

Выявление альфа-синуклеина в обонятельных луковицах мыши в онтогенезе *in vivo* и в органотипической культуре

Д.Н. Воронков, А.А. Лыжин, М.Р. Капкаева, Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспеков

ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

Введение. Агрегация альфа-синуклеина (α-Syn) считается причиной нейродегенерации при болезни Паркинсона. Накопление и агрегация α-Syn в обонятельных луковицах (ОЛ) предположительно приводят к нарушениям обоняния при паркинсонизме. Вместе с тем функция α-Syn и его локализация в ОЛ в норме требуют уточнения.

Цель исследования – охарактеризовать распределение α-Syn в онтогенезе ОЛ и оценить адекватность культивирования эксплантатов ОЛ как модельной системы для изучения патогенеза болезни Паркинсона.

Материалы и методы. Исследовали обонятельные луковицы эмбрионов беспородных мышей на 17-й и 19-й день внутриутробного развития и у новорожденных мышей в возрасте 2 и 7 дней. Экспланты ОЛ мышей 17-го эмбрионального дня и 2-го постнатального дня культивировали 24 часа в роллерной установке. Иммуногистохимическим методом исследовали локализацию α-Syn, синаптофизина и тирозингидроксилазы в обонятельных луковицах.

Результаты. Экспрессия α-Syn, синаптофизина и тирозингидроксилазы обнаруживалась в периферических слоях обонятельных луковиц и менялась по мере их созревания, однако локализация этих белков совпадала лишь частично. На 2-й день постнатального развития α-Syn выявляли в телах и отростках нейронов митрального слоя и в обонятельных клубочках. К 7-му дню α-Syn выявлялся преимущественно в пресинаптических окончаниях в обонятельных клубочках. В органотипической культуре организация ОЛ соответствовала их нативной структуре.

Выводы. Экспрессия α-Syn в развивающихся ОЛ связана с формированием обонятельных клубочков и созреванием клеток митрального слоя, а его распределение в норме согласуется с особенностями вовлечения обонятельных структур в нейродегенеративный процесс при болезни Паркинсона. Полученные данные демонстрируют возможность использования органотипических культур ОЛ для моделирования патологических процессов при болезни Паркинсона.

Ключевые слова: альфа-синуклеин, обонятельные луковицы, онтогенез, органотипическая культура.

Для корреспонденции: Дмитрий Николаевич Воронков. E-mail: voronkov@neurology.ru

Для цитирования: Воронков Д.Н., Лыжин А.А., Капкаева М.Р., Худоевков Р.М., Хаспеков Л.Г. Выявление альфа-синуклеина в обонятельных луковицах мыши в онтогенезе *in vivo* и в органотипической культуре. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):32–41. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.32-41

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научного центра неврологии. Номер госрегистрации АААА-А17-117030910135-3.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 09.09.2019. Получена после рецензирования 15.10.2019. Принята в печать 19.11.2019.

Alpha-synuclein detection in olfactory mouse bulbs in ontogenesis *in vivo* and in the organotypic culture

D.N. Voronkov, A.A. Lyzhin, M.R. Kapkaeva, R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Introduction. Alpha-synuclein (α-Syn) aggregation is considered as a cause of neurodegeneration in Parkinson's disease. Accumulation and aggregation of α-Syn in olfactory bulbs (OB) presumably leads to olfactory impairment in parkinsonism. However, the function of α-Syn and its localization in intact OB require more detailed research. The aim of the study was to characterize distribution of α-Syn in developing OB, and to assess the adequacy of OB explants cultivation as a model system for studying the pathogenesis of Parkinson disease.

Materials and methods. Mice OB were studied on 17 and 19 embryonic days and in postnatal 2 and 7 days. Explants of OB on 17-th embryonic day and 2nd postnatal day were cultured for 24 hours in roller culture

apparatus. Localization of a-Syn, synaptophysin and tyrosine hydroxylase were studied by immunohistochemical method.

Results. Expression of a-Syn, synaptophysin and tyrosine hydroxylase was found in the peripheral layers of olfactory bulbs and changed under development, however, the localization of these proteins coincided only partially. On day 2 of postnatal development, a-Syn was detected in the bodies and processes of neurons in the mitral layer and in the olfactory glomeruli. At day 7, a-Syn was detected predominantly in the presynaptic endings in the olfactory glomeruli. In organotypic culture, the organization of OB corresponded to their native structure.

Conclusions. In the developing OB α -Syn expression is associated with the formation of olfactory glomeruli and maturation of mitral layer cells. Distribution of α -Syn in intact OB consistent with the pattern of olfactory structures involvement in the neurodegenerative progression in Parkinson's disease. Moreover we demonstrate the possibility of using organotypic OB cultures for modeling pathological processes in Parkinson disease.

Key words: alpha-synuclein, olfactory bulbs, ontogenesis, organotypic culture.

Corresponding author: Dmitry N. Voronkov. E-mail: voronkov@neurology.ru

For citation: D.N. Voronkov, A.A. Lyzhin, M.R. Kapkaeva, R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov. Alpha-synuclein detection in olfactory mouse bulbs in ontogenesis *in vivo* and in the organotypic culture. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):32–41. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.32-41

Funding. The work was performed within the framework of the state assignment of Research center of neurology No. AAAA-A17-117030910135-3.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 09.09.2019. **Received in revised form** 15.10.2019. **Accepted** 19.11.2019.

