

© Коллектив авторов, 2012
УДК 612.017.2:611.018.8

Н.А. Коканова¹, Г.З. Михайлова¹, Р.Ш. Штанчаев¹, Н.Р. Тирас¹ и Д.А. Мошков^{1,2}

ИНДУКЦИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ НЕЙРОНОВ К β -АМИЛОИДУ

¹ Лаборатория ультраструктуры нейрона (зав. — проф. Д.А. Мошков), Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино; ² Магистерская образовательная программа «Медико-биологические науки» (зав. — проф. Э.И. Лежнев), Пущинский государственный университет, e-mail: kokanchik@rambler.ru

Изучали влияние тренировочных адаптирующих вестибулярных стимуляций на функцию и трехмерную структуру маутнеровских нейронов (МН) золотых рыбок при экспериментальном амилоидозе, вызванном аппликацией агрегированного β -амилоидного белка ($A\beta_{25-35}$). Установлено, что по сравнению с контролем адаптированные МН приобретают значительную устойчивость к $A\beta_{25-35}$. Учитывая ключевую роль дофамина при адаптации МН к сенсорным стимуляциям, изучено его действие на развитие модельного амилоидоза и обнаружено, что аппликация дофамина на МН, а также увеличение его концентрации в мозгу с помощью L-дофа предохраняет структуру и функцию МН от патогенного воздействия $A\beta_{25-35}$. С помощью электронной микроскопии показано, что защитное действие дофамина на нейроны может объясняться его способностью диссоциировать полимеры β -амилоида на короткие неактивные фрагменты.

Ключевые слова: маутнеровские нейроны, трехмерная структура, функция, β -амилоид, адаптация

Главной и уязвимой мишенью амилоидных отложений в мозгу в виде сенильных бляшек являются нейроны, повреждение и преждевременная гибель которых служат основным патолого-анатомическим признаком болезни Альцгеймера [8]. Поэтому одним из адекватных подходов к ее профилактике и терапии является предохранение структуры нейронов при амилоидозе повышением их устойчивости к β -амилоиду. Недавно было показано, что маутнеровские нейроны (МН) после аппликации агрегированного β -амилоида могут быть использованы в качестве экспериментальной клеточной модели амилоидоза, характеризующейся существенным повреждением их трехмерной структуры и патологическим изменением функции, судя по аномалиям в поведении золотых рыбок [3]. Известно, что устойчивость живой клетки к различным физическим и химическим воздействиям обеспечивается полимеризацией цитозольного актина [9]. Полимеризацию актина в МН можно индуцировать естественными повторяющимися адаптирующими стимуляциями [1]. Возможна она и при прямом воздействии определенных препаратов [6]. Неизвестно, однако, способны ли эти меры предохранить МН от повреждающего механического действия жестких β -амилоидных лент, как недавно установлено, весьма значительного для нервных клеток [11]. Целью настоящей работы было исследование изменений строения МН, а также их влияния на поведение рыбки под воздействием аппликации на них β -амилоида после предварительно вырабатываемой адаптации. Изучено также влияние дофамина, играющего центральную роль в формирова-

нии адаптированного состояния [1], на проявления амилоидоза.

Материал и методы. Работа проведена на 92 мальках золотой рыбки *Carassius auratus* (Оранда, 3–5 мес, длина около 3,5 см, масса около 2 г).

