

УДК 577.3; 57.04; 616.8; 615.27

ПРИМЕНЕНИЕ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2020 г. Г.Т. Рихирева*, М.Г. Маклецова**

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н.Семенова РАН,
119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: grikhireva@bk.ru

**Донской государственный технический университет, 344000, Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1

E-mail: mgn52@bk.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 22.12.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Представлен краткий обзор работ авторов по применению низкотемпературной ЭПР-спектроскопии в исследованиях крови пациентов с болезнью Паркинсона и тканей органов крыс, взятых в экспериментах, моделирующих ранние стадии паркинсонизма. Анализ полученных и литературных данных позволяет предположить, что процесс деградации гемоглобина можно включить в перечень фундаментальных характеристик патогенеза болезни Паркинсона.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, ЭПР-спектроскопия, метаболизм железа, гемоглобин.

DOI: 10.31857/S0006302920020210

В работе биохимических систем органов и тканей животных и человека участвуют парамагнитные металлокомплексы и свободнорадикальные соединения, которые характеризуются специфическими спектрами электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Метод низкотемпературной ЭПР-спектроскопии является одним из сравнительно быстрых способов зарегистрировать изменения в метаболическом состоянии органов и тканей. Он имеет ряд преимуществ перед трудоемкими биохимическими методами в исследовании молекулярно-клеточных механизмов функционирования организма, поскольку позволяет исследовать цельные ткани органов без нарушения их структуры, а быстрое и глубокое замораживание (до 77 К) обеспечивает фиксацию состояния исследуемых объектов. Кроме того, на одних и тех же образцах можно получить информацию о сдвигах в нескольких биохимических системах, что позволяет делать как конкретные, так и более общие заключения о реакции организма на стрессорные воздействия различной природы (патологии, облучение, химические соединения и т.д.) и о механизмах защиты при использовании лекарственных препаратов. По ЭПР-спектрам тканей можно оценить состояние

дыхательной цепи митохондрий, состояние содержащей цитохром Р-450 гидроксидирующей системы, активацию процессов биосинтеза дезоксирибонуклеотидов и др.

Болезнь Паркинсона — хроническое, мультифакторное, возраст-зависимое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции мозга и дефицитом дофамина в nigrostriatной системе. На клеточном уровне болезнь Паркинсона характеризуется интенсификацией окислительного стресса, снижением уровня глутатиона, дисфункцией митохондрий и метаболизма железа и увеличением его содержания в черной субстанции мозга [1–6].

Метаболитами железа, обладающими парамагнитными свойствами, являются метгемоглобин (MetHb) и переносчики железа белки Cu^{2+} -церулоплазмин и Fe^{3+} -трансферрин. Спектры ЭПР крови пациентов с болезнью Паркинсона и тканей экспериментальных животных нами были измерены при 77 К на радиоспектрометре ER-220D фирмы Bruker (Германия). Содержание парамагнитных белков определяли как величину, пропорциональную амплитуде сигналов ЭПР с g -фактором 2.05 для церулоплазмина, с g -фактором 4.3 для трансферрина и с g -фактором 6.0 для MetHb.

Сокращения: ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, MetHb — метгемоглобин, МРТР — 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.

К настоящему времени участие окислительного стресса в развитии старения и возрастных нейродегенеративных заболеваний является общепринятым [2]. Редокс-активные ионы железа являются одними из главных индукторов окислительного стресса в тканях. Механизмы и источники накопления железа в черной субстанции мозга при болезни Паркинсона до сих пор не выяснены. Эти вопросы представляют особый интерес для выяснения триггерных этапов патогенеза заболевания, поскольку аномальное повышение содержания железа в субстанции нигра у пациентов с болезнью Паркинсона наблюдается на самых ранних стадиях заболевания [6]. Следует отметить, что определенное повышение содержания железа в субстанции нигра наблюдается и при естественном старении [7]. Пул железа в организме в значительной степени поддерживается в результате вторичного использования железа после катаболических процессов при разрушении железосодержащих белков, главным образом, гемоглобина. В физиологических условиях имеет место спонтанное окисление гемоглобина с образованием активных форм кислорода. Образование метгемоглобина (MetHb) является начальной стадией деградации гемоглобина. Восстановление функционального оксигемоглобина, способного переносить газообразный кислород в ткани, в норме осуществляется с участием восстановленного глутатиона, содержание которого снижено у больных болезнью Паркинсона [6].

