

Иммуногистохимическое выявление α -синуклеина в слюнной железе как биомаркер болезни Паркинсона

В.Б. Соболев, Р.М. Худоерков

ФГБНУ “Научный центр неврологии” (Москва)

Болезнь Паркинсона (БП) с молекулярной точки зрения относится к *синуклеинопатиям*. Под этим термином понимают группу нейродегенеративных заболеваний, объединяемых на основании наличия цитоплазматических включений, основу которых составляет белок α -синуклеин [1]. Поиск специфических форм α -синуклеина в тканях организма рассматривается в настоящее время как перспективное направление в разработке ранней диагностики БП, а сам α -синуклеин – как возможный биомаркер заболевания.

В группу синуклеинов входят α -, β -, γ -синуклеины и синоретин [2]. α -синуклеин впервые был идентифицирован в 1993 г. в ткани мозга человека при ультраструктурном исследовании амилоидных бляшек у пациентов с болезнью Альцгеймера [3]. Было установлено, что человеческий ген, кодирующий α -синуклеин (*SNCA*), гомологичен уже известному гену α -синуклеина крысы и локализуется на хромосоме 4q21 [4]. Основная изоформа белка α -синуклеина включает 140 аминокислотных остатков, но есть и более короткие формы – из 126, 112 и 98 остатков [5]. Только полная из указанных изоформ проходит весь этап посттрансляционной модификации, а более короткие – нет; последние, вероятно, и несут в себе наибольшую опасность аномальной конформации и патологической агрегации [6].

Полная версия белка состоит из трех участков молекулы: N-концевой спирали, центрального участка и отрицательно заряженного C-участка [7]. N-концевой участок обеспечивает липофильные свойства, что способствует фиксации белка с мембранными структурами

с образованием липопротеиновых комплексов. Центральный участок молекулы обеспечивает взаимодействие с другими молекулами α -синуклеина и формирование нерастворимых олиго- и полимерных белковых образований [8]. Взаимодействие с этой областью потенциально может влиять на агрегационные свойства белка [9].

α -синуклеин составляет до 1% от общего белка цитозоля, предположительно, это обуславливает большую значимость указанного белка во внутриклеточных процессах [10]. Однако его функции до сих пор не выяснены. Предполагается, что роль α -синуклеина связана со стабильностью мембран, везикулярным транспортом и пресинаптической сигнализацией [11, 12]. Установлено, что в нормальных условиях α -синуклеин существует преимущественно в мономерном состоянии; однако в экспериментальных стрессовых условиях среды могут создаваться физиологические альтернативные конформации (мономерные и димерные), а также патологические димерные и полимерные формы, образующие фибриллы и превращающиеся в цитоплазматические включения – тельца и нейриты Леви. Последние считаются патоморфологически маркерами БП [8].

Нейротоксины, тяжелые металлы и другие факторы окружающей среды, как и мутации гена *SNCA*, повышают склонность белка к полимеризации и агрегации [13]. Предполагаемые механизмы нейротоксичности конформированного α -синуклеина и его агрегатов связаны с митохондриальной дисфункцией, протеолитическим стрессом, оксидативным повреждением и др. [14].

Тельца Леви как патоморфологический маркер БП наиболее характерны для черной субстанции среднего мозга, но также обнаруживаются в двигательных ядрах блуждающего нерва, базальных ядрах Мейнерта, голубом пятне и располагаются диффузно в других структурах на более поздних сроках болезни [15]. Однако агрегаты α -синуклеина могут быть маркерами и других нейродегенеративных заболеваний — деменции с тельцами Леви, мультисистемной атрофии, нейродегенераций с накоплением железа и др. При БП и деменции с тельцами Леви агрегаты выявляются не только в телах клеток, но и в отростках нейронов и глии [7]. При мультисистемной атрофии агрегаты α -синуклеина видны как цитоплазматические включения в нейронах и клетках глии. При нейроаксональной дистрофии (нейродегенерации с накоплением железа II типа) эти включения обнаруживались в виде аксональных сфероидов [16].

