

© Коллектив авторов, 2010
УДК 611.81.018:616.894-053.8:599.323.4

Е.И. Чумасов¹, Д.Э. Коржевский¹, Е.С. Петрова¹, Н.Н. Кузнецова² и Н.С. Сапронов²

РЕАКЦИЯ ГЛИИ СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ КОНЕЧНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д.Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии; ² отдел нейрофармакологии (руков. — чл.-кор. РАН Н.С. Сапронов), Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург; e-mail: iemmorphol@yandex.ru, dek2@yandex.ru

Целью настоящего исследования явилось изучение реактивных изменений в субвентрикулярной зоне (СВЗ) боковых желудочков головного мозга крыс в отдаленные сроки после интравентрикулярного введения нейротоксического вещества — агрегированного бета-амилоидного-пептида (БАП). Установлено, что через 3 мес клетки эпендимы и СВЗ реагируют на внутрижелудочковое введение БАП формированием своеобразных глиозных структур, сходных по составу, строению клеток и, вероятно, механизму образования с амилоидными бляшками. Иммуногистохимически установлено, что они состоят, главным образом, из реактивных астроцитов и микроглиоцитов. Предполагается, что атипичный морфогенез этих структур обусловлен взаимосвязью дегенеративных и регенераторных процессов, в которых участвуют как клетки эпендимы, так и прогениторные клетки пролиферативной зоны конечного мозга.

Ключевые слова: головной мозг, субвентрикулярная зона, астроциты, бета-амилоидный пептид, болезнь Альцгеймера

Создание адекватных экспериментальных моделей хронических нейродегенеративных заболеваний — одна из актуальных задач современной нейробиологии и экспериментальной медицины. Среди заболеваний, моделирование которых необходимо для разработки новых методов патогенетической терапии, своей социальной значимостью выделяется болезнь Альцгеймера. Для ее моделирования на лабораторных животных применяют различные подходы [3, 5, 17]. Один из них — метод внутрижелудочкового введения нейротоксического вещества — агрегированного бета-амилоидного пептида (БАП) [12, 16].