Мыши с ускоренным темпом старения являются адекватной моделью для изучения патогенеза возраст-зависимых нейродегенеративных заболеваний. В основе возрастных изменений линии быстростареющих мышей SAMP1 (Senescence-Accelerated Mouse Prone) лежит нарушение антиоксидантного статуса в организме: значительно уменьшена активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы) и снижено содержание низкомолекулярных антиоксидантов (глутатиона, карнозина, таурина и др.). Проведя сравнительное исследование влияния гипобарического стресса на двух линиях мышей с обычным (SAMR1; Senescence-Accelerated Mouse Resistant) и ускоренным темпом старения (SAMP1), мы обратили внимание на то, что в крови быстростареющих мышей после эпизода стресса наблюдается значительное накопление MetHb (на 62%) по сравнению с мышами SAMR1, у которых такая реакция отсутствовала [8]. Этот факт побудил нас исследовать содержание MetHb в крови пациентов с болезнью Паркинсона [9]. В эритроцитах больных с болезнью Паркинсона (на третьей-четвертой стадии) было выявлено значительное (в пять раз; $p \leq 0.001$) увеличение содер-

жания MetHb по сравнению с донорами той же возрастной группы.

Повышение уровня MetHb создает условия возникновения гипоксии в тканях. Установлено, что метгемоглобинемия в два раза сильнее по сравнению со снижением тканевого уровня кислорода подавляет дыхательную функцию крови [10].

В ряде работ обсуждается роль MetHb в развитии нейродегенеративных заболеваний как биомаркера и как индуктора окислительного стресса. Более того, есть наблюдения о связи риска нейродегенерации у потомства матерей с метгемоглобинемией во время беременности [11].

В литературе сообщались данные о падении содержания гемоглобина в крови пациентов с болезнью Паркинсона [12], что может быть связано как со снижением уровня биосинтеза белка, так и с усилением его катаболизма. Вопрос о том, снижение синтеза гемоглобина или усиление его распада является причиной снижения уровня гемоглобина у больных болезнью Паркинсона, дискутируется в литературе [6].

В недавней работе [13] было обнаружено, что более низкие уровни гемоглобина в крови пациентов с болезнью Паркинсона связаны с тяжестью заболевания и с изменениями в метаболизме железа: по содержанию железа, ферритина и общей связывающей способности железа.

Установленный нами факт увеличения содержания MetHb при добавлении в суспензию эритроцитов индукторов окислительного стресса (акролеин, дофамин) и предотвращения этого эффекта с помощью эндогенного антиоксиданта карнозина позволил нам рассматривать MetHb как биомаркер окислительного стресса [14]. Следует отметить, что при болезни Паркинсона наблюдается резкое увеличение содержания акролеина в субстанции нигра [15].

В настоящее время фактически установлено, что окислительный стресс играет ведущую роль в индукции нейродегенеративных процессов. Считается, что отношение церулоплазмин/трансферрин отражает способность сыворотки крови улавливать и секвестрировать металлы переменной валентности (железо и медь), которые активно участвуют в развитии окислительного стресса [16]. Исследуя содержание и отношение белков Cu^{2+} -церулоплазмин/ Fe^{3+} -трансферрин в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона на разных стадиях заболевания, мы обнаружили, что исследуемый показатель выше в крови пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению с контролем той же возрастной группы за счет увеличивающегося содержания церулоплазмина и тенденции к снижению насыщенности трансферрина

железом. В группах больных, получавших и не получавших заместительную L-ДОФА-терапию, прослеживалась тенденция к постепенному увеличению отношения исследуемых белков при прогрессировании заболевания: от 119% ($p \leq 0.01$) на первой стадии до 189% ($p \leq 0.001$) на четвертой стадии по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о наличии при болезни Паркинсона изменений в функционировании системы, обеспечивающей снижение содержания токсичных ионов Fe^{2+} в плазме, и эти изменения являются одним из патогенетических факторов болезни Паркинсона на всех стадиях заболевания [17].

Поскольку болезнь Паркинсона является неизлечимым и прогрессирующим заболеванием, то особое значение имеет его ранняя диагностика. Для исследования механизмов начальных так называемых «домоторных» стадий патогенеза болезни Паркинсона широко используются экспериментальные модели болезни на животных, поскольку клиническая симптоматика становится очевидной только на развернутой стадии заболевания, когда нейродегенерации подвергаются уже 60–80% дофаминергических нейронов. Во многих работах в качестве экспериментального индуктора паркинсонизма используют низкие дозы нейротоксина МРТР (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine). При участии фермента моноаминоксидазы типа В МРТР метаболизируется в астроцитах в его активный нейротоксичный метаболит МРР+ (1-метил-4-фенил-2,3-дигидропиридин). Ион МРР+ избирательно поглощается дофаминергическими нейронами благодаря его сродству к транспортеру дофамина, что обуславливает селективность повреждающего действия этого соединения [18].

