

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ, ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И МОДЕЛИРОВАНИИ ПАРКИНСОНИЗМА

Д.Н. Воронков, В.Н. Сальков, О.В. Сальникова, В.Б. Соболев, Р.М. Худоерков

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва

Цель исследования – иммуногистохимически охарактеризовать распределение альфа-синуклеина в структурах нервной системы интактных животных, в эксперименте и при болезни Паркинсона (БП). У интактных крыс Вистар α -Syn локализовался в синаптических окончаниях разных медиаторных систем, а в телах нейронов – преимущественно в области ядер ствола и в среднем мозге, которые наиболее подвержены нейродегенерации при БП. Обнаружена различная локализация α -Syn и его фосфорилированной по серину-129 формы в зависимости от клона используемых антител. На ротеноновой модели паркинсонизма, а также на аутопсийном и биопсийном материале, взятом у лиц с БП, показано накопление фосфорилированного α -Syn по мере развития дегенеративного процесса. Охарактеризовано несколько типов агрегатов α -Syn, отражающих этапы созревания и формирования многослойной структуры телец Леви при болезни Паркинсона.

Ключевые слова: альфа-синуклеин, болезнь Паркинсона, иммуногистохимия, тельца Леви

В настоящее время накоплено множество фактов, подтверждающих участие альфа-синуклеина (α -Syn) в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в первую очередь болезни Паркинсона (БП) [3, 9]. Предполагается, что прионоподобное распространение патологических форм α -Syn в нервной системе по межнейрональным связям приводит к последовательному повреждению и дегенерации вначале структур периферической, а затем и центральной нервной системы [7]. Однако причины повышенной уязвимости нейронов черной субстанции (ЧС) остаются невыясненными.

Альфа-синуклеин, по-видимому, связан с синаптической передачей, так как он взаимодействует с синаптическими везикулами, участвует в аксональном транспорте и регуляции функциональной активности митохондрий [9, 34]. В нервной ткани содержится до 1% α -Syn в цитозольном белке, вырабатывается он преимущественно в нейронах и, вероятно, в олигодендроглиоцитах на разных стадиях дифференцировки, а кроме того α -Syn обнаруживается в гемоцитобластах и форменных элементах крови [12, 22, 35]. В клетке α -Syn находится в динамическом равновесии между свободной и мембраносвязанной формами. При патологии конформационные изменения α -Syn приводят

к образованию различных олигомерных форм белка, которые отличаются размерами, формой и проявлением токсических свойств [13]. Олигомеры способны образовывать фибриллярные структуры, которые при агрегации в нейронах формируют нерастворимые белковые включения – тельца Леви. Тем не менее остается неясным, является ли формирование нерастворимых внутриклеточных агрегатов α -Syn побочной реакцией при нейродегенеративном процессе, проявлением нейропротекции или повреждающим клетку фактором [22]. Морфогенез телец Леви не выяснен полностью, а локализация α -Syn в нервной системе в условиях нормы требует уточнения, поскольку отмечаются расхождения в результатах, получаемых на разных видах животных и с разными клонами антител [14, 19, 38]. Для практических целей перспективны исследования, направленные на выявление α -Syn в качестве биомаркера, что необходимо для совершенствования патоморфологической диагностики БП, в том числе прижизненной, на ранних стадиях заболевания.

Цель исследования – охарактеризовать распределение альфа-синуклеина в структурах нервной системы в норме, его патологическую агрегацию при моделировании паркинсонизма и при болезни Паркинсона.