Физиологическая часть работы. Всех рыбок делили на 8 групп, первые 6 состояли из двух подгрупп, отличающихся тем, что рыбок одной из них дополнительно подвергали 2-часовой утомительной вестибулярной стимуляции (ВС), вращая одновременно вокруг rostro-каудальной (длинной) и дорсовентральной (короткой) осей тела со скоростью 42 об/мин [4]. В этой же установке у рыбок вырабатывали адаптированное состояние по методике, разработанной ранее [4], используя ежедневные короткие сеансы ВС. Длительность процесса адаптации к ВС составляла 15 сут. 1-я группа представляла собой интактный контроль. У рыбок 2-й группы изучали действие аппликации растворителя β -амилоида (дистиллированная вода) [5] на МН через 17–24 ч, т.е. в те сроки, когда дистиллированная вода уже не вызывает патологических изменений нейронов. Рыбкам 3-й и 4-й группы апплицировали 20 мкг в 4 мкл раствора агрегированного (3 сут, 37 °C) фрагмента 25–35, β -амилоида, далее — $A\beta_{25-35}$ (Sigma, США), вызывающего в МН амилоидоз [3] и соответственно агрегированного инвертированного нетоксичного фрагмента 35–25 β -амилоида (далее $A\beta_{35-25}$, Ана Спес, США). Рыбок 5-й группы предварительно подвергали повторяющимся ВС, индуцирующим адаптацию [4]. Затем на их МН апплицировали $A\beta_{25-35}$. Рыбкам 6-й группы на МН последовательно апплицировали 5 мкл раствора дофамина (Pharma Orion, Финляндия) в концентрации $1,0 \times 10^{-2}$ М (эффективная доза вблизи МН составила около $1,0 \times 10^{-5}$ М [1]), а через 30 мин — $A\beta_{25-35}$. Результат сочетанного воздействия оценивали в момент проявления максимального эффекта дофамина и $A\beta_{25-35}$, через 7 ч [1, 3]. Чтобы совместить сроки эффективного действия на МН обоих препаратов и последующей утомительной ВС, ее начинали через 5 ч после инъекции дофамина. У рыбок 7-й группы после аппликации на МН $A\beta_{25-35}$ уровень дофамина в мозгу повышали медикаментозно, для чего рыбок на 5 ч помещали в 200 мл

раствора L-дофа концентрацией 20 мг/мл (Леводопа, Torrent Pharmaceutical, Индия), предполагая, что этот препарат через жабры проникает в кровь и попадает в мозг. Рыбок 8-й группы сначала выдерживали в растворе L-дофа в течение 2 ч или раздельно 5 ч, а затем через 20 ч на МН апплицировали $A\beta_{25-35}$. Время экспозиции и доза L-дофа в экспериментах с рыбками 7-й и 8-й группы были подобраны предварительно. У каждой рыбки до и после воздействия определяли моторную асимметрию и подвижность. Моторную асимметрию выражали в виде коэффициента моторной асимметрии (КМА) как отношение числа поворотов в предпочитаемую сторону к общему числу поворотов в обе стороны. Подвижность рыбки (показатель интегральной функциональной активности МН) определяли как общее число поворотов в обе стороны за 1 мин (ее выражали в относительных единицах, отн. ед.), используя ранее разработанные методики [2]. В интересах более адекватной оценки взаимосвязи структуры и функции конкретных МН в некоторых случаях, кроме статистических значений КМА и подвижности рыбок по каждой из групп, представлены также индивидуальные показатели рыбок и приведены объемные реконструкции их МН.

Морфологическая часть работы. Мозг фиксировали около 12 ч при комнатной температуре погружением в раствор следующего состава (на 10 мл): 4% свежеприготовленный параформ на 0,1 М какодилатном буфере 5,6 мл, диметилсульфоксид 0,25 мл, 25% глутаральдегид 2,04 мл, 1 М какодилатный буфер 0,44 мл, вода дистиллированная 1,56 мл, pH 7,2–7,4. После промывки 0,1 М какодилатным буфером препараты дополнительно фиксировали 4 ч при комнатной температуре в 2% растворе четырехоксида осмия на том же буфере, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и в 100% ацетоне (3 смены общей продолжительностью не менее 2 ч). Затем мозг пропитывали смесью эпоновая смола — ацетон в пропорции 1:1 в 1-е сутки и 3:1 во 2-е сутки, после этого образцы заключали в эпоновую смолу, представляющую смесь следующих компонентов: эпона-812 (4,5 части), эпона-DDSA (3 части), эпона-MNA (2 части) и DMP-30 (0,15 части). Применяемые составы фиксаторов и смолы обеспечивали практически беззасадочную заливку мозга. Полимеризацию смолы проводили в течение 24 ч при 37 °C и последующие 24 ч при 60 °C. Залитый в эпон продолговатый мозг резали фронтально на пирамитоме LKB (Швеция) серийно на гистологические срезы толщиной 3 мкм, идентифицировали на них под световым микроскопом NU-2E Carl Zeiss (Германия), снабженном цифровой фотокамерой Nikon Coolpix (Япония), все участки МН и последовательно фотографировали при 250-кратном увеличении. Трехмерную реконструкцию МН по срезам осуществляли по модифицированной методике [2]. Для оценки структурных различий между левым и правым МН у одной и той же рыбки использовали коэффициент структурной асимметрии нейронов (КСА) [2]. В необходимых случаях определяли, используя те же компьютерные программы [2], сумму объемов обоих нейронов, которая характеризует, насколько значительна их дистрофия после сочетанных воздействий аппликации β -амилоида и стимуляции. Негативно контрастированный (2% раствор уранилацетата) β -амилоид ($A\beta_{25-35}$ и $A\beta_{35-25}$) *in vitro* в норме и после взаимодействия с дофамином (10^{-3} М в физиологическом растворе с метабисульфитом как антиокислителем [7]) исследовали в электронном микроскопе Тесла БС-500 (Чехословакия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel (Microsoft Office 2003). Значимость различий данных определяли при помощи

