

УДК 577.175.82

Катехоламины в слезной жидкости как маркеры болезни Паркинсона: клиническое и экспериментальное исследование

А. Р. Ким^{1*}, М. Р. Нодель^{2,3}, Т. А. Павленко⁴, Н. Б. Чеснокова⁴, Н. Н. Яхно², М. В. Угрюмов¹¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Российский геронтологический научно-клинический центр, Москва, 129226 Россия⁴Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца Минздрава России, Москва, 105062 Россия

*E-mail: alexandrrkim@gmail.com

Поступило в редакцию 09.08.2019

Принято к печати 17.10.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-99-103

РЕФЕРАТ Важным подходом к ранней диагностике болезни Паркинсона (БП) считается обнаружение периферических биомаркеров на самой ранней стадии заболевания. Нами изучена возможность использования в качестве маркеров изменений концентрации катехоламинов в слезной жидкости больных с БП. Обнаружено, что концентрация норадреналина и дофамина у больных БП увеличена по сравнению с возрастным контролем, что более выражено на стороне появления двигательных симптомов. Напротив, концентрация адреналина в слезной жидкости больных снижена с обеих сторон. Поскольку нет оснований считать, что маркеры клинической стадии БП можно использовать и для диагностики доклинических стадий, изучен состав слезной жидкости у мышей при нейротоксическом моделировании доклинической и клинической стадий БП. Показано, что концентрация норадреналина в слезной жидкости мышей при моделировании клинической стадии БП выше, чем в контроле. На модели доклинической стадии обнаружена тенденция к увеличению концентрации норадреналина. Таким образом, у больных БП и у мышей на моделях доклинической и клинической стадий БП присутствуют однонаправленные изменения состава слезной жидкости, которые могут рассматриваться как перспективные биомаркеры для ранней диагностики этого заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биомаркеры, болезнь Паркинсона, нелеченные больные, слезная жидкость, экспериментальные модели.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; ДГБА – 3,4-дигидроксипензиламин; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется, в частности, гибелью дофаминергических нейронов nigrostriatной системы мозга. Клинически БП проявляется через много лет после начала патологического процесса при гибели большей части дофаминергических нейронов черной субстанции, что объясняет существующие ограничения фармакотерапии заболевания [1]. Отсюда следует, что важнейшей задачей является разработка ранней

(доклинической) диагностики БП, которая позволит выявить заболевание до появления первых двигательных симптомов и использовать превентивную нейропротекторную терапию [1].

В последнее время все большее внимание уделяется изучению изменений зрения при БП и приводящих к этому патологических процессов в глазу и вспомогательном аппарате глаза как потенциальных источников периферических биомаркеров БП [2]. Важную роль играет нарушение метаболизма катехоламинов, которые обеспечивают передачу

Таблица 1. Клинические характеристики когорт пациентов

Когорта	N	Пол, м / ж	Возраст, лет	Оценка стадии БП			Длительность болезни, лет
				Шкала Hoehn-Yahr	UPDRS II (повседневная деятельность)	UPDRS III (двигательная активность)	
Больные с БП	26	16 / 10	60.3 ± 2.0	1.8 ± 0.1	8.7 ± 1.0	23.6 ± 2.3	2.6 ± 0.3
Контроль	19	4 / 15	57.4 ± 2.9	-	-	-	-

зрительной информации в сетчатке, регулируют скорость аккомодации и внутриглазное давление [2]. Кроме того, при БП изменениям подвергается и ткань век, содержащая многочисленные железы, секреторный продукт которых входит в состав слезной жидкости. Конъюнктив, выстилающая внутреннюю поверхность век, и находящиеся в ней железы имеют симпатическую иннервацию [3], дисфункция которой отмечается при БП в рамках мультисистемной дегенерации, затрагивающей как центральные, так и периферические отделы автономной нервной системы [4].

