

Физиологические исследования

УДК 616.4

Е.В. Косарева, Т.О. Толстоуцкая, Н.С. Гришанова, В.Г. Сергеев

ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В ЛИМФОУЗЛАХ ПАЦИЕНТОВ С ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

При помощи иммуногистохимического метода исследовали интенсивность мечения клеток, окрашенных антителами к альфа-синуклеину на срезах лимфоузлов пациентов, страдающих В-хроническим лимфолейкозом, лимфой маргинальной зоны селезенки и иными, не лимфопролиферативными заболеваниями. Обнаружена повышенная экспрессия альфа-синуклеина в лимфоцитах маргинальной зоны лимфоузлов пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями. В-хронический лимфолейкоз характеризовался повышением интенсивности свечения в областях, соответствующих мантийной зоне лимфоидных фолликулов корковой области в среднем на $68,9 \pm 12,5\%$ относительно контроля. Кроме того, в мантийной зоне иногда встречались небольшие по численности группы клеток с высокой экспрессией А-син. Интенсивность экспрессии А-син в клетках мантийной зоны больных с лимфомой маргинальной зоны селезенки значительно превышала таковую как в сравнении с пациентами контрольной группы (на $360,8 \pm 16,6\%$; $P < 0,001$), так и больными В-хроническим лимфолейкозом (на $248,3 \pm 16,6\%$; $P < 0,001$). Полученные данные свидетельствуют о возможности использования иммуногистохимического выявления А-син в лимфоузлах для дифференциальной диагностики лимфопролиферативных заболеваний.

Ключевые слова: лимфоузлы, лимфопролиферативные заболевания, альфа-синуклеин.

Дифференциальная диагностика лимфом остается одной из актуальных проблем современной онкоморфологии. Особенно это касается патологий, с характерным отсутствием морфологических различий между нормальными и опухолевыми лимфоцитами, а также схожим характером гистологических изменений при злокачественных и реактивных изменениях в лимфоузлах. Очевидным решением этой проблемы может служить совершенствование известных методов иммуноцитопенотипирования посредством нахождения новых, специфических маркеров той или иной патологии.

Интригующие результаты исследований последнего времени свидетельствуют о том, что нейродегенеративные и онкологические заболевания могут иметь общие молекулярные пути [1-3]. В этой связи мы обратили внимание на возможную вовлеченность в патофизиологические механизмы лимфопролиферативных заболеваний белка альфа-синуклеина (А-син). Этот небольшой цитоплазматический белок (140 аминокислотных остатков) описывался до недавнего времени главным образом в нейронах. Известно, что мутации гена, кодирующего А-син, также как его мисфолдинг и накопление в нейронах черной субстанции мозга, инициируют их гибель и, как следствие, развитие болезни Паркинсона [4].

Важно отметить, что повышенная экспрессия А-син характерна и для целого ряда опухолей мозга, таких как медуллобластома, нейробластома, пинеобластома и ганглиома [5; 6], рак яичников и молочных желез [7], колоректальный рак [8] и меланома [9]. Высокие уровни А-син описаны в клетках красного костного мозга при острых эритроидном и мегакариобластном лейкозах [10]. В условиях клеточной культуры гемопоэтическая дифференцировка линии миелогенных лейкозных клеток сопровождается повышением экспрессии в них А-син [11], а добавление в культуру этого белка ускоряет дифференцировку клеток остеосаркомы [12].

Вышеприведенные факты, а также данные о том, что А-син экспрессируется в лимфоцитах и моноцитах, а также клетках культивируемых линий лимфом [13; 14] позволяют предполагать, что этот белок может быть вовлечен в молекулярные механизмы лимфопролиферативных заболеваний (или, по крайней мере, некоторых из них) и служить диагностическим маркером для их идентификации.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на биопсийном материале лимфоузлов пациентов БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР» с верифицированными диагнозами В-хронический лимфолейкоз (7 пациентов) и лимфома маргинальной зоны селезенки (6 пациентов), после информированного согласия пациентов на участие в проведенном исследовании. В качестве контроля исследовали биоптаты лимфоузлов 6 пациентов, не страдающих лимфопролиферативными заболеваниями.

