

ДОФАМИН ПЛАЗМЫ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В CD45⁺-КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© А. К. Емельянов,^{1–3,*} А. О. Лавринова,¹ Е. М. Литусова,¹ Д. Г. Кулабухова,^{1,2}
И. В. Милюхина,^{1,2,4} О. А. Беркович,² С. Н. Пчелина^{1–4}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300,

² Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197022,

³ С.-Петербургский национальный исследовательский Академический университет
РАН Санкт-Петербург, 194021, и

⁴ Институт экспериментальной медицины, 197376;
* электронный адрес: e_anton_gen@mail.ru

В настоящее время считается, что в основе нейродегенерации при болезни Паркинсона (БП) лежит агрегация небольшого пресинаптического белка альфа-синуклеина (SNCA). Предполагается, что гибель дофаминергических нейронов при БП может быть опосредована влиянием дофамина на процесс его олигомеризации. В настоящем исследовании с использованием иммуноферментного анализа мы провели оценку концентрации дофамина в плазме периферической крови у пациентов со спорадической формой БП (сБП) ($n = 50$), не принимающих Л-ДОФА-содержащих препаратов, и лиц без неврологических заболеваний ($n = 31$). Анализировали корреляцию уровня дофамина с уровнем мРНК гена *SNCA*, а также с уровнем общего и олигомерного альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках периферической крови. В результате исследования различий уровень дофамина в плазме периферической крови между группой пациентов с сБП и контрольной группой не обнаружили. Корреляции уровня дофамина плазмы с уровнем мРНК гена *SNCA*, общего и олигомерного альфа-синуклеина CD45⁺-клеток периферической крови указанных групп также не было выявлено. Полученные результаты предполагают отсутствие связи между экспрессией гена альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках и уровнем дофамина плазмы периферической крови.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, дофамин, ген *SNCA*, CD45⁺-клетки периферической крови

Принятые сокращения: БП — болезнь Паркинсона, ДН — дофаминергические нейроны, ИФА — иммуноферментный анализ, Л-ДОФА — 3,4-диоксифенилаланин, сБП — спорадическая форма болезни Паркинсона, ЦНС — центральная нервная система.

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное нейродегенеративное заболевание, при котором в дофаминергических нейронах (ДН) черной субстанции мозга человека наблюдается агрегация пресинаптического белка альфа-синуклеина, роль которого в патогенезе данного заболевания к настоящему времени показана неоднократно (Bridi, Hirth, 2018). Несмотря на то что альфа-синуклеин экспрессируется в различных отделах головного мозга, нейродегенерация при БП наблюдается в определенных областях центральной нервной системы (ЦНС) с преимущественной гибелью ДН в черной субстанции. Считается, что нарушение гомеостаза дофамина в ДН может способствовать развитию нейродегенерации при БП. К настоящему моменту появляется все больше данных,

полученных *in vitro*, которые показывают, что увеличение концентрации экзогенного дофамина влечет за собой повышение уровня агрегации альфа-синуклеина в клетке (Lee et al., 2011). Предполагается также его участие в регуляции экспрессии гена *SNCA* (Emelyanov et al., 2018), однако оценку влияния дофамина плазмы крови на уровень экспрессии *SNCA* у пациентов с БП не проводили.

В настоящем исследовании мы оценили концентрацию дофамина периферической плазмы пациентов со спорадической формой БП (сБП), не принимающих Л-ДОФА-содержащих препаратов, а также корреляцию этого показателя с уровнем мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках периферической крови.

Материал и методика

Обследуемые группы. В исследование включили 50 пациентов с диагнозом сБП (средний возраст 63.5 ± 10 лет, средний возраст начала заболевания 58.9 ± 9.4 года, 18 мужчин и 32 женщины) и отсутствием других неврологических заболеваний, а также 31 индивидуума без неврологических заболеваний в качестве контрольной группы (средний возраст 62.9 ± 10.3 года, 17 мужчин и 14 женщин). Пациенты были обследованы в центре нейродегенеративных заболеваний Института экспериментальной медицины, а группа контроля — в ПСПБГМУ им. акад. И. П. Павлова. Все индивидуумы контрольной группы проходили осмотр невролога с целью исключения неврологических заболеваний. Исследование одобрено этическим комитетом указанных медицинских учреждений и проводилось при информированном согласии пациентов.