Материалы и методы

Локализацию α -Syn исследовали у интактных крыс Вистар в головном, спинном мозге и периферической нервной системе. Кроме того, исследовали локализацию α -Syn в стриатуме крыс при повреждении дофаминовых нейронов черной субстанции, через 4 недели после одностороннего стереотаксического введения 6 мкг 6-гидроксидофамина гидрохлорида (6-OHDA, Sigma-Aldrich, Германия) в 3 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты. Локализацию α -Syn в обонятельных луковицах крыс оценивали также на модели с интраназальным введением ротенона, который растворяли в диметилсульфоксиде, из расчета 2,5 мг/кг, и вводили его животным 2 недели, с интервалом через день. На аутопсийном мозге лиц с БП (материал получали из лаборатории патологической анатомии Научного центра неврологии и исследовали его с разрешения локального этического комитета) выявляли тельца и нейриты Леви в ЧС. Биопсийные образцы слюнных желез брали у пациентов с БП и у неврологически здоровых людей, оценивая тельца и нейриты Леви в периферических нервных волокнах (биоптаты брали сотрудники МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского у пациентов, дававших письменное согласие на проведение биопсии). Биопсийные образцы фиксировали в растворе формалина и готовили замороженные либо парафиновые срезы, которые для демаскировки антигенов обрабатывали или муравьиной кислотой, или цитратным буфером (рН=6,0) в микроволновой печи. Общий α -Syn выявляли с помощью поликлональных антитела кролика к С-концевому фрагменту белка (Sigma-Aldrich, S3062, Германия). Фосфорилированный по остатку серина 129 α -Syn (α -Syn-p129) выявляли моноклональными антителами разных производителей: Biolegend (клон PSyn/81A, США), Wako (PSyn #64, Япония), Abcam (EP1536Y, США). Кроме того, иммуногистохимически выявляли астроцитарную глию (GFAP), синаптические структуры (синаптофизин), белки нейрофиламентов и лектин IB4 для исследования микроглии и периферических нейронов. Реакцию связывания антител определяли при помощи меченных флуорохромов CF448 или CF555, соответствующих вторичных антител (Sigma-Aldrich, Германия) или пероксидазным методом (набор Sigma-Aldrich EXTRA3KIT, Германия, набор ThermoFisher UltraVison, США). Препараты исследовали и документировали под микроскопом Nikon Eclipse Ni-u (Япония), оснащенный цифровой фотокамерой Nikon Ds-Qi1 и программами анализа изображений.

Результаты и обсуждение

Распределение α -Syn в головном и спинном мозге

Имуногистохимически α -Syn определяли во всех отделах мозга интактных животных, но больше всего его находили в слое IV коры головного мозга, обонятельных бугорках и пириформной коре (слой I), гиппокампе (мшистые волокна зубчатой фасции), обоня-

тельных луковицах (гломерулярный слой), переднем обонятельном ядре, амигдаларном комплексе, дорсальных ядрах таламуса, ретикулярной части черной субстанции (рис. 1 А) и в гранулярном и молекулярном слоях коры мозжечка. В стволовом отделе мозга α -Syn выявляли в парабрахальном ядре, голубом пятне, дорсальном комплексе ядер вагуса. Пресинаптическая локализация α -Syn подтверждалась совместным окрашиванием с синаптофизин (рис. 1 Б).

В результате обнаружили, что α -Syn лишь отчасти связан с дофаминергическими структурами и его высокое содержание наблюдается как в глутаматергических, так и ГАМК-ергических окончаниях, что совпадает с данными других авторов [35]. Указанное распределение α -Syn в нейрохимически разных структурах мозга было установлено нами при одностороннем разрушении дофаминовых нейронов ЧС мозга крыс нейротоксином 6-гидроксидофамином, который не снижал значительно интенсивность иммуноокрашивания на α -Syn в стриатуме [2].

У интактных животных наряду с пресинаптической локализацией α -Syn выявляли и в соме нейронов, в основном в дофаминергических или норадренергических структурах, которые соответствуют предполагаемым путям распространения патологических форм α -Syn при БП [7]: дорсальное двигательное ядро блуждающего нерва, голубое пятно, компактная часть черной субстанции, вентральное поле покрывки, а также обонятельные сенсорные нейроны, перигломерулярные нейроны обонятельных луковиц и ядер гипоталамуса, что сопоставимо с результатами других авторов [14, 19, 23]. Вместе с тем в ядрах нейронов α -Syn мы не находили. Следует отметить локализацию α -Syn в сенсорных структурах, что может иметь значение в патогенезе недвигательных симптомов, наблюдаемых при БП, – помимо обонятельного эпителия он обнаруживался в ганглиозных клетках сетчатки и на синапсах внешних реснитчатых клеток внутреннего уха, что показали и другие исследователи [5, 33]. Кроме того, мы обнаружили цитоплазматическое окрашивание чувствительных нейронов спинального ганглия и их окончаний в области дорсальных рогов спинного мозга. На срезах спинного мозга при совместном выявлении α -Syn и непертидергических нейронов (окрашивание лектином IB4) области их локализации перекрывались незначительно. Согласно нашим результатам, α -Syn в спинальном ганглии в основном локализовался в клетках, которые не окрашиваются лектином IB4 и в литературе [8] характеризуются как пептидергические ноцицептивные нейроны, дающие проекции во внешнюю часть пластины II и первую пластину Рекседа в дорсальных рогах спинного мозга.

