ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2009
УДК 611.813.8.018:599.323.4

М.Ю. Степаничев, Ю.В. Моисеева, Н.А. Лазарева, М.В. Онуфриев и *Н.В. Гуляева*

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК В СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЕ МОЗГА У ВЗРОСЛЫХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ β-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА (25–35)

Лаборатория функциональной биохимии нервной системы (зав. — проф. Н.В. Гуляева) Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Проведен анализ влияния интрацеребровентрикулярного введения фрагмента (25–35) — β–амилоидного пептида [Aβ (25–35)] на пролиферацию клеток в субвентрикулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа взрослых крыс. Животным вводили в боковые желудочки мозга предварительно агрегированный Aβ (25–35), контрольный пептид Aβ (35–25) в количестве 15 нмоль или растворитель (стерильную воду). В 1–5-е сутки после инъекции крысам интраперитонеально вводили аналог тимидина 5-бромо-2'-дезоксиуридин (BrdU). Иммуногистохимическое выявление включения BrdU в ДНК проводили на фронтальных срезах мозга через 6 и 12 сут после введения пептидов. Установлено, что через 6 сут после воздействия в субвентрикулярной зоне число клеток, содержавших BrdU, не различалось в исследованных группах крыс. Через 12 сут после операции общее число BrdU-позитивных клеток значительно уменьшалось во всех исследованных группах животных. В то же время число таких клеток у крыс, получавших Aβ (25–35), было существенно выше в этой зоне мозга по сравнению с таковым у животных, которым вводили воду или контрольный пептид. Таким образом, Aβ (25–35) значимо увеличивал пролиферацию клеток в субвентрикулярной зоне после интрацеребровентрикулярного введения.

Ключевые слова: *гиппокамп, зубчатая извилина, субвентрикулярная зона, пролиферация клеток, амилоид-β (25–35).*

Бета-амилоидный пептид (Aβ) является фрагментом трансмембранного белка предшественника, APP, образующимся в результате нарушения нормального протеолиза этого белка. Накопление и самоагрегация Aβ в мозгу человека считается одним из центральных процессов при болезни Альцгеймера [9]. Исследование ткани мозга пациентов, эксперименты на культурах клеток и на лабораторных животных показали, что в агрегированной форме Aβ вызывает гибель нейронов, нарушение процессов обучения и памяти. Указанные изменения наблюдаются как у мутантных по APP животных с отчетливо выраженным церебральным амилоидозом, так и у крыс и мышей, которым Aβ вводили интрацеребрально путем инъекций или инфузии [10].

Нарушение функциональных возможностей мозга, в том числе и компенсаторных, может быть связано с изменением уровня нейрогенеза, который продолжается в субвентрикулярной (СВЗ) и субгранулярной зонах зубчатой извилины гиппокампа в течение всей жизни [1]. Известно, что воздействие Aβ на культуру стволовых клеток, выделенных из СВЗ, вызывало усиление пролиферации и формирования нейросфер [7]. Кроме того, усиление нейрогенеза было обнаружено в мозгу пациентов, страдавших болезнью Альцгеймера [6]. Аналогичные данные были получены и при исследовании мозга мутантных мышей [5]. В то же время ряд авторов показали, что введение Aβ угнетает нейрогенез в герминативных зонах мозга обычных мышей, и обнаружили его снижение у мутантных по APP мышей [3, 4].

Цель настоящей работы — исследование уровня пролиферации клеток в СВЗ крыс после интрацеребровентрикулярного введения нейротоксичного фрагмента Aβ (25–35).