Определение концентрации дофамина в плазме периферической крови. Концентрацию дофамина в плазме периферической крови оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора Dopamine ELISA (IBL, Германия) согласно прилагаемым инструкциям. Исследования каждого образца проводили в трех повторах. Оптическую плотность оценивали на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Получение фракции CD45⁺-клеток периферической крови. CD45⁺-клетки выделяли из 8 мл периферической крови центрифугированием в градиенте плотности раствора фикола (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Великобритания) с последующим проведением магнитного сортирования и использованием ручного сепаратора MACS (Miltenyi Biotec, США), а также колонок miniMACS типа MS (Miltenyi Biotec, США) согласно прилагаемой инструкции. Полученную клеточную смесь аликвотировали и замораживали при температуре -70°C .

Определение уровней общего и олигомерного белков альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках. Оценку уровня общего и олигомерного альфа-синуклеина проводили методом ИФА с использованием коммерческих наборов Human alpha-synuclein ELISA Kit (Invitrogen, США) и Human alpha-synuclein PATHO ELISA (Analytikjena, Германия) соответственно согласно прилагаемым инструкциям. Лизирование CD45⁺-клеток и оценку концентрации общего белка в лизатах проводили с использованием коммерческих наборов Total Protein Extraction Kit (Chemicon (Millipore), США) и Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, США) соответственно согласно прилагаемым инструкциям. Клеточные лизаты выравнивали по количеству общего белка (6 мкг на пробу). Исследования каждого образца проводили трижды. Оптическую плотность и уровень люминесценции оценивали на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) и спектрофлуориметре CLARIO Star (BMG LABTECH, Германия) соответственно.

Оценка уровня мРНК гена *SNCA*. Тотальную РНК выделяли из CD45⁺-клеток крови с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора Revert Aid First cDNA Synthesis kit (ThermoScientific, США) согласно условиям фирмы-производителя и хранили при -80°C .

Определение уровня мРНК гена *SNCA*, а также референсного гена *GNB2L1* проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческого набора, содержащего краситель-интеркалятор SYBR Green 1 (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad, США) на приборе CFX96 (BioRad, США). Оценку уровня мРНК указанных генов проводили с использованием разработанных с помощью программы PrimerExpress 3.0 праймеров (*SNCA* — FOR: 5'-TTCCAGTGTGGTGTAAAGAAATTCAT-3', REV: 5'-CCTTGGCCTTTGAAAGTCCTT-3'; *GNB2L1* — FOR: 5'-GAATACCCCTGGGTGTGTGCAA-3', REV: 5'-GGACA-CAAGACACCCACTCTGA-3') (ДНК-Синтез, Москва). Каждый образец амплифицировали в трех повторах с целью минимизации отклонения результатов. Оценку относительного уровня мРНК проводили с использованием метода 2^{-ΔΔCt}.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 21.0. Проверку полученных вариационных рядов на соответствие нормальному распределению проводили методом Шапиро—Уилка. Парное сравнение вариационных рядов проводили с использованием критерия Манна—Уитни. Оценку корреляций по указанным параметрам в исследуемых группах проводили с использованием коэффициента Спирмена. Значения $P < 0.05$ считали статистически значимыми. Данные представлены в виде медиан с указанием минимума и максимума (медиана (минимум—максимум)).