t-теста Стьюдента. Количественные данные представлены значениями среднего арифметического и ошибки среднего. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Физиологические данные. КМА интактных рыбок (группа 1) до и после ВС сохранялся на уровне $0,550 \pm 0,021$ ($n=5$). Подвижность рыбок (здесь и далее указана в отн. ед.) падала с $6,1 \pm 1,8$ до $2,5 \pm 1,1$ ($n=6$, $P < 0,01$). Значения КМА рыбок после аппликации на МН дистиллированной воды (группа 2) не отличались от таковых у интактных и составили $0,57 \pm 0,06$ и $0,550 \pm 0,011$ ($n=3$) до и после ВС соответственно. Подвижность рыбок незначимо снижалась с 8 ± 3 до $3,0 \pm 2,7$ ($n=5$, $P > 0,05$). После аппликации $A\beta_{25-35}$ на МН (группа 3) у половины рыбок через 17 ч КМА аномально увеличился с $0,58 \pm 0,07$ до $0,77 \pm 0,11$ ($n=7$). У другой части рыб той же группы он снижался с $0,62 \pm 0,06$ до $0,50 \pm 0,010$ ($n=8$). После ВС у всех рыбок данной группы наблюдалась инверсия моторной асимметрии до $0,27 \pm 0,14$ ($n=5$). При этом, подвижность рыбок незначимо повышалась с $4,5 \pm 1,5$ до $6,3 \pm 1,9$ ($P > 0,05$). Таким образом, аппликация β -амилоида и последующая ВС не изменяли подвижности рыбок по сравнению с контролем. При изучении воздействия на МН аппликации инвертированного $A\beta_{35-25}$ (4-я группа) обнаружено, что у части рыбок значения КМА не менялись ($0,71 \pm 0,08$ и $0,69 \pm 0,05$, $n=7$), а у других — снижались с $0,73 \pm 0,08$ до $0,45 \pm 0,05$ ($n=5$). Утомительная ВС инвертировала моторную асимметрию (КМА изменялся до $0,35 \pm 0,14$, $n=5$). Подвижность рыбок после стимуляции не значимо снижалась с $4,1 \pm 1,0$ до $2,9 \pm 0,5$ ($n=8$, $P > 0,05$). Ежедневные короткие сеансы ВС рыбок 5-й группы повышали устойчивость МН к утомительной ВС. В норме КМА был равен $0,57 \pm 0,03$, а после аппликации дистиллированной воды $0,54 \pm 0,04$ ($n=12$) и после сочетанного действия дистиллированной воды и ВС он составил $0,52 \pm 0,04$ ($n=5$). Аппликация $A\beta_{25-35}$ на МН адаптированных рыбок приводила к значимому усилению моторной асимметрии (с $0,50 \pm 0,05$ до $0,62 \pm 0,07$, $n=12$, $P < 0,05$). Совместное действие аппликации $A\beta_{25-35}$ и ВС на МН адаптированных рыбок не изменяло КМА ($0,63 \pm 0,12$, $n=6$). Подвижность рыбок значимо не изменялась, оставаясь на уровне $7,5 \pm 2,8$. Аппликация дофамина на МН раздельно и в сочетании с последующей ВС не влияла на моторную асимметрию рыбок. Подвижность рыбок после аппликации дофамина значимо повышалась с $4,0 \pm 1,1$ до $8,4 \pm 1,6$ ($n=12$, $P < 0,01$). Аппликация $A\beta_{25-35}$ на МН, предварительно подвергнутые действию дофамина, изменяла КМА рыбок с $0,69 \pm 0,14$ до $0,54 \pm 0,09$ ($n=8$), а последующая ВС возвращала его к исходному

