

УДК: 616.858-008.6, 535.372

УФ – ИНДУЦИРОВАННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОЖИ IN VIVO ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2025 г. В. В. Салмин^{1, 2, 3, *}, В. Б. Лощенов^{3, 4}, А. Б. Очирова³,
Н. П. Байнаев-Мангилев³, М. Н. Андреев⁵, Е. Ю. Федотова⁵, А. Б. Салмина⁵,
академик РАН С. Н. Иллариошкин⁵

Поступило 01.08.2024 г.

После доработки 25.08.2024 г.

Принято к публикации 10.09.2024 г.

Установлены закономерности изменения параметров УФ-индуцированной аутофлуоресценции кожи у пациентов с болезнью Паркинсона, связанные с развитием дизметаболических процессов – неферментативное гликирование белков и увеличение жесткости внеклеточного матрикса, нарушение обмена тканевых флуорофоров, митохондриальная дисфункция, аккумуляция aberrантных белков. Впервые обнаружены существенные отличия спектров аутофлуоресценции кожи при болезни Паркинсона, позволяющие дифференцировать их от спектров аутофлуоресценции кожи здоровых лиц и лиц без признаков развития хронической нейродегенерации: меньшая по отношению к отраженному сигналу флуоресценция кожи при ее возбуждении УФ светом с длиной волны 375 нм у пациентов с болезнью Паркинсона.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, конечные продукты гликирования белков, флуоресцентная спектроскопия, кожа

DOI: 10.31857/S2686738925010044, **EDN:** tdfogq

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большой интерес вызывает изучение патологических агрегатов альфа-синук-

клеина экстрацеребральной локализации. Это связано с особенностями распространения aberrантного белка в организме на ранних стадиях развития патологии [1]. Вместе с тем обнаружение альфа-синуклеина в периферических тканях дает возможность разрабатывать новые подходы к ранней неинвазивной диагностике болезни Паркинсона (БП), например, с помощью биопсии кожи, подъязычной слюнной железы [2], ректальной слизистой [3] и т.д.

В коже (эпидермис преимущественно базального и шиповатого слоев, макрофаги, нервные окончания) у пациентов с БП регистрируется раннее отложение альфа-синуклеина [4], что рассматривается в настоящее время как одна из причин подавления пролиферации клеток кожи и развития хронического воспаления, а также как возможный перспективный диагностический маркер синуклеинопатий, пригодный для дифференциальной диагностики разных форм паркинсонизма дегенеративной природы.

Хроническое воспаление в коже при БП может поддерживаться и иным механизмом, обусловленным аккумуляцией конечных продуктов гликирования (AGEs) и сопутствующей гиперэкспрессией рецепторов конечных продуктов гликирования

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”, Долгопрудный, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)”, Москва, Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ”, Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр “Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук”, Москва, Россия

⁵Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научный центр неврологии”, Москва, Россия

*e-mail: vsalmin@gmail.com

(RAGEs) в клетках кожи. Действительно, феномен интенсивного неферментативного гликирования белков, в том числе альфа-синуклеина, с активацией RAGE-опосредованного хронического нейровоспаления описан при БП в ткани головного мозга [5]. AGEs-модифицированный альфа-синуклеин имеет повышенную тенденцию к агрегации и измененную кинетику образования фибрилл [6]. Логично предположить, что и в коже при БП может запускаться аналогичный процесс хронического воспаления, обусловленный аккумуляцией AGEs-модифицированного альфа-синуклеина и гиперэкспрессией RAGEs. В свою очередь, изменение пула AGEs-модифицированных белков может влиять на параметры аутофлуоресценции кожи у пациентов с БП [7]. Хроническое воспаление всегда ассоциировано с дисфункцией митохондрий клеток. Кроме того, повреждение митохондрий — “классический” механизм патогенеза БП, который активно используется для моделирования этой патологии на экспериментальных животных путем применения митохондриальных токсинов (МРТР, ротенон). Дисфункция митохондрий имеет своим результатом снижение эффективности окислительного фосфорилирования, дефицит АТФ, развитие т.н. псевдогипоксии и редуцированного стресса с преобладанием восстановленной формы пиридинового нуклеотида над окисленной формой (НАДН/НАД+) в клетках [8]. В фибробластах кожи пациентов с БП регистрируются аналогичные события [9]. Флуоресценция НАДН меняется в случае агрегации альфа-синуклеина в клетках: при его накоплении увеличивается фракция связанного с белками НАДН. Это позволяет предлагать использовать параметры флуоресценции НАДН как индикатор агрегации альфа-синуклеина в клетках, что оценивается по увеличению времени жизни флуоресценции НАДН в комплексе с альфа-синуклеином в клетках [10].