Использованные реактивы: Dopamine ELISA (IBL, Германия), Human alpha-synuclein ELISA Kit (Invitrogen, США), Human alpha-synuclein PATHO ELISA (Analytikjena, Германия), Total Protein Extraction Kit (Chemicon (Millipore), США), Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, США), RNeasy Mini Kit (Qiagen, США), Revert Aid First cDNA Synthesis kit (ThermoScientific, Литва) и SYBR Green 1 (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования не обнаружено различий при сравнении концентрации дофамина в плазме периферической крови группы пациентов с сБП (медиана (мин-макс): 0.145 (0.044—0.492), нг/мл) и группы контроля (медиана (мин—макс): 0.148 (0.059—0.285), нг/мл) ($P = 0.806$). Аналогичные результаты получены ранее в подобных зарубежных и отечественных исследованиях (Eldrup et al., 1995; Ahlskog et al., 1996; Андоскин и др., 2015). Следует подчеркнуть важность включения в исследование пациентов с БП, не получающих терапии Л-ДОФА-содержащими препаратами, поскольку прием данных препаратов оказывает влияние на уровень дофамина в плазме периферической крови (Eldrup et al., 1995; Chang et al., 2018). Известно также, что прием пациентами с БП данных препаратов может влиять на процесс метилирования регуляторной области *SNCA* и как следствие — на его экспрессию (Matsumoto et al., 2010; Schmitt et al., 2015).

В настоящем исследовании мы впервые оценили корреляцию уровня дофамина в плазме периферической крови пациентов с сБП и контроля с уровнем мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках тех же групп, показатели которых измерены ранее (см. таблицу) (Емельянов и др., 2016; Emelyanov et al., 2018). Выбор

Корреляция концентрации дофамина с уровнем мРНК гена *SNCA*, а также общим и олигомерным альфа-синуклеином в плазме крови пациентов с СБП и контроля

Параметр мРНК гена <i>SNCA</i>	Коэффициент корреляции, r	
	БП	контроль
Уровень мРНК гена <i>SNCA</i>	r = -0.111 (n = 20, P = 0.64)	r = -0.15 (n = 9, P = 0.7)
Общий альфа-синуклеин	r = -0.022 (n = 44, P = 0.885)	r = -0.137 (n = 29, P = 0.447)
Олигомерный альфа-синуклеин	r = -0.318 (n = 11, P = 0.34)	r = -0.205 (n = 8, P = 0.627)

Примечание. n — численность исследуемых групп.

в качестве объекта исследования CD45⁺-клеток периферической крови обусловлен их схожестью с ДН по ряду биохимических изменений, происходящих в результате развития БП, а также тем, что на мембране лимфоцитов представлены все виды рецепторов дофамина, дофаминовый транспортер, в них происходит синтез дофамина с участием тирозингидроксилазы (Buttarelli et al., 2011).

Следует отметить, что в большинстве проведенных к настоящему моменту исследований оценку уровня мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина проводили в лимфоцитарной фракции периферической крови, полученной в результате градиентного центрифугирования на фиколе (Fuchs et al., 2008; Brighina et al., 2010; Pchelina et al., 2011). Однако известно, что в выделенной таким образом фракции лимфоцитов присутствуют другие клетки, содержащие альфа-синуклеин, включая эритроциты (Boyum, 1968). Следует отметить, что среди всех клеток периферической крови основное количество альфа-синуклеина содержится в эритроцитах (Barbour et al., 2008). К настоящему времени многократно показано, что их гемолиз может влиять на показатели уровня общего альфа-синуклеина в плазме крови и спинно-мозговой жидкости (Hong et al., 2010; Shi et al., 2010; Emelyanov et al., 2016). Использование в настоящем исследовании метода магнитного сортирования после центрифугирования периферической крови в градиенте фикола и получения однородной фракции CD45⁺-клеток позволило исключить контаминацию образцов альфа-синуклеином эритроцитов.

Корреляции уровня дофамина плазмы как с уровнем мРНК гена *SNCA*, так и с уровнем общего и олигомерного альфа-синуклеина CD45⁺-клеток периферической крови указанных групп не обнаружено (см. таблицу). Следует отметить, что на уровень дофамина в плазме крови может влиять ряд факторов, включая прием пищи и лекарственных препаратов (Goldstein et al., 2003). Кроме того, в плазму крови дофамин может попадать непосредственно из CD45⁺-клеток, где происходит его синтез. В связи с этим для оценки взаимосвязи уровня дофамина и метаболизма альфа-синуклеина целесообразно оценивать уровень дофамина в CD45⁺-клетках с последующим сопоставлением его с нарушением метаболизма альфа-синуклеина в этих клетках.

