

Н.А. Коканова, Г.З. Михайлова, Р.Ш. Штанчаев, Н.Р. Тирас, Е.Н. Безгина и Д.А. Мошков

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МАУТНЕРОВСКИХ НЕЙРОНОВ ЗОЛОТОЙ РЫБКИ ПОСЛЕ АППЛИКАЦИИ β -АМИЛОИДА

Лаборатория ультраструктуры нейрона (зав. — проф. Д.А. Мошков) Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино; Магистерская общеобразовательная программа Медико-биологические науки (зав. — проф. Э.И. Лежнев) Пущинского государственного университета, e-mail: kokanchik@rambler.ru; gmikhailova@rambler.ru; rshtanch@mail.ru; ntiras@rambler.ru; Bezgina@mail.ru; d_moshkov@mail.ru

Исследовали влияние аппликации агрегированного фрагмента 25-35 β -амилоидного пептида на трехмерную структуру и объем мautнеровских нейронов (МН), определяемые реконструкцией по серийным гистологическим срезам, и на моторную асимметрию золотой рыбки. Показано, что в интактном состоянии и в контроле моторная асимметрия рыбок стабильна и строго коррелирует со структурной асимметрией нейронов. Под влиянием же β -амилоида она сильно изменяется или инвертируется и не совпадает, часто даже противоречит структурной асимметрии МН. Это происходит за счет сильной дистрофии или, наоборот, гипертрофии индивидуальных нейронов и их отдельных дендритов с изменением пропорций между ними. Предполагается, что повреждающее действие β -амилоида на структуру МН и не согласующееся с ним («неправильное») поведение рыбок могут быть результатом механической деформации, вызываемой его лентовидными фибриллами. В целом, можно заключить, что МН являются адекватным объектом для изучения структурных аспектов амилоидоза.

Ключевые слова: мautнеровские нейроны, структура, функция, β -амилоид 25–35.

Болезнь Альцгеймера, клинически проявляющаяся прогрессирующей потерей памяти, объясняют возрастающей гибелью нейронов, завершающейся атрофией мозга, которую связывают с церебральным амилоидозом, внеклеточным локальным отложением волокнистого β -амилоидного белка (β -амилоида) в виде сенильных бляшек [3, 12]. Этим процессам предшествует длительный период, когда нейродегенерации еще нет, а симптоматически болезнь Альцгеймера диагностируется. Установить, какие морфологические изменения происходят при этом в индивидуальных нейронах мозга, из-за неопределенности их топографии и функции практически невозможно, что мешает расшифровать механизмы амилоидоза и определить возможные мишени для выбора терапии. Обойти указанные трудности помогает моделирование болезни Альцгеймера, которое наиболее часто осуществляется с помощью введения β -амилоида в желудочки головного мозга лабораторных животных [10], но такой подход не позволяет исследовать морфофункциональные корреляции на конкретных нейронах. В этом аспекте, по-нашему мнению, влияние β -амилоида на морфофункциональное состояние индивидуальных нейронов проще изучать, апплицируя на них этот токсин. Цель настоящей работы — исследовать клеточную модель амилоидоза, вызванного аппликацией β -амилоида на мautнеровские нейроны (МН) золотой рыбки.

Материал и методы. Работу проводили на 3–5-месячных мальках золотой рыбки породы оранда, длиной около 3,5 см, массой около 2 г. Моторную асимметрию каждой рыбки (спонтанное предпочтение поворачиваться вправо или влево) определяли по величине коэффициента моторной асимметрии (КМА), вычисляемого как отношение количества поворотов в предпочитаемую сторону к общему числу поворотов [1]. Для фиксации и заливки продолговатого мозга использована стандартная электронно-микроскопическая методика. Объемы тела нейрона, латерального и вентрального дендритов и объемные изображения правого и левого МН определяли на основании трехмерной реконструкции по серийным гистологическим срезам толщиной 3 мкм, которые готовили на пирамитоме ЛКБ (Швеция) и просматривали под световым микроскопом NU-2E (Карл Цейс, ГДР). Фотосъемку вели с помощью цифровой камеры CoolPix 995 (Nikon, Япония). Пространственную структуру и расчет объемов отдельных частей МН получали с помощью специальных компьютерных программ [2, 6]. Различия между правым и левым МН выражали в виде коэффициента структурной асимметрии (КСА), вычисляемого как отношение объема нейрона, расположенного контралатерально относительно предпочитаемой рыбой стороны поворота, к сумме объемов обоих нейронов. О взаимосвязи функции и структуры МН судили по степени корреляции между КМА и КСА.