Биоптаты лимфатических узлов фиксировались в 10 %-ом нейтральном забуференном формалине при комнатной температуре (около 20 °С) не менее 24 часов. Затем взятый материал обезжиривался в спиртах восходящей концентрации и пропитывался парафином по общепринятой стандартной методике. Депарафинированные срезы лимфоузлов толщиной 7 мкм в течение суток инкубировали в растворе антител к А-син (мышинные IgG, 1:200; Sigma-Aldrich). Визуализацию связавшихся антител проводили последующей инкубацией с биотилированными антимышинными антителами (1:200; Chemicon) и стрептовидином, конъюгированным с флуороизоотиоцианатом (1:200; Sigma-Aldrich).

Измерение интенсивности свечения иммунореактивного продукта на срезах производили при помощи компьютерной программы ImagePro Insight 7.0 (Media Cybernetics, USA). Результат подсчета представляли в процентном выражении относительно контроля, интенсивность свечения в котором принималась за 100 %. Статистический анализ данных проводили в компьютерной программе «Statistica 10.0». Результаты исследований проверяли на нормальность распределения значений с помощью W-теста Шапиро-Вилкоксона. Различия в количестве клеток и интенсивности экспрессии иммунореактивного сигнала между группами пациентов анализировали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На срезах лимфатических узлов пациентов контрольной группы, окрашенных при помощи иммуногистохимического метода, иммунореактивный к А-син сигнал выявлялся в виде крайне слабого, диффузного свечения в цитоплазме лимфоцитов, причем не обнаруживалось значительных различий в интенсивности свечения между гистологически различающимися областями органа (рис. 1а). Вместе с тем обращала на себя внимание относительно высокая экспрессия А-син клеток, образующих трубчатые структуры, морфологически сходные с лимфатическими синусами (рис. 2). Вероятно, необычная высота эндотелия представляет собой функциональную адаптацию к интенсивной транмиграционной активности лимфоцитов через стенку синусов. В этом случае обнаруженная экспрессия иммунореактивного А-син в эндотелиальных клетках может свидетельствовать о вовлеченности этого пептида в процессы, сопровождающие лимфоцитарную транмиграцию.

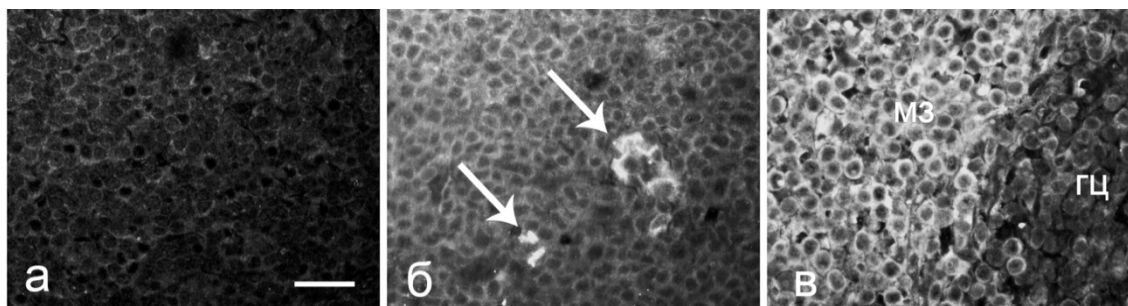


Рис. 1. Экспрессия иммунореактивного альфа-синуклеина в лимфоузлах пациентов контрольной группы (а), больных В-хроническим лимфолейкозом (б) и лимфомой маргинальной зоны селезенки (в)

Стрелками обозначены отдельные клеточные группы с высокой экспрессией альфа-синуклеина.