На доклинической стадии БП развиваются изменения обмена меланина в коже (большая склонность к солнечным ожогам, себорейным поражениям, увеличение риска развития меланомы, раннее поседение волос), что первоначально связывали со снижением продукции меланина вследствие аккумуляции альфа-синуклеина в клетках кожи [11]. Недавно были получены данные о том, что альфа-синуклеин играет физиологическую роль в регуляции дифференцировки меланоцитов и трансфере меланосом из меланоцитов в кератиноциты [12]. Кроме того, связь состояния меланоцитов с развитием БП может быть обусловлена общими метаболическими путями биосинтеза дофамина и меланина посредством участия в них L-DOPA [13]. Ожидаемым изменением в спектрах отражения излучения от кожи при БП является снижение поглощения

меланина и, как следствие, увеличение коэффициента отражения (рассеяния) ультрафиолетового (УФ) излучения по отношению к видимой области спектра [14].

Следует учитывать, что сигнал аутофлуоресценции биологической ткани зависит от многих факторов, в частности, присутствия различных флуорофоров (коллаген, эластин, НАД(Ф)Н, конечные продукты гликирования, липофусцин и пр.), особенностей локальной микроциркуляции и метаболизма (в том числе в контексте их сезонных или суточных изменений), фототипа кожи, поэтому анализ каждого из таких эффектов может быть интересен для валидации метода диагностики заболеваний, характеризующихся изменением спектра аутофлуоресценции тканей. Исходя из имеющихся данных о патогенезе БП, мы предположили, что по мере аккумуляции альфа-синуклеина в клетках кожи происходят существенные изменения спектральных характеристик ткани вследствие изменения содержания эндогенных флуорофоров (НАДН, триптофан, флуоресцирующие AGEs, например, пентозидин) или молекул, поглощающих излучение накачки и флуоресценции (меланин). Мы предположили, что регистрация спектра аутофлуоресценции кожи позволит осуществлять раннюю и дифференциальную диагностику БП, а также поможет объективизировать оценку эффективности проводимой терапии у пациентов с БП и другими синуклеинопатиями.

Целью исследования явилось изучение УФ-индуцированной флуоресценции кожи пациентов с болезнью Паркинсона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены следующие группы испытуемых:

1А) Контрольная группа, 21 человек — здоровые добровольцы в возрасте 50–80 лет обоего пола.

1Б) Группа сравнения, 15 человек — пациенты с головной болью напряжения, дегенеративно-дистрофическими изменениями позвоночника, дисциркуляторной энцефалопатией в возрасте 50–80 лет, обоего пола.

2) Пациенты с БП, 18 человек — в возрасте 50–80 лет, обоего пола, стадии 1–3 по функциональной шкале Хен–Яра.

Критерий исключения: наличие хронических заболеваний (декомпенсированный сахарный диабет, тяжелая почечная или печеночная недостаточность).

Во всех группах пациентам проводится регистрация спектра УФ-индуцированной аутофлуоресценции с внутренней поверхности кожи предплечья с помощью оригинального малогабаритного

спектрофлуориметра с УФ-светодиодным (375 нм) возбуждением [15]. Спектры, полученные с помощью прибора, анализировались в диапазоне длин волн 400-670 нм. Для нивелирования эффекта влияния суточных изменений метаболизма на сигнал аутофлуоресценции ткани регистрация УФ-аутофлуоресценции проводилась в первой половине дня.

