

ОТНОШЕНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИН/ТРАНСФЕРРИН В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2017 г. М.Г. Маклецова, Г.Т. Рихирева*, В.В. Полещук, С.Н. Иллариошкин

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

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

E-mail: mgm52@bk.ru

Поступила в редакцию 10.07.17 г.

Методом ЭПР-спектроскопии изучено отношение концентраций Cu^{2+} -церулоплазмин/ Fe^{3+} -трансферрин в плазме крови у 54 пациентов на разных стадиях болезни Паркинсона, которые принимали и не принимали L-ДОФА-терапию. Установлено, что у пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, показатель церулоплазмин/трансферрин повышался на 157% по сравнению с группой контроля из числа клинически здоровых людей той же возрастной группы. В крови больных болезнью Паркинсона отношение церулоплазмин/трансферрин увеличивалось на стадии 1 заболевания – на 119%, на стадии 2 – на 117% и на стадии 3 – на 135% по сравнению с контролем. Статистически достоверного различия между отношением церулоплазмин/трансферрин у больных, получавших и не получавших заместительную L-ДОФА-терапию, выявлено не было. Полученные данные свидетельствуют о наличии изменений в функционировании системы церулоплазмин:трансферрин, обеспечивающей снижение содержания токсичных ионов Fe^{2+} в плазме при болезни Паркинсона. Эти изменения являются патогенетически значимым фактором болезни Паркинсона на всех стадиях заболевания.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, отношение церулоплазмин/трансферрин.

Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных хронических системных неизлечимых заболеваний, в патогенезе которого важную роль играет окислительный стресс [1–3]. Одним из главных индукторов окислительного стресса являются редокс-активные ионы железа, накопление которых в дофаминергических нейронах субстанции nigra характерно для БП [2]. Механизмы и источники накопления железа в структурах мозга при БП до сих пор не выяснены окончательно [4,5]. Дисфункция метаболизма железа (поглощение и выделение, запасание и перераспределение в тканях) играет ключевую роль в патогенезе БП [6].

Важную роль в метаболизме железа играют мультифункциональный медьсодержащий белок церулоплазмин и переносчик железа трансферрин. Церулоплазмин – мультимедный белок плазмы крови – выполняет в организме ряд биологических функций. К наиболее важным из них относят феррооксидазное действие и иммобилизацию сывороточного железа, антиоксидантное действие, супероксиддисмутазную

и пероксидазную активности, контроль оборота меди в организме, участие в острофазных реакциях воспаления и в иммунном ответе организма; кроме того, церулоплазмин регулирует уровни биогенных аминов [7]. Роль церулоплазмина в гомеостазе железа неопровержимо доказана при изучении наследственных мутаций с полным отсутствием церулоплазмина – ацерулоплазминемией [7]. Нарушение биосинтеза церулоплазмина приводит к накоплению железа в базальных ганглиях мозга и тяжелым поражениям центральной нервной системы. Церулоплазмин, катализируя реакцию окисления двухвалентного железа в трехвалентное, снижает содержание редокс-активного железа (Fe^{2+}), после чего Fe^{3+} включается в транспортный цикл трансферрина и переносится в ткани [4]. Систему церулоплазмин/трансферрин рассматривают как главную антиоксидантную систему сыворотки крови [8]. Считается, что отношение церулоплазмин/трансферрин отражает способность сыворотки крови улавливать и секвестрировать металлы переменной валентности (Fe и Cu), которые активно участвуют в развитии окислительного стресса [6]. Отклонения от значений клинической нормы отношения церулоплазмин/трансферрин обнаружено при многих нейродегенеративных заболеваниях, таких как

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

Таблица 1. Содержание Cu^{2+} -церулоплазмина, Fe^{3+} -трансферрина и отношение церулоплазмин/трансферрин в плазме крови больных с БП

	Церулоплазмин, усл. ед./мл плазмы	Трансферрин, усл. ед./мл плазмы	Церулоплазмин/трансферрин
Клиническая норма ($n = 12$)	43 ± 1	83 ± 6	$0,54 \pm 0,04$
БП ($n = 54$)	77 ± 4	67 ± 4	$1,34 \pm 0,09$
	$p \leq 0,0001$	$p = 0,232$	$p \leq 0,0001$

болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона и другие патологии [9–12]. В литературе отсутствуют данные о состоянии системы церулоплазмин/трансферрин в плазме крови пациентов с БП на разных стадиях заболевания, а также о влиянии заместительной L-ДОФА-терапии на данный показатель. Cu^{2+} -церулоплазмин и Fe^{3+} -трансферрин обладают парамагнитными свойствами и могут быть зарегистрированы методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Целью данной работы явилось изучение отношения сигналов ЭПР белков Cu^{2+} -церулоплазмин/ Fe^{3+} -трансферрин в плазме крови больных на разных стадиях заболевания БП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 54 больных российской популяции в возрасте от 38 до 78 лет с диагностированной болезнью Паркинсона. Клинический диагноз БП был установлен в соответствии с критериями «включения–исключения» согласно UK BrainBankCriteria. Степень выраженности двигательных нарушений оценивали по международной рейтинговой шкале UPDRS. Оценка тяжести заболевания проводилась по функциональной шкале Hoehn–Yahr. Были проведены две серии обследования: в первую серию вошли больные БП, не получавшие заместительную L-ДОФА-терапию; во вторую – больные БП, получающие заместительную L-ДОФА-терапию. В каждой серии были обследованы четыре группы больных соответствующей стадии заболевания: 18 человек со стадией 1; 11 человек – со стадией 2; 22 человека – со стадией 3 и 3 человека – со стадией 4. Среди них были 29 женщин и 25 мужчин, средний возраст составил $57,03 \pm 3,61$ лет. Длительность заболевания составляла от трех месяцев (стадия 1) до семи–восьми лет (стадия 3).

Все пациенты находились на стационарном или амбулаторном лечении в 5-м неврологическом отделении ФГБНУ НЦН и оформляли информированное согласие на участие в исследовании и использовании их биоматериала. Контрольную группу составили 12 клинически здоровых людей той же возрастной группы.

Забор крови осуществляли утром натощак. Спектры ЭПР плазмы крови измеряли при 77 К на радиоспектрометре ER-220D фирмы Bruker (Германия) с использованием стандартной методики накопления и анализа спектров ЭПР на мини-ЭВМ «Аспект-2000». Содержание Cu^{2+} -церулоплазмина и Fe^{3+} -трансферрина определяли как величину, пропорциональную амплитуде сигналов ЭПР с g -фактором 2,05 для церулоплазмина и g -фактором 4,3 для трансферрина [13]. В форме спектров ЭПР всех пациентов не было отмечено различий, что позволило рассчитать отношение концентраций церулоплазмин/трансферрин на основании данных измерения амплитуды сигналов ЭПР. Содержание церулоплазмина и трансферрина выражали в условных единицах на 1 мл плазмы (усл. ед./мл).

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 (сопоставление двух независимых групп данных) и Манни–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе обнаружено, что в плазме крови пациентов БП содержание Cu^{2+} -церулоплазмина увеличивалось на 79% ($p \leq 0,0001$) по сравнению с контролем, а содержание Fe^{3+} -трансферрина статистически достоверно не изменялось (табл. 1). При БП отношение церулоплазмин/трансферрин превышало значение клинической нормы на 157% ($p \leq 0,0001$) (табл. 1).

В крови больных БП, ранее не получавших заместительную L-ДОФА-терапию (первая серия), отношение церулоплазмин/трансферрин увеличивалось на стадии 1 заболевания на 119% ($p \leq 0,01$), на стадии 2 – на 117% ($p \leq 0,001$) и на стадии 3 – на 135% ($p \leq 0,001$) по сравнению с контролем (табл. 2).

В крови больных БП, ранее получавших заместительную L-ДОФА-терапию (вторая серия), было обнаружено увеличение отношения церулоплазмин/трансферрин: на стадии 1 заболевания – на 119% ($p \leq 0,01$), на стадии 2 –

Таблица 2. Влияние заместительной L-ДОФА-терапии на отношение церулоплазмин/трансферрин в плазме крови больных на разных стадиях БП

Клиническая норма	Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Стадия 4
Больные, не получавшие заместительную L-ДОФА-терапию				
$0,54 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,07$ $p \leq 0,001$ $n = 12$	$1,17 \pm 0,07$ $p \leq 0,001$ $n = 6$	$1,27 \pm 0,50$ $p \leq 0,0001$ $n = 7$	Нет данных
Больные, получающие заместительную L-ДОФА-терапию				
	$1,18 \pm 0,02$ $p \leq 0,0001$ $n = 6$	$1,25 \pm 0,09$ $p \leq 0,0001$ $n = 5$	$1,28 \pm 0,17$ $p \leq 0,0001$ $n = 15$	$1,56 \pm 0,16$ $p \leq 0,0001$ $n = 3$

на 132% ($p \leq 0,001$), на стадии 3 – на 137% ($p \leq 0,001$) и на стадии 4 – на 189% ($p \leq 0,001$) по сравнению с контролем (табл. 2).