Очевидно, обнаруживаемая у интактных животных высокая экспрессия α -Syn в структурах мозга, входящих в предполагаемый путь распространения патологических форм белка [7], повышает их уязвимость при патологическом процессе и вероятность формирования агрегатов α -Syn.

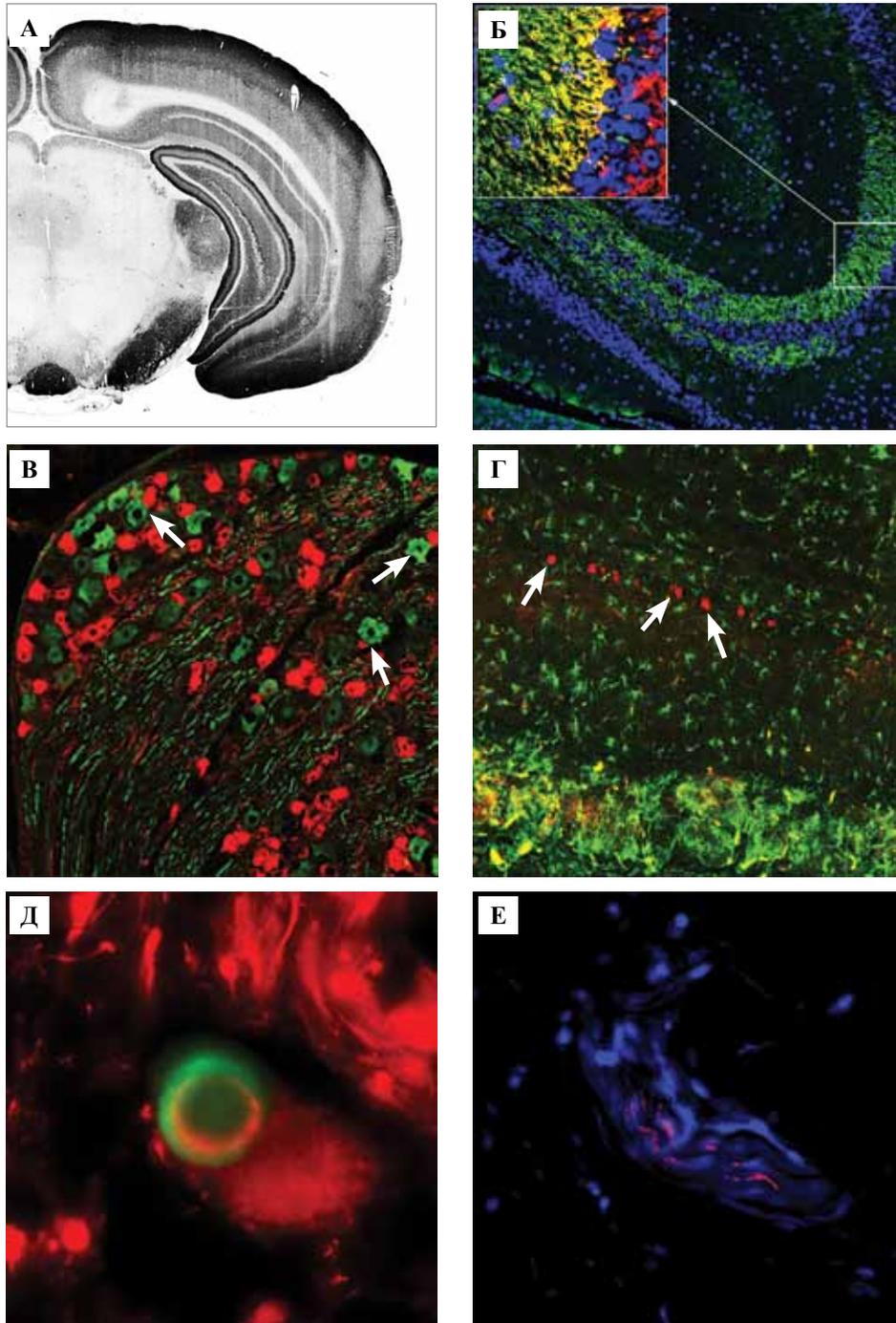


Рис. 1. Выявление альфа-синуклеина (a-Syn) в норме, при моделируемом паркинсонизме и болезни Паркинсона.

А – распределение a-Syn в структурах мозга крысы, на уровне черной субстанции.

Фронтальный срез, правое полушарие. Иммунопероксидазная реакция. $\times 0,75$

Б – пресинаптическая локализация a-Syn в гиппокампе крысы ($\times 4$). На вставке представлен фрагмент зубчатой фасции.