Сбор слезной жидкости – это несложная неинвазивная процедура, в отличие от взятия крови или ликвора, которые традиционно используются для поиска периферических биомаркеров [5]. Тем не менее, поиску биомаркеров БП в слезе посвящены лишь единичные работы, причем в них анализируется только белковый состав слезы. Так, показано, что в слезной жидкости больных с БП повышается уровень фактора некроза опухоли [6], увеличивается концентрация олигомерного α-синуклеина [7] и меняется протеомный профиль в целом [8]. Эти исследования указывают на перспективность поиска биомаркеров БП в слезе. Однако имеет смысл анализировать не только белки, но и низкомолекулярные вещества, вовлеченные в патогенез БП, в частности катехоламины, которые активно изучают в качестве потенциальных биомаркеров БП в крови и ликворе [9].

Следует подчеркнуть, что нет данных, согласно которым биомаркеры, обнаруженные у пациентов с диагностированной клинической стадией БП, могут использоваться на доклинической стадии этого заболевания [1]. Поэтому нами проведен сравнительный анализ изменения концентрации катехоламинов в слезной жидкости нелеченых больных с ранней стадией БП и у животных при моделировании доклинической и клинической стадий этого заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты с БП и контрольная группа

Анализировали пробы слезной жидкости, взятые у 26 пациентов с диагнозом БП на 1–2 стадиях

по Hoehn-Yahr до начала противопаркинсонической терапии и у лиц сходного возраста без двигательных нарушений. Все пациенты дали письменное согласие на проведение исследования.

Диагноз БП был поставлен в соответствии с клиническими диагностическими критериями Международного общества изучения двигательных расстройств 2015 года (MDS-2015). В контрольную группу вошли индивиды того же возраста без неврологических болезней. В исследование не включали пациентов с офтальмологическими заболеваниями. Ключевые клинические характеристики когорт представлены в *табл. 1*.

Сбор слезной жидкости проводили утром с помощью стерильной фильтровальной бумаги (шириной 5 мм), которую закладывали за нижнее веко, как при проведении теста Ширмера. Слезную жидкость собирали путем естественной сорбции на тест-полоску в отсутствие стимуляции слезотечения в течение 5 мин. Длину намоченной части полоски измеряли для расчета объема пробы, после чего помещали полоски в пробирки с 0.1 н. HClO₄, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Животные

В работе использовали 30 мышей-самцов линии C57BL/6 в возрасте 2–2.5 месяцев и массой 22–26 г (питомник «Пушино»). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Для моделирования БП на доклинической стадии проводили двукратное подкожное введение 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) (Sigma, США) в разовой дозе 8 мг/кг. Для моделирования БП на клинической стадии подкожно вводили МФТП 4 раза в дозе 10 мг/кг. Интервал между инъекциями в обоих случаях составлял 2 ч [10]. Контрольная группа получала 0.9% NaCl по аналогичной схеме.

Через 2 недели после введения МФТП или 0.9% NaCl оценивали состояние мышей по показателю пройденного пути в тесте «открытое поле» с помощью установки для анализа поведения животных PhenoMaster (TSE Systems, Германия). Далее у животных, находящихся под изофлурановым наркозом, собирали слезную жидкость с помощью полосок

из фильтровальной бумаги шириной 2.5 мм, аналогичных полоскам Ширмера.

После сбора слезной жидкости анестезированных мышшей декапитировали, из мозга выделяли дорсальный стриатум согласно ранее описанной методике [10]. Пробы стриатума взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Концентрацию катехоламинов (норадреналин, адреналин и дофамин) измеряли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). Пробы гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Labsonic M (Sartorius, Франция) в 200 мкл 0.1 н. HClO_4 (Sigma, США), содержащих внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин (ДГБА, Sigma) в концентрации 25 пмоль/мл, после чего центрифугировали (20 мин при 2000 г).

ВЭЖХ проводили на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr. Maјsch GmbH, Германия) при температуре $+30^{\circ}\text{C}$ и скорости подвижной фазы 1.2 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония) согласно [11].