Для анализа производилась нормировка спектров флуоресценции на среднее значение сигнала от излучения УФ светодиода, отраженного от поверхности кожи (D-нормировка). С целью более точного сравнения формы спектров мы применили дополнительную нормировку. Для этого был вычислен средний спектр по всей группе пациентов $F(\lambda)$ и для каждого спектра $F_i(\lambda)$ вычислялись коэффициенты линейной регрессии a_i , b_i методом наименьших квадратов – так, чтобы после последующей перенормировки указанные спектры были максимально приближены к среднему:

$$F(\lambda) \cong a_i F_i(\lambda) + b_i$$

Затем проводилась перенормировка спектров с учетом найденных коэффициентов:

$$f_i(\lambda) = \frac{F_i(\lambda) - b_i}{a_i}$$

Результатом применения дополнительной нормировки является уменьшение стандартного отклонения (I-нормировкой).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки возможностей УФ-индуцированной флуоресцентной спектроскопии в диагностике БП мы проанализировали значимость различий в спектрах флуоресценции между выбранными группами (рис. 1). Для анализа мы построили зависимости Z-оценки различий между выбранными попарно группами от длины волны, полученной с помощью критерия Манна-Уитни. Превышение указанного показателя по модулю критического значения 1.96 соответствует значимым различиям на уровне $p < 0.05$. Указанный подход позволяет также выбрать наиболее информативные для дальнейшего анализа области спектра и метод их нормировки. Как следует из представленного рисунка, при методе D-нормировки спектры Z-оценки в группах (Контроль – Паркинсон) и (Группа сравнения Паркинсон) одинаковы и значимо отличаются во всем регистрируемом диапазоне, что в определенной мере подтверждает результат, полученный в работе [16]. Но для групп (Контроль – Группа сравнения) значимые различия не обнаружены.

Использование I-нормировки также обнаруживает значимые различия в формах спектров

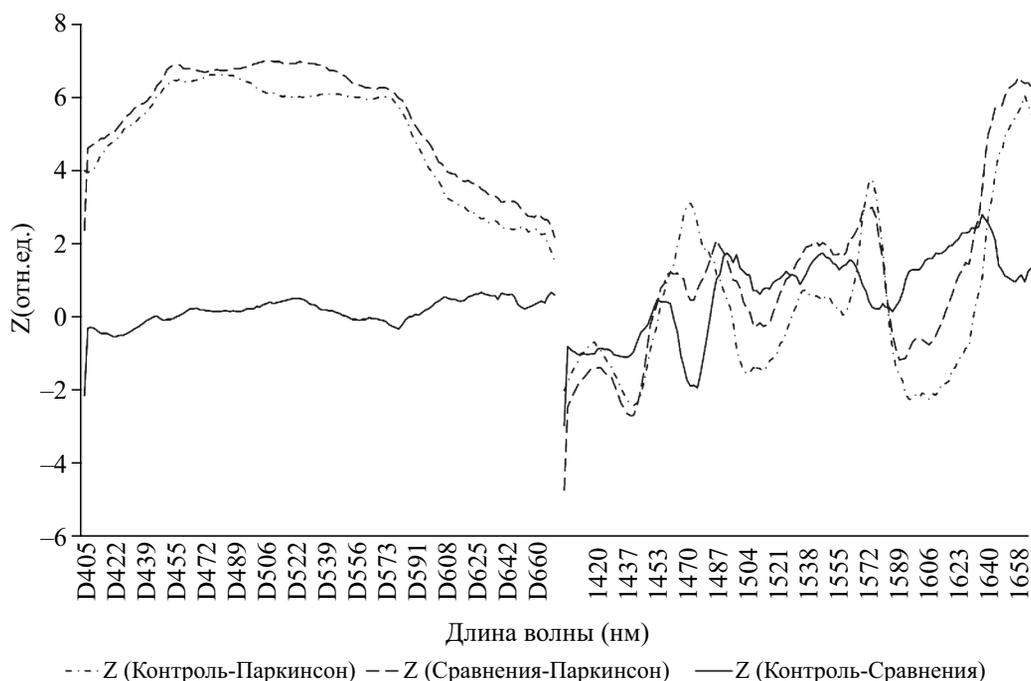


Рис. 1. Распределение Z-оценок по длинам волн при различной нормировке при попарном сравнении клинических групп.