Таким образом, можно предположить, что концентрация дофамина в плазме крови не влияет на экспрессию гена *SNCA* в CD45⁺-клетках крови.

Авторы выражают большую благодарность всем пациентам и лицам контрольной группы за принятие участия в данном исследовании.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01187).

Список литературы

- Андоскин П. А., Емельянов А. К., Николаев М. А., Сенкевич К. А., Шилин В. П., Тимофеева А. А., Якимовский А. Ф., Пчелина С. Н. 2015. Влияние дофамина плазмы на уровень альфа-синуклеина CD45⁺-клеток крови при болезни Паркинсона. Уч. зап. С.-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова. XXII (2) : 14—17.
- Емельянов А. К., Андоскин П. А., Милухина И. В., Тимофеева А. А., Якимовский А. Ф., Сенкевич К. А., Николаев М. А., Пчелина С. Н. 2016. Ассоциация rs356219 и rs356165 с болезнью Паркинсона и повышенной экспрессией гена альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках крови. Цитология. 58 (2) : 99—104. (Emelyanov A. K., Andoskin P. A., Miliukhina I. V., Timofeeva A. A., Yakimovskii A. F., Senkevich K. A., Nikolaev M. A., Pchelina S. N. 2016. *SNCA* rs356219 and rs356165 variants are associated with Parkinson's disease and increased alpha-synuclein gene expression in the CD45⁺-blood cells. 58 (2) : 99—104.)
- Ahlskog J. E., Uitti R. J., Tyce G. M., O'Brien J. F., Petersen R. C., Kokmen E. 1996. Plasma catechols and monoamine oxidase metabolites in untreated Parkinson's and Alzheimer's diseases. J. Neurol. Sci. 136 : 162—168.
- Barbour R., Kling K., Anderson J. P., Banducci K., Cole T., Diep L., Fox M., Goldstein J. M., Soriano F., Seubert P., Chilcote T. J. 2008. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. Neurodegener. Dis. 5 : 55—59.
- Böyum A. 1968. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 97 : 31—50.
- Bridi J. C., Hirth F. 2018. Mechanisms of α -synuclein induced synaptopathy in Parkinson's disease. Front. Neurosci. 12 : 80.
- Brighina L., Prigione A., Begni B., Galbusera A., Andreoni S., Piolti R., Ferrarese C. 2010. Lymphomonocyte alpha-synuclein levels in aging and in Parkinson's disease. Neurobiol. Aging. 31 : 884—885.
- Buttarelli F. R., Fanciulli A., Pellicano C., Pontieri F. E. 2011. The dopaminergic system in peripheral blood lymphocytes: from physiology to pharmacology and potential applications to neuropsychiatric disorders. Curr. Neuropharmacol. 9 : 278—288.
- Chang K. H., Cheng M. L., Tang H. Y., Huang C. Y., Wu Y. R., Chen C. M. 2018. Alternations of metabolic profile and kynurenine metabolism in the plasma of Parkinson's Disease. Mol. Neurobiol. Doi: 10.1007/s12035-017-0845-3.
- Eldrup E., Mogensen P., Jacobsen J., Pakkenberg H., Christensen N. J. 1995. CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epinephrine in Parkinson's disease. Acta Neurol. Scand. 92 : 116—121.

Emelyanov A., Andoskin P., Pchelina S. 2016. Dataset of total, oligomeric alpha-synuclein and hemoglobin levels in plasma in Parkinson's disease. *Data Brief*. 10 : 182—185.

Emelyanov A., Kulabukhova D., Garaeva L., Andoskin P., Pchelina S. 2018. SNCA variants and alpha-synuclein level in CD45⁺ blood cells in Parkinson's disease. *Neurol. Sci.* (In press).

Feany M., Bender W. 2000. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*. 404 : 394—398.