Статистика

Данные ВЭЖХ представлены в виде среднего в процентах от контроля \pm стандартная ошибка среднего. Поскольку БП развивается асимметрично, в группе больных данные были перегруппированы на соответствующие ипсилатеральной стороне (пробы слезной жидкости, собранной из глаза на стороне начала и большей тяжести двигательных симптомов) и контралатеральной стороне (пробы, собранные на стороне, где двигательные симптомы отсутствовали или были выражены минимально). В контрольной группе и у экспериментальных животных данные, полученные при анализе слезной жидкости правого и левого глаза, усредняли.

Нормальность данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистический анализ результатов проводили с помощью параметрического t -критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна–Уитни в программном пакете GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Критерием значимости считали $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе впервые измерена концентрация катехоламинов в слезной жидкости пациентов с БП до начала лечения. Показано, что уровень норадреналина и дофамина в слезной жидкости больных значительно

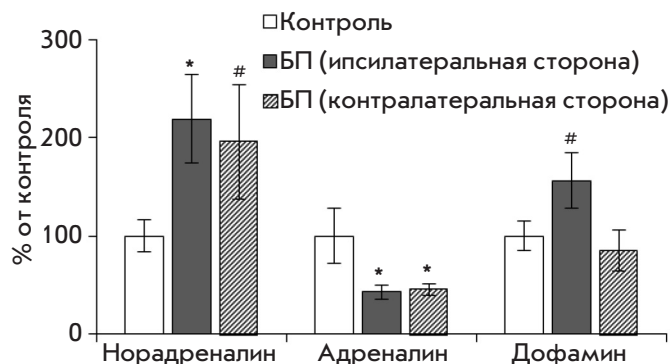


Рис. 1. Концентрация катехоламинов в слезной жидкости больных с БП, взятой из глаза на стороне проявления моторных симптомов (ипсилатеральной) и на противоположной (контралатеральной) стороне. * $p < 0.05$, # $p < 0.15$ относительно контрольной группы

но выше, чем у здоровых лиц (контроль) того же возраста (рис. 1). Обнаружена отчетливая асимметрия: повышение концентрации норадреналина и дофамина в большей степени выражено на ипсилатеральной стороне, т.е. на стороне большей выраженности моторных симптомов, по сравнению с контралатеральной стороной. Поскольку нами не обнаружены статистически значимые различия в объеме собранных проб (данные не представлены), выявленную асимметрию в концентрации дофамина и норадреналина у пациентов с БП нельзя объяснить асимметричной гипокинезией мышц глаз с нарушением оттока слезной жидкости. Тем не менее, асимметрия в изменении содержания маркеров в слезе хорошо согласуется с представлениями об асимметричном характере развития БП. Так, при диагностировании БП на ранней клинической стадии пороговая деградация нигростриатной дофаминергической системы и моторные нарушения проявляются только с одной стороны [12]. Следует подчеркнуть, что асимметрия в составе слезы является первым наблюдением асимметричности развития БП за пределами нигростриатной системы [12].

В отличие от норадреналина и дофамина, уровень адреналина в слезной жидкости снижался как на ипси-, так и на контралатеральной стороне (рис. 1). Такая реакция похожа на выявленное ранее снижение содержания адреналина в плазме крови у больных с БП [9]. Следует отметить, что источник катехоламинов в слезной жидкости точно не установлен. При этом известно, что в кровь адреналин попадает из надпочечников, а норадреналин и дофамин – преимущественно из окончаний симпатических норадренергических нейронов [13]. Вероятно, обнаруженные в слезе катехоламины имеют такое же происхождение.



Рис. 2. Схема методологии проверки биомаркеров

Изменения концентрации катехоламинов в слезной жидкости больных БП потенциально могли бы использоваться для разработки ранней диагностики. Тем не менее, всегда существует риск того, что биомаркеры, выявленные у больных на клинической стадии, отсутствуют на доклинической стадии. В связи с этим, особую ценность приобретает экспериментальное моделирование БП, поскольку с его помощью можно воспроизвести обе стадии заболевания [1, 10]. Так, согласно созданной нами общей методологии, совпадение биомаркеров, обнаруженных у больных

и у животных при моделировании клинической стадии БП, свидетельствует о корректном воспроизведении данных аспектов патогенеза этого заболевания (рис. 2). Некоторые из них можно считать биомаркерами доклинической стадии БП, если они выявляются и на модели доклинической стадии [9].