аутофлуоресценции в группах (Контроль – Паркинсон) и (Группа сравнения Паркинсон), которые проявляют себя только в некоторых областях, соответствующих типичным флуорофорам и хромофорам кожи. Так, область 400–410 нм может быть описана изменениями экспрессии как со стороны коллагена и эластина, так и флуоресцирующего продукта гликирования белков – пентозидина. Область 420–440 нм соответствует полосе Сорс дезоксигемоглобина. Область 460–480 нм характеризует пик аутофлуоресценции НАДН. Пик 570–580 нм соответствует альфа-полосе молекулы оксигемоглобина, а область 630–670 нм может быть ассоциирована с пиком флуоресценции протопорфиринов (в частности, протопорфирина-9) [17]. Изменения в области полосы флуоресценции протопорфиринов, по всей видимости, связаны с изменениями метаболизма гема при нейродегенеративных заболеваниях [18]. Таким образом, использование I-нормировки потенциально позволяет анализировать не только общий уровень аутофлуоресценции, но проводить дифференциальную диагностику по отдельным хромофорам и флуорофорам.

Отсутствие значимых различий в спектрах аутофлуоресценции контрольной группы и группы сравнения позволяет их объединить в единую группу, а весь дальнейший анализ проводить, сравнивая группы лиц без БП и с БП.

Сравнение спектров аутофлуоресценции при использовании D-нормировки показывает, что

амплитуда спектра равномерно снижается во всем диапазоне при наличии БП (рис. 2). Причиной этого может быть увеличение коэффициента отражения-рассеяния в УФ-области, приводящее к тому, что относительный уровень аутофлуоресценции, нормированный на сигнал отражения, падает. Как известно, меланин имеет существенное поглощение в ультрафиолете, и в то же время не имеет структурных пиков во всем видимом диапазоне [19]. Поэтому к эффекту снижения относительного уровня флуоресценции кожи в видимой области может привести редуцированное содержание меланина в коже пациентов с БП [11]. Другим потенциальным механизмом, увеличивающим долю отраженного – рассеянного УФ излучения накачки, может быть увеличение показателя преломления коллагенсодержащего внеклеточного матрикса у пациентов с БП. Последняя гипотеза требует проверки, в том числе с точки зрения глубины проникновения УФ излучения и разного присутствия молекул коллагена в поверхностных и более глубоких слоях кожи, но в ее пользу указывает факт увеличения жесткости матрикса за счет поперечных сшивок при действии на матрикс конечных продуктов гликирования [20]. Кроме того, следует учитывать, что индуцированная ультрафиолетовым светом аутофлуоресценция верхнего слоя ткани, обладая большей проникающей способностью из-за большей длины волны, достигает более глубоких слоев и, рассеиваясь и поглощаясь, несет информацию