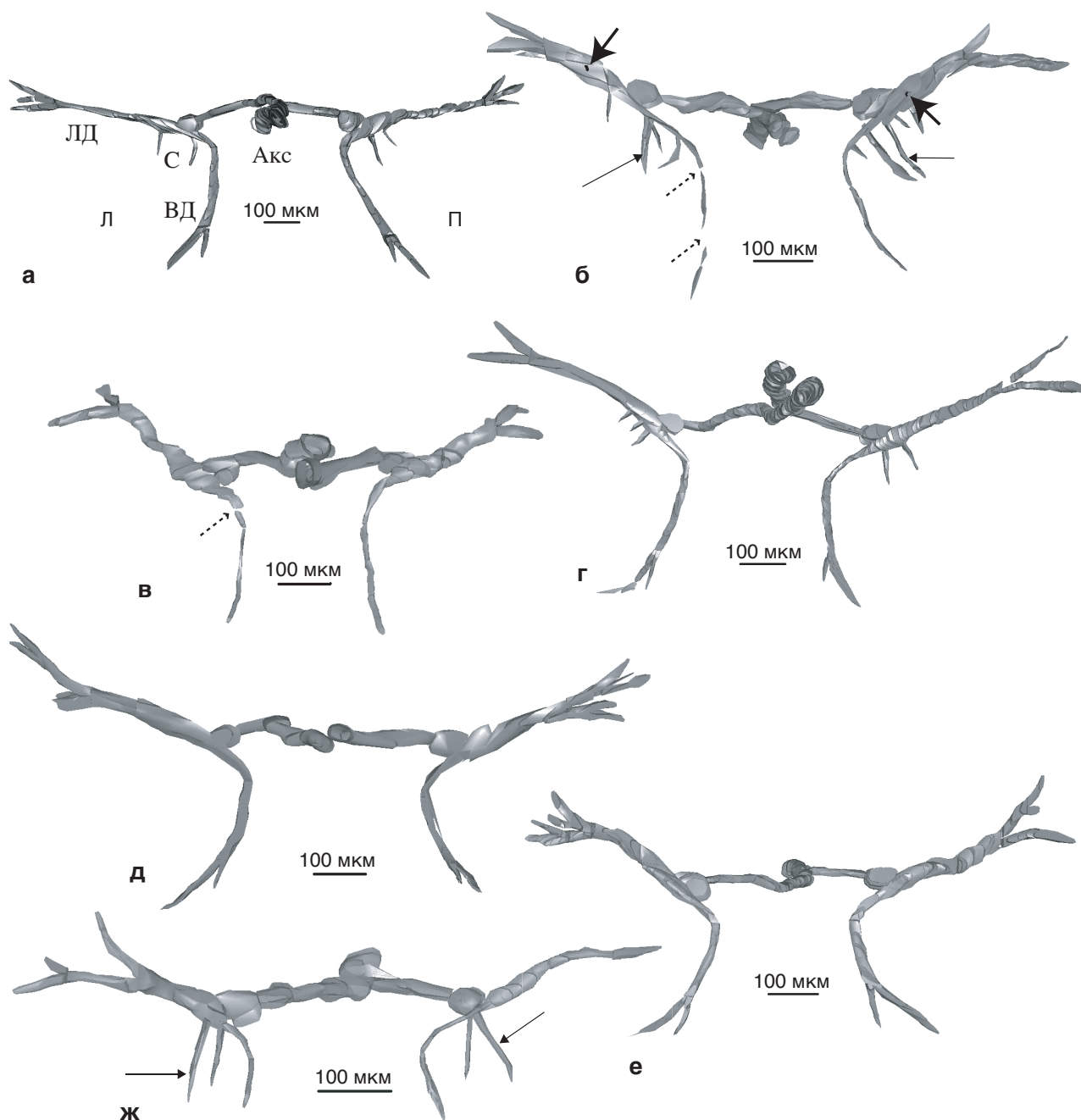


Рис. 1. Трехмерная реконструкция маутнеровских нейронов (МН) золотой рыбки после различных комплексных воздействий.