Введение

Белок α -синуклеин (α -Syn), состоящий из 140 аминокислот, относится к белкам неглобулярной конформации и не имеет выраженной вторичной структуры. Подобные белки участвуют в белок-белковых взаимодействиях, вследствие чего становятся структурированными при связи с другими белками. В норме в центральной нервной системе α -Syn обнаруживается в нервных окончаниях и составляет около 1% общего белка головного мозга [1]. Вероятно, что в нейронах α -Syn связан с мембраной синаптических везикул, участвует в контроле их транспорта и вовлечен в регуляцию синаптической передачи, а также в синаптогенез и развитие сенсорных систем [2, 3]. Показана экспрессия α -Syn разными популяциями нейронов, в том числе дофаминергическими, – наиболее уязвимыми при болезни Паркинсона (БП). Высокая экспрессия синуклеина обнаруживается в содержащих тирозингидроксилазу нейронах дорсального моторного ядра вагуса, черной субстанции, обонятельных лукович (ОЛ) [4–6].

Общепризнано, что одним из основных звеньев патогенетического процесса при БП является накопление и агрегация в нейронах токсических фибриллярных форм α -Syn. Предполагают, что этот процесс инициируется в периферических отделах нервной системы, в частности в структурах обонятельного анализатора, в том числе ОЛ, что может быть причиной нарушений обоняния, которые опережают появление двигательных симптомов у пациентов с БП и могут служить одним из ранних признаков заболевания [7].

Известно, что ОЛ наряду с черной субстанцией содержат дофаминергические нейроны, однако данные об их роли в патогенезе обонятельных нарушений неоднозначны [8, 9]. Так, при аутопсийных исследованиях

в ОЛ пациентов с БП обнаружены синуклеин-позитивные патологические агрегаты и уменьшение размеров обонятельных клубочков (гломерул) [10, 11]. В эксперименте интраназальное введение нейротоксических индукторов паркинсонизма вызывало накопление α -Syn, деструкцию и дисфункцию перигломерулярных дофаминовых нейронов в ОЛ и повреждение черной субстанции [12, 13]. В то же время разрушение черной субстанции у животных, согласно ряду авторов, приводит к нарушению миграции дофаминовых нейронов, а их количество в ОЛ увеличивается [14, 15]. По другим данным, обонятельный дефицит при повреждении черной субстанции связан с повреждением нигро-олифакторных проекций и проявлением дисфункции митральнейронов [16]. Имеются сообщения и об отсутствии обонятельных нарушений в эксперименте, в том числе на генетических моделях БП [17].

Таким образом, участие перигломерулярных дофаминергических нейронов и роль агрегации α -Syn в патогенезе обонятельных нарушений при БП остаются неясными. Кроме того, локализация α -Syn в обонятельных структурах и его функциональные свойства детально не исследованы. Следовательно, для дальнейшего выяснения механизмов патогенеза БП, опосредуемых агрегацией α -Syn, необходимо расширение представлений о его распределении в центральной нервной системе, а также о роли в онтогенезе и формировании синапсов. В связи с этим актуальна разработка новых экспериментальных моделей, одной из которых может быть органотипическая культура ткани ОЛ, позволяющая в контролируемых условиях и в сопоставлении с данными *in vivo* исследовать отдельные популяции нейронов, используя преимущества тканевой культуры как модельной системы. Несмотря на то, что разные

варианты органотипических культур эмбриональных и постнатальных ОЛ были описаны ранее и продемонстрированы их морфологические, электрофизиологические и ультраструктурные особенности [18–20], мы не обнаружили данных об экспрессии α -Syn и развитии дофаминергических перигломерулярных нейронов в органотипических культурах ОЛ.

Целью настоящей работы было охарактеризовать распределение α -Syn в структурах развивающихся ОЛ, а также оценить адекватность использования культивируемых эксплантатов ОЛ для изучения патогенеза БП.

Материалы и методы

Для морфологического исследования ОЛ *in vivo* использовали эмбрионы беспородных мышей, на 17-й (E17) и 19-й (E19) день внутриутробного развития ($n=5$ для каждого срока) и новорожденных мышей в возрасте 2 и 7 дней (P2, $n=5$ и P7, $n=3$). Полученные ОЛ фиксировали погружением в смесь формалина, этанола и уксусной кислоты (2:7:1) и переносили в 70% этанол, затем обезвоживали в растворах этанола восходящей концентрации и абсолютизированным изопропанолом, после чего проводили через хлороформ и пропитывали парафином. Тотальные парафиновые срезы ОЛ толщиной 12 мкм готовили на санном микротоме Leica SR2000 (Германия), используя нож для твердых образцов. Для морфологического исследования животных выводили из эксперимента декапитацией. Манипуляции проводили в соответствии с регламентирующими документами (Принципы надлежащей лабораторной практики 2009, ГОСТ Р 53434-200 и рекомендации ЕС Euthanasia of experimental animals, 1997, ISBN 92-827-9694-9) решением локального этического комитета № 2-5/19 от 20 февраля 2019 года.

Для культивирования ОЛ от E17 ($n=5$) и P2 ($n=5$) помещали во флаконы с питательной средой и инкубировали в термостатируемой роллерной установке [21] целиком, в оболочке, чтобы воспрепятствовать распаду ОЛ. Питательная среда содержала 90% минимальной среды Игла на солях Эрла, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамин и 10 mM буфера HEPES, pH 7,2–7,4. В каждый флакон помещали по 3–5 ОЛ и культивировали при температуре +35°C в течение 24 часов. Затем эксплантаты обрабатывали для морфологического исследования так же, как и нативные ОЛ, и готовили из них срезы толщиной 5–7 мкм.

Иммуногистохимическое исследование срезов ОЛ проводили с применением мышинных моноклональных антител к синаптофизину (Dako, Дания), кроличьих поликлональных антител к тирозингидроксилазе (TH, Sigma, Германия), мышинных моноклональных антител к глиофибрилярному белку (GFAP, Sigma, Германия), конъюгированных с флуорохромом Cy3, кроличьих моноклональных антител к α -Syn (Sigma, Германия) и мышинных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA, Abcam, Великобритания).