По данным литературы, при БП локализация агрегатов α -синуклеина не ограничивается структурами центральной нервной системы (ЦНС). Они выявляются также в периферических тканях и органах, что может иметь большое значение для верификации патологического процесса в наиболее ранней (латентной) стадии, т.е. еще до дебюта классических (моторных) признаков заболевания и гибели большей части нейронов черной субстанции [12, 17]. Детекция ранних патологических синуклеинпозитивных включений, телец и нейритов Леви легла в основу хорошо известной теории Браака, свидетельствующей о периферическом начале нейродегенеративного процесса при БП [12]. В поддержку этой теории получено большое количество данных о периферической локализации иммуногистохимических маркеров, что также подтверждено в работах на основе метаанализа [8].

В аутопсийном материале обонятельных луковиц агрегаты α -синуклеина были выявлены в 95% случаев у лиц с БП и лишь в 7% — у пожилых неврологически здоровых людей [18]. Однако в другой работе связь частичной потери обоняния при БП и наличия α -синук-

леина в обонятельных луковицах подтверждена не была [19].

При исследовании биопсийного материала слизистой оболочки толстой кишки была продемонстрирована 100% специфичность фосфорилированного α -синуклеина как маркера БП, но чувствительность этого метода составила всего 70–80% [20]. По данным еще одного исследования, частота выявления α -синуклеина в слизистом и подслизистом слоях кишечника у больных БП составляла 55%, в то время как в контрольной группе у 1 из 10 индивидуумов имела место положительная проба в слизистом слое кишечника [21]. Исследователи из Германии при изучении патолого-анатомического материала установили, что включения α -синуклеина обнаруживаются в метасимпатической нервной системе кишечника даже на ранних стадиях БП, при этом α -синуклеин также выявлялся в дорсальном моторном ядре блуждающего нерва [11, 12].

При исследовании малых слюнных желез в полости рта (в области губ) α -синуклеин был обнаружен в 60% случаев при БП и в 30% случаев — в группе контроля [22]. Согласно другим оценкам, при исследовании слюнных желез специфичность и чувствительность иммуногистохимического метода выявления α -синуклеина при БП достигают 100%. При исследовании сплетений и нервов гортани при БП было выявлено, что плотность позитивных по α -синуклеину включений и волокон является более высокой у пациентов с дисфагией [23]. При исследованиях биоптатов кожи продемонстрированы наименьшие показатели чувствительности — примерно 20% (при специфичности примерно 80%) [8].

Помимо этого α -синуклеин в мономерной и олигомерной форме представлен в эритроцитах, цереброспинальной жидкости, плазме крови, слюне [24–26]. Данный факт плохо укладывается в концепцию исключительно внутриклеточной локализации белка. Отметим, что до настоящего времени исследование биологических жидкостей (цереброспинальной жидкости и плазмы крови) на различные изоформы α -синуклеина не дает надежных и

воспроизводимых результатов в контексте биомаркеров нейродегенеративного процесса [8, 23, 25, 27]. На этом фоне поиск α -синуклеина в тканях, иннервируемых вегетативной нервной системой, выглядит более перспективным [28, 29].

В разных ганглиях и сплетениях периферической нервной системы отмечается различная частота выявления α -синуклеина. Так, при анализе симпатических ганглиев агрегаты α -синуклеина были найдены в 80% случаев, при исследовании блуждающего нерва – в 73%, седалищного нерва – в 50%, при исследовании желудочно-кишечного тракта – в 65%, дыхательных путей (гортань, первичные бронхи, легкие) – в 12,5%, эндокринных органов – в 22%, мочеполовой системы – в 12,5% [8, 18]. При исследовании биоптатов кожи наблюдался низкий уровень включений α -синуклеина [30, 31]. При сравнении разных областей кожи было установлено, что в биоптатах кожи спины (на уровне нижнего грудного и верхнего поясничного позвонка) α -синуклеин выявлялся в 16 (52%) из 31 пробы, в биоптатах кожи проксимального отдела ноги (внутренняя поверхность бедра) – в 6 пробах, в дистальном отделе – в 4, на указательном пальце ноги – в 5 [31].