Важной особенностью БП является то, что для нее точно определен пороговый уровень нейродегенерации, после которого возникают двигательные симптомы: это гибель 50–60% тел дофаминергических нейронов в черной субстанции, потеря 70–80% аксонов дофаминергических нейронов в стриатуме и соответственно снижение уровня дофамина в стриатуме на 70–80% по сравнению с контролем [1].

Как следует из представленных результатов, через 2 недели после двукратного введения МФТП в дозе 8 мг/кг у мышей отсутствовали изменения в тесте «открытое поле», а уровень дофамина в стриатуме снизился на 65.6% (рис. 3). В свою очередь, у животных, получивших четыре инъекции по 10 мг/кг МФТП, показатель пройденного пути снизился почти в 2 раза, а уровень дофамина в стриатуме упал на 83.3% (рис. 3). Таким образом, воспроизведенные в данной работе модели доклинической и ранней клинической стадий БП у мышей полностью соответствуют описанным выше ключевым параметрам.

Концентрация норадреналина в слезной жидкости мышей на модели доклинической стадии БП имела тенденцию ($p < 0.15$) к повышению на 57.6% и на 111% – на модели клинической стадии БП по сравнению с контролем (рис. 4). Уровень адреналина и дофамина был ниже порога чувствительности метода, что скорее всего связано с малым объемом собранных проб (1–2 мкл). Существуют способы сти-

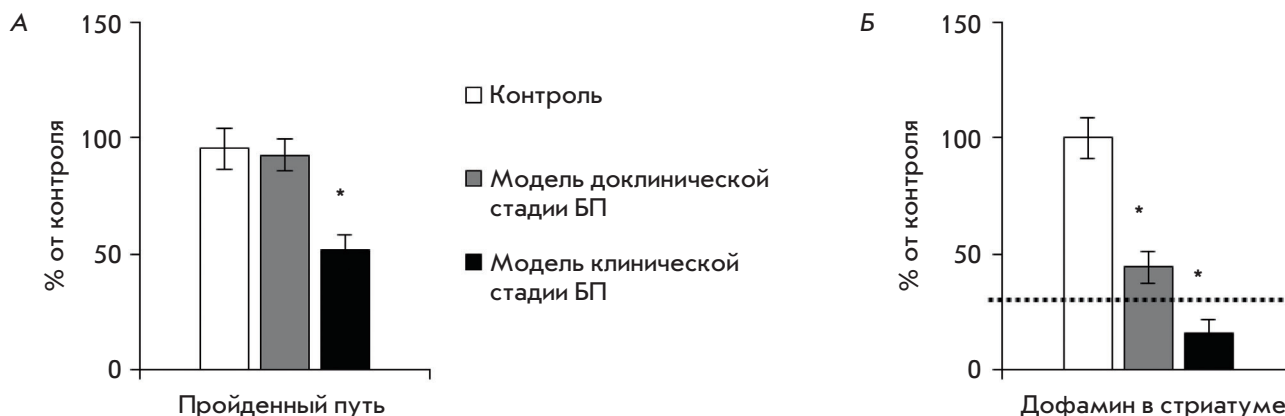


Рис. 3. Пройденный путь в тесте «открытое поле» (А) и концентрация дофамина в стриатуме (Б) у контрольных мышей и мышей при моделировании доклинической и клинической стадий БП. * $p < 0.05$ относительно контрольной группы, пунктир – порог проявления нарушений моторики