Материал и методы. Работа проведена на самцах крыс линии Вистар массой 230–290 г (питомник «Столбовая», Московская обл.) в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Крыс содержали в виварии при искусственном световом режиме (8.00–20.00 — день, 20.00–8.00 — ночь) и свободном доступе к воде и пище. Животных анестезировали хлоралгидратом (350 мг/кг внутрибрюшинно). Введение Aβ (25–35), Aβ (35–25) или растворителя (стерильной воды для инъекций) проводили в боковые желудочки мозга по следующим координатам: от брегмы AP –0,8 мм, L±1,5 мм (в каждую группу входило по 6 животных). Микрошприц погружали на глубину 4,0 мм. Введение веществ проводили со скоростью 1 мкл/мин. Иглу оставляли на месте введения в течение 5 мин. Aβ (25–35) и Aβ (35–25) (Bachem, США) инъецировали в количестве 7,5 нмоль/желудочек (общее количество — 15 нмоль) в объеме 5 мкл. Aβ (25–35) предварительно агрегировали, как описано ранее [10, 11]. В 1–5-е сутки после операции крысам внутрибрюшинно вводили 5-бром-2'-дезоксиуридин (BrdU), приготовленный на изотоническом растворе NaCl, содержащем 0,008 М NaOH. Введение BrdU в дозе 50 мг/кг проводили дважды в день с интервалом 4 ч. Через 6 и 12 сут

после операции крыс повторно анестезировали, и мозг фиксировали интракардиальной перфузией 4% раствора параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4). Мозг извлекали и дофиксировали в том же фиксаторе в течение 24 ч. После этого на вибротоме готовили фронтальные срезы толщиной 50 мкм. Срезы окрашивали иммуногистохимически для выявления включившегося в ДНК BrdU. Для этого срезы последовательно промывали 0,01 М фосфатно-солевым буфером, инкубировали в смеси 50% формамид/2X цитратный буфер при 65 °C в течение 2 ч, денатурировали ДНК в 2 М HCl при 37 °C в течение 30 мин и после промывки и блокирования неспецифического связывания инкубировали с моноклональными антителами к BrdU (BD Pharmingen, США). Детекцию первичных антител проводили с антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с биотином (Sigma, США), и авидин-пероксидазным комплексом (Vectastain