Обозначения: мз – мантийная зона фолликулярного узелка; гц – герминативный центр фолликулярного узелка. Длина линии = 30 мкм

Исследование лимфатических узлов, полученных от пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, продемонстрировало достоверное увеличение интенсивности экспрессии иммунореактивного А-син относительно контроля в части лимфоцитов, локализующихся в определенных областях органа. Так, В-хронический лимфолейкоз характеризовался повышением интенсивности свечения в областях, соответствующих мантийной зоне лимфоидных фолликулов корковой области в среднем на $68,9 \pm 12,5$ % относительно контроля. Кроме того, в мантийной зоне иногда встречались небольшие по численности группы клеток с высокой экспрессией А-син (рис. 1б). Важно отметить, что при этом клетки паракортикальной зоны лишь незначительно повышали интенсивность мечения, а герминативная область фолликулов практически не содержала иммунореактивного сигнала.

Аналогичная гистотопография меченных клеток наблюдалась и в лимфатических узлах больных с лимфомой маргинальной зоны селезенки (рис. 1в). Однако интенсивность экспрессии А-син в клетках мантийной зоны значительно превышала таковую как в сравнении с пациентами контрольной группы (на $360,8 \pm 16,6\%$; $P < 0,001$), так и больными В-хроническим лимфолейкозом (на $248,3 \pm 16,6\%$; $P < 0,001$). Последний факт позволяет сделать вывод о перспективности использования этого показателя в качестве информативного критерия для дифференциации описанных нозологических форм в ходе патанатомического анализа.

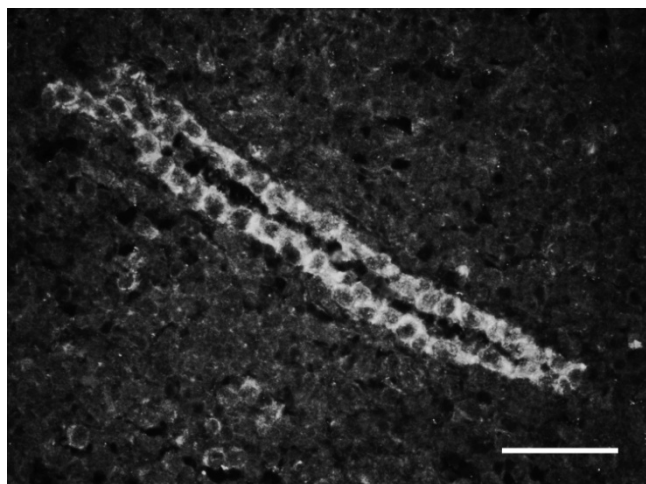


Рис.2. Экспрессия иммунореактивного альфа-синуклеина в высоком эндотелии синусов мозгового вещества лимфоузлов. Длина линии = 30 мкм

Тот факт, что при лимфопролиферативных заболеваниях наблюдается повышенная экспрессия А-син в лимфоцитах мантийной зоны, которая является областью преимущественной локализации В-лимфоцитов памяти, а также «наивных» В-лимфоцитов костномозгового происхождения, может свидетельствовать о вовлеченности А-син в патофизиологические реакции В-клеток этих популяций. На основании имеющихся данных об ингибирующем воздействии высоких уровней А-син на активность убиквитин-протеосомной системы в нервных клетках при болезни Паркинсона [15] и дисрегуляции этой системы при лимфопролиферативных заболеваниях [16; 17] можно предположить, что нарушение процессов аутофагии, индуцированное перепроизводством синуклеина, может быть общим патофизиологическим механизмом для нейродегенеративных и лимфопролиферативных заболеваний.