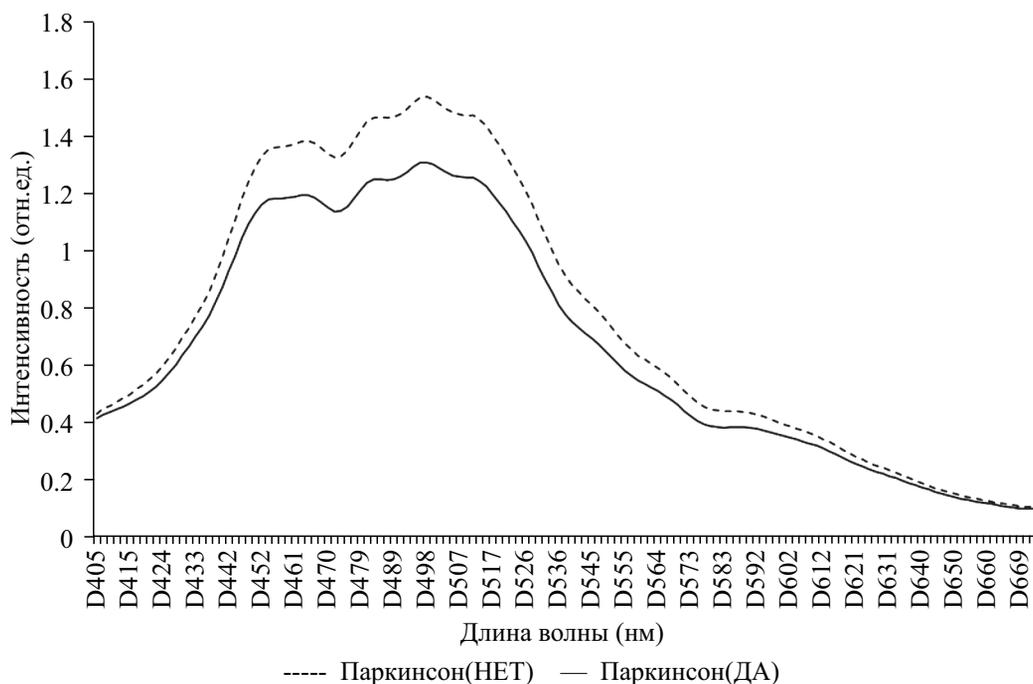


Рис. 2. Спектры аутофлуоресценции для групп с БП и без нее при использовании D-нормировки.