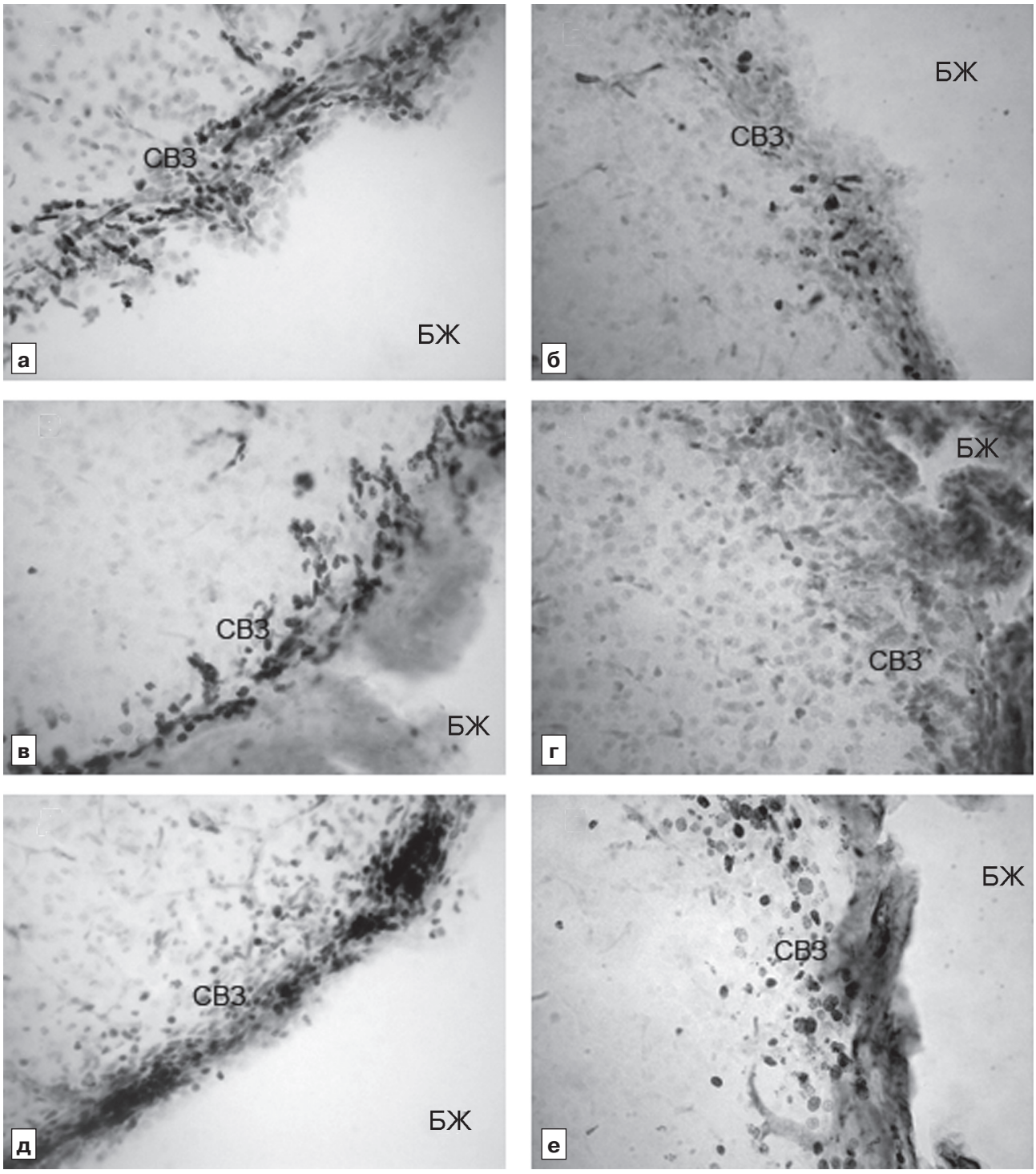

Рис. 1. Субвентрикулярная зона зубчатой извилины гиппокампа крыс, инъецированных растворителем — стерильной водой (а, б), Аβ (35–25) (в, г) и Аβ (25–35) (е, д) через 6 (а, в, д) и 12 сут (б, г, е) после стереотаксической операции.

СВЗ — субвентрикулярная зона; БЖ — боковой желудочек. Иммуногистохимическая реакция на антитела к BrdU с докрашиванием толуидиновым синим. Об. 40, ок. 10.

ABC kit, Vector Labs, США). В качестве хромогена применяли диаминобензидин (Sigma Fast kit, Sigma, США). Часть срезов дополнительно окрашивали толуидиновым синим. Число иммунопозитивных клеток подсчитывали на 4 срезах, взятых от каждого животного, с расстоянием 500 мкм между срезами. Клетки подсчитывали в СВЗ, расположенной вдоль латеральной стенки желудочка. Число клеток в левом и правом полушарии суммировали, и для статистического анализа использовали значения, полученные при усреднении числа клеток по 4 срезам. Оценку статистической значимости полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Использование метода множественного мечения репликации ДНК аналогом тимидина BrdU позволило выявить довольно большое число клеток, прошедших S-пептид клеточного цикла в СВЗ через 6 сут после операции (1 сут после окончания введения BrdU; рис. 1, а).

Это показывает относительно высокий уровень образования новых клеток в этом регионе мозга у взрослых крыс. Через 12 сут после операции (6 сут после последней инъекции BrdU) число иммунопозитивных клеток существенно уменьшалось у контрольных животных (см. рис. 1, б). Введение нетоксичного пептида с обратной аминокислотной последовательностью Аβ (35–25) не оказывало заметного воздействия на уровень пролиферации в СВЗ (см. рис. 1, в, г). Как и в группе контрольных крыс, у этих животных наблюдалось уменьшение числа меченых клеток в СВЗ через 12 сут после операции. Число BrdU-позитивных клеток в СВЗ через 6 сут после введения Аβ (25–35) также было сравнимо с таковым у контрольных крыс (см. рис. 1, д). В то же время в этой группе животных не было обнаружено характерного снижения числа пролиферирующих клеток (см. рис. 1, е), которое наблюдалось у крыс, получавших инъекцию растворителя или пептида с обратной последовательностью. Более того, число клеток, содержащих BrdU, было больше через 12 сут после введения Аβ (25–35) по сравнению с таковым у двух других групп животных (рис. 2).