В работе [19] была описана и обоснована схема получения модели ранней премоторной («домоторной») стадии паркинсонизма у крыс. Она создается после однократной интракраниальной инъекции МРТР (100 мкг) в черную субстанцию мозга, в результате чего имеет место частичная дегенерация дофаминергических нейронов с умеренным уменьшением уровня дофамина в nigrostriatной системе. В описанной модели паркинсонизма через три недели после операции наблюдали депрессивноподобное состояние животных и когнитивные нарушения. Двигательные нарушения отсутствовали. Таким образом, ранняя премоторная стадия болезни Паркинсона характеризуется эмоциональными и когнитивными нарушениями.

Для выяснения состояния животных в премоторной стадии паркинсонизма мы провели измерение спектров ЭПР образцов крови, селезенки, мозжечка и продолговатого мозга, взятых у крыс,

подвергнутых однократному интракраниальному введению нейротоксина МРТР по схеме, аналогичной описанной в работе [19]. Выбор селезенки как объекта изучения был обусловлен тем, что в этом органе с помощью гем-оксигеназной системы происходит окончательное разрушение гемоглобина (MetHb) с выделением свободных ионов железа, монооксида углерода и билирубина.

Эксперименты были проведены на 15 крысах-самцах линии Вистар [20]. Животных подвергали однократному интракраниальному введению МРТР для создания модели премоторной стадии болезни Паркинсона. Исследовали следующие группы животных: группа 1 («Контроль») – животные, которым вводили однократно интракраниально 8 мкл физиологического раствора билатерально в черную субстанцию ($AP = 5.2$ мм, $ML \pm 2$ мм, $DV = 7.7$ мм); группа 2 («Введение МРТР») – животные, которым вводили однократно интракраниально МРТР (30 мкг в 8 мкл физиологического раствора) билатерально в черную субстанцию. На 23-и сутки после введения МРТР животных декапитировали. Образцы крови и тканей селезенки, мозжечка и продолговатого мозга замораживали в жидком азоте для последующего измерения спектров ЭПР. Содержание гемоглобина в крови определяли по методу Драбкина (использовали реактивы ООО «Агат-Мед», Москва) и выражали в мг на мл крови. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в соответствии с общепринятыми методами статистики и выражали в средних значениях \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Для оценки достоверности обнаруженных изменений применяли тесты Манна-Уитни.

Измерения показали, что однократное интракраниальное введение крысам нейротоксина МРТР через 23 суток вызывает падение концентрации гемоглобина и MetHb в периферической крови на 25% ($p \leq 0.06$) и 43% ($p \leq 0.06$) соответственно, а также увеличение содержания MetHb в селезенке на 92% ($p \leq 0.06$) по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о том, что регистрируемое в исследуемой экспериментальной модели падение уровня гемоглобина в крови крыс по времени соответствует значительной активации процесса дегградации гемоглобина (увеличение содержания MetHb в селезенке почти вдвое по сравнению с контролем). В спектрах ЭПР образцов тканей мозжечка и продолговатого мозга, взятых у крыс с введенным МРТР, полностью отсутствовали отчетливо регистрируемые в норме [21] сигналы ЭПР компонентов дыхательной цепи переноса электрона в митохондриях. Этот факт является показателем дисфункции митохондрий на ранних стадиях экспериментального паркинсонизма.

В качестве подтверждения вывода об активации катаболизма гемоглобина при болезни Паркинсона, по-видимому, можно рассматривать результаты недавних работ об изменении концентрации общего билирубина в крови пациентов с болезнью Паркинсона [22, 23]. Исследуя несколько групп больных с различными стадиями заболевания (по шкале НУ всего пять стадий), они обнаружили, что группы с НУ ≤ 3 имеет более высокий уровень билирубина по сравнению со здоровым контролем. Авторы предполагают, что повышение уровня билирубина связано с активацией фермента гем-оксигеназы на ранних стадиях болезни Паркинсона [24].