Связывание антител выявляли с помощью соответствующих вторичных антител (F(ab')₂ фрагментов IgG), меченных флуорохромами CF488 или CF555 (Sigma, Германия). Часть срезов для выявления TH окрашивали иммунопероксидазным методом, используя набор EXTRA3 KIT (Sigma, Германия). Перед инкубацией первичных антител проводили тепловую обработку срезов в цитратном буфере (0,1M, pH 6,0, 90–95°C) в течение 10 минут в микроволновой печи, контролируя температуру между повторными включениями. Иммунофлуоресцентное окрашивание осуществляли по рекомендациям производителя антител, негативный контроль окрашивания проводили без использования первичных антител. Срезы заключали в среду EverBright (Biotium, США) и исследовали под микроскопом Nikon Eclipse Ni-u (Япония). Микрофотографии получали при помощи цифровой камеры Nikon DS-Qi.

Измерения интенсивности окрашивания на α -Syn в гломерулярном слое проводили на 5–7 срезах от трех животных из каждой исследованной группы, с помощью программы NIS Elements с коррекцией фонового окрашивания, выделяя при помощи графического планшета область интереса на изображениях, полученных при одинаковых настройках микроскопа. Статистический анализ результатов проводили в программе StatSoft Statistica 7.0, используя непараметрический тест Краскелла–Уоллиса ANOVA, в связи с отклонением выборки от нормального распределения.

Результаты

На 17-й день эмбрионального развития ОЛ содержали формирующиеся гранулярный, митральный и редкочеточный плексиформный слой. Сходная картина наблюдалась и у ОЛ от E19. Обонятельные клубочки отчетливо выявлялись к сроку P2 (рис. 1). Дофаминергические TH-позитивные нейроны в ОЛ у эмбрионов E17 располагались по периферии обонятельных луковиц, однако гломерулярный слой еще не был сформирован. У мышей к сроку P2 перигломерулярные TH-позитивные нейроны локализовались вокруг клубочков и формировали своими отростками сеть внутри гломерул (рис. 2).

Синаптофизин в ОЛ эмбрионов E17 преимущественно выявлялся в нейропиле развивающихся слоев – плексиформном, гломерулярном и в нервных окончаниях вокруг клеток митрального слоя, тогда как у мышей P2 наибольшая его экспрессия наблюдалась в обонятельных клубочках (рис. 2).

Экспрессия α -Syn, как и синаптофизина, обнаруживалась в периферических слоях ОЛ и менялась по мере их созревания, однако локализация этих белков совпадала лишь частично, так как α -Syn в отличие от синаптофизина обнаруживался и в перикарионе нейронов развивающихся ОЛ. Помимо этого антитела к α -Syn связывались с клетками обонятельного эпителия.

По мере формирования ОЛ наблюдался пик экспрессии α -Syn в раннем постнатальном периоде. Ин-

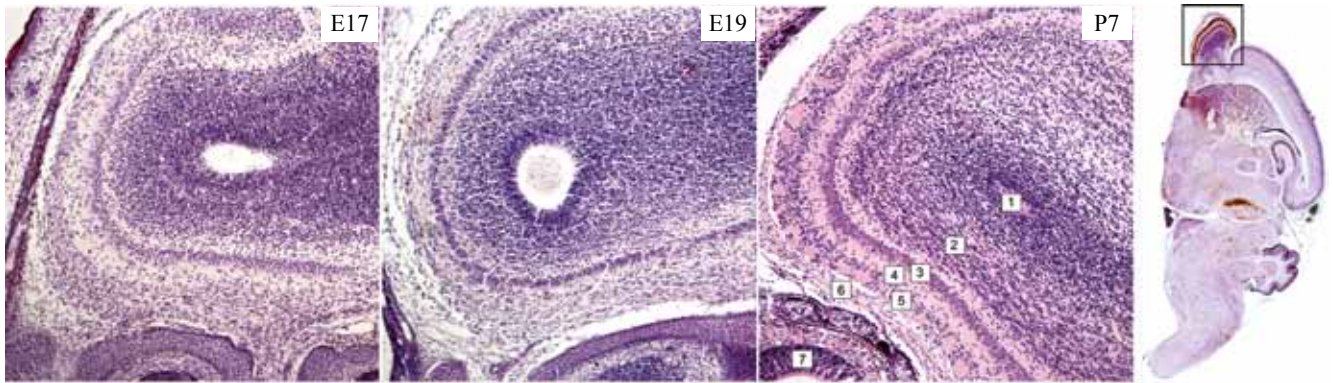


Рис. 1. Развитие слоев обонятельных луковиц мыши в эмбриональном и постнатальном периоде. E17, E19 – 17-й и 19-й день эмбрионального развития, соответственно, P7 – 7-й постнатальный день. Окрашивание гематоксилином и эозином, объектив $\times 10$. На малом увеличении (объектив $\times 0,75$) показан мозг мыши 2-го постнатального дня (иммунопероксидазная реакция на тирозингидроксилазу – коричневый). Обонятельная луковица обведена квадратом. Обозначения: 1 – обонятельный желудочек, 2 – гранулярные слои, 3 – митральный слой, 4 – плексиформный слой, 5 – гломерулярный слой, 6 – обонятельный нерв, 7 – обонятельный эпителий

Fig. 1. Developing of the olfactory bulbs layers in embryonic and postnatal period. E17, E19 – embryonic days, P7 – 7th postnatal day. Haematoxylin-eosine staining. $\times 10$ lens magnification. At low magnification ($\times 0,75$ lens) the 2nd postnatal brain is shown (IHC anti-tyrosine hydroxylase staining, brown). Olfactory bulb outlined by square.