Аппликации в область расположения нейронов фрагмента 25–35 β -амилоида (Sigma, США) объемом 4 мкл в дозе 1 мкг/г массы тела проводили по описанному ранее методу [5, 11]. Контрольным рыбкам апплицировали среду разведения (дистиллированную воду [8]). Электронно-микроскопически определено, что коммерческий (неактивный) пептид представляет собой мелкодисперсный фибриллярный препарат (рис. 1, а).

После агрегации пептида в течение 1–3 сут при температуре 37 °С формируются протяженные спирально скрученные плоские ленты, соизмеримые по размерам с нейронами и

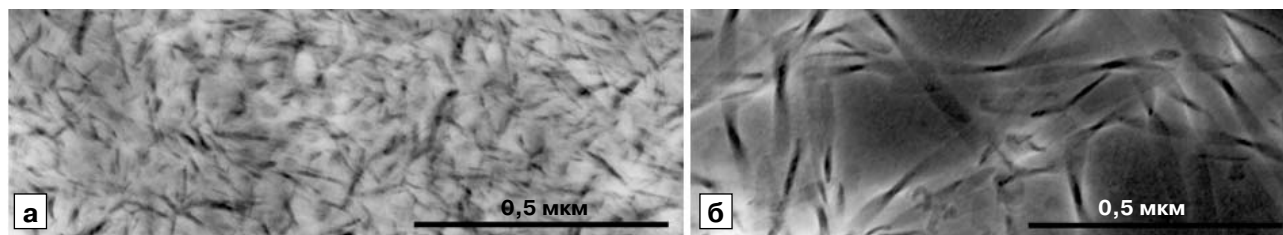


Рис. 1. Ультраструктура β -амилоидного пептида.

а — контрольный белок; б — белок, агрегированный при 37 °С. Негативный контраст.

дендритами (рис. 1, б), идентичные тем, которые выделены из сенильных бляшек головного мозга при болезни Альцгеймера. Благодаря высокой физиологической активности их используют для имитации болезни Альцгеймера на животных [4, 8]. Предварительные эксперименты показали, что у золотых рыбок наибольший эффект проявлялся после 5-часовой аппликации β -амилоида на МН. В работе применяли в основном этот срок воздействия.

Для электронно-микроскопического изучения МН готовили ультратонкие срезы с помощью ультратомов LKB-3 (Швеция) и Leica EM UC6 (ФРГ), пептид анализировали методом негативного контрастирования, препараты просматривали в электронном микроскопе Tesla BC-500 (Чехословакия). Статистическую обработку количественных данных проводили в программе Microsoft Excel, вычисляя значения среднего арифметического и его стандартную ошибку, различия считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. Агрегированный β -амилоид идентифицируется в ультратонких срезах как крупнозернистый осмиофильный материал в расширенных межклеточных про-

странствах у поверхности МН между синапсами (рис. 2).

Сравнительный анализ в контрольной группе показал, что аппликация на МН среды разведения не изменяет моторной асимметрии рыбок (таблица), значения их КМА и интактных рыбок до и после аппликации практически совпадают. Моторная асимметрия при 5-часовом влиянии β -амилоида на МН существенно зависела от исходного предпочтения рыбки.

