after one hour 10  $\mu$ M acrolein to the incubation system increased methemoglobin formation 10-fold compared to its initial level. Preincubation of erythrocytes with 5 mM carnosine followed by acrolein addition prevented the increase in the methemoglobin content, but carnosine had no effect on methemoglobin formation induced by dopamine.

*Key words: methemoglobin, dopamine, acrolein, carnosine, Parkinson's disease*