Legend: 1 – olfactory ventricle, 2 – granular layers, 3 – mitral cell layer, 4 – plexiform layer, 5 – glomerular layer, 6 – olfactory nerve, 7 – olfactory epithelium

тенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на α -Syn в гломерулярном слое значительно увеличивалась (на 38,2%, K-W ANOVA $H(2, N=85)=7,69$; $p=0,02$) ко 2-му постнатальному дню по сравнению с E17. На 7-й постнатальный день интенсивность окрашивания на α -Syn вновь снижалась и была выше лишь на 11,6% по сравнению с E17. Наряду с усилением экспрессии α -Syn изменялась и его внутриклеточная локализация. На 2-й день постнатального развития интенсивно окрашивались тела и отростки нейронов в митральном слое, а также в обонятельных клубочках (рис. 2), тогда как к 7-му дню окрашивание тел нейронов снижалось и α -Syn выявлялся преимущественно в обонятельных клубочках. Следовательно, пик экспрессии α -Syn в ОЛ и его наибольшее содержание в цитоплазме митральных нейронов приходится на этап формирования гломерулярного слоя, а по мере их дифференцировки цитоплазматическая локализация сменяется пресинаптической.

При органотипическом культивировании клеточная организация ОЛ соответствовала их нативной структуре. В explantатах, полученных от E17, после 24 часов *in vitro* можно было выделить соответствующие слои, характеризующиеся высокой экспрессией синаптофизина (рис. 3), хотя в центральной части explantатов, соответствующей гранулярному и митральным слоям, клетки были разрежены. Нейроны, содержащие PCNA, были синуклеиннегативными и обнаруживались в периферических слоях explantатов, тогда как в нативных ОЛ их значительное количество сосредоточено в области рострального миграционного потока и вблизи обонятельного желудочка, в центральной части ОЛ. Локализация GFAP соответствовала выявленным сло-

ям: во внутренней части explantатов астроциты формировали радиальные отростки, а в наружной части располагался поверхностный, пиальный слой астроглии. У дофаминергических нейронов прослеживалось радиальное направление отростков, что было нехарактерно для нативных ОЛ.

Структура explantатов, полученных от P2, после 24 часов культивирования в целом сохранялась (рис. 4), а перигломерулярные дофаминергические нейроны и глиальные клетки не отличались от нативных. Гломерулярный слой интенсивно окрашивался на α -Syn и синаптофизин, однако отмечалась инволюция обонятельных клубочков, то есть снижение их размеров и разрежение слоя. α -Syn был локализован преимущественно пресинаптически, а его цитоплазматическая локализация в митральных клетках была существенно менее выражена по сравнению с нативными ОЛ на том же сроке развития.

Обсуждение

Полученные результаты демонстрируют, что локализация α -Syn в развивающихся ОЛ тесно связана с формированием синаптических структур в гломерулах, что подтверждается совместным выявлением синаптофизина, локализация которого отражает динамику формирования синаптических контактов. Аналогичная закономерность ранее была обнаружена при развитии неокортекса [2, 22]. Выявленные нами изменения внутриклеточной локализации α -Syn согласуются с данными, полученными на культурах клеток гиппокампа [23], где по мере дифференцировки нейронов этот белок вначале локализовался в их телах, а затем накапливался в пресинаптических окончаниях.