а — после аппликации дистиллированной воды и вестибулярной стимуляции; б — после аппликации агрегированного β -амилоидного белка ($A\beta_{25-35}$) и вестибулярной стимуляции; в — после аппликации инвертированного β -амилоида ($A\beta_{35-25}$) и вестибулярной стимуляции; г — аппликация $A\beta_{25-35}$ и вестибулярная стимуляция следовала после адаптации; д — после аппликации дофамина, $A\beta_{25-35}$ и длительной стимуляции; е — после воздействия $A\beta_{25-35}$ и L-дофа; ж — после воздействия L-дофа и $A\beta_{25-35}$. ЛД — латеральный дендрит; ВД — вентральный дендрит; С — сома; Акс — аксоны; Л — левый МН; П — правый МН; пунктирные стрелки — разрывы (перетяжки) дендрита; длинные стрелки — гипертрофированные боковые дендриты; толстая стрелка — ядро, переместившееся в ЛД.

уровню $0,56 \pm 0,15$ ($n=5$). При этом, сохранялась высокая подвижность ($5,05 \pm 1,0$ в сочетании с аппликацией $A\beta_{25-35}$ и $5,0 \pm 1,6$ — после ВС). Действие дофамина было подобно эффекту тренировочных сеансов ВС, индуцирующих адаптацию МН. Аппликация $A\beta_{25-35}$ на МН рыбок группы 7 вызывала инверсию моторной асимметрии

(КМА изменился с $0,55 \pm 0,05$ до $0,40 \pm 0,14$, $n=4$). При этом подвижность рыбок сохранялась — $6,7 \pm 1,1$ и $6,9 \pm 1,0$ соответственно. Последующее выдерживание рыбки в растворе L-дофа нормализовало значение КМА до $0,56 \pm 0,11$ и изменяло подвижность до 6 ± 4 . Если воздействие L-дофа предшествовало аппликации $A\beta_{25-35}$ (группа 8),

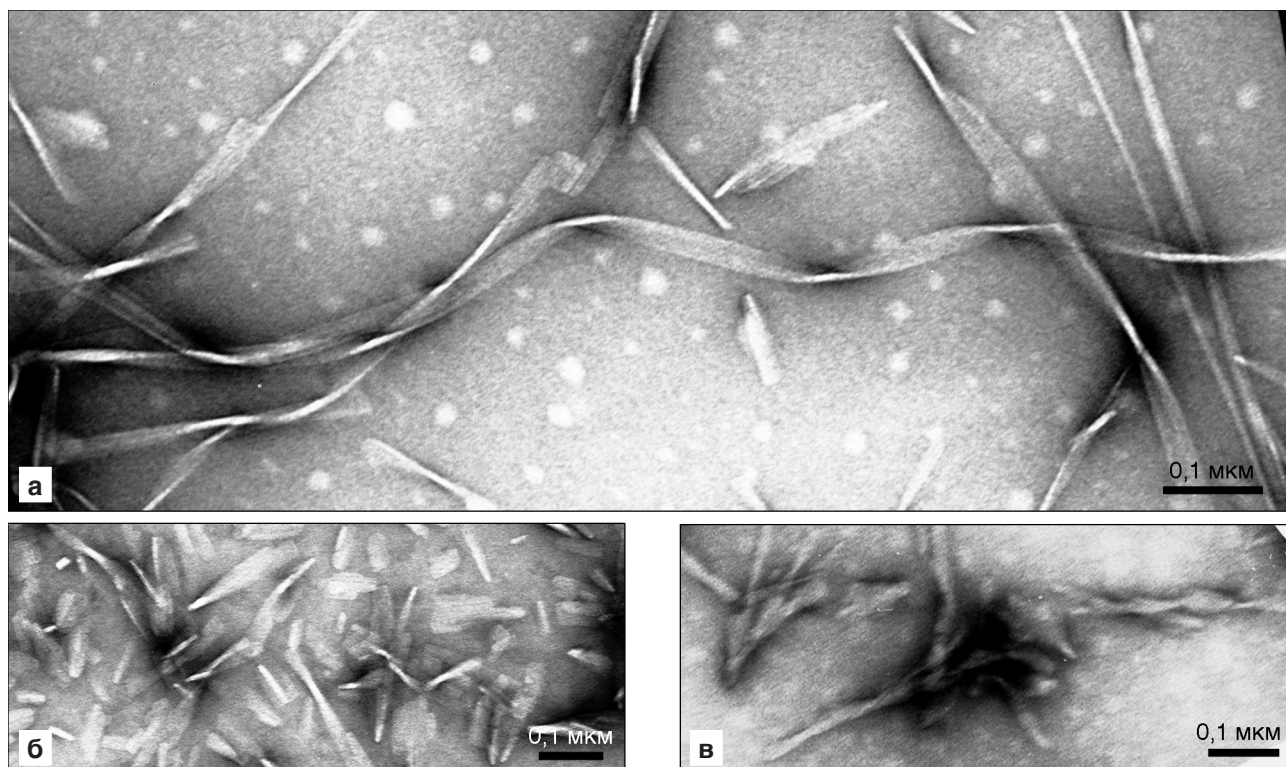


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение β -амилоида.