Fuchs J., Tichopad A., Golub Y., Munz M., Schweitzer K. J., Wolf B., Berg D., Mueller J. C., Gasser T. 2008. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J.* 22 : 1327—1334.

Goldstein D. S., Eisenhofer G., Kopin I. J. 2003. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 : 800—811.

Hong Z., Shi M., Chung K. A., Quinn J. F., Peskind E. R., Galasko D., Jankovic J., Zabetian C. P., Leverenz J. B., Baird G., Montine T. J., Hancock A. M., Hwang H., Pan C., Bradner J., Kang U. J., Jensen P. H., Zhang J. 2010. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain*. 133 : 713—726.

Kalia L., Lang A. 2015. Parkinson's disease. *The Lancet*. 386 : 896—912.

Lee H., Baek S., Ho D., Suk J., Cho E., Lee S. 2011. Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Exp. Mol. Med.* 43 : 216—222.

Matsumoto L., Takuma H., Tamaoka A., Kurisaki H., Date H., Tsuji S., Iwata A. 2010. CpG demethylation enhances alpha-synuc-

lein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 5 : e15522.

Pchelina S. N., Emelyanov A. K., Yakimovskii A. F., Miller D. W., Shabalina I. G., Drozdova A. S., Schwarzman A. L. 2011. Reduced content of alpha-synuclein in peripheral blood leukocytes of patients with LRRK2-associated Parkinson's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* 150 : 679—681.

Roberts H., Brown D. 2015. Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric alpha-synuclein. *Biomolecules*. 5 : 282—305.

Roberts R., Wade-Martins R., Alegre-Abarrategui J. 2015. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain. *Brain*. 138 : 1642—1657.

Schmitt I., Kaut O., Khazneh H., deBoni L., Ahmad A., Berg D., Klein C., Frohlich H., Wullner U. 2015. L-dopa increases alpha-synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients *in vivo* and *in vitro*. *Movement Disorders*. 30 : 1794—1801.

Shi M., Bradner J., Hancock A. M., Chung K. A., Quinn J. F., Peskind E. R., Galasko D., Jankovic J., Zabetian C. P., Kim H. M., Leverenz J. B., Montine T. J., Ginghina C., Kang U. J., Cain K. C., Wang Y., Aasly J., Goldstein D., Zhang J. 2011. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease diagnosis and progression. *Ann. Neurol.* 69 : 570—580.

Singleton A. 2003. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 302 : 841—841.

Поступила 15 III 2018

PLASMA DOPAMINE AND SNCA GENE EXPRESSION IN CD45⁺ PERIPHERAL BLOOD CELLS IN PARKINSON'S DISEASE

A. K. Emelyanov,^{1-3,*} A. O. Lavrinova,¹ E. M. Litusova,¹ D. G. Kulabukhova,^{1,2} I. V. Miliukhina,^{1,2,4} O. A. Berkovich,² S. N. Pchelina¹⁻⁴

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Leningrad Region, 188300,

² I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, 197022,

³ St. Petersburg National Research Academic University RAS, St. Petersburg, 194021, and

⁴ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376;

* e-mail: e_anton_gen@mail.ru

Alpha-synuclein (SNCA) aggregation is implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). In numerous studies an effect of dopamine on alpha-synuclein oligomerization was shown. In this study we evaluated plasma dopamine level in drug-naive sporadic PD (sPD) patients (n = 50) and controls (n = 31). The correlation between plasma dopamine level and gene expression, total and oligomeric alpha-synuclein levels in CD45⁺ peripheral blood cells was assessed. We found no difference in plasma dopamine level between sPD patients and controls. No correlation between plasma dopamine level and SNCA gene expression, total and oligomeric alpha-synuclein levels in CD45⁺ peripheral blood cells was observed. Thus, our data suggest that there is no link between alpha-synuclein gene expression in CD45⁺ cells and plasma dopamine level.

Key words: Parkinson's disease, alpha-synuclein, dopamine, SNCA gene, CD45⁺ peripheral blood cells