В физиологических экспериментах аппликация β -амилоида приводила к значимому ($P < 0,05$) сглаживанию моторной асимметрии рыбок-правшей, КМА уменьшался с $0,62 \pm 0,02$ до $0,50 \pm 0,03$ ($n=10$). У рыбок-левшей моторная асимметрия несколько усиливалась под влиянием пептида, КМА увеличивался с $0,56 \pm 0,02$ до $0,60 \pm 0,03$ ($n=10$). При воздействии β -амилоида через 17 ч его влияние на рыбок-левшей сохранялось (КМА изменился с $0,61 \pm 0,08$ до $0,74 \pm 0,16$, $n=6$), а на рыбок-

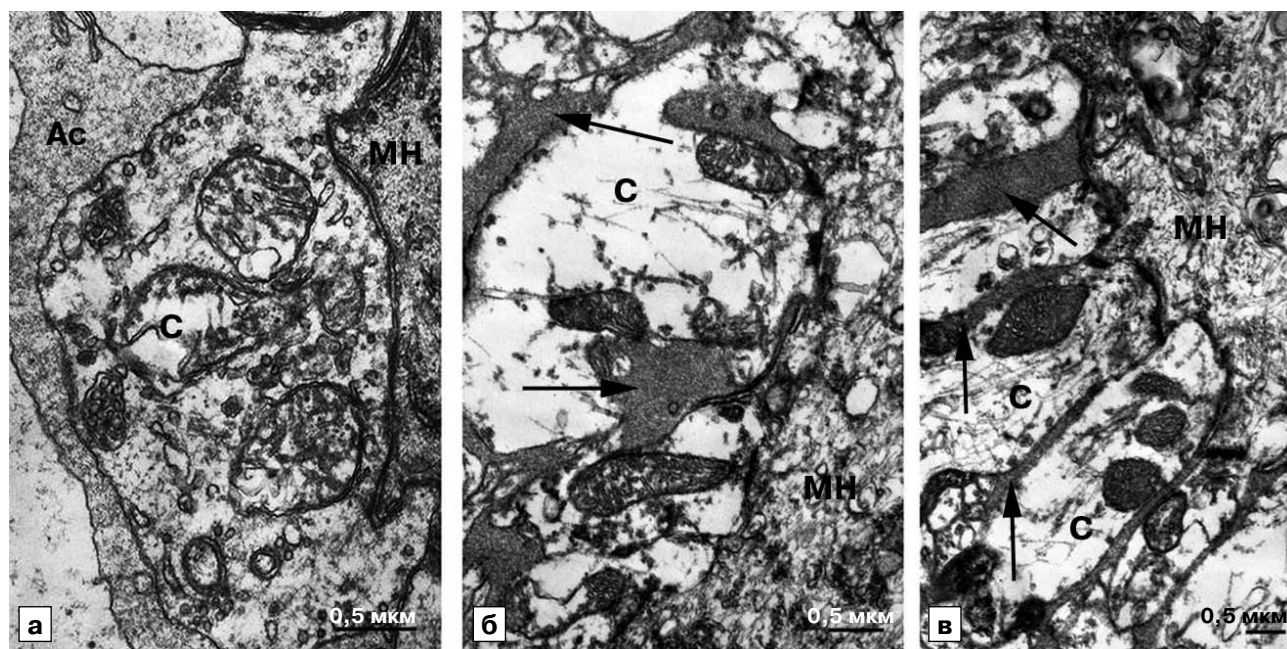


Рис. 2. Участок поверхности маутнеровского нейрона интактной (а) и подопытных (б, в) золотых рыбок после 5-часовой (б) и 17-часовой (в) аппликации β -амилоида.

Ас — отросток астроцита; МН — цитоплазма маутнеровского нейрона; С — синапс. Стрелки — зернистый материал вблизи МН.