Агрегированный β -амилоидный белок ($A\beta_{25-35}$) до (а) и после совместной 3,5-часовой инкубации с дофамином в концентрации 10^{-3} М (б); в — агрегированный $A\beta_{35-25}$.

КМА рыбок практически не изменялся ($0,64 \pm 0,10$ до и $0,69 \pm 0,13$ после выдерживания в растворе L-дофа), а подвижность рыбок снижалась с $3,3 \pm 1,1$ до $2,2 \pm 0,6$ ($n=3$). Последующая аппликация $A\beta_{25-35}$ приводила к патологической инверсии моторной асимметрии рыбок (КМА изменился до $0,33 \pm 0,04$, $n=3$), а подвижность рыбок нормализовалась до значения $4,7 \pm 1,4$, т. е. наблюдалась картина, близкая к таковой в группе 3, а предшествующее воздействие L-дофа имитировало стимуляцию. Сравнение рыбок этой и группы 7 показало, что снижение подвижности рыбок, скорее всего, обусловлено влиянием L-дофа, а не $A\beta_{25-35}$.

Морфологические данные. Трехмерная структура МН рыбок разных групп представлена на рис. 1. КСА МН интактных рыбок (1-я группа) ($n=3$ для каждого из случаев до и после ВС) в нашей работе совпадает с КМА рыбок как до ($0,50 \pm 0,07$ и $0,57 \pm 0,07$ соответственно), так и после ВС ($0,43 \pm 0,12$ и $0,40 \pm 0,10$ соответственно). При этом, сумма объемов правого и левого нейронов уменьшается более чем в 2 раза (с 686×10^3 до 311×10^3 мкм³). Сочетание воздействия дистиллированной воды и последующей ВС (через 24 ч) рыбок группы 2 (см. рис. 1, а) также приводит к уменьшению суммы объемов обоих нейронов до 472×10^3 мкм³. В то же время, после аппликации $A\beta_{25-35}$ и ВС рыбок группы 3 в МН, наряду

с уменьшением суммарного объема обоих МН, составившего всего 180×10^3 мкм³, свидетельствующего об отчетливо выраженной общей дистрофии, наблюдаются значительные структурные изменения (см. рис. 1, б). Существенно истончаются вентральные дендриты, в них появляются перетяжки, гипертрофируются небольшие дендриты, отходящие от вентральной поверхности соматической части МН и в норме практически незаметные, набухают и значительно укорачиваются латеральные дендриты, а ядра нейронов перемещаются в латеральный дендрит. Инвертированный $A\beta_{35-25}$ в сочетании с ВС тоже повреждает структуру МН, в частности, вызывает уменьшение объемов вентральных дендритов (см. рис. 1, в). Их суммарный объем снижается до 255×10^3 мкм³, а КСА становится равным 0,44. Предварительная выработка в МН адаптации (рыбки группы 4) делает их трехмерную структуру устойчивой как к $A\beta_{25-35}$, так и к утомительной ВС (см. рис. 1, г), сохраняя близкие к интактному контролю суммарные объемы обоих нейронов (573×10^3 мкм³). Схожее влияние оказывает на структуру МН аппликация дофамина (рыбки группы 6). Суммарное значение объемов МН после сочетанного действия $A\beta_{25-35}$ и ВС (см. рис. 1, д) остается близким к таковому у интактных рыбок. При этом, их КСА (0,61) соответствует КМА той же рыбки. Такое же действие

оказывает на МН косвенное увеличение содержания дофамина в мозгу под влиянием воздействия на рыбок L-дофа (рыбки группы 7). МН в этом случае (см. рис. 1, е) после аппликации $A\beta_{25-35}$ имеют такой же вид, как МН рыбок группы 6, их суммарный объем составляет $506 \times 10^3 \text{ мкм}^3$. Аппликация $A\beta_{25-35}$ после L-дофа повреждает структуру МН так же, как и у рыбок группы 3 (см. рис. 1, ж): снижает сумму объемов обоих МН до $143 \times 10^3 \text{ мкм}^3$, что свидетельствует о развившейся дистрофии. Вместе с тем, об отчетливом амилоидозе свидетельствует несоответствие моторной асимметрии рыбки (0,37) и структурной асимметрии ее МН (0,61).