Обозначения: локализация синаптофизина (SP) – красным, локализация a-Syn – зеленым, ядра клеток (окрашены DAPI) – синим

В – цитоплазматическая локализация фосфорилированного a-Syn в нейронах спинального ганглия (антитела pSyn81/A)

интактной крысы, указано стрелками. Обозначения: красным – лектин IB4, зеленым – a-Syn. $\times 10$

Г – накопление фосфорилированного a-Syn (указано стрелками) в нейронах митрального слоя обонятельных луковиц мозга крысы после интраназального введения ротенона.

Обозначения: красным – фосфорилированный a-Syn, зеленым – GFAP, астроглия. $\times 4$

Д – черная субстанция мозга человека, концентрическая структура телец Леви.

Обозначения: красным – нейрофиламенты, зеленым – альфа-синуклеин. $\times 100$

Е – выявление нервного волокна, содержащего фосфорилированный a-Syn, в биопсийном материале слюнной железы пациента с болезнью Паркинсона. Обозначения: красным – фосфорилированный a-Syn, синим – окрашивание DAPI. $\times 40$

Локализация фосфорилированной формы α -Syn в норме

Фосфорилированный по серину α -Syn (α -Syn-p129) обнаруживается в тельцах Леви и служит маркером патологической агрегации белка [20, 26]. При этом исследования распределения и локализации α -Syn-p129 в периферической нервной системе (ПНС) у пациентов с БП показывают противоречивые результаты [10, 18, 29], демонстрируя различную чувствительность и специфичность, что связано как с особенностями постановки иммуногистохимической реакции, так и с различиями клонов антител, использованных в этих работах. Кроме того, фосфорилирование α -Syn, по-видимому, важно для взаимодействия белка с мембранами [6, 24] и происходит также и в норме.

В связи с тем, что локализация α -Syn-p129 в норме требует уточнения, а используемые антитела могут влиять на результаты диагностического исследования, мы провели анализ выявления α -Syn-p129 с помощью моноклональных антител, относящихся к разным клонам, в спинальном ганглии и спинном мозге крыс. Обнаружилось, что разные антитела к α -Syn-p129 демонстрировали сходную, но не однотипную реакцию связывания. Локализацию, наиболее соответствующую реакции на общий α -Syn, наблюдали с антителами EP1536Y. Тем не менее у части нейронов спинального ганглия антитела к EP1536Y и P-syn#64 связывались с клеточными ядрами. Антитела P-syn/81A выявляли α -Syn-p129 в соме нейронов спинального ганглия (рис. 1 В). Упомянутые антитела избирательно связывались с популяцией IB4-негативных нейронов, а кроме того было отмечено их связывание с периферическими GFAP-негативными глиальными клетками в спинальном ганглии. Вслед за другими авторами [25, 34, 38] мы можем предположить, что различия в локализации белка с антителами разных клонов могут быть связаны с изменением конформации α -Syn, что приводит к недоступности для антител определенных эпитопов белка и отражает внутриклеточную динамику фосфорилированного и нефосфорилированного α -Syn, а также его взаимодействия с другими белками.

В то же время неоднозначность результатов, полученных при окрашивании разными антителами к фосфорилированному α -Syn, может указывать на их неспецифическое связывание, в том числе с другими белками этого семейства, а локализация фосфорилированного α -Syn в структурах ПНС в норме и при патологии требует дальнейшего анализа, особенно в свете обсуждаемой перспективы использования фосфорилированного α -Syn как биомаркера БП [4, 21, 39].

Патологическая агрегация α -Syn в эксперименте и при болезни Паркинсона

Для оценки возможности выявления и особенностей агрегации α -Syn при моделировании БП нами было проведено интраназальное введение ротенона крысам. Ротенон – ингибитор митохондриального дыхания,