Заключение

Имуногистохимическое исследование позволило нам обнаружить достоверные различия в интенсивности экспрессии А-син в лимфоцитах маргинальной зоны лимфоузлов пациентов с различными нозологическими формами лимфопролиферативных заболеваний (В-хронический лимфолейкоз и лимфома маргинальной зоны селезенки). Наше исследование свидетельствует о возможности использования А-син в качестве диагностического маркера лимфопролиферативных заболеваний. Кроме того, полученные результаты дополняют представление о молекулярных механизмах злокачественных опухолей лимфатической системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Staropoli J.F. Tumorigenesis and neurodegeneration: two sides of the same coin? // *Bioassays*. 2008. Vol. 30. P. 719-727.
2. Morris L.G., Veeriah S., Chan T.A. Genetic determinants at the interface of cancer and neurodegenerative disease // *Oncogene*. 2010. Vol.29. P. 3453-3464.
3. Garber K. Parkinson's disease and cancer: the unexplored connection // *J Natl Cancer Inst*. 2010. Vol. 102. P. 371-374.
4. George S., Rey N.L., Reichenbach N., Steiner J.A., Brundin P. α -Synuclein: The Long Distance Runner // *Brain Pathology*. 2013. Vol. 23. P. 350-357.
5. Kawashima M., Suzuki S. O., Dohura K., Iwaki T. // *Acta Neuropathol*. 2000. Vol. 99. P. 154-160.
6. Fung K.M., Rorke L.B., Giasson B., Lee V.M., Trojanowski J.Q. // *Acta Neuropathol*. 2003. Vol.106. P. 167-175.

7. Bruening W., Giasson B.I., Klein-Szanto A.J., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary // *Cancer*. 2000. Vol. 88. P. 2154-2163.
8. Ye Q., Wang T.F., Peng Y.F., Xie J., Feng B. Expression of alpha-, beta- and gamma-synuclein in colorectal cancer, and potential clinical significance in progression of the disease // *Oncol Rep*. 2010. Vol. 23. P. 429-436.
9. Matsuo Y., Kamitani T. Parkinson's disease-related protein, alpha-synuclein, in malignant melanoma // *PLoS One*. 2010. Vol. 5. e10481.
10. Maitta R.W., Wolgast L.R., Wang Q., Zhang H., Bhattacharyya P., Gong J.Z., Sunkara J., Albanese J.M., Pizzolo J.G., Cannizzaro L.A., Ramesh K.H., Rotech H. Alpha- and beta-synucleins are new diagnostic tools for acute erythroid leukemia and acute megakaryoblastic leukemia // *Am J Hematol*. 2011. Vol. 86, № 2. P. 230-234.
11. Hashimoto M., Yoshimoto M., Sisk A., Hsu, L.J., Sundsmo M., Kittel A., Saitoh T., Miller A., Masliah, E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1997. Vol. 237. P. 611-616.
12. Fujita M., Sugama S., Nakai M., Takenouchi T., Wei J., Urano T., Inoue S., Hashimoto M. alpha-Synuclein stimulates differentiation of osteosarcoma cells: relevance to down-regulation of proteasome activity // *J Biol Chem*. 2007. Vol. 282, № 8. P. 5736-5748.
13. Kim S., Jeon B.S., Heo C., Im P.S., Ahn T.B., Seo J.H., Kim H.S., Park C.H., Choi S.H., Cho S.H. Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease // *FASEB J*. 2004. Vol. 18. P. 1615-1617.
14. Shin E.C., Cho S.E., Lee D.K., Hur M.W., Paik S.R., Park J.H., Kim J. Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages // *Mol Cells*. 2000. Vol. 10. P. 65-70.
15. Ager A. High endothelial venules and other blood vessels: critical regulators of lymphoid organ development and function // *Frontiers in immunology*. 2017. Vol. 8. P. 45.
16. Abou-Sleiman P.M., Muqit M.M., Wood N.W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease // *Nat. Rev. Neurosci*. 2006. Vol. 7. P. 207-219.
17. Pierdominici M., Barbati C., Vomero M., Locatelli S.L., Carlo-Stella C., Ortona E., Malorni W. Autophagy as a pathogenic mechanism and drug target in lymphoproliferative disorders // *FASEB J*. 2014. Vol. 28, № 2. P. 524-535.
18. Bertolo C., Roa S., Sagardoy A., Mena-Varas M., Robles E.F., Martinez-Ferrandis J.I., Sagaert X., Tousseyn T., Orta A., Lossos I.S., Amar S., Natkunam Y., Briones J., Melnick A., Malumbres R., Martinez-Climent J.A. LITAF, a BCL6 target gene, regulates autophagy in mature B-cell lymphomas // *Br J Haematol*. 2013. Vol. 162, № 5. P. 621-630.