Обсуждение полученных данных. В настоящей работе установлено, что ежедневные короткие сеансы ВС, а также аппликация дофамина и увеличение его концентрации в мозгу с помощью L-дофа существенно повышают морфофункциональную устойчивость МН золотой рыбки к повреждающему действию β -амилоида, по-видимому, оказываемому жесткими амилоидными лентами, обволакивающими нейроны [3, 11] и ВС. Можно было бы предположить, что укрепляющий эффект связан с полимеризацией цитозольного актина дофамином, управляющим МН [1, 4, 6]. Вместе с тем, некоторые детали не согласуются с таким представлением. Так, предшествующая обработка рыбок L-дофа не укрепляла МН к действию β -амилоида, хотя должна была бы стабилизировать актиновый цитоскелет. С другой стороны — действие L-дофа вслед за $A\beta_{25-35}$ вряд ли объясняется цитоскелетным механизмом, так как амилоидоз уже к этому времени был отчетливо выражен. Терапевтический механизм дофамина может быть основан на его способности *in vitro* дезагрегировать фибриллы β -амилоида [10]. Действительно, в условиях, идентичных нашим экспериментам *in vivo*, дофамин *in vitro* фрагментирует протяженные лентовидные фибриллы $A\beta_{25-35}$ на весьма короткие белковые комплексы (сравни рис. 2, а и 2, б), несоизмеримые с размерами МН и их дендритов. Диссоциация крупных агрегатов β -амилоида, по-видимому, существенно снижает травматичность их действия [11], которое мы рассматриваем как главный механизм патогенеза амилоидоза в нашей модели [3]. Эту точку зрения подтверждают также данные о действии нетоксичного инвертированного $A\beta_{35-25}$ на структуру и функцию МН, при агрегировании формирующего достаточно длинные лентовидные фибриллы, вызывающие функциональные сдвиги и влияющие на строение вентрального дендрита МН, размеры которого близки к длине фибрилл. В целом, анализ морфометрических данных

свидетельствует о том, что после воздействия β -амилоида индуцируется несоответствие структурной асимметрии МН моторной асимметрии рыбки, в чем мы и видим явное проявление амилоидоза [3]. Очевидна также возможность повышать дофамином или тренировками морфофункциональное противодействие МН β -амилоиду. Все это дает основание предполагать, что работа на клеточной модели амилоидоза, созданной на МН золотой рыбки, может быть полезной при разработке новых подходов к профилактике и терапии его системных моделей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-00451а и Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», государственный контракт № 02.740.11.0301.

Авторы благодарны канд. биол. наук И.Я. Подольскому за обсуждение статьи и сделанные ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безгина Е.Н., Павлик Л.Л., Михайлова Г.З. и др. Морфофункциональные эффекты аппликации глутамата и дофамина на маутнеровские нейроны золотой рыбки. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2006, т. 38, № 4, с. 320–330.
2. Григорьева Е.Е., Штанчаев Р.Ш., Михайлова Г.З. и др. Корреляция размеров отдельных частей маутнеровского нейрона с его интегральной функцией после энуклеации глаза. *Морфология*, 2010, т. 137, вып. 6, с. 20–29.
3. 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. 43–47.
4. 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.
5. Степанович М.Ю., Здобнова И.М., Зарубенко И.И. и др. Исследование эффектов центрального введения бета-амилоидного пептида (25–35): патоморфологические изменения в гиппокампе и нарушение пространственной памяти. *Журн. высш. нерв. деят.*, 2004, т. 54, № 5, с. 705–711.
6. Тирас Н.Р., Михайлова Г.З. и Мошков Д.А. Эффекты, вызываемые полимеризующим актин пептидом в маутнеровских нейронах золотой рыбки. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2007, т. 38, № 5/6, с. 389–400.
7. Шубина В.С., Лавровская В.П., Безгина Е.Н. и др. Цитохимическая и ультраструктурная характеристика клеток ВНК-21, подвергнутых воздействию дофамина. *Морфология*, 2010, т. 137, вып. 1, с. 5–9.
8. Aigelsreiter A., Janig E., Stumptner C. et al. How a cell deals with abnormal proteins. Pathogenetic mechanisms in protein aggregation diseases. *Pathobiology*, 2007, v. 74, № 3, p. 145–158.
9. Korichneva I. and Hämmerling U. F-actin as a functional target for retro-retinoids: a potential role in anhydrotretinol-triggered cell death. *J. Cell Sci.*, 1999, v. 112, pt. 15, p. 2521–2528.