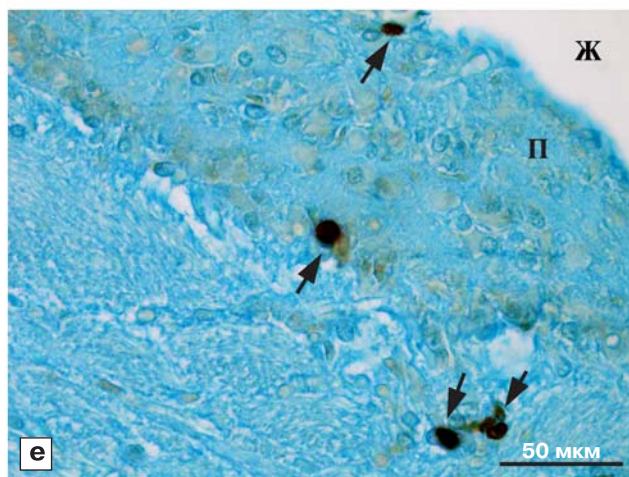
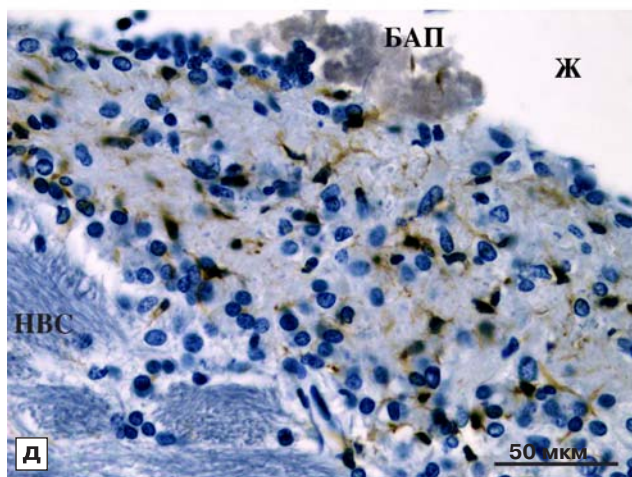
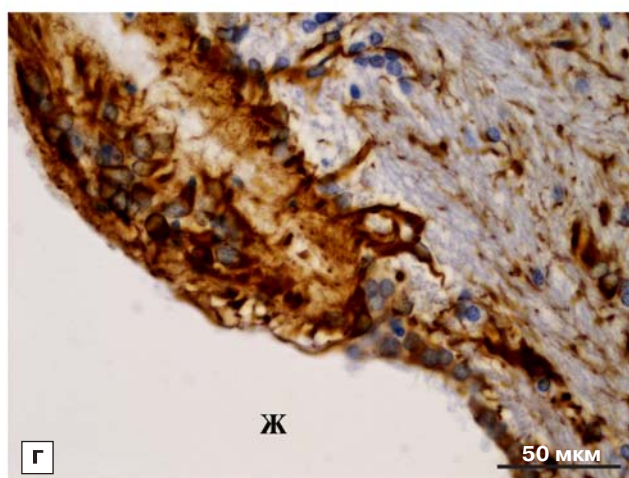
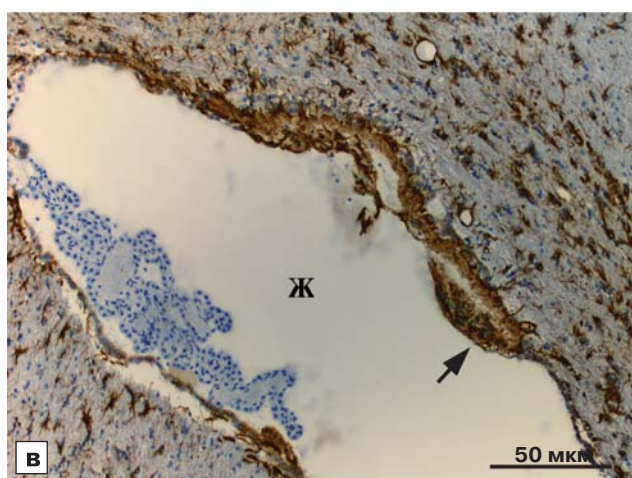
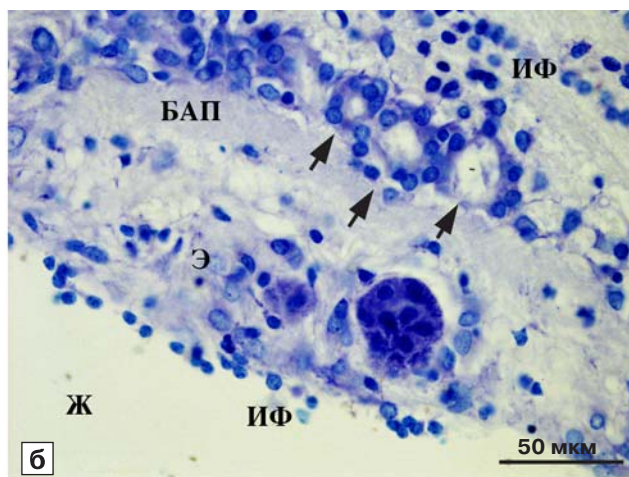
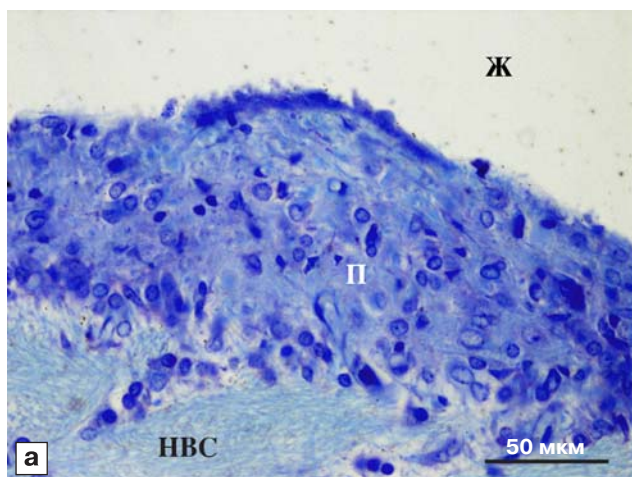
В ряде экспериментальных исследований было показано, что после одностороннего внутрижелудочкового введения БАП у животных появляются амнезия, нарушения поведенческих реакций, сопровождающиеся нейродегенеративными изменениями в определенных отделах коры головного мозга и гиппокампе на ранних этапах развития нейродегенеративного процесса [13, 14, 16]. Особое внимание было уделено ранней пролиферативной реакции в субвентрикулярной зоне (СВЗ) конечного мозга [15], которая может быть связана с компенсаторной активацией нейрогенеза и дифференцировкой нейральных стволовых и прогениторных клеток. Однако в целом структурно-функциональные изменения, происходящие в СВЗ в отдаленные сроки после введения БАП, остаются неисследованными.