Поступила в редакцию 01.09.17

E.V. Kosareva, T.O. Tolstolutskaia, N.S. Grishanova, V.G. Sergeev

INTENSITY OF ALPHA-SYNUCLEIN EXPRESSION IN LYMPHATIC NODES OF PATIENTS WITH LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

We investigated expression of alpha-synuclein in lymphatic nodes of patients with B-chronic lymphatic leukemia, lymphoma of the spleen marginal zone, and other non-lymphoproliferative diseases using immunohistochemistry. An increased expression of alpha-synuclein in the lymphocytes of the marginal lymph nodes of patients with lymphoproliferative diseases was detected. B-chronic lymphocytic leukemia was characterized by an increase in the intensity of luminescence in the mantle zone of lymphoid follicles of the cortical region by $68.9 \pm 12.5\%$ with respect to control. In addition, in the mantle zone, there were sometimes small groups of cells with high A-syn expression. The intensity of A-syn expression in cells of the mantle zone of patients with lymphoma of the marginal zone of the spleen was significantly higher than in comparison with patients in the control group (by $360.8 \pm 16.6\%$; $P < 0.001$) and patients with B-chronic lymphocytic leukemia (by $248.3 \pm 16.6\%$, $P < 0.001$). The obtained data testify to the possibility of using immunohistochemical detection of A-syn in lymph nodes for differential diagnosis of lymphoproliferative diseases.

Keywords: lymph nodes, lymphoproliferative diseases, alpha-synuclein.

REFERENCE

1. Staropoli J.F. Tumorigenesis and neurodegeneration: two sides of the same coin? in *Bioassays*. 2008, vol. 30, pp. 719-727.
2. Morris L.G., Veeriah S., Chan T.A. Genetic determinants at the interface of cancer and neurodegenerative disease, in *Oncogen*, 2010, vol. 29, pp. 3453-3464.
3. Garber K. Parkinson's disease and cancer: the unexplored connection, in *J Natl Cancer Inst*, 2010, vol. 102, pp. 371-374.
4. George S., Rey N.L., Reichenbach N., Steiner J.A., Brundin P. α -Synuclein: The Long Distance Runner, in *Brain Pathology*, 2013, vol. 23, pp. 350-357.
5. Kawashima M., Suzuki S. O., Dohura K., Iwaki T., in *Acta Neuropathol*, 2000, vol. 99, pp. 154-160.
6. Fung K.M., Rorke L.B., Giasson B., Lee V.M., Trojanowski J.Q., in *Acta Neuropathol*, 2003, vol. 106, pp. 167-175.
7. Bruening W., Giasson B.I., Klein-Szanto A.J., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary, in *Cancer*, 2000, vol. 88, pp. 2154-2163.
8. Ye Q., Wang T.F., Peng Y.F., Xie J., Feng B. Expression of alpha-, beta- and gamma-synuclein in colorectal cancer, and potential clinical significance in progression of the disease, in *Oncol Rep*, 2010, vol. 23, pp. 429-436.