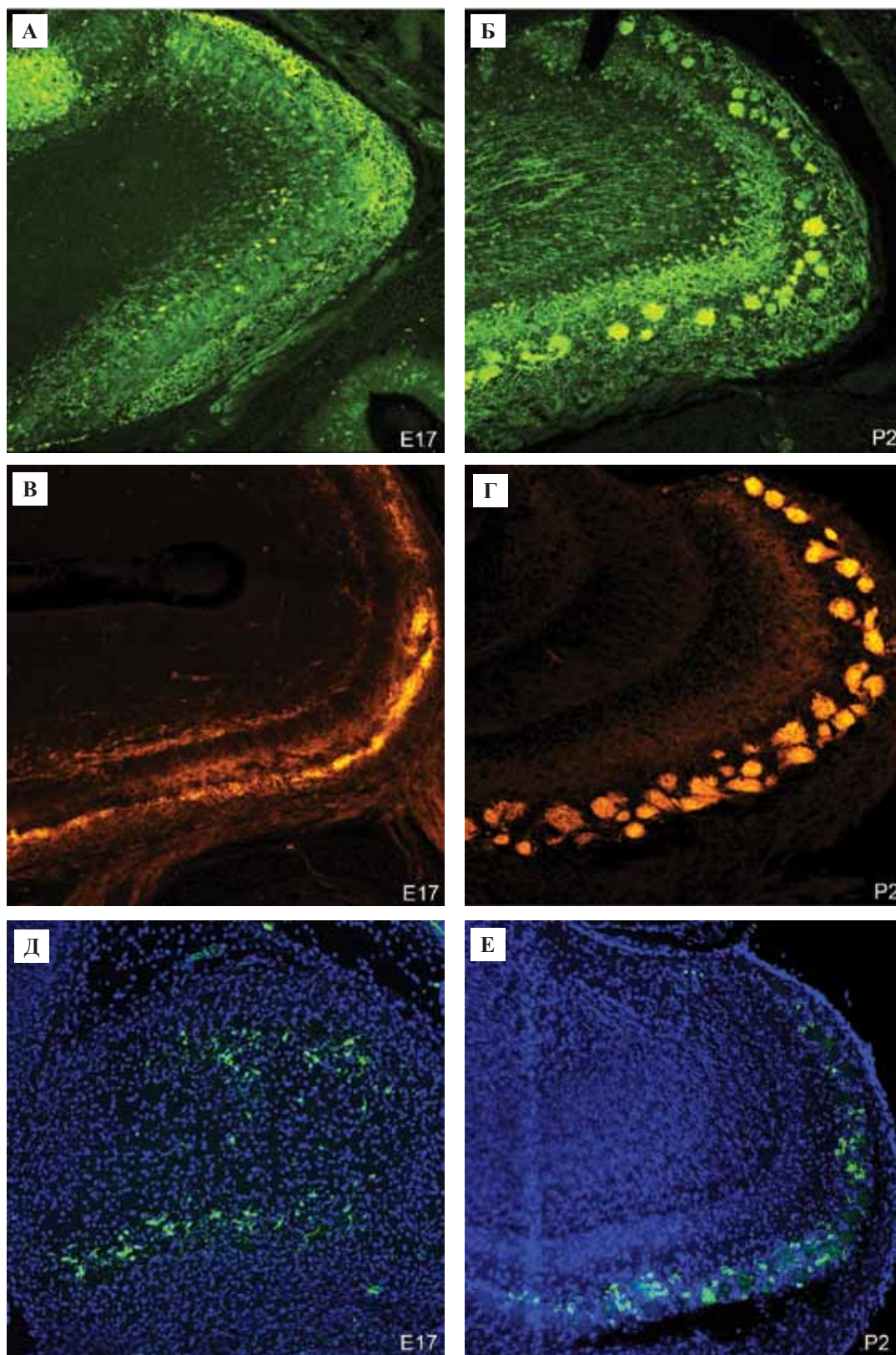


Рис. 2. Обонятельные луковицы мыши в эмбриональном (E17) и раннем постнатальном (P2) периоде, сагиттальные срезы.

А, Б – иммунофлуоресцентное выявление альфа-синуклеина, объектив×10, В, Г – выявление синаптофизина, объектив×10, Д, Е – выявление тирозингидроксилазы, ядра клеток окрашены DAPI, объектив ×10

Fig. 2. Embryonic (E17) and early postnatal (P2) mouse olfactory bulbs, sagittal sections. А, Б – immunofluorescence α -synuclein detection, В, Г – synaptophysin detection, Д, Е – tyrosine hydroxylase detection, nuclear counterstain – DAPI. $\times 10$ lens

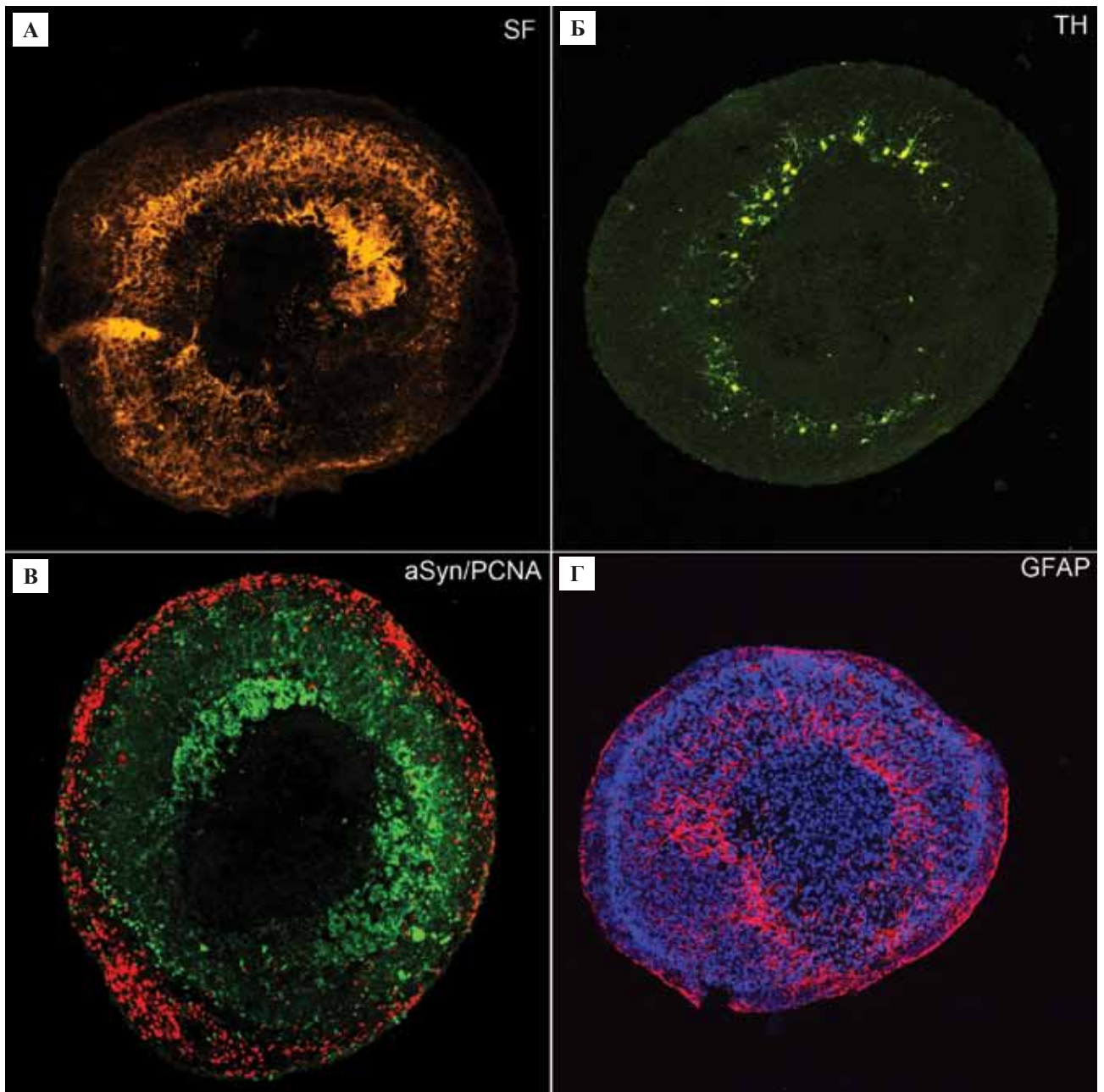


Рис. 3. Эксплантаты обонятельных луковиц мыши, взятых на 17-й эмбриональный день, 24 часа *in vitro*.

Иммунофлуоресцентное выявление.

