

РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Ананян А.А.¹, Черникова И.В.², Милютин Н.П.¹, Хаджиева Х.И.², Ящук С.В.¹

¹Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И.Ивановского
ул. Стачки, д. 194/1, Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: npmilutina@sfned.ru

²Ростовский государственный медицинский университет
Нахичеванский пер., д. 29, Ростов-на-Дону, 344022, РФ

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Цель работы - исследование роли системы прооксиданты↔антиоксиданты и апоптоза лимфоцитов периферической крови в оценке тяжести нейродегенеративного процесса при болезни Паркинсона (БП). Установлены глубокие нарушения редокс-баланса и развитие окислительного стресса в лимфоцитах больных БП на всех стадиях заболевания. Нарушения редокс-баланса в лимфоцитах характеризуются чрезмерной активацией антиоксидантных ферментов – СОД, глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы на фоне ингибирования каталазы и глутатионпероксидазы, а также существенной стимуляцией прооксидантных ферментов – НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы. Активность глутатион-S-трансферазы лимфоцитов может рассматриваться как чувствительный и информативный тест для оценки тяжести патологического процесса при БП. Важнейшим следствием сдвига редокс-баланса является апоптоз лимфоцитов, который может отражать уровень клеточной гибели клеток ЦНС вследствие единых механизмов обмена дофамина и сходства компонентов рецепторного аппарата клеток иммунной и нервной системы.

Ключевые слова: редокс-статус, антиоксидантные ферменты, прооксиданты, апоптоз, лимфоциты, болезнь Паркинсона.

Высокая чувствительность головного мозга к повреждающему действию кислорода обуславливает заболевания, при которых окислительный стресс (ОС) является одной из главных причин гибели нервных клеток при нейродегенеративных патологиях. Болезнь Паркинсона (БП) - широко распространенное нейродегенеративное заболевание с нарастающей симптоматикой (тремор, ригидность, брадикинезия), которая коррелирует с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга. В патогенез болезни Паркинсона вовлечены такие факторы, как агрегация белка α -синуклеина, окислительный стресс, дисфункция митохондрий, нейровоспаление, активация апоптоза, ЭПР-стресс [1]. С учетом увеличения доли пожилых людей, а также улучшения медицинской помощи больным БП, в ближайшие 20 - 30 лет следует ожидать роста распространенности заболевания [2]. Болезнь Паркинсона – полигенное системное заболевание, связанное с развитием окислительного стресса не только в ЦНС, но и за ее пределами, в связи с чем оценка нарушения редокс-баланса в крови может представлять интерес для диагностики БП.

Цель работы - исследование роли системы прооксиданты↔антиоксиданты и апоптоза лимфоцитов периферической крови в оценке тяжести нейродегенеративного процесса при болезни Паркинсона (БП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группа больных была сформирована из 28 человек (7 мужчин / 21 женщина) от 52 до 72 лет (средний возраст $59,1 \pm 1,1$), поступивших в неврологическое отделение ГУЗ “Ростовская областная клиническая больница” с диагнозом болезнь Паркинсона. Стадии заболевания оценивались по критериям международной классификации по шкале Хен-Яра [3] и соответствовали I - III стадиям заболевания. Больные были разделены на 3 группы: 1- пациенты с 1 стадией болезни, 2 - пациенты со 2 стадией, 3 - пациенты с 3-й стадией заболевания. Возраст больных колебался от 52 до 72 лет (средний возраст $59,1 \pm 1,1$). В качестве контрольной была использована кровь 15 практически здоровых людей доноров, женщин и мужчин, в возрасте от 35 до 52 лет (средний возраст $46,2 \pm 0,7$). Лимфоциты выделяли из цельной крови в градиенте плотности фиколл-верографина [4]. Апоптоз лимфоцитов оценивали лазерной проточной цитофлуориметрией на приборе FACS Canto, Becton Dickinson (США) с использованием набора «Annexin V-FITC apoptosis detection kit 1», BD Pharmingen (США). Исследовали редокс-статус плазмы и лимфоцитов периферической крови. Состояние прооксидантной системы оценивали по уровню малонового диальдегида (МДА) [5] в плазме крови, активности НАДФН-оксидазы [6] и миелопероксидазы (МПО) [7] в лимфоцитах. Содержание в плазме крови нитрит- и нитрат-ионов определяли по цветной реакции нитритов с реактивом Грисса [8]. В плазме крови и мононуклеарной фракции определяли активность антиоксидантных ферментов. Активность супероксиддисмутазы (СОД) и супероксидустраняющую активность плазмы крови (СУА) оценивали по ингибированию восстановления нитросинего тетразолия супероксидом, генерируемым при аутоокислении адреналина) [9]. Активность каталазы и скорость утилизации перекиси водорода ($V_{H_2O_2}$) определяли по реакции перекиси водорода с молибдатом аммония [10]. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли по конъюгации восстановленного глутатиона (GSH) с 1,2-динитро-хлор-бензолом [11]. Содержание GSH определяли по реакции с дитио-бис-нитробензойной кислотой [12].

Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли с гидроперекисью трет-бутила [13]. Об активности глутатионредуктазы (ГР) судили по скорости окисления НАДФН [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью MS Excel 2007 и Statistica 6.0. Для каждой серии рассчитывали средние арифметические значения показателей и их стандартные ошибки ($M \pm m$). Для оценки статистически значимых различий между сравниваемыми группами использовали U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента. При $p \leq 0,05$ различия считали статистически значимыми, при $0,05 < p \leq 0,1$ предполагали тенденцию к статистической значимости различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Свободнорадикальное окисление и глубокие нарушения динамического равновесия в системе ПОЛ \leftrightarrow АО играют ведущую роль в патогенезе БП. При нейродегенеративном процессе, развивающемся при БП, наблюдается как локальный (тканевой), так и системный окислительный стресс, развивающийся в крови. Изучение роли активированных кислородных метаболитов (АКМ) в гибели нейронов (локальный ОС) nigростриатной системы показано многими авторами на животных моделях [15] [16]. Первичные триггеры, включая воздействие экологических нейротоксинов, черепно-мозговую травму или инфекцию и генетические изменения, могут взаимодействовать и индуцировать дофаминергическую дегенерацию нейронов.

Важно отметить, что к причинам повышенной чувствительности нейронов черной субстанции к окислительному стрессу относят присутствие эндогенного дофамина (ДА), восстановленного железа (Fe^{2+}) и нейромеланина [17]. При этом в данной структуре мозга отмечается более низкий уровень глутатиона и активности фермента его синтеза - глутамилцистеинил-лигазы [18]. С другой стороны, избыточная продукция ДА дофаминергическими нейронами может приводить к его аутоокислению с образованием хинона и в качестве побочных продуктов - супероксида и гидропероксида, повреждающих клетки [18]. Гидропероксид, в свою очередь, в присутствии Fe^{2+} через механизм реакции Фентона образует наиболее токсичный гидроксильный радикал, который еще более усиливает повреждение нейронов черной субстанции и клеток близлежащих структур мозга

В итоге под воздействием экзогенных или эндогенных факторов происходит блокирование переноса электронов через комплекс I электрон-транспортной цепи митохондрий нейронов черной субстанции. Это приводит к угнетению дыхания, снижению синтеза АТФ и, самое важное – к увеличению образования митохондриями супероксидного анион-радикала и других АФК, что, в свою очередь, способствует усилению ПОЛ. Интенсификация СРО в митохондриях при БП с неизбежностью запускает митохондриальный путь апоптоза клеток ЦНС, а гибель нейронов проявляется позднее в нарушении двигательной функции организма.

Полученные нами результаты и анализ данных литературы позволяют прийти к заключению, что локальный ОС, являясь инициирующим и ведущим механизмом нейродегенеративного процесса при БП, неразрывно связан с системным ОС, который развивается в крови, что показано в нашей работе. Установлено, что в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона обнаружена активация процессов перекисного окисления липидов, что подтверждается накоплением МДА и возрастанием его уровня на 78 % в первой группе больных, на 124 % во второй группе и на 45 % в третьей группе пациентов. В плазме крови обследованных больных обнаружено существенное увеличение содержания метаболитов оксида азота (NOx) по сравнению с контрольной группой, что указывает на возможную роль оксида азота в нейропатохимических механизмах БП.