Цель настоящего исследования состояла в определении реактивных изменений в СВЗ боковых желудочков головного мозга крыс в отдален-

ные сроки после интравентрикулярного введения БАП.

Материал и методы. Половозрелым крысам-самцам линии Вистар (n=8) под стереотаксическим контролем вводили агрегированную суспензию БАП (фрагмент с аминокислотной последовательностью 25–35, Sigma, США) внутрь левого бокового желудочка по методу, разработанному в отделе нейрофармакологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины [13]. Правое полушарие служило своеобразным контролем для сравнительного морфологического исследования. В качестве дополнительного контроля использовали головной мозг крыс линии Вистар (n=5), которым БАП не вводили. Через 3 мес животных выводили из опыта путем передозировки паров этилового эфира. Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами работ с экспериментальными животными» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [7] и заливали в парафин. Серийные срезы исследовали с помощью гистологических (гематоксилин-эозин, толудиновый синий по Нисслю), а также современных иммуногистохимических методик, использовавшихся для выявления глиального фибриллярного кислого белка астроцитов (GFAP) [9], белка Iba1, характерного для микроглии [4], и ядерного белка пролиферирующих клеток (PCNA) [6].

Результаты исследования. В группе животных, получавших БАП, обнаружены значительные морфологические изменения в области левого бокового желудочка, в который был введен БАП, и в соседних с ним тканях серого и белого вещества мозга. Желудочек расширен, а стенка его частично лишена характерной эпендимной выстилки. Сосудистое сплетение уменьшено и часто спаяно с одной из стенок желудочка, его



Эпендимная выстилка бокового желудочка крысы через 3 мес после введения в него бета-амилоидного пептида.

а — общий вид скопления клеточных элементов в виде «подушки» на латеральной поверхности желудочка; б — сферические структуры из эпендимоцитов (стрелки) в толще «подушки»; в — просвет гипертрофированного желудочка и общий вид «подушки» (стрелка); г — фрагмент «подушки»: локальное скопление реактивных астроцитов; д — микроглия в толще «подушки» (коричневые отростчатые клетки); е — пролиферирующие клетки (стрелки) в толще «подушки». БАП — скопления бета-амилоида; Ж — просвет бокового желудочка мозга; П — «подушка»; Э — нарушение целостности эпендимной выстилки желудочка; ИФ — лимфоцитарные и моноцитарные инфильтраты; НВС — пучки нервных волокон стриатума. а — б — окраска толуидиновым синим по Нисслю; в, г — иммуногистохимическая реакция на глиальный кислый фибриллярный белок, докраска гематоксилином; д — реакция на белок микроглиоцитов Iba1, докраска гематоксилином; е — реакция на ядерный антиген пролиферирующих клеток, докраска астровым синим.

эпителий местами уплощен, сосуды расширены, а соединительная ткань отечна. Контралатеральный желудочек несколько расширен, а его эпендимная выстилка сохранена.

В верхнелатеральной стенке левого желудочка вместо слоя типичных кубических эпендимоцитов наблюдается видоизмененный клеточный пласт, который представлен многочисленными мелкими, округлыми, а в некоторых местах — сильно уплощенными клетками. Частота и плотность расположения этих клеток в пласте значительно выше, чем в норме. На границе с мозолистым телом, где эпендимный слой, выстилающий желудочек, сильно истончен, обнаруживаются отек ткани серого и белого вещества и повышенная концентрация клеточных элементов — особенно пролиферирующих астроцитов и олигодендроцитов, которые образуют здесь небольшие островковые скопления и тяжи. Тяжи этих клеток находятся на месте пучков разрушенных миелиновых волокон. При докраске срезов толуидиновым синим между тяжами астроцитов кое-где видны цепочки ядер олигодендроцитов, а также мелкоклеточные элементы (моно-, микроглио-, лимфоциты). Эта картина свидетельствует о развитии процесса уоллеровской дегенерации в мозолистом теле, что является указанием на нарушение межполушарных связей у экспериментальных животных.