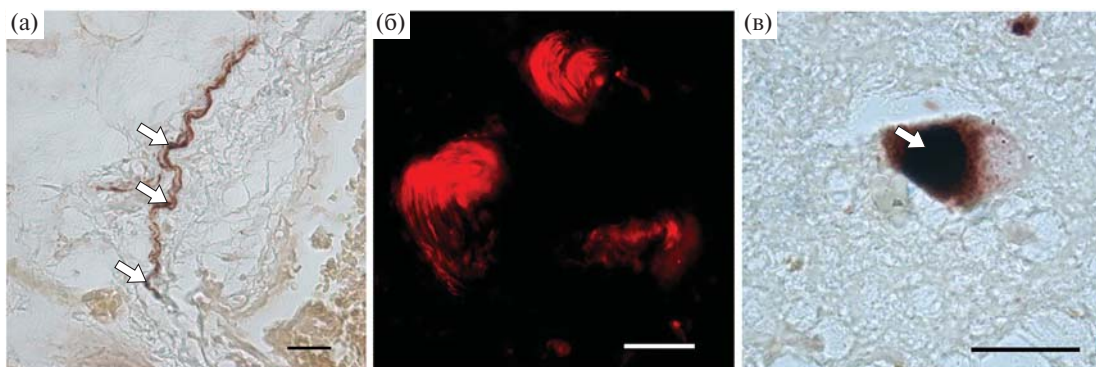
Что касается типов нервных волокон кожи, имеющих включения α -синуклеина, то была установлена его локализация в немиелинизированных волокнах ЦНС [12]. Среди этих волокон продемонстрирована преимущественная его выявляемость в нейронах и их отростках, позитивно окрашиваемых на субстанцию Р (SP) и тирозингидроксилазу (TH) [8, 31]. Также накопления α -синуклеина встречаются в VIP- и CGRP-позитивных волокнах (VIP – vasoactive intestinal peptide (вазоактивный интестинальный пептид), CGRP – calcitonin gene-related peptide (кальцитонин-ген-связанный пептид)). Предполагается, что выявление α -синуклеина в SP-позитивных волокнах может быть признаком ранних этапов развития заболевания [12, 32].

Тельца Леви – конечная стадия агрегации патологической формы α -синуклеина в ней-

ронах – имеют диаметр до 25 мкм и приобретают насыщенный цвет хромагена при иммуногистохимическом окрашивании. Известно, что α -синуклеин в составе телец Леви или в виде неоформленных агрегатов может выявляться и у здоровых пожилых людей: так, при исследовании аутопсийного материала у 10–12% неврологически здоровых лиц старше 60 лет в нейронах ЦНС обнаруживались тельца Леви. Это затрудняет работу по поиску оптимального метода детекции биомаркеров БП и интерпретации данных по ранней диагностике пресимптоматической стадии заболевания [8]. Ряд авторов называют указанную патоморфологическую находку *заболеванием со случайными тельцами Леви* [8, 33].

В нашей **собственной работе** мы исследовали условия оптимального иммуногистохимического выявления фосфорилированного α -синуклеина в биопсийном материале слюнных желез человека. Биоптаты получали благодаря сотрудничеству с отделениями челюстно-лицевой хирургии и неврологии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского (координаторы исследования – докт. мед. наук Р.Р. Богданов и член-корр. РАН С.Н. Иллаиошкин).