Характеристика маутнеровских нейронов (МН) золотых рыбок после аппликации β -амилоида ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группы рыбок	МН	Объем МН (10^3 мкм^3)							КМА		КСА
		Сома	ЛД	ВД	Аксон	АЧ	$\Sigma 1\text{МН}$	$\Sigma 2\text{МН}$	до аппликации	после аппликации	
Интактные (n=9)	К	191 $\pm$ 20*	85 $\pm$ 16	84 $\pm$ 12	185 $\pm$ 24	40 $\pm$ 6	360 $\pm$ 31	598 $\pm$ 49	0,59 $\pm$ 0,02		0,60 $\pm$ 0,02
	И	109 $\pm$ 13	60 $\pm$ 7	69 $\pm$ 18	160 $\pm$ 25	34 $\pm$ 7	238 $\pm$ 21				
Контроль (n=3)	К	116 $\pm$ 34*	78 $\pm$ 4	55 $\pm$ 18	274 $\pm$ 49	49 $\pm$ 8	249 $\pm$ 50	446 $\pm$ 68	0,57 $\pm$ 0,06	0,56 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,07
	И	90 $\pm$ 15	54 $\pm$ 28	53 $\pm$ 10	242 $\pm$ 73	45 $\pm$ 17	197 $\pm$ 42				
Опыт:											
А	К	51	27	9	104	19	83	250	0,53	0,56	0,33
	И	115	24	28	145	42	167				
Б	К	92	57	61	192	48	210	580	0,73	0,60	0,36
	И	163	118	89	234	60	370				
В	К	192	127	140	102	42	459	707	0,50	0,34	0,65
	И	130	44	74	140	43	248				
Г	К	133	31	40	256	52	204	447	0,55	0,58	0,46
	И	160	52	31	229	56	243				
Д	К	125	74	42	109	38	241	389	0,53	0,56	0,62
	И	62	48	38	196	42	148				

Примечание. ЛД и ВД — латеральный и вентральный дендриты; АЧ — аксонная чаша. $\Sigma 1\text{МН}$ — объем одного нейрона (включает объем тела и дендритов); $\Sigma 2\text{МН}$ — объем обоих нейронов. КМА, КСА — коэффициенты моторной и структурной асимметрии соответственно. К, И — контралатеральный, ипсилатеральный МН относительно предпочитаемой рыбкой стороны поворота. А–Д — через 5 ч после инъекции β -амилоида; Г — через 17 ч. Интактные, контрольные, А, Б, В, Г: рыбки-правши; Д: рыбка-левша.

* Различия значимы по сравнению с соответствующим значением объема ипсилатерального нейрона.

правшей — нет (КМА до и после аппликации составил 0,54 $\pm$ 0,04, n=3).

Результаты исследования структуры МН у отдельных интактных, контрольных и подопытных рыбок (для примера выбраны рыбки-правши) представлены на рис. 3 и 4.

Визуально у интактных и контрольных рыбок (см. рис. 3, а, б соответственно) размер левого контралатерального нейрона (его тела и обоих дендритов) значительно превышает размер правого ипсилатерального нейрона и его отдельных участков. Иная картина наблюдается у МН подопытных рыбок. На рис. 4, а структурная асимметрия МН соответствовала рыбке-левше, хотя рыбка стала еще более выраженной правшой. Рис. 4, б иллюстрирует другой специфический случай. После аппликации β -амилоида структурное различие между ее МН соответствует отчетливо выраженной правше, а моторная асимметрия инвертировалась, рыбка стала левшой.

Результаты морфометрического анализа показали, что КМА интактных и контрольных рыбок, который отражает функциональную асимметрию МН, строго коррелирует с КСА этих нейронов и равен в абсолютном выражении (см. таблицу). Воздействие β -амилоида приводит к несоответствию функционального состояния МН и