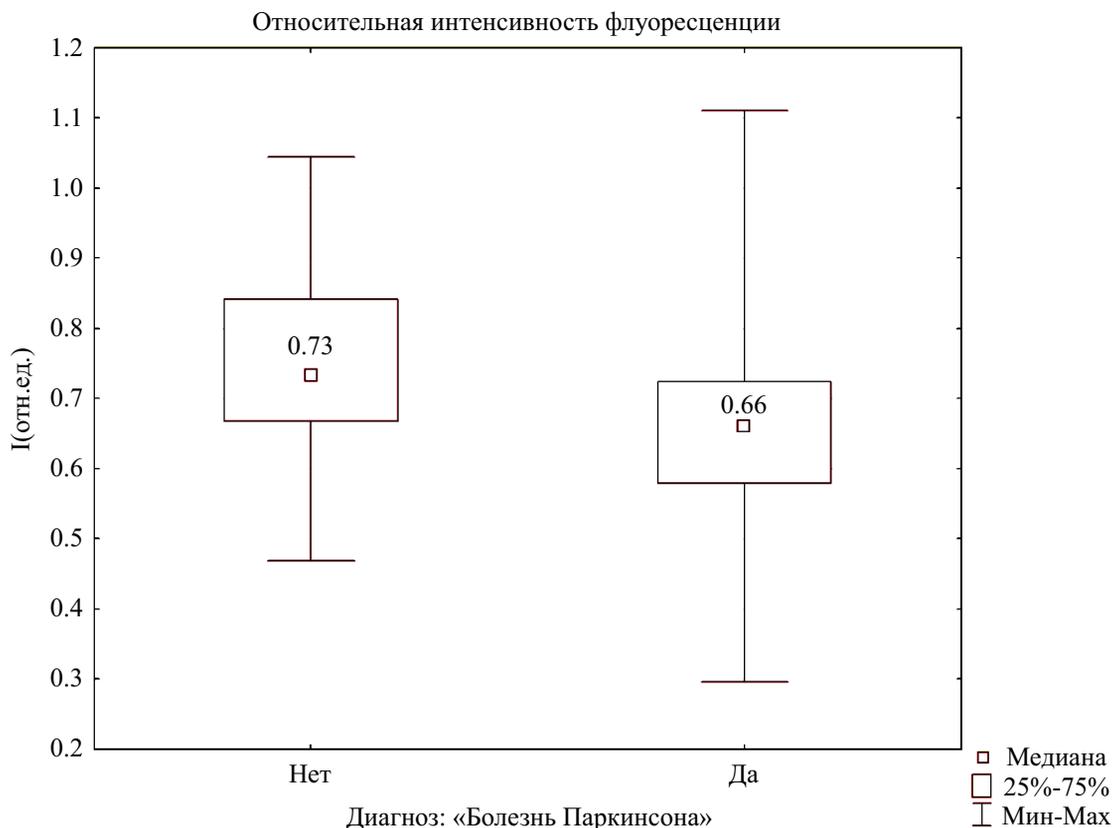


Рис. 3. Относительная флуоресценция в группах с БП и без нее.

о более глубоких слоях ткани. Поскольку спектр флуоресценции кожи имеет пик на длине волны 500 нм, а на уровне половинной интенсивности занимает область 410–550 нм, то указанное излучение способно проникать в кожу на глубину до 2 мм, надежно входя в слой дермы. Наиболее простым способом количественной оценки вклада увеличения отражения-рассеяния в УФ области по отношению к флуоресценции является отношение площадей под спектральным контуром рассеянного излучения накачки с площадью под контуром спектра аутофлуоресценции при использовании D-нормировки. Значимость различий по указанному параметру с помощью критерия Манна-Уитни $p < 10^{-5}$. Диаграмма относительной флуоресценции в группах с БП и без нее представлена на рис. 3.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований мы впервые показали, что спектры УФ- индуцированной аутофлуоресценции кожи значимо различны у больных с БП и лиц контрольной группы (условно здоровые лица) и группы сравнения