А – синаптофизин (SF), Б – тирозингидроксилаза (TH), В – альфа-синуклеин (зеленым) и PCNA – красным, Г – глиофибриллярный белок (GFAP), ядра клеток окрашены DAPI. объектив $\times 10$

Fig. 3. Explants of mouse olfactory bulb, 17-th postnatal day, 24 hours in vitro. Immunofluorescence detection
 А – synaptophysin (SF), Б – tyrosine hydroxylase (TH), В – α -synuclein (aSyn, in green) and PCNA (in red),
 Г – gliofibrillar protein (GFAP, in red), nuclear counterstain – DAPI.
 А, Б, В, Г – $\times 10$ lens

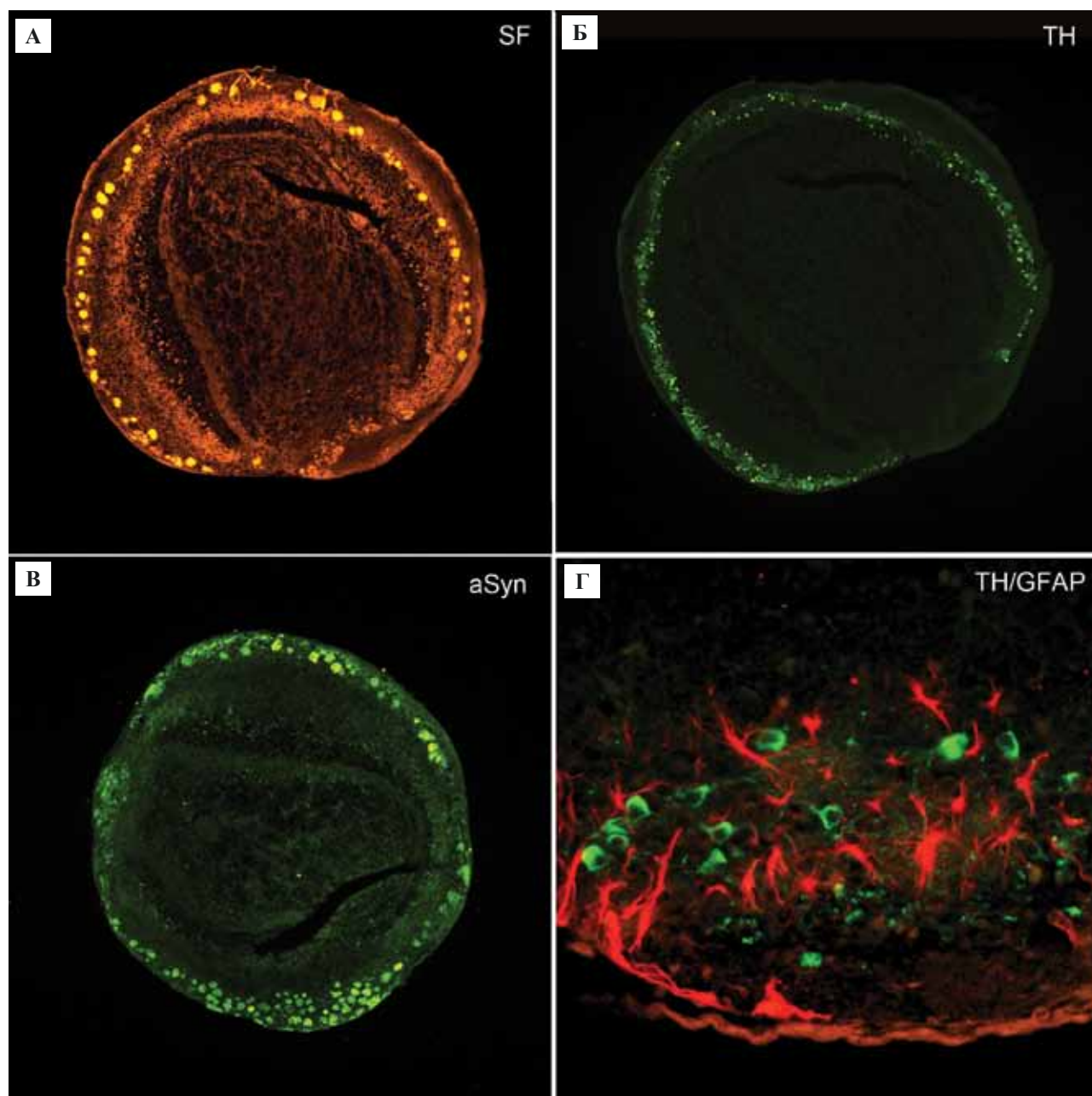


Рис. 4. Эксплантаты обонятельных луковиц мыши, взятых на 2-й постнатальный день, 24 часа *in vitro*.

Иммунофлуоресцентное выявление.

А – синаптофизин (SF), Б – тирозингидроксилаза (ТН), В – альфа-синуклеин (a-Syn), Г – тирозингидроксилаза (ТН, зеленым) и глиофибрилярный белок (GFAP, красным) в перигломерулярном слое.

А, Б, В – объектив $\times 4$, Г – объектив $\times 40$

Fig. 4. Explants of mouse olfactory bulb, 2-nd postnatal day, 24 hours *in vitro*. Immunofluorescence detection.

А – synaptophysin (SF), Б – tyrosine hydroxylase (TH), В – α -synuclein (aSyn), Г – localization of tyrosine hydroxylase (TH, in green) and gliofibrillar protein (GFAP, in red) in the periglomerular layer.