Таким образом, применение низкотемпературной ЭПР-спектроскопии в изучении метаболизма железа при болезни Паркинсона на образцах крови и суспензии эритроцитов пациентов с болезнью Паркинсона позволило установить, что MetHb является биомаркером окислительного стресса. По уровню MetHb в тканях можно судить о наличии окислительного стресса, о создании гипоксических условий в организме и об интенсификации процесса деградации гемоглобина. Данные, полученные в опытах с животными, которые были подвергнуты воздействию индуктора паркинсонизма (МРТР), позволили установить, что на ранних премоторных стадиях паркинсонизма регистрируется активация деградации гемоглобина (кровь, селезенка) и отключение митохондриальной дыхательной цепи переноса электрона в тканях мозга (мозжечок, продолговатый мозг).

Полученные данные представляют интерес для выяснения механизмов патогенеза болезни Паркинсона.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России (тема 0082-2014-0001 № АААА-А17-117040610310-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Jiang, J. Wang, J. Rogers, and J. Xie, *Mol. Neurobiol.* **54**, 3078 (2017). DOI: 10.1007/s12035-016-9879-1.
2. S. R. Danielson and J. K. Andersen, *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1787 (2008).
3. O. Hwang, *Exp. Neurobiol.* **22**, 11 (2013).
4. J. Blesa, I. Trigo-Damas, and A. Quiroga-Varela, *Front Neuroanat.* **9**, 91 (2015).
5. G. H. Kim, J. E. Kim, S. J. Rhie, et al., *Exp. Neurobiol.* **24** (4), 325 (2015).
6. J. Freed and L. Chakrabarti, *npj Parkinson's Disease* **2**, 16021 (2016) DOI: 10.1038/npjparkd.2016.21.
7. R. D. Abbott, G. W. Ross, C. M. Tanner, et al., *Neurobiol. Aging* **33**, 914 (2012).
8. М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, С. Л. Стволинский и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **152** (9), 330 (2011).
9. М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, В. В. Полещук и др., *Биомед. химия* **62** (2), 193 (2016).
10. Б. Л. Курляндский и В. А. Филлов, *Общая токсикология* (М., 2002).
11. L. Mohorovic, F. M. Lavezzi, S. Stifter, et al., *Adv. Biosci. Biotechnol.* **5** (1), 2014).
12. R. Savica, B. R. Grossardt, J. M. Carlin, et al., *Neurology* **73**, 1381 (2009).
13. Q. Deng, X. Zhong, J. Chen, et al., *Brain Res.* **1655**, 145 (2017).
14. М. Г. Маклецова, Т. Н. Федорова, В. В. Полещук и Г. Т. Рихирева, *Биофизика* **62** (2), 319 (2017).
15. A. Moghe, S. Ghare, V. Lamoreau, et al., *Toxicol. Sci.* **143** (2), 242 (2015).
16. А. В. Козлов, В. И. Серпиенко, Ю. А. Владимиров и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **98**, 668 (1984).
17. М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, В. В. Полещук и С. Н. Иллариошкин, *Биофизика* **62** (6), 1204 (2017).
18. С. Н. Иллариошкин, Л. Г. Хаспеков и И. А. Гривенников, *Моделирование болезни Паркинсона с использованием плюрипотентных стволовых клеток* (М., 2016).
19. А. В. Непоклонов, И. Г. Капица, Е. А. Иванова и др., *Нейрофармакология* **75** (11), 3 (2012).
20. М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, К. В. Грякалов и др., *Асимметрия* **12** (4), 336 (2018).
21. М. К. Пулатова, Г. Т. Рихирева и З. В. Куроптева, *Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии* (Энергоатомиздат, М., 1989).
22. M. Moccia, M. Picillo, R. Erro, et al., *Eur. J. Neurol.* **22**, 954 (2015).
23. Macias-Garcia, C. Méndez-Del Barrio, S. Jesús, et al., *Parkinsonism and Related Disorders* **63**, 213 (2019). DOI: 10.1016/j.parkreldis.2019.01.012.
24. M. F. McCarty, *Med. Hypotheses* **81**, 607 (2013).

Application of EPR-Spectroscopy in Studies of Iron Metabolism in Parkinson's Disease**G.T. Rikhireva* and M.G. Makletsova******Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia****Don State Technical University, pl. Gagarina 1, Rostov-on-Don, 344000 Russia*

In this paper, we presented an overview of our researches on the use of EPR spectroscopy at low temperature in studies of the blood of patients with Parkinson's disease and tissues of rat models that mimic parkinsonism at early stages. Analysis of data from the experiments and literature suggests that the degradation process of hemoglobin can be considered one of the fundamental characteristics of Parkinson's disease pathogenesis.

Keywords: Parkinson's disease, EPR spectroscopy, iron metabolism, hemoglobin