используемый как пестицид, вызывает окислительный стресс, нарушает синтез и сборку белков цитоскелета, репликацию ДНК и везикулярный транспорт медиаторов [32, 37]. В головном мозге он оказывает наибольшее воздействие на дофаминовые нейроны. Это, вероятно, способствует образованию токсичных продуктов неферментативного окисления дофамина, которые могут приводить к дисфункции убиквитин-протеасомной системы и патологической агрегации α -Syn [32], что, впрочем, подтверждают работы о накоплении α -Syn нейронами черной субстанции под действием ротенона [40]. Предполагается, что одним из основных патогенетических механизмов БП является распространение патологических форм α -Syn в передний мозг через периферический отдел обонятельного анализатора, а распространение патологических форм в ствол мозга через блуждающий нерв происходит из кишечника [36]. В то же время работы об изменениях в обонятельных структурах под влиянием ротенона противоречивы [27, 30]. В нашем исследовании у животных, получавших ротенон интраназально, по сравнению с контролем статистически значимо снижалась плотность перигломерулярных дофаминовых нейронов (на 45%) и увеличивалась плотность микроглии (на 16%). При выявлении α -Syn-p129 в группе контроля обонятельные гломерулы окрашивались слабо, а под действием ротенона окрашивание увеличивалось. При этом локализация фосфорилированного синуклеина не только соответствовала распределению общего α -Syn, но и обнаруживалась в телах клеток митрального слоя обонятельных луковиц (рис. 1 Г), а число клеток митрального слоя не менялось. Важно, что общий α -Syn не находили в соме митральных нейронов контрольной группы, что свидетельствует об изменении его локализации в клетке при фосфорилировании. Выявленное нами накопление фосфорилированной формы белка в митральных клетках согласуется с результатами, полученными на мышах с мутантным геном α -Syn [36], и с работой, выполненной методами электрофизиологии [30], о дисфункции митральных клеток при введении ротенона. Обнаружены накопления фосфорилированного α -Syn в митральном слое подтверждает предположение об участии связей обонятельного анализатора в распространении патологических форм белка, так как аксоны митральных нейронов проецируются в пириформную кору и переднее обонятельное ядро, а эти структуры, в свою очередь, имеют многочисленные связи со структурами переднего мозга, в которых показано накопление телец Леви при БП.

Тельца Леви в эксперименте мы не наблюдали, что может объясняться длительностью их формирования у человека, поэтому для уточнения особенностей их морфологии был использован аутопсийный материал мозга человека. При исследовании локализации общего и фосфорилированного α -Syn в ЧС аутопсийного мозга людей, не имевших неврологической патологии в анамнезе (контрольная группа), тельца Леви находи-

ли исключительно у лиц старческого возраста, старше 75 лет (в трех из десяти исследованных случаев) [1]. В аутопсийном мозге людей с БП стадия 3 по шкале Хен–Яра – женщина 47 лет (смешанная форма), мужчины 59 лет (дрожательно-ригидная форма) и 70 лет (смешанная форма) – тельца Леви находили в ЧС во всех случаях [1], причем плотность их распределения, количество в нейронах и их размеры были больше, чем в контроле. Кроме того, в телах и отростках нейронов обнаруживали округлые α -Syn-позитивные включения (или агрегаты) и вытянутые, деформированные нейриты Леви, которые давали иммунопозитивное окрашивание со всеми использованными в работе антителами к α -Syn-p129. Площадь одного α -Syn-позитивного включения составляла в среднем $56,7 \pm 2,8$ мкм². В зависимости от размеров, формы и локализации агрегатов их разделили с помощью кластерного анализа на три типа [1]: тип 1 – мелкие образования, тип 2 – крупные и округлые образования, определяемые как в телах, так и в отростках нейронов, сюда же отнесли и вытянутые нейриты Леви, и тип 3 – переходные формы, локализовавшиеся в отростках нейронов. В агрегатах типа 1 и типа 2 (46% случаев из 422 исследованных включений) наружный слой имел вид кольца и интенсивно окрашивался на α -Syn, а центральная их часть на α -Syn окрашивалась слабо (рис. 1 Д). В агрегатах типа 3 кольцевидное окрашивание на α -Syn выявили лишь в 17,5% случаев, а большая их часть окрашивалась равномерно. По-видимому, уплотнение диффузных белковых агрегатов («бледных телец») со временем приводит к формированию телец Леви со слоистой структурой [16, 17]. Снижение окрашивания на α -Syn в центральной части свидетельствует о «созревании» белковых включений и может быть связано с убиквитинилированием и другими модификациями синуклеина или малой доступностью центральной части телец Леви для антител.

Кроме того, в телах Леви обнаруживали и нейрофиламенты, причем их концентрическую локализацию, сходную с локализацией α -Syn, выявили лишь в одной трети агрегатов. Сравнение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на α -Syn, белок нейрофиламентов и синаптофизин показало, что пик интенсивности окрашивания на нейрофиламенты смещен к центру телец Леви, а локализация синаптофизина и α -Syn совпадает.