Обсуждение полученных данных. В представленной работе было исследовано влияние интрацеребровентрикулярного введения агрегированного Аβ (25–35) в боковые желудочки мозга крыс на пролиферацию нейральных предшественников в СВЗ. Как было показано ранее, интрацеребровентрикулярное введение Аβ (25–35) приводит к когнитивному дефициту, сопровождающемуся нейродегенеративными изменениями в гиппокампе, неокортексе и базальных ядрах переднего мозга [10]. Предполагалось, что одной

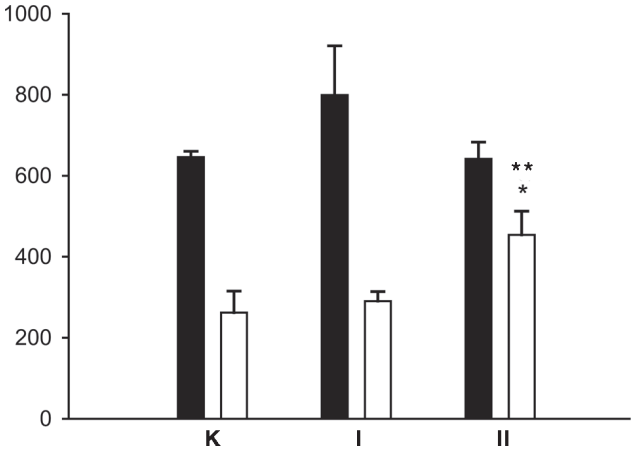

Рис. 2. Число BrdU-позитивных клеток в субвентрикулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа крыс после введения агрегированного Аβ (25–35).

По оси абсцисс: К — контроль; I — после введения Аβ (35–25); II — после введения Аβ (25–35); по оси ординат — число BrdU-позитивных клеток на срезе; темные столбики — 6 сут после операции; светлые столбики — 12 сут после операции; различия значимы: одна звездочка — по сравнению с соответствующим контролем при $P<0,05$; две звездочки — по сравнению с соответствующей группой Аβ (35–25); вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

из причин таких изменений может служить нарушение функционально значимой или компенсаторной пролиферации нейральных предшественников в области мозга, максимально близкой к месту введения. Полученные нами результаты демонстрируют, что введение Аβ (25–35) в боковые желудочки не только не тормозит этот процесс, но и способствует сохранению пролиферации на более высоком уровне в течение довольно значительного периода времени после инъекции этого пептида. Следует отметить, что наши данные противоречат опубликованным ранее результатам работ, в которых авторы показали, что Аβ (25–35) способен замедлять пролиферацию стволовых клеток в СВЗ у мышей [3]. В то же время наши эксперименты отличаются от этих работ по дозе использованного пептида, виду экспериментальных животных и временным точкам.

Метод мечения «новообразованных» клеток, использованный в настоящей работе, позволил выявить большую популяцию пролиферирующих клеток. Введенный BrdU в течение нескольких дней метит группы клеток, которые прошли последнее деление в разные сроки и дифференцируются с разной скоростью. Поэтому полученные данные о различиях в уровне пролиферации клеток в СВЗ не дают окончательного ответа на вопрос о том, какова дальнейшая судьба образовавшихся клеток. Еще один вопрос, который нуждается в дальнейшем исследовании, касается

возможного влияния Аβ на дифференцировку и миграцию клеток, образовавшихся в СВЗ.

Результаты предшествующих работ показали, что у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, происходит усиление пролиферации клеток в СГЗ [5]. Причины этого явления пока не выяснены. Активация пролиферации нейральных предшественников, по-видимому, вызвана присутствием в их микроокружении олигомерных агрегатов Аβ, но не его фибрилл [5, 7]. Агрегированный Аβ может находиться в мозгу экспериментальных животных в течение, как минимум, 1 нед и даже проникать в близлежащие регионы, к которым относится и СВЗ [8]. Олигомерные агрегаты способны взаимодействовать с поверхностными белками мембран клеток [2], запуская различные сигнальные каскады, которые могут регулировать пролиферацию, например активируемые тирозинкиназой (TyrK). Было установлено, что ингибирование TyrK предотвращает нейрогенное влияние Аβ в культуре стволовых клеток [7].