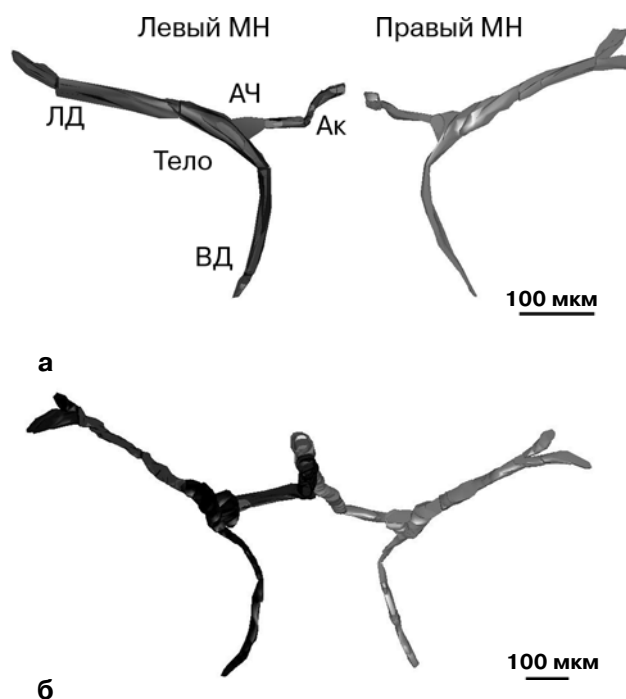


Рис. 3. Объемные изображения маутнеровских нейронов (МН) интактной (а) и контрольной (б) золотых рыбок.

Ак — аксон; АЧ — аксонная чаша; ВД и ЛД — вентральный и латеральный дендриты соответственно.

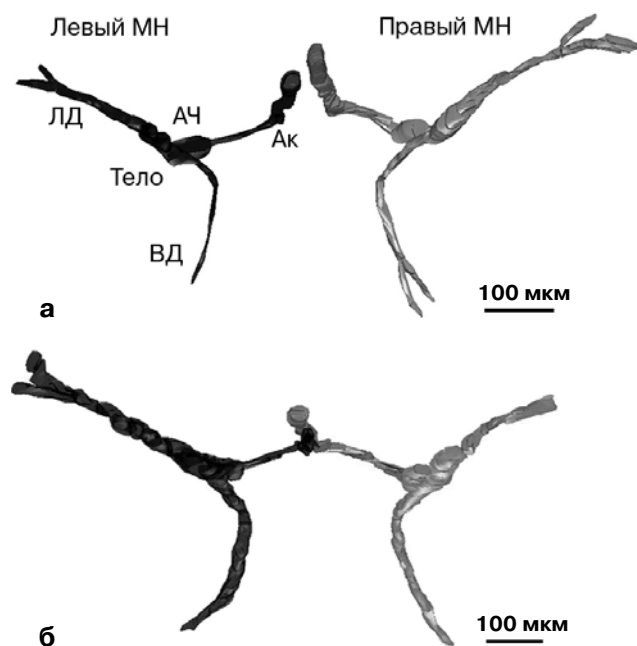


Рис. 4. Объемные изображения маутнеровских нейронов (МН) двух типичных подопытных золотых рыбок (а, б) через 5 ч после аппликации β -амилоида.

Обозначения те же, что и на рис. 3.

структурной асимметрии контралатерального и ипсилатерального нейронов. Так, у двух подопытных рыбок-правшей А и Б (см. таблицу) спустя 5 ч после инъекции амилоида исходная моторная асимметрия сохраняется. В то же время КСА их МН инвертировались, и обе рыбки должны были быть отчетливо выраженными левшами. В первом случае (рыбка А, см. таблицу) аномалия проявилась полным несоответствием функциональной активности соотношения объемов отдельных частей нейронов. Интегральный объем левого, исходно доминантного, нейрона вопреки наблюдаемым в норме пропорциям стал вдвое меньше, объем вентрального дендрита в 3 раза меньше, чем у правого, исходно субдоминантного нейрона. В другом случае (рыбка Б, см. таблицу) β -амилоид вызвал существенную дистрофию исходно доминантного МН, уменьшив на треть его интегральный объем без нарушения пропорций между телом и дендритами, хотя такая инверсия структурной асимметрии МН противоречила реальной моторной асимметрии рыбки. Противоположный случай аномальной взаимосвязи структуры и функции МН под действием β -амилоида можно видеть у рыбки-правши В (см. таблицу). Ее моторная асимметрия после 5-часовой аппликации амилоида инвертировалась, рыбка стала отчетливо выраженной левшой, зато структурная асимметрия МН в целом оставалась исходной — характерной для рыбки-правши. При

этом ее контралатеральный МН сильно гипертрофировался, увеличившись в 1,5 раза по сравнению с МН интактных и контрольных рыбок, нарушились объемные пропорции между дендритами и телом нейрона.