Полученные результаты свидетельствуют о глубоких нарушениях редокс-статуса в крови при БП. Уровень супероксид-устраняющей активности (СУА) в плазме крови возрастает во всех трех группах обследованных, что на 126-198 % выше, чем в контрольной группе. Активность СОД в лимфоцитах больных БП увеличивается в трех обследованных группах на 247-368 % относительно контроля, что свидетельствует о напряженности функционирования фермента. При этом скорость утилизации перекиси водорода ($V_{H_2O_2}$) в плазме крови при БП снижается на 37-44 % во второй и третьей группах пациентов. В лимфоцитах активность каталазы возрастает на 76 % на первой стадии болезни, а на 2-й и 3-й стадиях снижается на 47 % и 63 %, соответственно.

Известно, что СУА и $V_{H_2O_2}$ являются интегральными показателями, характеризующими регуляцию свободнорадикального окисления на стадии активации молекулярного кислорода и запуска цепного процесса ПОЛ. СУА характеризует элиминацию супероксида в биологических жидкостях различными путями: с участием СОД 3 (экстрацеллюлярной изоформы СОД), церулоплазмينا, низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата, мочевой кислоты, урата и др.). Скорость утилизации перекиси водорода в биологических жидкостях зависит от расщепления гидропероксида различными компонентами – каталазой, глутатионпероксидазой, пероксиредоксином, глутаредоксином, селен-содержащими белками, а также показывает использование перекиси водорода как субстрата миелопероксидазой и эозинпероксидазой в образовании гипогалогенитов [19].

Как следует из полученных результатов, в крови пациентов с болезнью Паркинсона наблюдается выраженная дисфункция и напряженность функционирования ферментов глутатион-зависимой антиоксидантной системы. В плазме крови и лимфоцитах активность глутатионпероксидазы снижается на 90-94 % и на 24-36 %, соответственно, во всех трех клинических группах по сравнению с нормой. Установлено, что на всех стадиях заболевания содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах больных БП снижается на 49-64 % относительно контроля, что согласуется с ингибированием глутатионредуктазы.

Полученные нами данные в определенной степени согласуются с результатами других авторов, согласно которым уровень окисленного глутатиона и содержание ТБК-положительных продуктов типа МДА в крови пациентов с БП значительно превышали контроль [20]. При этом активность ГР в лимфоцитах при БП возрастает на 161-290 % на всех стадиях заболевания.

Следует подчеркнуть, что наиболее существенные изменения при БП обнаружены в активности глутатион-S-трансферазы. В лимфоцитах при БП активность GST резко возрастает: на 1-ой стадии увеличение составляет 394 %, на 2-ой – 548 % и на 3-й стадии заболевания – 570 %. Активность глутатион-S-трансферазы лимфоцитов может рассматриваться как чувствительный и информативный тест для оценки тяжести патологического процесса при БП.

Таким образом, в крови пациентов с БП наблюдается выраженная дисфункция компонентов антиоксидантной системы, приводящая к повышению интенсивности ПОЛ в плазме крови. Проведенное исследование выявило увеличение активности ключевых ферментов прооксидантной системы крови – миелопероксидазы и НАДФН-оксидазы. При БП в лимфоцитах периферической крови наблюдается значительная стимуляция активности прооксидантных ферментов. Активность НАДФН-оксидазы возрастает на 190-217 % в трех группах пациентов с БП. Активность МПО увеличивается на 31-44 % во всех трех клинических группах относительно контроля.

Глубокие нарушения редокс-баланса в лимфоцитах и, в целом, в крови, приводят к повышению интенсивности программируемой клеточной гибели мононуклеаров. Представленные данные, касающиеся нарушения редокс-равновесия в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с БП, подтверждаются результатами оценки уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови методом проточной лазерной цитофлуориметрии. Согласно полученным результатам, процент лимфоцитов на стадии раннего апоптоза от общего их числа у здоровых лиц на 42 % выше нормы ($p < 0,05$). Это свидетельствует о значительной интенсификации апоптоза лимфоцитов у пациентов с БП на 2-3-ей стадиях заболевания.