Наличие внешнего слоя (гало) и ядра в телах Леви определяется при окрашивании эозином в световом микроскопе и электронномикроскопически [31]. По данным литературы, в телах Леви иммуногистохимически обнаруживают не менее 70 разных белков [31], в том числе убиквитин, синаптофизин и белки нейрофиламентов. Продемонстрированная слоистая организация α -Syn-позитивных включений при БП подтверждается исследованиями других авторов [16]. В целом агрегация белков цитоскелета и синаптофизина при БП, очевидно, связана с наруше-

ниями структуры аксонов и везикулярного транспорта в нейронах ЧС [28].

Возможности прижизненной патоморфологической диагностики БП

Выявление ранних симптомов БП, основанное на оценке накопления α -Syn в вегетативных нервных волокнах, представляется весьма перспективным для клинической диагностики, поскольку вегетативные нарушения часто предшествуют появлению двигательных расстройств при БП [3, 11]. Раннее выявление α -Syn у пациентов с экстрапирамидной патологией важно для дифференциальной диагностики БП с другими нейродегенеративными заболеваниями и может принципиально влиять на тактику лечения и прогноз болезни [3]. Работы по прижизненному обнаружению агрегатов α -Syn в структурах периферической нервной системы и оценке его диагностического значения ведутся разными группами исследователей на биопсийных образцах толстой кишки, кожи, слюнных желез [4, 21, 39]. В настоящем исследовании в связи с малой инвазивностью проводимой операции использовали биопсийный материал подъязычной слюнной железы, который брали у пациентов с БП и у лиц контрольной группы (неврологически здоровых). Обнаружено, что нефосфорилированный α -Syn локализовался в крупных нервно-сосудистых пучках слюнной железы (рис. 1 Е) и в отдельных волокнах вокруг ацинусов железы. Сходную локализацию имел и фосфорилированный α -Syn. У пациентов с БП в пяти случаях из восьми скопления α -Syn-p129 выявляли в нервных волокнах, содержащих тирозингидроксилазу. У двух пациентов в ранний период заболевания (стадия 1 по Хен–Яру) α -Syn-p129 не определялся. При этом у одного из неврологически здоровых пациентов α -Syn-p129 выявляли в двух срезах из 25 (с минимальной частотой). Для уточнения значения выявления α -Syn у неврологически здоровых лиц требуются дальнейшие исследования. Так, усиление фосфорилирования α -Syn при старении может быть причиной ложноположительных результатов [15], что согласуется с нашими данными, полученными при исследовании мозга людей старческого возраста. Исход исследования может зависеть и от специфичности используемых антител. В целом полученные данные демонстрируют накопление фосфорилированного α -синуклеина в периферических нервных окончаниях у пациентов с БП и свидетельствуют о возможности прижизненной оценки патологической агрегации α -Syn на биопсийном материале слюнных желез.

Заключение

Обобщая представленные результаты, можно отметить, что α -синуклеин широко распространен в нервной системе, а его локализация не ограничивается дофаминергическими структурами. Кроме того, полученные данные позволяют предположить, что особенностью дофаминергических структур, вовле-

ченных в предполагаемый путь распространения патологического α -синуклеина при болезни Паркинсона, является локализация этого белка или одной из его форм в перикарионе нейронов. Фосфорилированный α -синуклеин обнаруживается в нервной системе и в норме, но при болезни Паркинсона наблюдается его накопление, изменение локализации в клетке и формирование агрегатов, что позволяет делать выводы о характере и особенностях течения нейродегенеративного процесса. Агрегаты α -синуклеина в нейронах ЧС могут быть разделены на несколько типов, отражающих этапы их созревания и формирования классических телец Леви с концентрической многослойной структурой. И тем не менее вопрос, свидетельствует ли наличие этих агрегатов у неврологически здоровых людей о ранней стадии синуклеинопатии или оно связано с физиологическим старением, остается открытым.