А, Б, В – $\times 4$ lens, Г – $\times 40$ lens

Показано, что α -Syn взаимодействует с белками везикулярного комплекса, но предполагают, что его участие в синаптогенезе незначительно, поскольку α -Syn – один из последних белков, обнаруживаемых при созревании синаптических окончаний [3, 23, 24]. Вместе с тем у нокаутных по гену α -Syn мышей нарушаются рабочая память и пространственное обучение [25], а также развитие нейронов черной субстанции [26, 27]. Наши результаты согласуются с предположением, что основной пул α -Syn в ОЛ принадлежит окончаниям митральных, перигломерулярных и, возможно, обонятельных сенсорных нейронов, то есть тех типов клеток, которые вовлечены в патогенез обонятельных нарушений при БП [28]. Отростки обонятельных нейронов образуют в гломерулах контакты с дендритами митральных клеток, аксоны которых, в свою очередь, формируют прямые проекции в переднее обонятельное ядро, моносинаптически связанное с областями древней, старой и новой коры [28]. Таким образом, нормальное распределение α -Syn согласуется с гипотезой «обонятельного пути» распространения его патологических агрегатов [29–31].

Проведенный нами анализ структуры эксплантатов ОЛ в эмбриональном и постнатальном периоде показывает, что жизнеспособность клеток и основные характеристики структуры нативных ОЛ после 24 часов культивирования сохраняются. Использование альтернативных моделей, связанных с культивированием мезенцефальных дофаминергических нейронов, осложняется тем, что ввиду сложности выделения, высокой уязвимости и плохой выживаемости лишь 0,5–1% клеток в первичной культуре оказывается дофаминергическими [32]. Важное преимущество культивирования ОЛ состоит в возможности относительно простого получения и исследования популяции перигломерулярных дофаминергических нейронов в своем нормальном микроокружении и митральных нейронов, предположительно служащих основным звеном в транспорте патологических форм α -Syn в передний мозг [28]. Эксплантаты ОЛ могут быть пригодны и для исследования патологической агрегации α -Syn при аппликации известных токсинов, используемых для моделирования БП, биодоступность которых при интраназальном введении может быть ограничена [8].

Заключение

Экспрессия α -Syn в развивающихся обонятельных луковицах связана с формированием обонятельных клубочков и созреванием клеток митрального слоя, а его распределение в норме согласуется с особенностями вовлечения обонятельных структур в нейродегенеративный процесс при болезни Паркинсона. Полученные данные демонстрируют возможность использования органотипических культур обонятельных луковиц для моделирования патологических процессов при болезни Паркинсона.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.Н. Воронков, А.А. Лыжин, Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспеков.

Сбор и обработка материала – Д.Н. Воронков, М.Р. Капкаева, А.А. Лыжин.

Написание текста – Д.Н. Воронков, М.Р. Капкаева, Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспеков.

Редактирование – Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспеков.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – D.N. Voronkov, A.A. Lyzhin, R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov.

Collected the data and performed the analysis – D.N. Voronkov, M.R. Kapkaeva, A.A. Lyzhin.

Wrote the paper – D.N. Voronkov, M.R. Kapkaeva, R.M. Khudoerkov.

Edited the manuscript – R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov.

Литература/References

1. Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2011;5(4):46–51.
Pchelina SN. Alpha-synuclein as a biomarker of Parkinson's disease. *Annaly klinicheskoy i experimental'noy neurologii*. 2011;5(4):46–51 (In Russ.). URL: <http://annaly-nevrologii.com/wp-content/uploads/2016/08/Tom-5-4-2011.pdf>
2. Zhong S, Luo X, Chen X. *et al*. Expression and Subcellular Location of Alpha-Synuclein During Mouse-Embryonic Development. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(3):469–82. DOI:10.1007/s10571-009-9473-4.
3. Burré J, Sharma M, Südhof TC. *Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(3):a024091. doi:10.1101/cshperspect.a024091.
4. Voronkov DN, Khudoerkov RM, Sal'nikova OV, Sobolev VB. Localization of α -Synuclein in the Rat Brain and Its Relationship with Dopaminergic Structures. *Neurosci Behav Physiol*. 2017;47(9):1147–52. DOI: 10.1007/s11055-017-0522-z
5. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J Comp Neurol*. 2016;524(6):1236–58. DOI: 10.1002/cne.23901.
6. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Expression of α -synuclein is regulated in a neuronal cell type-dependent manner. *Anat Sci Int*. 2019;94(1):11–22. DOI: 10.1007/s12565-018-0464-8.
7. Fullard ME, Morley JF, Duda JE. Olfactory dysfunction as an early biomarker in Parkinson's disease. *Neurosci Bull*. 2017;33(5):515–25. DOI: 10.1007/s12264-017-0170-x.
8. Rojo AI, Cavada C, de Sagarra MR, 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. DOI:10.1016/j.expneurol.2007.07.022.
9. Cave JW, Fujiwara N, Weibman AR, Baker H. Cytoarchitectural changes in the olfactory bulb of Parkinson's disease patients. *npj Park Dis*. 2016;2(1):16011. DOI:10.1038/npjparkd.2016.11.
10. Beach TG, White CL, Hladik CL *et al*. Olfactory bulb α -synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. 2009;117(2):169–74. DOI:10.1007/s00401-008-0450-7.