9. Matsuo Y., Kamitani T. Parkinson's disease-related protein, alpha-synuclein, in malignant melanoma, in *PLoS One*, 2010, vol. e10481.
10. Maitta R.W., Wolgast L.R., Wang Q., Zhang H., Bhattacharyya P., Gong J.Z., Sunkara J., Albanese J.M., Pizzolo J.G., Cannizzaro L.A., Ramesh K.H., Ratch H. Alpha- and beta-synucleins are new diagnostic tools for acute erythroid leukemia and acute megakaryoblastic leukemia, in *Am J Hematol*, 2011, vol. 86, no 2, pp. 230-234.
11. Hashimoto M., Yoshimoto M., Sisk A., Hsu L.J., Sundsmo M., Kittel A., Saitoh T., Miller A., Masliah E., in *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, vol. 237, pp. 611-616.
12. Fujita M., Sugama S., Nakai M., Takenouchi T., Wei J., Urano T., Inoue S., Hashimoto M. alpha-Synuclein stimulates differentiation of osteosarcoma cells: relevance to down-regulation of proteasome activity, in *J Biol Chem*, 2007, vol. 282, no 8, pp. 5736-5748.
13. Kim S., Jeon B.S., Heo C., Im P.S., Ahn T.B., Seo J.H., Kim H.S., Park C.H., Choi S.H., Cho S.H. Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease, in *FASEB J*, 2004, vol. 18, pp. 1615-1617.
14. Shin E.C., Cho S.E., Lee D.K., Hur M.W., Paik S.R., Park J.H., Kim J. Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages, in *Mol Cells*, 2000, vol. 10, pp. 65-70.
15. Ager A. High endothelial venules and other blood vessels: critical regulators of lymphoid organ development and function, in *Frontiers in immunology*, 2017, vol. 8, pp. 45.
16. Abou-Sleiman P.M., Muqit M.M., Wood N.W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, in *Nat. Rev. Neurosci.* 2006, vol. 7, pp. 207-219.
17. Pierdominici M., Barbati C., Vomero M., Locatelli S.L., Carlo-Stella C., Ortona E., Malorni W. Autophagy as a pathogenic mechanism and drug target in lymphoproliferative disorders, in *FASEB J*, 2014, vol. 28, no 2, pp. 524-535.
18. Bertolo C., Roa S., Sagardoy A., Mena-Varas M., Robles E.F., Martinez-Ferrandis J.I., Sagaert X., Tousseyn T., Orta A., Lossos I.S., Amar S., Natkunam Y., Briones J., Melnick A., Malumbres R., Martinez-Climent J.A. LITAF, a BCL6 target gene, regulates autophagy in mature B-cell lymphomas, in *Br J Haematol*, 2013, vol. 162, no 5, pp. 621-630.

Косарева Елена Вячеславовна,
биолог клинко-диагностической лаборатории
E-mail: kosarevalena@list.ru

Толстолуцкая Татьяна Олеговна,
кандидат медицинских наук,
заведующая клинко-диагностической лабораторией
E-mail: ttolstolutskaya@ya.ru

БУЗ УР «Первая республиканская клиническая
больница МЗ УР»
426039, Россия, г.Ижевск, ул.Воткинское Шоссе, 57

Гришанова Наталья Стефановна, студентка
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1)
E-mail: nat.grin13@gmail.com

Сергеев Валерий Георгиевич,
доктор биологических наук, заведующий кафедрой
физиологии, клеточной биологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1)
заведующий учебно-экспериментальной лабораторией
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская
академия»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281
E-mail: cellbio@yandex.ru

Kosareva E.V.,
biologist of clinical and diagnostic laboratory
E-mail: kosarevalena@list.ru

Tolstolutskaya T.O.,
Candidate of Medicine, head of clinical
and diagnostic laboratory
E-mail: ttolstolutskaya@ya.ru

1st Republican Clinical Hospital
Votkinskoe Shosse st., 57, Izhevsk, Russia, 426039

Grishanova N.S., student
Udmurt State University
Universitetskaya st., 1, Izhevsk, Russia, 426034
E-mail: nat.grin13@gmail.com

Sergeev V.G.,
Doctor of Biology, Head of department of physiology,
cell biology and biotechnology
Udmurt State University
Universitetskaya st., 1, Izhevsk, Russia, 426034;
Head of educational and research laboratory
Izhevsk State Medical Academy
Kommunarov st., 281, Izhevsk, Russia, 426034
E-mail: cellbio@yandex.ru