Объектом исследования служили нервные волокна в биоптатах слюнных желез человека, которые фиксировали в 4% нейтральном формалине, промывали проточной водой, затем часть фиксированных образцов дегидратировали и готовили для заливки в парафин, сравнивая два варианта проводки – через хлороформ и изопропанол [34]. Парафиновые срезы толщиной от 10 до 40 мкм готовили на санном микротоме Leica SR2000. Первую партию образцов делили на две части, первую часть образцов проводили по вышеописанной методике, вторую часть проводили через 15 и 30% растворы сахарозы, а затем пропитывали средой О.С.Т. (Tissue-Tek), после чего замораживали и раскладывали на срезы с помощью замораживающего микротомы (Sakura Tissue-Tek). В работе использовали моноклональные мышинные антитела к фосфорилированному α -синуклеину (α -Syn-p129) двух разных про-



Позитивная реакция на α -синуклеин. а – окрашиваемые на фосфорилированный α -синуклеин включения в ТН-позитивном нервном волокне (указаны стрелками); б – позитивные на фосфорилированный α -синуклеин крупные волокна при использовании вторичных антител с флуорохромом; в – позитивный контроль с выявлением α -синуклеина в тельцах Леви (стрелка) в черной субстанции мозга больного БП. Размер линейки – 25 мкм.

изготовителей (Wako и BioLegend). Для работы на световом микроскопе светлого поля использовали полимерную систему двойной детекции MultiVision TL-012-MARN (Thermo Fisher Scientific) и отдельный набор для пероксидазного метода детекции EXTRA 3 kit (Sigma). Для проведения флуоресцентной микроскопии в качестве вторичных антител использовали меченные флуорохромами антитела фирмы Sigma: sab4600060 (CF555), sab4600045 (CF488). Для раскрытия эпитопа антигена проводили демаскировку (pretreatment), используя разные способы обработки срезов: нагревание их в кислом и щелочном буферных растворах (цитратный буфер, pH 6,0 и буфер Трис-ЭДТА, pH 9,0–9,2) в условиях микроволнового излучения (600 Вт, до 10 мин); проводили также обработку в кон-

центрированной муравьиной кислоте с разной длительностью воздействия.

С целью верификации результатов иммунной реакции для каждого типа обработки использовали препараты срезов среднего мозга человека на уровне черной субстанции. Выявление телец и нейритов Леви служило критерием удачно проведенной реакции (рисунок).

При подготовке образцов к заливке в парафин наилучшие результаты были получены при применении изопропилового спирта (табл. 1). В работе с парафиновыми и криотомными срезами мы отдали предпочтение первым, так как на криотомных срезах наблюдается высокий уровень неспецифического окрашивания в слюнной железе при использовании антител, меченных щелочной фосфата-

Таблица 1. Результаты иммуногистохимического исследования в зависимости от проводки и условий обработки препаратов

Проводка	Условия			
	без обработки	Трис-ЭДТА	цитратный буфер	муравьиная кислота
Хлороформ	–	–	+	++
Изопропиловый спирт	–	+	+	+++

Примечание. Результаты приведены для исследования с использованием системы вторичной детекции TL-012 MARN в виде балльной шкалы.

Обозначения здесь и в табл. 2: “–” – положительное окрашивание не выявлено ни в одной партии, либо оно единично; “+” – положительное окрашивание встречается в меньшей части партий препаратов; “++” – положительное окрашивание встречается в половине и более партий препаратов; “+++” – положительное окрашивание встречается в большинстве партий препаратов.

Таблица 2. Сравнение систем детекции и мечения в зависимости от условий демаскировки антигена

Система детекции	Условия			
	без обработки	Трис-ЭДТА	цитратный буфер	муравьиная кислота
EXTRA-3	–	+	+	+++
TL-012 (MARH/MHRA)	–	+	++	+++
Флуоресценция	–	–	+	+++

зой. При сравнении различных наборов детекции было выявлено, что полимерный набор (с включением модификаций MARH и MHRA) демонстрирует наибольшую чувствительность и воспроизводимость результатов (табл. 2).

Условия демаскировки антигена значительно влияли на связывание антител Wako, тогда как антитела BioLegend были менее чувствительны к способу предварительной обработки материала. Если демаскировку антигена не проводили, то антитела от обоих производителей демонстрировали слабую иммунореактивность. Демаскировка антигена в кислой среде была более эффективной, чем в щелочной, при этом антитела фирмы Wako давали лучшие результаты.