11. *Zapiec B, Dieriks BV, Tan S, Faull RLM, Mombaerts P, Curtis MA.* A ventral glomerular deficit in Parkinson's disease revealed by whole olfactory bulb reconstruction. *Brain.* 2017;140(10):2722–36. DOI:10.1093/brain/awx208.
12. *Sasajima H, Miyazono S, Noguchi T, Kashiwayanagi M.* Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. *Neurotoxicology.* 2015;51:106–15. DOI:10.1016/j.neuro.2015.10.006.
13. *Ekimova IV, Simonova VV, Guzeev MA, Lapshina KV, Chernyshev MV, Pastukhov YF.* Changes in sleep characteristics of rat preclinical model of Parkinson's disease based on attenuation of the ubiquitin—proteasome system activity in the brain. *J Evol Biochem Physiol.* 2016;52(6):463–74. DOI:10.1134/S1234567816060057.
14. *Ilkiw JL, Kmita LC, Targa ADS et al.* Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.* 2019;56(2):1082–95. DOI:10.1007/s12035-018-1134-5.
15. *Pifl C, Reither H, del Rey NLG, Cavada C, Obeso JA, Blesa J.* Early Paradoxical Increase of Dopamine: A Neurochemical Study of Olfactory Bulb in Asymptomatic and Symptomatic MPTP Treated Monkeys. *Front Neuroanat.* 2017;11:46. DOI:10.3389/fnana.2017.00046.
16. *Zhang W, Sun C, Shao Y, Zhou Z, Hou Y, Li A.* Partial depletion of dopaminergic neurons in the substantia nigra impairs olfaction and alters neural activity in the olfactory bulb. *Sci Rep.* 2019;9(1):254. DOI:10.1038/s41598-018-36538-2.
17. *Kurtenbach S, Wewering S, Hatt H., Neuhaus E.M., Lübbert H.* Olfaction in Three Genetic and Two MPTP-Induced Parkinson's Disease Mouse Models. *Whitworth AJ, ed. PLoS One.* 2013;8(10):e77509. DOI:10.1371/journal.pone.0077509.
18. *Viktorov IV, Sharonova IN.* Formation of functional synaptic connections between heterogeneous brain formations in organotypic nerve tissue culture. *Neurophysiology.* 1981;12(5):311–7. DOI:10.1007/BF01066077.
19. *Chuah MI, Farbman AI.* Mitral cell differentiation and synaptogenesis of rat presumptive olfactory bulb in organ culture. *Cell Tissue Res.* 1986;243(2). DOI:10.1007/BF00251052.
20. *Werther GA, Cheesman H, Russo V.* Olfactory bulb organ culture is supported by combined insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor. *Brain Res.* 1993;617(2):339–42. DOI:10.1016/0006-8993(93)91102-x
21. *Viktorov IV, Lyzhin AA, Shashkova NA.* Cultivation of reaggregated brain cells in rapidly rotating mini-rollers. *Bull Eksp Biol Med.* 1985;99(5):632–4. PMID: 3890982 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3890982>.
22. *Hsu LJ, Mallory M, Xia Y et al.* Expression Pattern of Synucleins (Non-A β Component of Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein/ α -Synuclein) During Murine Brain Development. *J Neurochem.* 2002;71(1):338–44. DOI:10.1046/j.1471-4159.1998.71010338.x.
23. *Withers GS, George JM, Banker GA, Clayton DF.* Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Dev Brain Res.* 1997;99(1):87–94. DOI:10.1016/S0165-3806(96)00210-6.
24. *Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VMY.* Synucleins Are Developmentally Expressed, and α -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *J Neurosci.* 2000;20(9):3214–20. DOI:10.1523/JNEUROSCI.20-09-03214.2000.
25. *Kokhan VS, Afanasyeva MA, Van'kin GI.* α -Synuclein knockout mice have cognitive impairments. *Behav Brain Res.* 2012;231(1):226–30. DOI:10.1016/j.bbr.2012.03.026.
26. *Garcia-Reitboeck P, Anichtchik O, Dalley JW et al.* Endogenous alpha-synuclein influences the number of dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. *Exp Neurol.* 2013;248:541–5. DOI:10.1016/j.expneurol.2013.07.015.
27. *Tarasova TV, Lytkina OA, Goloborshcheva VV et al.* Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain. *PeerJ.* 2018;6:e4779. DOI:10.7717/peerj.4779.
28. *Ubeda-Bañon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, Martinez-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. DOI:10.1007/s00429-013-0651-2.
29. *Cersosimo MG.* Propagation of alpha-synuclein pathology from the olfactory bulb: possible role in the pathogenesis of dementia with Lewy bodies. *Cell Tissue Res.* 2018;373(1):233–43. DOI:10.1007/s00441-017-2733-6.
30. *Niu H, Shen L, Li T, Ren C et al.* Alpha-synuclein overexpression in the olfactory bulb initiates prodromal symptoms and pathology of Parkinson's disease. *Translat. Neurodegener.* 2018;7:25 DOI:10.1186/s40035-018-0128-6
31. *Rey NL, George S, Steiner JA, Madaj Z et al.* Spread of aggregates after olfactory bulb injection of α -synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta Neuropathol.* 2018;135(1):65–83. DOI:10.1007/s00401-017-1792-9.
32. *Weinert M, Selvakumar T, Tierney TS, Alavian KN.* Isolation, Culture and Long-Term Maintenance of Primary Mesencephalic Dopaminergic Neurons From Embryonic Rodent Brains. *J Vis Exp.* 2015;(96):52475. DOI:10.3791/52475.

Информация об авторах

Дмитрий Николаевич Воронков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Анатолий Александрович Лыжин – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейробиологии Научного центра неврологии.

Марина Рафаилевна Капкаева – аспирант лаборатории экспериментальной нейробиологии Научного центра неврологии.

Рудольф Михайлович Худоерков – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Леонид Георгиевич Хаспеков – доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной нейроцитологии Научного центра неврологии.

Information about authors

Dmitry N. Voronkov – Cand. Sci. (Med.), Senior researcher, Laboratory of neuromorphology, Research center of neurology.

E-mail: voronkovdm@gmail.com, voronkov@neurology.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Anatoly A. Lyzhin – Cand. Sci. (Med.), Senior researcher, Laboratory of experimental neurocytology, Research center of neurology.

E-mail: lyzhin53@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-2247-7291>

Marina R. Kapkaeva – Doctoral student, Laboratory of experimental neurocytology, Research center of neurology.

E-mail: mareenqa@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2833-2897>

Rudolf M. Khudoerkov – Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Laboratory of neuromorphology, Research center of neurology.

E-mail: rolbrain@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6951-3918>

Leonid G. Khaspekov – Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of experimental neurocytology, Research center of neurology.

E-mail: khaspekleon@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6652-9412>