В СВЗ левого желудочка, в отдельных местах (по-видимому, в зоне непосредственного прилегания амилоидных агрегатов к стенке желудочка), наблюдаются реактивные и дистрофические изменения. Это выражается в исчезновении на данном участке непрерывного эпендимного пласта с образованием широкой бесклеточной зоны, окруженной валом пролиферирующих глиальных элементов. При больших увеличениях видно, что в бесклеточной зоне находится масса тончайших плотно расположенных фибрилл, окрашивающихся по Ниссли в голубой цвет. Образовавшаяся в ответ на токсическое действие БАП ткань СВЗ часто имеет вид «подушки» (рисунок), выдающейся в просвет желудочка, для которой характерен гетерогенный клеточный состав. В ней отчетливо определяются кубической формы эпендимоциты. Одни из них располагаются обособленно, другие — в виде коротких цепочек, а третьи — образуют характерные, небольших размеров (от 50 до 100 мкм), шарообразные структуры — «сфероиды» (см. рисунок, б) — с просветом или без него. Иммуногистохимическое исследование соседних серийных срезов с постановкой реакций на GFAP, микроглиальный маркер Iba1 и PCNA дало возможность более детально описать структуру ткани субвентрикулярной «подушки».

На препаратах видно, что основное количество клеточных элементов «подушки» представлено реактивными астроцитами. Они находятся между измененными, пролиферирующими эпендимоцитами и «сфероидами», а в некоторых местах эти клетки замещают эпендиму и выстилают просвет желудочка на значительном протяжении. Кроме реактивных астроцитов и эпендимоцитов, в «подушке» обнаружена микроглия (см. рисунок, д), а также остатки продуктов распада других клеточных элементов. В основании и вблизи поверхности этой атипичной структуры встречаются PCNA-иммунопозитивные клетки (см. рисунок, е). Многие отростки астроцитов сильно уплощены и заполнены GFAP-иммунопозитивными глиофибриллами. На границе «подушки» с окружающей нервной тканью присутствуют 1–2 ряда реактивных астроцитов, образующих своеобразный демаркационный вал. Подобные образования в СВЗ мозга были характерны только для левого полушария и не наблюдались в контралатеральном. Иногда рядом с ними в просвете желудочка, при подкрашивании толуидиновым синим, можно видеть аморфные депозиты, которые, вероятно, являются остатками введенного БАП.

Обсуждение полученных данных. Данные литературы свидетельствуют о том, что инъекционная модель болезни Альцгеймера успешно используется для решения различных фундаментальных и прикладных задач нейробиологии [13, 19, 20]. Одной из причин, вызывающих нейродегенеративные изменения, по мнению многих авторов, является отложение в различных отделах мозга БАП, обладающего токсичностью по отношению к нервной ткани. С целью поиска новых терапевтических подходов и фармакологических препаратов, предотвращающих или замедляющих развитие заболевания, на этой модели проводятся физиологические [13, 16] и биохимические [10, 14] исследования. Работы, посвященные морфологическому анализу нейродегенеративных процессов на данной модели, немногочисленны [21].

В настоящей работе было изучено влияние интрацеребрального введения БАП в боковой желудочек мозга крыс на структуру эпендимной выстилки и СВЗ желудочков конечного мозга. Изменения были обнаружены преимущественно в латеральной области левого желудочка (того желудочка, в который вводили БАП). Показано, что в этой области на границе с полостью желудочка наблюдается скопление клеточных элементов в виде своеобразной «подушки». С помощью иммуногистохимической реакции на GFAP установлено, что большинство клеток этого образования

являются реактивными астроцитами. Астроциты, как известно, обладают высокой чувствительностью к различным повреждающим факторам и способны отвечать на них комплексом реактивных проявлений, включающих пролиферацию, рост, миграцию, дифференцировку и экспрессию специфических белков [8, 9]. Они реагируют на гибель нейронов, повреждения сосудов, гипоксию, демиелинизацию заместительным глиозом [9, 22]. Реактивные астроциты отличаются от обычных тем, что они интенсивнее окрашиваются при постановке иммуногистохимической реакции на GFAP, в то время как ядро остается негативным к маркеру, имеют значительно большие размеры по сравнению с интактными клетками и толстые маловетвящиеся отростки [8]. Появление токсических депозитов БАП в желудочке мозга вызывает каскад нейродегенеративных изменений, приводящих к развитию локальной глиальной реакции. Присутствие в зоне глиоза микроглиоцитов объясняется реакцией последних на гибель клеток мозга, как это происходит и при других патологических состояниях.