Известно, что важнейшими инициаторами апоптоза являются активные формы кислорода (АФК) и состояние окислительного стресса [21], который развивается при нейродегенеративном процессе при болезни Паркинсона. С другой стороны, известно, что лимфоциты имеют рецепторные структуры, сходные с нейрональными, а, следовательно, могут быть чувствительны к тем же сигнальным молекулам, которые управляют активностью нервных клеток [22].

Выявленный повышенный уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП может, в определенной мере, отражать повышенную индукцию апоптоза в нейронах мозга и вносить вклад в патогенез заболевания. Следует отметить, что в исследованиях других авторов в лимфоцитах периферической крови пациентов с БП обнаружены увеличение количества апоптотического рецептора Fas, усиление активности каспаз 3 и 9 и снижение экспрессии антиапоптотического гена *Bcl-2* [23].

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует, что в молекулярных механизмах болезни Паркинсона важнейшая роль принадлежит системному окислительному стрессу, который развивается в крови и самым тесным образом связан с локальным стрессом, который является первичным и протекает в клетках центральной нервной системы (черной субстанции мозга). Согласно полученным результатам, наибольший дисбаланс, нарушение синергизма функционирования компонентов антиоксидантной системы на фоне усиления прооксидантного потенциала наблюдается в мононуклеарах периферической крови у пациентов с БП. Сдвиг редокс-баланса мононуклеаров наблюдается, начиная с ранних стадий дегенеративного процесса в ЦНС, и может рассматриваться как информативный показатель развития патологического процесса у больных БП. Причем, из всех изученных показателей ОС наибольшие изменения наблюдаются в активности глутатион-S-трансферазы лимфоцитов, активность которой увеличивается в 4,9 раз на 1-ой стадии заболевания, в 6,5 раз – на 2-ой стадии и в 6,7 раз – на 3-й стадии заболевания. Активность глутатион-S-трансферазы лимфоцитов может рассматриваться как чувствительный и информативный тест для оценки тяжести патологического процесса при БП.

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП "Высокие технологии" ЮФУ в рамках базовой части госзадания МОН, проект № 6.6762.2017/БЧ.

Список литературы / References:

1. Obeso J.A., Rodriguez-Oroz M.C., Goetz C.G., Marin C., Kordower J.H., Rodriguez M., Hirsch E.C., Farrer M., Schapira A.H., Halliday G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med.*, 2010, vol. 6, pp. 653-661
2. Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 2007, vol. 5, pp. 384-386.
3. Hoehn M.M., Yahr M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 1967, vol. 17, pp. 427-442.
4. Böyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968, vol. 97, pp. 31-50.
5. Орехович В.Н. *Современные методы в биохимии*. М: Медицина, 1977, 392 с. [Orekhovich V.N. *Modern methods in biochemistry*. Moscow: Meditsyna, 1977, 392 p. (In Russ.)]