Воздействие 17-часовой аппликации β -амилоида на МН рыбки-правши Г (см. таблицу) слегка обостряло моторную асимметрию и не значительно изменяло структурную асимметрию МН. Закономерное рассогласование функциональной и структурной асимметрии МН наблюдалось как и у предыдущих особей, хотя эффект действия β -амилоида ослабевал. Несколько по-иному действовал β -амилоид на рыбку-левшу Д (см. таблицу). Значения ее моторной и структурной асимметрии немного обострялись, однако полного соответствия КМА и КСА, характерного для интактных и контрольных рыбок, тоже не было.

Обсуждение полученных данных. Известно, что в обычных условиях в мозгу поддерживается постоянство пропорций между разными дендритами индивидуальных нейронов, которое свойственно нейронам разных отделов ЦНС млекопитающих [14], и не только им, но и нейронам низших позвоночных, в частности, МН золотой рыбки, причем закономерности их структурной организации имеют функциональный смысл [1, 6].

Сохраняются ли постоянными пропорции между нейритами в условиях невропатологий, в частности, при хроническом церебральном амилоидозе, остается неизвестным. Предполагается, но не подтверждено, что одним из механизмов дисфункции мозга высших позвоночных при естественной и экспериментальной болезни Альцгеймера может быть дистрофия отростков нейрона, вызванная сжатиями, растяжениями, изгибом и другими видами механической деформации, испытываемыми центральными нейронами в сенильных бляшках [9, 10, 15]. Для подтверждения этой точки зрения нужны более простые и воспроизводимые модели амилоидоза. Недавно разработанная генетическая модель таупатии на рыбках данио-зебре [13], возможно, создает предпосылку для перевода изучения механизмов амилоидоза на клеточный уровень, однако пока таких исследований не проводили. В настоящей работе мы применили в качестве модели амилоидоза прямое воздействие β -амилоида в остром опыте на МН золотой рыбки. Установлено, что аппликация амилоида на эти нейроны вызывает различные дистрофические изменения структуры местного и общего характера, которые можно объяснить неконтролируемой лигатурой МН лентами β -амилоида. Они, как мы показали, окружают

МН и способны их деформировать. Подобные искажения структуры, например, местное сжатие или окклюзия дендритов нейронов в условиях *in vitro* способны приводить к серьезным функциональным изменениям [7]. Сходная картина наблюдалась нами *in vivo*. Аппликация β -амилоида вызывала уменьшение вентрального дендрита и это, вероятно, явилось причиной сохранения исходной моторной асимметрии рыбки, несмотря на двукратное уменьшение размеров контралатерального МН по сравнению с ипсилатеральным. Аналогичное увеличение функциональной активности меньшего по размеру МН при многократном уменьшении размера его вентрального дендрита имело место при длительной оптокинетической стимуляции [2, 6]. Существенно, что отклонения в структуре не всегда влекут за собой прямые коррелятивные изменения в поведении, вызванные спровоцированными β -амилоидом аномалиями функции. Деструктивное действие амилоида на МН и не согласующееся с ним («неправильное») поведение рыбок можно рассматривать как главные признаки модельной формы амилоидоза, индуцированного аппликацией β -амилоида. В целом, можно заключить, что МН являются адекватным объектом для изучения структурных аспектов амилоидоза.

Работа проведена при финансовой поддержке грантов Президента РФ «Ведущие научные школы» № 217. 2008. 4; РФФИ № 09-04-00451-а; Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы», проект № 3840 и Федерального агентства по науке и инновациям, Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», номер государственного контракта 02.740.11.0301.