Литература/References

1. Воронков Д.Н., Сальков В.Н., Ануфриев П.Л., Худоевков Р.М. Тельца Леви при болезни Паркинсона (гистологическое, иммуногистохимическое и интерферометрическое исследование) // Архив патологии. 2018. Т. 80, № 4. С. 9–13 [Voronkov D.N., Salkov V.N., Anufriev P.L., Khudoerkov R.M. Lewy bodies in Parkinson's disease: histological, immunohistochemical, and interferometric examinations // *Arkhiv patologii*. 2018. V. 80, No 4. P. 9–13. (In Russ.)].
2. Воронков Д.Н., Худоевков Р.М., Сальникова О.В., Соболев В.Б. Локализация альфа-синуклеина в мозгу крысы и ее взаимосвязь с дофаминергическими структурами // Морфология. 2017. Т. 151, № 1. С. 7–13 [Voronkov D.N., Khudoerkov R.M., Sal'nikova O.V., Sobolev V.B. Localization of α -Synuclein in the Rat Brain and Its Relationship with Dopaminergic Structures // *Morfologiya*. 2017. V. 151, No 1. P. 7–13 (In Russ.)].
3. Иллариошкин С.Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона // Неврологический журнал. 2015. Т. 20, № 4. С. 4–13 [Illarioshkin S.N. Modern view on etiology of Parkinson's disease // *Nevrologicheskiy zhurnal*. 2015. V. 20, No 4. P. 4–13 (In Russ.)].
4. Соболев В.Б., Худоевков Р.М. Иммуногистохимическое выявление α -синуклеина в слюнной железе как биомаркер болезни Паркинсона // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. 2017. № 2. С. 16–23 [Sobolev V.B., Khudoerkov R.M. Immunohistochemical assessment of α -synuclein in salivary glands as a biomarker of Parkinson's disease // *Byulleten' Natsional'nogo obshchestva po izucheniyu bolezni Parkinsona i rasstroistv dvizhenii*. 2017. V. 2. P. 16–23 (In Russ.)].
5. Akil O., Weber C.M., Park S.N., Ninkina N. et al. Localization of Synucleins in the Mammalian Cochlea // *JARO: Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2008;9(4): 452–63.
6. Arawaka S., Sato H., Sasaki A., Koyama S. et al. Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in alpha-synuclein aggregates // *Acta Neuropathologica Communications*. 2017;1(5):48.
7. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197–211.
8. Braz J.M., Nassar M.A., Wood J.N., Basbaum A.I. Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor // *Neuron*. 2005;47(6):787–93.
9. Burré J. The Synaptic Function of α -Synuclein // *J Parkinsons Dis*. 2015;5(4):699–713. doi: 10.3233/JPD-150642.
10. Corbillé A.G., Letournel F., Kordower J.H., Lee J. et al. Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies // *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4:35. doi: 10.1186/s40478-016-0305-8.
11. Dickson D.W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2012;2(PII):a009258. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258>.
12. Djelloul M., Holmqvist S., Boza-Serrano A., Azevedo C. et al. Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models // *Stem Cell Reports*. 2015;5(2):174–84.
13. Fusco G., Chen S.W., Williamson P.T.F., Cascella R. et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers // *Science*. 2017;358(6369):1440–43.
14. Huang Z., Xu Z., Wu Y., Zhou Y. Determining nuclear localization of alpha-synuclein in mouse brains // *Neuroscience*. 2011;199:318–32.
15. Jellinger K.A. Lewy body-related α -synucleinopathy in the aged human brain // *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2004;111(10–11):1219–35.
16. Kanazawa T., Uchihara T., Takahashi A., Nakamura A. et al. Three-Layered Structure Shared Between Lewy Bodies and Lewy Neurites –Three-Dimensional Reconstruction of Triple-Labeled Sections // *Brain Pathol*. 2008;18(3):415–22.
17. Kuusisto E., Parkkinen L., Alafuzoff I. Morphogenesis of Lewy Bodies: Dissimilar Incorporation of α -Synuclein, Ubiquitin, and p62 // *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(12):1241–53.
18. Lee J.M., Derkinderen P., Kordower J.H., Freeman R. The Search for a Peripheral Biopsy Indicator of α -Synuclein Pathology for Parkinson Disease // *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017;76(1):2–15. doi: 10.1093/jnen/nlw103.
19. Li J., Henning J.P., Dahlstrom A. Differential localization of alpha-, beta- and gamma-synucleins in the rat CNS // *Neuroscience*. 2002;113(2):463–78.
20. Ma M.R., Hu Z.W., Zhao Y.F., Chen Y.X. et al. Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation // *Scientific Reports*. 2016;6:37130. <https://doi.org/10.1038/srep37130>.
21. Malek N., Swallow D., Grosset K.A., Aichtchik O. et al. Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease – a systematic review // *Acta Neurol Scand*. 2014;130(2):59–72.
22. Miraglia F., Ricci A., Rota L., Colla E. Subcellular localization of alpha-synuclein aggregates and their interaction with membranes // *Neural Regeneration Research*. 2018;13(7): 1136–44.