(лица с патологией нервной системы, не имеющие признаков нейродегенерации) сопоставимого возраста и пола, при этом группы контроля и сравнения значимо не отличаются между собой. Мы обнаружили, что относительная флуоресценция кожи у пациентов с БП значительно ниже, чем в контрольной группе и группе сравнения, что может свидетельствовать о более высоком отражении-рассеянии УФ излучения (375 нм) кожей пациентов с БП.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на реализацию крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (проект № 075-15-2024-638).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено Этической комиссией Научного центра неврологии №4-7/23 от 19.04.2023 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Braak H., Del Tredici K., Potential pathways of abnormal tau and α -synuclein dissemination in sporadic Alzheimer's and Parkinson's diseases // Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2016. Vol. 8, N 11. P. a023630.
2. Хачева К.К., Иллариошкин С.Н., Карабанов А.В., и др., Сравнительная диагностическая чувствительность транскраниальной сонографии черной субстанции и биопсии слюнной железы у пациентов с болезнью Паркинсона // Известия Российской Военно-медицинской академии, 2021. Т. 40, №4. С. 101–106.
3. Chung S.J., König I.R., Lohmann K., et al., Association of SNCA variants with α -synuclein of gastric and colonic mucosa in Parkinson's diseases. // Parkinsonism & related disorders, 2019. Vol. 61. P. 151–155.
4. Wang Z., Becker K., Donadio V., et al., Skin α -synuclein aggregation seeding activity as a novel biomarker for Parkinson disease // JAMA neurology, 2021. Vol. 78, N 1. P. 30–40.
5. Videira P.A., Castro-Caldas M., Linking glycation and glycosylation with inflammation and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease // Frontiers in neuroscience, 2018. Vol. 12. P. 381.
6. Farzadfard A., König A., Petersen S.V., et al., Glycation modulates alpha-synuclein fibrillization kinetics: A sweet spot for inhibition // Journal of Biological Chemistry, 2022. Vol. 298, N5. P. 101848.
7. Meerwaldt R., Links T., Graaff R., et al., Simple non-invasive measurement of skin autofluorescence // Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. Vol. 1043, N1. P. 290–298.
8. Xiao W., Loscalzo J., Metabolic responses to reductive stress // Antioxidants & redox signaling, 2020. Vol. 32, N18. P. 1330–1347.
9. Teves J.M., Bhargava V., Kirwan K.R., et al., Parkinson's disease skin fibroblasts display signature alterations in growth, redox homeostasis, mitochondrial function, and autophagy // Frontiers in neuroscience, 2018. Vol. 11. P.737.
10. Plotegher N., Stringari C., Jahid S., et al., NADH fluorescence lifetime is an endogenous reporter of α -synuclein aggregation in live cells // The FASEB Journal, 2015. Vol. 29, N6. P. 2484.
11. Leupold D., Szyz L., Stankovic G., et al., Melanin and neuromelanin fluorescence studies focusing on Parkinson's disease and its inherent risk for melanoma // Cells, 2019. Vol. 8, N6. P. 592.
12. Rächinger N., Mittag N., Böhme-Schäfer I., et al., Alpha-Synuclein and Its Role in Melanocytes // Cells, 2022. Vol. 11, N13. P. 2087.
13. Gillbro J., Olsson M., The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents—existing and new approaches // International Journal of Cosmetic Science, 2011. Vol. 33, N3. P. 210–221.
14. Hani A., Baba R., Shamsuddin N., et al., Determination of melanin types and relative concentrations: an observational study using a non-invasive inverse skin reflectance analysis // International Journal of Cosmetic Science, 2014. Vol. 36, N5. P. 451–458.
15. Salmin V.V., Taranushenko T.E., Kiseleva N.G., et al., Noninvasive Sensing of Serum sRAGE and Glycated Hemoglobin by Skin UV-Induced Fluorescence, in Biomedical Photonics for Diabetes Research, 2022, CRC Press. P. 155–176.
16. Wu D., Tao Y., Zhang M., et al., Selectively increased autofluorescence at fingernails and certain regions of skin: a potential novel diagnostic biomarker for Parkinson's disease // bioRxiv, 2018. P. 322222.
17. Seo I., Tseng S., Cula G., et al. Fluorescence spectroscopy for endogenous porphyrins in human facial skin. in Photonic Therapeutics and Diagnostics V. 2009: SPIE.
18. Chiabrando D., Fiorito V., Petrillo S., et al., Unraveling the role of heme in neurodegeneration // Frontiers in neuroscience, 2018. Vol. 12. P. 712.
19. Kollias N., Baqer A., Spectroscopic characteristics of human melanin in vivo // Journal of investigative dermatology, 1985. Vol. 85, N1. P. 38–42.
20. Ishizaki K., Yagi M., Morita Y., et al., Relationship between glycativ stress markers and skin stiffness // Glycative Stress Research, 2020. Vol. 7, N3. P. 204–210.

UV-INDUCED FLUORESCENCE SPECTROSCOPY OF SKIN IN VIVO IN PARKINSON'S DISEASE

**V. V. Salmin^{1, 2, 3, *}, V. B. Loschenov^{3, 4}, A. B. Ochirova³,
N. P. Bainaev-Mangilev³, M. N. Andreev⁵, E. Yu. Fedotova⁵, A. B. Salmina⁵,
Academician of the RAS S. N. Illarioshkin⁵**

¹*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russian Federation*

²*Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russian Federation*

³*National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russian Federation*

⁴*Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

⁵*Research Center of Neurology, Moscow, Russian Federation*

**e-mail: vsalmin@gmail.com*

We found characteristic patterns of UV-induced skin autofluorescence in patients with Parkinson's disease associated with the development of dysmetabolic alterations like non-enzymatic protein glycation and an increase in the extracellular matrix stiffness, impaired metabolism of tissue fluorophores, mitochondrial dysfunction, and accumulation of aberrant proteins. For the first time, we demonstrate the key differences in the skin autofluorescence spectra in Parkinson's disease that allow distinguishing them from those obtained in healthy persons or in individuals without signs of chronic neurodegeneration: skin fluorescence is lower in relation to the reflected signal when it is excited by UV light with a wavelength of 375 nm in patients with Parkinson's disease.

Keywords: Parkinson disease, alpha-Synuclein, Advanced Glycation Endproducts, Fluorescence Spectroscopy, Skin