Обработка срезов в течение 10 мин концентрированной (>99%, чистая для анализа) муравьиной кислотой показала, что она является мощным солюбилизирующим агентом и повышает выявляемость α -синуклеина (см. рисунок, б), а также (по данным литературы) – амилоида и прионных белков [35, 36]. При обработке муравьиной кислотой в течение короткого времени (1–2 мин) результат был близок к тому, который отмечался при тепловой обработке.

Полученные нами данные о специфичности и чувствительности использованного метода обнаружения в слюнных железах человека фосфорилированного α -синуклеина в качестве биомаркера нейродегенеративного процесса “паркинсонического” типа сходны с таковыми, описанными ранее в литературе [37].

При работе с системой детекции MultiVision TL-012-MARH с целью надежного выявления фосфорилированного α -синуклеина в нервных волокнах и исключения неспецифического окрашивания, связанного с эндогенной

активностью щелочной фосфатазы (служившей ферментной меткой для вторичных антител), лучше проводить совместное выявление на одном срезе фосфорилированного α -синуклеина с нейрональным ферментом (в нашем случае таким ферментом была TH). Их совместная локализация служит свидетельством накопления α -синуклеина в адренергических нервных волокнах (см. рисунок, а).

Полученные результаты весьма значимы с практической точки зрения, поскольку внедрение в клинику информативных биомаркеров БП направлено на своевременную диагностику заболевания и раннюю нейропротекторную терапию [38, 39]. Именно эти цели преследует выявление фосфорилированного α -синуклеина в биоптатах слюнных желез пациентов. Нами предложена значимая модификация иммуногистохимической методики, повышающая надежность локализации фосфорилированного α -синуклеина в нервных волокнах слюнных желез и исключаящая неспецифическое окрашивание: она заключается в выявлении на одном срезе фосфорилированного α -синуклеина и TH. Развитие этих исследований может открыть новую страницу в превентивной неврологии.

Список литературы

1. Kiely A.P., Asi Y.T., Kara E. et al. α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson’s disease and multiple system atrophy? // *Acta Neuropathol.* 2013. V. 125. P. 753–769.
2. Ninkina N., Peters O.M., Connor-Robson N. et al. Contrasting effect of α -synuclein and gamma-synuclein on the phenotype of cysteine string protein α (CSP α) null mutant mice suggest distinct function of these proteins in neuronal synapses // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 44471–44477.

3. Ueda K., Fukushima H., Masliah E. et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. V. 90. P. 11282–11286.
4. Campion D., Martin C., Heilig R. et al. The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease // *Genomics*. 1995. V. 26. P. 254–257.
5. Beyer K., Ariza A. α -Synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration // *Mol. Neurobiol.* 2013. V. 47. P. 509–524.
6. Levitan K., Chereau D., Cohen S.I. et al. Conserved C-terminal charge exerts a profound influence on the aggregation rate of α -synuclein // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 411. P. 329–333.
7. Uversky V.N. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation // *J. Neurochem.* 2007. V. 103. P. 17–37.
8. Malek N., Swallow D., Grosset K.A. et al. α -Synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease – a systematic review // *Acta Neurol. Scand.* 2014. V. 130. P. 59–72.
9. Bernstein S.L., Liu D., Wyttenbach T. et al. α -Synuclein: stable compact and extended monomeric structures and pH dependence of dimer formation // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. V. 15. P. 1435–1443.
10. Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M. et al. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system // *Neuron*. 1995. V. 14. P. 467–475.
11. Braak H., Bohl J., Del Tredici K. Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 396. P. 67–72.
12. Braak H., Del Tredici K., Rub U.I. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging*. 2003. V. 24. P. 197–211.
13. Breydo L., Wu J.W., Uversky V.N. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1822. P. 261–285.
14. Bennett M.C. The role of α -synuclein in neurodegenerative diseases // *Pharmacol. Ther.* 2005. V. 105. P. 311–331.
15. Forno L.S. Neuropathology of Parkinson's disease // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996. V. 55. P. 259–272.
16. Jellinger K.A. Neuropathological spectrum of synucleinopathies // *Mov. Disord.* 2003. V. 18 (Suppl. 6). P. S2–S12.
17. Caviness J.N. Presymptomatic Parkinson's disease: the Arizona experience // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012. V. 18 (Suppl. 1). P. 203–206.
18. Beach T.G., Adler C.H., Sue L.I. et al. Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders // *Acta Neuropathol.* 2010. V. 119. P. 689–702.
19. Witt M., Bormann K., Gudziol V. et al. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2009. V. 24. P. 906–914.
20. Lebouvier T., Neunlist M., Bruley S. et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. P. e12728.
21. Pouclet H., Lebouvier T., Coron E. et al. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease // *Neurogastroenterol. Motil.* 2012. V. 24. P. e202–e205.
22. Cersosimo M.G., Perandones C., Micheli F.E. et al. α -Synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients // *Mov. Disord.* 2011. V. 26. P. 188–190.
23. Mu L., Sobotka S., Chen J. et al. Parkinson disease affects peripheral sensory nerves in the pharynx // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2013. V. 72. P. 614–623.
24. Lee H.J., Patel S., Lee S.J. Intravesicular localization and exocytosis of α -synuclein and its aggregates // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. P. 6016–1624.
25. Lee P.H., Lee G., Park H.J. et al. The plasma α -synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy // *J. Neural. Transm.* 2006. V. 113. P. 1435–1439.
26. Nakai M., Fujita M., Waragai M. et al. Expression of α -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 358. P. 104–110.
27. Mata I.F., Agarwal P. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma α -synuclein level // *Arch. Neurol.* 2010. V. 67. P. 1350–1356.
28. Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R. et al. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. V. 95. P. 6469–6473.
29. Goedert M. Neurodegeneration. Alzheimer's and Parkinson's diseases: the prion concept in