Между стадиями 1 и 2, 2 и 3, 3 и 4 не было обнаружено статистически достоверного различия, однако отмечается тенденция к увеличению данного показателя при переходе от ранних стадий к более поздним.

Статистически достоверное различие между отношением церулоплазмин/трансферрин у больных, получавших и не получавших заместительную L-ДОФА-терапию, выявлено не было (табл. 2). Тенденция к постепенному увеличению данного показателя в ходе заболевания сохранялась.

Таким образом, при БП отношение церулоплазмин/трансферрин отчетливо увеличивалось по сравнению с контролем. Эти изменения наблюдались уже на ранних стадиях заболевания, что связано, по-видимому, с увеличением содержания Cu^{2+} -церулоплазмина. В то же время по литературным данным увеличение концентрации церулоплазмина является нейропротекторным фактором БП и введение церулоплазмина оказывает выраженное положительное терапевтическое воздействие на больных, что свидетельствует об антиоксидантном дефиците в плазме крови при БП [14]. С учетом полифункциональности церулоплазмина увеличение его содержания может быть связано не только с феррооксидантной активностью. В частности, содержание Cu^{2+} -церулоплазмина увеличивается при воспалительных процессах, когда он проявляет супероксиддисмутазную активность. Установлено, что хроническое воспаление и окислительный стресс, связанный с нарушением обмена железа, наблюдается при БП [15].

Сходные с нашими результатами были получены С. Мариани с соавторами, которые также показали увеличение отношения церулоплазмин/трансферрин на основе иммуноферментного анализа в крови пациентов с БП [16]. При этом в крови больных БП отмечалось

увеличение содержания церулоплазмина и снижение насыщения трансферрина железом, приводящее к дисбалансу в обмене железа. Отношение содержания железа в субстанции nigra к его содержанию в плазме крови пациентов БП резко возрастало и отражало процесс накопления железа в субстанции nigra в мозге больных БП [5]. Авторы связывают увеличение отношения церулоплазмин/трансферрин с высоким риском развития БП. Более того, была показана зависимость между риском развития когнитивных нарушений у пожилых людей и увеличением значений отношения церулоплазмин/трансферрин [17].

Важно отметить, что увеличение отношения церулоплазмин/трансферрин обнаружено в крови пациентов с заболеваниями печени, которые сопровождались эпизодами энцефалопатии, по сравнению с группой больных с заболеваниями печени, в анамнезе которых не было эпизода энцефалопатии, и по сравнению с клинической нормой [18].

Стабильное повышение отношения церулоплазмин/трансферрин при поражении когнитивной сферы и моторных нарушениях позволяет предположить возможность использования данного показателя как прогностического признака угрозы развития деменции при БП, что необходимо для определения тактики лечения больного и требует дальнейшего исследования.

Таким образом, полученные данные указывают на наличие изменений в функционировании системы церулоплазмин/трансферрин, обеспечивающей снижение содержания токсичных Fe^{2+} в плазме. Эти изменения являются одним из патогенетических факторов БП на всех стадиях заболевания.

Важную роль в развитии когнитивных нарушений при БП играют поливалентные металлы, особенно железо. Перспективным является использование хелаторов железа, одним из которых является природный антиоксидант карнозин. Дополнительное введение карнозина в противопаркинсоническую терапию оказалось

эффективным в проведенном ранее пилотном исследовании [19].

ВЫВОДЫ

1. В крови пациентов с БП показатель церулоплазмин/трансферрин был выше по сравнению с группой контроля на 157%. Содержание Cu^{2+} -церулоплазмина увеличивалось на 79%, а содержание Fe^{3+} -трансферрина достоверно не изменялось по сравнению с контролем.

2. В крови больных БП отношение церулоплазмин/трансферрин увеличивалось на стадии 1 заболевания на 119%, на стадии 2 – на 117% и на стадии 3 – на 135% по сравнению с контролем.