ЛИТЕРАТУРА

- Михайлова Г.З., Павлик В.Д., Тирас Н.Р. и Мошков Д.А. Корреляция размеров маутнеровских нейронов с предпочтением золотых рыбок поворачиваться вправо или влево. *Морфология*, 2005, т. 127, вып. 2, с. 16–19.
- Михайлова Г.З., Тирас Н.Р., Павлик В.Д. и др. Морфологические характеристики маутнеровских нейронов золотых рыбок с измененной асимметрией моторного поведения. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2006, т. 38, № 1, с. 18–31.
- Преображенская И.С. и Яхно Н.Н. Болезнь Альцгеймера: клиника, патогенез, лечение. *Русский мед. журн.*, 2006, т. 14, № 4, с. 641–652.
- Степанчев М.Ю., Моисеева Ю.В., Лазарева Н.А. и др. Изменения пролиферации клеток в субвентрикулярной зоне мозга у взрослых крыс при введении β -амилоидного пептида (25–35). *Морфология*, 2009, т. 135, вып. 1, с. 13–16.
- Тирас Н.Р., Михайлова Г.З. и Мошков Д.А. Эффекты, вызываемые полимеризующим актин пептидом, в маутнеровских нейронах золотой рыбки. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2006, т. 38, № 5, с. 389–400.
- Штанчаев Р.Ш., Михайлова Г.З., Дектярева Н.Ю. и др. Изменения вентрального дендрита маутнеровского нейрона золотой рыбки под воздействием оптокинетической стимуляции. *Морфология*, 2007, т. 132, вып. 6, с. 29–34.
- Bekker J.M. and H usser M. Targeted dendrotomy reveals active and passive contributions of the dendritic tree to synaptic integration and neuronal output. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, v. 104, № 27, p. 11447–11452.
- Cetin F. and Dinger. The effect of intrahippocampal β -amyloid peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, v. 1100, p. 510–517.
- Gruzlender J., Helmin K., Tsai J. and, Gan W.B. Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, v. 1097, p. 30–39.
- Knowles R.B., Wyart C., Buldyrev S.V. et al. Plaque-induced neurite abnormalities: Implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, v. 96, № 9, p. 5274–5279.
- Kolaeva S.G., Semenova T.P., Santalova I.M. et al. Effects of L-tyrosyl-L-arginine (kytorphin) on the behavior of rats and goldfish. *Peptides*, 2000, v. 21, p. 347–351.
- Mattson M. Pathways toward and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 2004, v. 430, p. 631–638.
- Paquet D., Bhat R., Sydov A. et al. A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J. Clin. Invest.*, 2009, v. 119, № 5, p. 1382–1395.
- Samsonovich A.V. and Ascoli G.A. Morphological homeostasis in cortical dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, v. 103, № 5, p. 1569–1574.
- Spires T.L. and Hyman B.T. Neuronal structure is altered by amyloid plaques. *Rev. Neurosci.*, 2004, v. 15, № 4, p. 267–278.

Поступила в редакцию 15.01.09
Получена после доработки 19.08.09

MORPHO-FUNCTIONAL IMPLICATIONS OF BETA-AMYLOID APPLICATION ONTO THE GOLDFISH MAUTHNER CELLS

N.A. Kokanova, G.Z. Mikhailova, R.Sh. Shtanchayev, N.R. Tiras, Ye.N. Bezgina and D.A. Moshkov

The influence of aggregated beta-amyloid peptide fragment 25–35 application on three-dimensional structure and volume of Mauthner cells (MCs), as determined by reconstruction from serial histological sections, and on goldfish motor asymmetry was studied. It was shown that in intact and control goldfish motor asymmetry was stable and strongly correlated with structural asymmetry of neurons. But under the influence of beta-amyloid, motor asymmetry appeared to be strongly changed or inverted, did not correlate with structural asymmetry and frequently even was opposite to it. This resulted from strong dystrophy or, on the contrary, hypertrophy of individual neurons and their separate dendrites with the change in the proportions between them. It is suggested that injurious effect of beta-amyloid peptide on MCs structure, discordant with (“irregular”) fish behavior, could be the result of mechanical deformation, induced by ribbon-like fibrils of amyloid peptide. These findings collectively suggest that MCs are the adequate object for the study of the structural aspects of amyloidosis.

Key words: Mauthner cells, structure, function, beta-amyloid 25–35.

Laboratory of Neuron Ultrastructure, RAS Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, “Biomedical Sciences” Master's Educational Program, Training Center of Biophysics and Biomedicine, Pushchino State University.