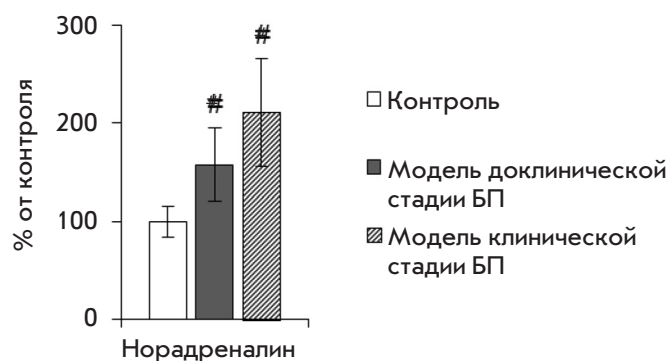


Рис. 4. Концентрация норадреналина в слезной жидкости контрольных мышей и мышей при моделировании доклинической и клинической стадий БП. # $p < 0.15$ относительно контрольной группы

мулировать слезотечение у животных с помощью холиномиметиков [14], однако известно, что состав слезной жидкости при стимуляции значительно меняется [15].

Сравнение изменений в содержании норадреналина, адреналина и дофамина в слезной жидкости больных с БП и у мышей при моделировании БП выявило во всех трех случаях повышение концентрации норадреналина в сравнении с контролем (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительный анализ биомаркеров

Биомаркер	Больные с БП	Модели БП на мышах	
		клиническая стадия	доклиническая стадия
Норадреналин	↑	↑#	↑#
Адреналин	↓	н.о.	н.о.
Дофамин	↑#	н.о.	н.о.

Примечание. ↑, ↓ – увеличение и снижение концентрации биомаркера в слезе в сравнении с контролем, н.о. – не определялось, # – тенденция ($p < 0.15$).

Таким образом, у больных с БП и у мышей на моделях доклинической и клинической стадий БП обнаружено повышение концентрации норадреналина в слезной жидкости, которое можно рассматривать как перспективный биомаркер для ранней диагностики БП. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 18 «Инновационные разработки в биомедицине» (проект № 0088-2019-0013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Угрюмов М.В. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. С. 4–14.
- Чеснокова Н.Б., Павленко Т.А., Угрюмов М.В. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117. С. 124–131.
- Diebold Y., Ríos J.D., Hodges R.R., Rawe I., Dartt D.A. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. V. 42. P. 2270–2282.
- Goldstein D.S. // Compr. Physiol. 2013. V. 3. P. 1569–1610.
- Börger M., Funke S., Bähr M., Grus F., Lingor P. // Basal Ganglia. 2015. V. 5. P. 63–69.
- Çomoğlu S.S., Güven H., Acar M., Öztürk G., Koçer B. // Neurosci. Lett. 2013. V. 553. P. 65–67.
- Hamm-Alvarez S.F., Okamoto C.T., Janga S.R., Feigenbaum D., Edman M.C., Freire D., Shah M., Ghanshani R., Mack W.J., Lew M.F. // Biomark. Med. 2019. V. 13. P. 941–952.
- Boerger M., Funke S., Leha A., Roser A.E., Wuestemann A.K., Maass F., Bähr M., Grus F., Lingor P. // Parkinsonism Relat. Disord. 2019. V. 63. P. 3–9.
- Kim A., Nigmatullina R., Zalyalova Z., Soshnikova N., Krasnov A., Vorobyeva N., Georgieva S., Kudrin V., Narkevich V., Ugrumov M. // Mol. Neurobiol. 2019. V. 56. P. 3437–3450.
- Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. // Neuroscience. 2011. V. 181. P. 175–188.
- Kim A.R., Pavlenko T.A., Katargina L.A., Chesnokova N.B., Ugrumov M.V. // Acta Naturae. 2018. V. 10. № 3 (38). P. 62–67.
- Djaldetti R., Ziv I., Melamed E. // Lancet Neurol. 2006. V. 5. P. 796–802.
- Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 305. P. 800–811.
- Karn R.C., Laukaitis C.M. // Proteomes. 2015. V. 3. P. 283–297.
- Stuchell R.N., Feldman J.J., Farris R.L., Mandel I.D. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1984. V. 25. P. 374–377.