23. Mori F., Tanji K., Yoshimoto M., Takahashi H. et al. Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system // *Brain Res.* 2002;941(1–2):118–26.
24. Muntané G., Ferrer I., Martínez-Vicente M. α -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain // *Neuroscience.* 2012;200:106–19.
25. Nam M.K., Han J.H., Jang J.Y., Yun S.E. et al. A novel link between the conformations, exposure of specific epitopes, and subcellular localization of alpha-synuclein // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects.* 2015;12:2497–505.
26. Oueslati A. Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? // *J Parkinsons Dis.* 2016;6(1):39–51.
27. Rojo A.I., Cavada C., De Sagarra M.R., Cuadrado A. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats // *Exp Neurol.* 2007;208(1):120–6.
28. Rudrabhatla P. Regulation of neuronal cytoskeletal protein phosphorylation in neurodegenerative diseases // *J Alzheimers Dis.* 2014;41(3):671–84. <https://doi.org/10.3233/JAD-130794>
29. Ruffmann C., Bengoa-Vergniory N., Poggiolini I., Ritchie D. et al. Detection of alpha-synuclein conformational variants from gastro-intestinal biopsy tissue as a potential biomarker for Parkinson's disease // *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018;44(7):722–36. doi: 10.1111/nan.12486.
30. Sasajima H., Miyazono S., Noguchi T., Kashiwayanagi M. Intranasal Administration of Rotenone to Mice Induces Dopaminergic Neurite Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra // *Biol. Pharm. Bull.* 2017;40(1):108–12.
31. Shahmoradian S.H., Genoud C., Graff-Meyer A., Hench J. et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of a crowded organellar membranous medley // *BioRxiv.* Jan. 2017. <https://doi.org/10.1101/137976>.
32. Sherer T.B., Betarbet R., Testa C.M., Seo B.B. et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease // *J. Neurosci.* 2003;23:10756–64.
33. Surgucheva I., Weisman A.D., Goldberg J.L., Shnyra A. et al. γ -Synuclein as a marker of retinal ganglion cells // *Molecular Vision.* 2008;14:1540–8.
34. Surguchov A. Intracellular Dynamics of Synucleins: “Here, There and Everywhere” // *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015;320:103–69.
35. Taguchi K., Watanabe Y., Tsujimura A., Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-Synuclein // *J. Comp. Neurol.* 2016;524(6):1236–58.
36. 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;219(5):1513–26.
37. Uversky V.N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration // *Cell Tissue Res.* 2004;318:225–41.
38. Vivacqua G., Casini A., Vaccaro R., Fornai F. et al. Different subcellular localization of alpha-synuclein in the C57BL/6J mouse's central nervous system by two novel monoclonal antibodies // *J Chem Neuroanat.* 2011;41(2):97–110.
39. Yan F., Chen Y., Li M., Wang Y. et al. Gastrointestinal nervous system α -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease // *Medicine (Baltimore).* 2018;97(28):e11337. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011337>.
40. Zhang Z.N., Zhang J.S., Xiang J., Yu Z.H. et al. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study // *Brain Res.* 2017;15(1655):104–13.

IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF α -SYNUCLEIN IN THE NERVOUS SYSTEM OF INTACT ANIMALS, IN PARKINSON'S DISEASE AND PARKINSONISM MODELING

D.N. Voronkov, V.N. Salkov, O.V. Salnikova, V.B. Sobolev, R.M. Khudoerkov

Research Center of Neurology, Moscow

The purpose of the study is to characterize immunohistochemically the distribution of alpha synuclein (α -Syn) in the structures of the nervous system of intact animals, in the experiment and in Parkinson's disease (PD). In intact Wistar rats, α -Syn was localized in the synaptic terminals belonging to different mediatory systems and in the soma of neurons, predominantly in the nuclei of brain stem and midbrain, which are most susceptible to neurodegeneration in PD. We found that α -Syn and its serine-129 phosphorylated form were localized depending on the clone of antibodies used. Phosphorylated α -Syn accumulation was shown in the progression of the degenerative process in the rotenone model of parkinsonism, as well as in autopsies and biopsies from persons with PD. The types of aggregates of α -Syn that reflect the stages of maturation and the formation of the multilayered Lewy bodies in PD were described.

Key words: α -synuclein, Parkinson's disease, immunohistochemistry, Lewy bodies

Информация об авторах

Воронков Дмитрий Николаевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

Адрес: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. E-mail: neurolab@yandex.ru

Сальков Владимир Николаевич – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: vla-salkov@yandex.ru

Сальникова Ольга Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: fial88@mail.ru

Соболев Валерий Борисович – младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: vsobolev@outlook.com

Худоерков Рудольф Михайлович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: rolfbrain@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 24 октября 2018 года