3. В группах больных, не получавших и получающих заместительную L-ДОФА-терапию, прослеживается тенденция к постепенному увеличению отношения церулоплазмин/трансферрин в ходе заболевания. Статистически достоверного различия между этими группами не выявлено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. Н. Иллариошкин, П. А. Сломинский, М. И. Шадрин и др., *Анналы клин. и эксперим. неврологии* **1** (1), 23 (2007).
2. M. S. Medeiros, A. Schumacher-Schuh, A. M. Cardoso, et al., *PLoS One* **11** (1), 11 (2016).
3. J. A. Santiago and J. A. Potashkin, *Front. Aging Neurosci.* (2017). doi.org/10.3389/fnagi.2017.00073.
4. A. Martin-Bastida, N. P. Lao-Kaim, C. Loan, et al., *Eur. J. Neurol.* **24** (2), 357 (2017).
5. P. Costa-Mallen, C. Gatenby, S. Friend, et al., *J. Neurol.* **378**, 38 (2017).
6. H. Jiang, J. Wang, J. Rogers, and J. Xie, *Mol. Neurobiol.* (2016). DOI:10.1007/s12035-016-9879-1.
7. Т. И. Мжельская, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **7**, 124 (2000).
8. A. V. Kozlov, V. I. Sergienko, Yu. A. Vladimirov, O. Azizova, *Bull. Eksp. Biol. Med.* **98**, 668 (1984).
9. A. Poujois, J.-C. Devedjian, C. Moreau, et al., *Curr. Treat. Options Neurol.* **18**, 46 (2016).
10. R. Squitti, C. Salustri, M. Siotto, et al., *Int. J. Alzheimer's Disease* (2011). DOI:10.4061/2011/231595.
11. C. Altamura, R. Squitti, P. Pasqualetti, et al., *Stroke* **40**, 1282 (2009).
12. Е. Н. Бургова, С. А. Гаспарян, Г. П. Чепрасова и др., *Проблемы репродукции* **4**, 62 (2011).
13. М. К. Пулатова, Г. Т. Рихирева и З. В. Куроптева, *Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии* (Энергоатомиздат, М., 1989).
14. S. Ayton, P. Lei, J. A. Duce, et al., *Ann. Neurol.* (2012). DOI:10.1002/ana. 23817.
15. C. C. De Farias, M. Maes, K. L. Bonifacio, et al., *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* (2017). DOI: 10.2174/1871527316666170223161004.
16. S. Mariani, M. Ventriglia, I. Simonelli, et al., *Front. Aging Neurosci.* **5** (5), 37 (2013).
17. S. Mariani, M. Ventriglia, I. Simonelli, et al., *Neurobiol. Aging* **34**, 632 (2013).
18. M. Marano, U. V. Gentilucci, C. Altamura, et al., *Metab. Brain Dis.* **30**, 1445 (2015).
19. A. Boldyrev, T. Fedorova, M. Stepanova, et al., *Rejuvenation Res.* **11**, 821 (2008).

Ceruloplasmin/Transferrin Ratio in Blood Plasma of Patients at Different Stages of Parkinson's Disease

M.G. Makletsova*, G.T. Rikhireva**, V.V. Poleshuk*, and S.N. Illarioshkin*

*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

EPR spectroscopy was used to study the ratio between Cu^{2+} -ceruloplasmin and Fe^{3+} -transferrin concentrations in blood plasma of 54 patients taking and not taking L-DOPA therapy at different stages of Parkinson's disease. It has been established that in Parkinson's disease patients the parameter of ceruloplasmin/transferrin ratio increased in blood by 157% compared to clinically healthy people of the same age range as controls. Blood of Parkinson's disease patients exhibited 119, 117 and 135% increase in the ratio of ceruloplasmin to transferrin at stage 1, 2 and 3 of the disease, respectively, compared to controls. No statistically significant differences have been observed for the ceruloplasmin/transferrin ratio in patients taking and not taking L-DOPA replacement therapy. The data obtained indicate changes in the functioning of the ceruloplasmin:transferrin system that provides a reduction in the content of toxic Fe^{2+} in plasma in Parkinson's disease. These changes are a pathogenetically significant factor in Parkinson's disease at all stages of the disease.

Keywords: Parkinson's disease, ceruloplasmin/transferrin ratio