Несмотря на то, что точное функциональное значение пролиферации клеток в мозгу взрослых млекопитающих остается неизвестным, многие исследователи полагают, что возможно использование этого эндогенного механизма образования новых нейронов для терапии нейродегенеративных заболеваний. Увеличение числа пролиферирующих клеток под влиянием олигомерных агрегатов Аβ на этапах патологии, когда еще отсутствует отчетливо выраженная гибель клеток, может отражать активацию защитно-компенсаторных процессов в мозгу на ранних этапах патогенеза болезни Альцгеймера.

Работа поддержана грантом РФФИ № 06-04-81016а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gage F.H. Neurogenesis in the adult brain. J. Neurosci., 2004, v. 22, № 3, p. 612–613.
2. Gong Y., Chang L., Viola K.L. et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, v. 100, № 18, p. 10417–10422.
3. Haughey N.J., Liu D., Nath A. et al. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Neuromolecular Med., 2002, v. 1, № 2, p. 125–135.
4. Haughey N.J., Nath A., Chan S.L. et al. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. J. Neurochem., 2002, v. 83, № 6, p. 1509–1524.
5. Jin K., Galvan V., Xie L. et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPSw,Ind) mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, v. 101, № 36, p. 13363–13367.
6. Jin K., Peel A.L., Mao X.O. et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, v. 101, № 1, p. 343–347.
7. Lopez-Toledano M.A. and Shelanski M.L. Neurogenic effect of β-amyloid peptide in the development of neural stem cells. J. Neurosci., 2004, v. 24, № 23, p. 5439–5444.
8. Nakagawa Y., Yuzuriha T. and Iwaki T. Active clearance of human amyloid β 1–42 peptide aggregates from the rat ventricular system. Neuropathology, 2004, v. 24, № 3, p. 194–200.
9. Selkoe D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol. Rev., 2001, v. 81, № 2, p. 741–766.
10. Stepanichev M.Yu., Onufriev M.V., Mitrokhina O.S. et al. Neurochemical, behavioral, and neuromorphological effects of central administration of beta-amyloid peptide (25–35) in rat. Нейрохимия, 2000, т. 17, № 4, с. 278–293.
11. Stepanichev M.Yu., Zdobnova I.M., Zarubenko I.I. et al. Amyloid-beta (25–35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. Physiol. Behav., 2004, v. 80, № 5, p. 647–655.

Поступила в редакцию 24.07.08

CELL PROLIFERATION CHANGES IN BRAIN SUBVENTRICULAR ZONE IN ADULT RATS AFTER β–AMYLOID PEPTIDE (25–35) ADMINISTRATION

Stepanichev M.Yu., Moiseyeva Yu.V., Lazareva N.A., Onufriyev M.V. and Gulyaeva N.V.

The effect of intracerebroventricular administration of the (25–35) fragment of amyloid-β peptide [Aβ(25–35)] on cell proliferation in the subventricular zone of the hippocampal dentate gyrus was studied in adult rats. The animals were treated with either Aβ(25–35) or Aβ(35–25) at a dose of 15 nmol, control rats were injected with a vehicle (sterile water). 1-5 days after peptide administration, the animals were intraperitoneally injected with a thymidine analogue 5-bromo-2'deoxyuridine (BrdU). Immunohistochemical detection of BrdU incorporation into DNA was performed on the frontal sections of the brains 6 and 12 days after treatment with peptides. 6 days after Aβ peptide treatment, the total number of BrdU-positive cells in the subventricular zone was not significantly different in all groups studied. The total number of labelled cells was significantly decreased 12 days after surgery. However, in the Aβ(25–35)-treated rats the number of BrdU-positive cells was higher as compared to that one in rats injected with control peptide or vehicle. Thus, intracerebroventricular administration of Aβ(25–35) significantly increased cell proliferation in the subventricular zone.

Key words: *hippocampus, dentate gyrus, subventricular zone, cell proliferation, amyloid-β peptide (25–35).*

Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System, RAS Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Moscow