10. Li J., Zhu M., Manning-Bog A.B. et al. Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 2004, v. 18, № 9, p. 962–964.
11. Lulevich V., Zimmer C.C., Hong H.S. et al. Single-cell mechanics provides a sensitive and quantitative means for probing amyloid-beta peptide and neuronal cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, v. 107, № 31, p. 13872–13877.

Поступила в редакцию 29.03.2011
Получена после доработки 08.07.2011

INDUCTION OF NEURON MORPHOLOGICAL RESISTANCE TO β -AMYLOID

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

The effect of training adaptive vestibular stimulations on goldfish Mauthner neurons (MN) function and three-dimensional morphology was studied in experimental amyloidosis caused

by application of aggregated beta-amyloid protein ($A\beta_{25-35}$). It was found that as compared with control, adapted (trained) MN gained significant resistance to $A\beta_{25-35}$. Taking into consideration the key role of dopamine in MN adaptation to sensory stimulations, its effect on the development of model amyloidosis was studied. It was shown that the application of dopamine onto MN as well as the increase of its concentration in brain by means of L-dopa protected MN structure and function against pathogenic influence of $A\beta_{25-35}$. Using electron microscopy it was shown that dopamine protective action on neurons was due to its ability to dissociate polymer amyloid molecules into short inactive fragments.

Key words: *Mauthner neurons, three-dimensional structure, function, β -amyloid, adaptation*

Neuron Ultrastructure Laboratory, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino; Master Educational Program in Medical-Biological Sciences, Pushchino State University

© В.М. Черток, А.Е. Коцюба, 2012
УДК 611.81.018.8:599.323.4

В.М. Черток и А.Е. Коцюба

H_2S -ПОЗИТИВНЫЕ НЕЙРОНЫ В НЕКОТОРЫХ ЯДРАХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО ЦЕНТРА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.М. Черток), Владивостокский государственный медицинский университет

Цель работы состояла в получении сведений о наличии и распределении H_2S^+ -нейронов в ядрах продолговатого мозга и моста, входящих в состав центра регуляции сердечно-сосудистой деятельности. С помощью иммуноцитохимического метода выявления цистатионин β -синтазы у крыс линии Вистар ($n=16$) в исследуемых ядрах установлено наличие H_2S^+ -нейронов. Более интенсивная реакция проявляется в крупных клетках двигательных ядер, тогда как мелкие клетки чувствительных ядер обычно имеют низкую и умеренную активность фермента. Полученные данные позволяют по-новому представить организацию работы нервных центров головного мозга, в том числе оказывающих управляющее воздействие на сердечно-сосудистую систему.

Ключевые слова: H_2S^+ -нейроны, цистатионин β -синтаза, ядра продолговатого мозга и моста

Эндогенный сероводород (H_2S) — один из наименее изученных газообразных нейромедиаторов, который, как теперь установлено, участвует в многочисленных физиологических и патологических процессах в организме [7]. Подобно оксиду азота и монооксиду углерода, H_2S оказывает сосудорасширяющее действие [16, 17]. Имеются косвенные доказательства участия H_2S в центральной регуляции гемодинамики [8, 13], хотя морфологических данных о наличии нервных клеток, использующих в качестве нейротрансмиттера H_2S в соответствующих ядрах ствола мозга, насколько нам известно, до сих пор не представлено. Поэтому цель настоящей работы состояла

в получении сведений о наличии и распределении H_2S -позитивных нейронов (H_2S^+ -нейронов) в некоторых ядрах, входящих в состав центра регуляции сердечно-сосудистой деятельности.

Материал и методы. Исследование выполнено с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» на материале, полученном от 16 крыс линии Вистар массой 240–280 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Животных выводили из эксперимента внутривенным введением раствора нембутала (5 мг на 100 г массы). Из полости черепа извлекали головной мозг, отделяли от него мост и продолговатый мозг, которые фиксировали в течение 1 ч в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при 4 °С, и делали криостат-