- relation to assembled A β , tau, and α -synuclein // Science. 2015. V. 349. P. 1255555.
30. Michell A.W., Luheshi L.M., Barker R.A. Skin and platelet α -synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease // Neurosci. Lett. 2005. V. 381. P. 294–298.
 31. Doppler K., Ebert S., Üçeyler N. et al. Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology // Acta Neuropathol. 2014. V. 128. P. 99–109.
 32. Ubeda-Bañon I., Saiz-Sanchez D., de la Rosa-Prieto C., Martínez-Marcos A. α -Synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: role of neural connections on spreading pathology // Brain Struct. Funct. 2014. V. 219. P. 1513–1526.
 33. DelleDonne A., Klos K.J., Fujishiro H. et al. Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease // Arch. Neurol. 2008. V. 65. P. 1074–1080.
 34. Викторов И.В., Прошин С.С. Применение изопропилового спирта в гистологических методах: обезвоживание и заливка ткани в парафин, обработка парафиновых срезов // Бюл. exper. биол. и мед. 2003. № 7. С. 119–120.
 35. Mori F., Tanji K., Yoshimoto M. et al. Demonstration of α -synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment // Exp. Neurol. 2002. V. 176. P. 98–104.
 36. Van Everbroeck B., Pals P., Martin J.J. Antigen retrieval in prion protein immunohistochemistry // J. Histochem. Cytochem. 1999. V. 47. P. 1465–1470.
 37. Del Tredici K., Hawkes C.H., Ghebremedhin E., Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease // Acta Neuropathol. 2010. V. 119. P. 703–713.
 38. Федотова Е.Ю., Четчин А.О., Абрамычева Н.Ю., Чигалейчик Л.А., Базиян Б.Х., Пономарева Т.А., Алексеева Н.С., Федин П.А., Кравченко М.А., Варакин Ю.Я., Иванова-Смоленская И.А., Иллариошкин С.Н. Идентификация лиц в латентной стадии болезни Паркинсона (исследование ПАРКИНЛАР): первые результаты и оптимизация алгоритма. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2015; 6: 4–11.
 39. Иллариошкин С.Н., Четчин А.О., Федотова Е.Ю. Транскраниальная сонография при экстрапирамидных заболеваниях. М.: АТМО 2014; 176с.