6. Длужевская Т.С., Погорелова Т.Н., Афонин А.А. Активность НАДФН-оксидазы в оценке состояния новорожденных детей. *Педиатрия*, 1989, № 3, с. 44-47. [Dluzhevskaja T.S., Pogorelova T.N., Afonin A.A. NADPH oxidase activity in evaluating the status of newborn infants. *Pediatriia*, 1989, no. 3, pp. 44-47. (In Russ.)]
7. Саидов М.З., Пинегин Б.В. Спектрофотометрический метод определения миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках. *Лаб. дело.*, 1991, № 3, с. 56-59. [Saidov M.Z., Pinegin B.V. A spectrophotometric method of determining the myeloperoxidase activity in phagocytic cells. *Lab Delo*. 1991, no. 3, pp. 56-60. (In Russ.)]
8. Голиков П.П. *Оксид азота в клинике неотложных заболеваний*. М: Медпрактика, 2004, 179 с. [Golikov P.P. *Nitric oxide in clinics of urgent diseases*. Moscow: Medpraktika, 2004, 179 p. (In Russ.)]
9. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопр. мед.химии*, 1999, № 3, с. 14-15. [Sirota T.V. Novel approach to the study of adrenaline auto-oxidation and its use for the measurements of superoxide dismutase activity. *Vopr. Med. Khim.*, 1999, no. 3, pp. 14-15. (In Russ.)]
10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*, 1988, № 1, с.16-19. [Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Maïorova I.G., Tokarev V.E. A method of determining catalase activity. *Lab Delo.*, 1988, no. 1, pp.16-19. (In Russ.)]
11. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathion-S-transferase: the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, pp. 7130-7139.
12. Ellman Q.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.*, 1959, vol. 82, pp 70-77.
13. Мойн В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лаб. дело*, 1986, № 12, с. 724-727. [Moin V.M. A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab Delo*, 1986, no. 12, pp. 724-727. (In Russ.)]
14. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов. *Лаб. Дело*, 1989, № 4, с. 19-21. [Iusupova L.B. Increasing the accuracy of determining the glutathione reductase activity of erythrocyte. *Lab Delo*, 1989, no. 4, pp. 19-21. (In Russ.)]
15. Taylor J.M., Main B.S., Crack P.P.J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem. Internat.*, 2013, vol. 62, pp. 803-819.
16. Cobb C.A., Cole M.P.P. Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiol. Disease.*, 2015, vol. 84, pp. 4-21.
17. Chaudhry Z.L., Ahmed B.Y. The Role of Caspases in Parkinson's Disease Pathogenesis: A Brief Look at the Mitochondrial Pathway. *Austin Alzheimers J. Parkinsons Dis.*, 2014, vol. 1, pp. 1-5.
18. Smeyne M., Smeyne R.J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, vol. 62, pp. 13-25.
19. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*. М.: Слово, 2006, 556 с. [Menshikova E.B., Lankin V.Z., Bondar I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A., *Oxidative Stress. Prooxidants and Antioxidants*. Moscow: Slovo, 2006, 556 p. (In Russ.)]
20. Younes-Mhenni S., Frih-Ayed M., Kerkeni A., Bost M., Chazot G. Peripheral Blood Markers of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Eur. Neurol.*, 2007, vol. 58, pp.78-83.
21. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A.. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.*, 2016, vol. 12, pp. 2977-2992.
22. Болдырев А.А. Нейрональные рецепторы в клетках иммунной системы. *Природа: Естественно-научный журнал РАН*, М.: Наука, 2005, № 7, с. 3-8. [Boldyrev A.A. Neuronal receptors in immune system cells. *Pryroda*, 2005, no. 7, pp. 3-8. (In Russ.)]
23. Усенко Т.С., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф., Боганькова Н.А., Вавилова Т.В., Шварцман А.Л., Пчелина С.Н. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной формой болезни Паркинсона. *Цитология*, 2012. № 54, с.44-48. [Usenko T.S, Emel'ianov A.K., Iakimovskii A.F., Bogan'kova N.A., Vavilova T.V., Shvartsman A.L., Pchelina S.N. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with LRRK2-associated Parkinson's disease. *Tsitologiya*, 2012, no. 54, pp. 44-48 (In Russ.)]

THE ROLE OF FREE RADICAL PROCESSES AND APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES
IN BLOOD WITH PARKINSON'S DISEASES

Ananyan A.A.¹, Chernikova I.V.², Milyutina N.P.¹, Hadzieva H.I.², Yaschuk S.V.¹

¹Southern Federal University, Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology,
Stachky str., 194/1, Rostov-on-Don, 344090, Russia; e-mail: npmilutina@sfnedu.ru

²Rostov State Medical University,
Nahichevansky lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

Abstract. The aim of the work is to study the role of the peripheral blood lymphocyte antioxidant system and apoptosis in assessment the severity of neurodegenerative process in Parkinson's disease (PD). The deep disorders of redox balance and development of oxidative stress in lymphocytes of patients with PD at all stages of the disease have been established. Disorders of redox balance in lymphocytes are characterized by excessive activation of antioxidant enzymes – SOD, glutathione-S-transferase, glutathione reductase on the background of inhibition of catalase and glutathione peroxidase, as well as significant stimulation of prooxidant enzymes – NADPH-oxidase and myeloperoxidase. The activity of glutathione-S-transferase of lymphocytes can be considered as a sensitive and informative test to assess the severity of the pathological process in PD. The most important consequence of the redox balance shift is apoptosis of lymphocytes, which can reflect the CNS cell death level due to unified mechanisms of dopamine metabolism and the similarity of the receptor apparatus components of the immune and nervous system cells.

Key words: redox-status, antioxidant enzymes, prooxidants, apoptosis, lymphocytes, Parkinson's disease.