Следует отметить, что «подушки» по своему клеточному составу и структуре напоминают амилоидные (сенильные) бляшки. Однако сведения о структуре амилоидных бляшек противоречивы. По данным одних авторов [2], сенильные бляшки представляют собой нерастворимые сферические образования диаметром около 0,2 мм. Типичная бляшка состоит из центральной более плотной части, образованной в основном отложениями труднорастворимого БАП, и окружена кольцом из дистрофических нейронов. Другие авторы, выявляя амилоидные бляшки в гиппокампе [1], акцентируют внимание только на структуре агрегатов различных токсичных и нетоксичных форм амилоидных пептидов. Третьи [11], характеризуя амилоидную бляшку, отмечают, что сформированная бляшка включает ядро, основу которого составляют патологический гиперагрегированный бета-амилоид и ряд дополнительных компонентов, а также окружающие его дегенерирующие нейроны, содержащие внутриклеточные сплетения филаментов. В нашем случае центром формирования «бляшки» можно считать амилоид, проникающий через поврежденную эпендиму в СВЗ левого желудочка. При этом периферию глиозного образования («подушки») составляет широкий вал из многочисленных реактивных астроцитов, а также моноклеарных клеток (вероятно, лимфоидных) и продуктов распада клеток, тогда как в центральной части присутствуют преимущественно астроциты и микроглиоциты.

Каков механизм образования обнаруженных «подушек» не совсем ясно. М.Ю. Степаничев и соавт. [15] с помощью аналога тимидина — BrdU — изучили изменение пролиферации прогениторных клеток СВЗ конечного мозга крыс после введения БАП. Установлено, что введение БАП приводит к увеличению в СВЗ числа пролиферирующих клеток-предшественников через 12 сут после операции. Дальнейшая судьба этих клеток пока не прослежена. Возможно, вследствие их пролиферации и формируются описанные нами глиальные образования. По нашим данным, в очагах дегенерации, в области глиальных разрастаний даже через 3 мес после введения БАП выявляются пролиферирующие PCNA-позитивные клетки. Их дифференцировка в астроциты может объяснить механизм развития заместительного глиоза на месте поврежденной эпендимной выстилки желудочка. Возможно также, что в образовании «подушек» участвуют нейральные стволовые клетки. В литературе имеются отдельные сведения о том, что в эпендиме мозга млекопитающих в постнатальный период встречаются CD133-положительные клетки, обладающие прогениторными потенциями [18]. В пользу этого свидетельствуют нередко формирующиеся в «подушках» сфероиды, которые представляют собой продукт неэффективной (в условиях повреждающего влияния БАП) регенерации эпендимы.

Таким образом, установлено, что клетки эпендимы и СВЗ реагируют на внутрижелудочковое введение БАП формированием своеобразных глиозных структур, сходных по составу, строению клеток и, вероятно, механизму образования с амилоидными бляшками. Атипичный морфогенез этих структур, по-видимому, обусловлен взаимосвязью дегенеративных и регенераторных процессов, в которых участвуют как клетки эпендимы, так и прогениторные клетки пролиферативной зоны конечного мозга.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-04-00180а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т.Т., Кудинов Н.В. и Кудинов А.Р. Альцгеймеровские амилоидные бляшки в механизмах нарушения синаптической пластичности нейронов. Вестн. РАМН, 2005, № 10, с. 3–7.
2. Григоренко А.П. и Рогов Е.И. Молекулярные основы болезни Альцгеймера. Молекул. биол., 2007, т. 41, № 2, с. 331–345.
3. Дудкин К.Н., Чуева И.В., Макаров Ф.Н. и др. Нарушение процессов обучения и памяти в модели болезни Альцгеймера на обезьянах: роль ассоциативных областей коры головного мозга. Рос. физиол. журн., 2005, т. 91, № 8, с. 857–871.

4. Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и Коржевский Д.Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF1 в клетках головного мозга крысы. *Морфология*, 2010, т. 137, вып. 2, с. 5–8.
5. Коканова Н.А., Михайлова Г.З., Штанчаев Р.Ш. и др. Морфофункциональные изменения маутнеровских нейронов золотой рыбки после аппликации β -амилоида. *Морфология*, 2009, т. 136, вып. 6, с. 43–48.
6. Коржевский Д.Э. Использование моноклональных антител к ядерному белку PCNA для выявления пролиферирующих клеток в развивающемся головном мозге человека. *Морфология*, 2000, т. 118, вып. 5, с. 68–70.
7. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–86.
8. Коржевский Д.Э., Ленцман М.В., Гиляров А.В. и др. Морфологические проявления локальной функциональной активации астроцитов, вызванной кратковременной общей ишемией головного мозга. *Журн. эволюц. биохим.*, 2007, т. 43, № 5, с. 423–426.
9. Коржевский Д.Э., Отеллин В.А., Григорьев И.П. и др. Структурная организация астроцитов гиппокампа крысы в постишемический период. *Морфология*, 2004, т. 125, вып. 2, с. 19–21.
10. Костанян И.А., Жохов С.С., Сторожева З.И. и др. Нейропротекторное действие гексапептида HLDF-6 на нейроны гиппокампа крыс на модели болезни Альцгеймера *in vivo* и *in vitro*. *Биоорг. химия*, 2006, т. 32, № 4, с. 399–407.
11. Левада О.А. Нейробиология и современные подходы к лечению болезни Альцгеймера. *Лікарська справа*, 2003, № 7, с. 12–16.
12. Митрохина О.С., Степанчев М.Ю., Моисеева Ю.В. и др. Влияние интрацеребровентрикулярного введения фрагмента (25–35) бета-амилоидного пептида на уровни перекисного окисления липидов в структурах мозга и в крови крыс. *Докл. РАН*, 1999, т. 368, № 5, с. 711–713.
13. Сапронов Н.С., Федотова Ю.О. и Лосев Н.А. Оптимизирующее действие сочетанного введения 8-OH-DPAT и галантамина на депрессивно-тревожное поведение старых крыс с деменцией альцгеймеровского типа. *Экспер. и клин. фармакол.*, 2006, т. 69, № 3, с. 10–13.
14. Степанчев М.Ю., Моисеева Ю.В. и Гуляева Н.В. «Инъекционные» модели болезни Альцгеймера: окислительный стресс в механизме токсичности A β 64A и бета-амилоидного пептида у грызунов. *Нейрохимия*, 2002, т. 19, № 3, с. 165–175.
15. 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.
16. Степанов И.И., Кузнецова Н.Н., Клементьев Б.И. и Сапронов Н.С. Влияние интрацеребровентрикулярного введения бета-амилоида на динамику обучения линейных и нелинейных крыс. *Рос. физиол. журн.*, 2006, т. 92, № 4, с. 449–460.
17. Abe E., Casamenti F., Giovanelli L. et al. Administration of amyloid β -peptides into the medial septum of rats decreases acetylcholine release from hippocampus *in vivo*. *Brain Res.*, 1994, v. 636, № 1, p. 162–164.
18. Coscun V., Wu H., Bianchi B. et al. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, v. 105, № 3, p. 1026–1031.
19. Haass C. The molecular significance of amyloid β -peptide for Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 1996, v. 246, № 3, p. 118–123.
20. Selkoe D.J. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1994, v. 53, № 5, p. 438–447.
21. 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.
22. Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A. and Gage F.H. Reactive astrocytes; cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*, 1997, v. 20, № 12, p. 570–577.

Поступила в редакцию 07.04.10

GLIAL REACTION IN THE FOREBRAIN SUBVENTRICULAR ZONE IN THE RAT MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

*Ye.I. Chumasov, D.E. Korzhevskiy, Ye.S. Petrova,
N.N. Kuznetsova and N.S. Sapronov*

The purpose of this study was to investigate the long-term reactive changes in the subventricular zone (SVZ) of the rat brain lateral ventricles after the intraventricular injection of beta-amyloid peptide (BAP). It was found that 3 months after BAP injection ependymal cells and SVZ cells reacted to the intraventricular BAP injection by the formation of glial structures, similar to amyloid plaques in their composition, cell structure and possible developmental mechanism. Using immunohistochemical methods, it was shown that they consisted mainly of reactive astrocytes and microgliaocytes. It is suggested that atypical morphogenesis of these structures is associated with the interrelationship between the degenerative and regenerative processes, which involve both ependymal cells and forebrain proliferative zone progenitor cells.

Key words: *brain, subventricular zone, astrocytes, beta-amyloid peptide, Alzheimer's disease*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Department of Neuropharmacology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg