НЕЙРОХИМИЯ, 2012, том 29, № 2, с. 139–149

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.152

НАРУШЕНИЕ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА – РАННЕЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ АМИЛОИДА-β В НЕЙРОНАХ

© 2012 г. Р. Я. Гордон[1, *], Е. Г. Макарова[2], И. Я. Подольский[2], В. В. Рогачевский[1], О. Л. Кордонец[2]

[1]*Институт биофизики клетки РАН*

[2]*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН*

Амилоидные β-пептиды (Aβ) играют ключевую роль в развитии болезни Альцгеймера (БА). Ответ нейронов на введение Aβ в экспериментальных моделях БА на животных остается недостаточно исследованным. Изучено раннее проявление действия $A\beta_{25-35}$ в нейронах поля CA1 гиппокампа после интраветрикулярного и интрагиппокампального введения. В работе использовали различные методы микроскопии: световую в сочетании с иммуногистохимией, флуоресцентную и электронную. Соотношение красной и зеленой флуоресценции (K_α) после окрашивания клеток акридиновым оранжевым (АО) отражает состояние rRNA в рибосомах и коррелирует с долей активных полирибосом в общем количестве рибосом в цитоплазме, что позволяет оценить интенсивность синтеза белка. В первый день после интрагиппокампального воздействия $A\beta_{25-35}$ значение K_α снизилось до 55% в морфологически неповрежденных нейронах. Через 14 дней в основной массе нейронов наблюдались признаки дегенерации и наличие депозитов Aβ. На 14-й день после интравентрикулярного введения значение K_α снизилось до 35% от контроля в морфологически неповрежденных нейронах. Депозитиы Aβ не были обнаружены в них. Ультраструктурный анализ цитоплазмы выявил существенное увеличение количества тяжелых полирибосом, что, вероятно, является причиной снижения величины K_α. Таким образом, ранним проявлением действия Aβ на пирамидные нейроны поля CA1 является нарушение синтеза белка в результате формирования в цитоплазме повышенного количества тяжелых полирибосом. Последующее развитие дегенерации нейронов, по-видимому, является результатом накопления в цитоплазме эндогенного Aβ.

Ключевые слова: амилоид-β, болезнь Альцгеймера, пирамидные нейроны поля CA1 гиппокампа, синтез белка, полирибосомы, нейродегенерация.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) – серьезное нейродегенеративное нарушение, сопровождающееся прогрессивным снижением памяти и слабоумием. Амилоидные β-пептиды (Aβ) играют значительную роль в патогенезе БА [1–5].

Многочисленные косвенные исследования показали, что БА сопровождается нарушением белкового синтеза [6–11]. Манн с соавторами выявил значительное повреждение белкового синтеза в нейронах мозга на разных стадиях БА по таким показателям, как содержание цитоплазматической РНК, объемы ядер и ядрышек [12]. Динг с соавторами показали, что снижение скорости и интенсивности белкового синтеза ассоциирует с нарушением функции рибосом. Авторы связывают такие изменения с ранней стадией БА [13].

Поскольку снижение белкового синтеза наблюдается в областях мозга, регулирующих когнитивную функцию (гиппокамп и фронтальная кора) [13], исследование этих структур представляет особый интерес.

Экспериментальные модели БА на животных позволяют исследовать ранний токсический эффект Aβ на когнитивные процессы и морфологическое состояние нейронов [14–22]. После интравентрикулярного введения Aβ может оказывать воздействие на разные структуры мозга, в том числе и на гиппокамп [15–19]. После интрагиппокампального введения Aβ действует непосредственно на гиппокамп [20, 21]. Существуют противоречивые данные о действии Aβ на когнитивные процессы и состояние нейронов при этих введениях [15, 16, 20–23]. Проведение сравнительного анализа различных методов центрального введения Aβ позволит внести ясность в этот вопрос.

Методом флуоресцентной микроскопии с акридиновым оранжевым (АО) исследовалось состояние цитоплазматической рРНК в индивидуальных пирамидных нейронах поля CA1 дорзального гиппокампа крыс на ранней стадии центрального введения агрегированного Aβ. Отношение интенсивностей красной и зеленой флуоресценции (ко-

* Адресат для корреспонденции: 142290, Пущино, Московская область, ул. Институтская, 3; тел.: +7 (916) 233-14-16; факс: +7 (4967) 33-05-09; e-mail: ritagordon@yandex.ru.

эффициент K_α) отражает состояние рРНК в рибосомах и позволяет оценить интенсивность белкового синтеза в каждой отдельной клетке. Подробное обоснование методики дано в предшествующей работе [24]. Белковый синтез может снижаться как при диссоциации рибосом, так и при формировании превалирующего количества тяжелых полирибосом. Для выяснения этого явления использовали электронную микроскопию. Для выявления признаков нейродегенерации использовали световую микроскопию (окраска крезиловым фиолетовым), идентификацию депозитов Aβ определяли иммуногистохимическим методом.

Для исследования прямого действия Aβ на нейроны была использована модель переживающих срезов гиппокампа, в которых контролировалась электрическая активность нейронов [25].

Показано, что ранним проявлением действия Aβ *in vivo* является нарушение белкового синтеза в пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа. Причиной такого эффекта является формирование превалирующего количества тяжелых полирибосом. В дальнейшем развивающаяся дегенерация нейронов, вероятно, является результатом накопления в цитоплазме эндогенного Aβ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 87 крысах – самцах Вистар (3 мес.), выращенных в стандартных условиях в питомнике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН со свободным доступом к пище и воде при естественном световом режиме. Эксперименты осуществляли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС) и одобренных комитетом по медицинской этике ИТЭБ РАН в соответствии с положением о работе с экспериментальными животными.

Вещества и способ введения. $A\beta_{25-35}$ (“Sigma”, USA) растворяли в дистиллированной воде и агрегировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Уровень агрегации β-амилоида определяли с помощью электронного микроскопа по наличию фибриллярных агрегатов после негативного контрастирования водным раствором уранилацетата. Контрольным животным вводили 0.9% раствор NaCl. Операции осуществляли в стереотаксическом аппарате в стерильных условиях под комбинированным наркозом золетила (“Verbae sante animale”, France) 12 мг/кг и ксилазина (“Bioveta”, Czechia) 20 мг/кг. Вещества вводили однократно билатерально по следующим координатам: (1) боковые желудочки мозга AP = –0.8 mm; L = 1.5 mm; H = 3 mm (n = 24, где n – число животных), (2) поле CA1 гиппокампа, AP = 4 мм; L = 3 мм; H = 3 мм [Paxinos, 1982] с помощью микрошприца Гамильтона (“Hamilton”, Germany, 5 мкл) в следующих концентрациях: $A\beta_{25-35}$ 1.6 нмоль/1 мкл, 0.9% раствор NaCl в концентрации 15 мкл/желудочек или 1 мкл/гиппокамп. Локализация места введения веществ осуществлялась на парафиновых срезах гиппокампа (40 мкм), окрашенных крезиловым фиолетовым.

Морфологические и гистохимические исследования были проведены после интрагиппокампального введения на 1-й и 14-й день: (1) интактный контроль, n = 6, (n – число животных); (2) введение 0.9% раствора NaCl, n = 6; (3) введение $A\beta_{25-35}$, n = 6; а после интравентрикулярного введения на 14-й и 30-й день: (1) интактный контроль, n = 9; (2) введение 0.9% раствора NaCl, n = 9; (3) введение $A\beta_{25-35}$, n = 9.

Переживающие срезы гиппокампа. Эксперименты выполнены на гиппокампальных срезах крыс толщиной 300 мкм, n = 12. Регистрацию популяционных спайков от пирамидных нейронов поля CA1 вызвали электрической стимуляцией коллатералей Шафера и начинали через 2 ч 40 мин после начала эксперимента по ранее описанной методике [27]. Контролем служили срезы, помещенные в перфузионную среду (раствор Кребса–Рингера на бикарбонатном буфере), n = 6 (n – число животных). В опыте в перфузионную среду вводили $A\beta_{25-35}$ в концентрации 260 нМ [28], n = 6. Длительность перфузии для каждого вещества составляла 20 мин.

Приготовление образцов ткани. После декапитации часть мозгов и часть переживающих срезов фиксировали в жидкости Карнуа (этанол – хлороформ – уксусная кислота 6 : 3 : 1 соответственно), а другую часть фиксировали в 4% формальдегиде на фосфатном буфере. После обезвоживания объекты помещали в парафин. Из блоков изготовляли срезы толщиной 7 мкм (микротом Leica, Germany). Срезы использовали для световой, флуоресцентной микроскопии и иммуногистохимии.

Флуоресцентная микроскопия. Для исследования состояния РНК в цитоплазме нейронов был использован метод окрашивания АО (Fluka Chemia AG, Buchs, Switzerland) в условиях оптимальных для взаимодействия красителя с РНК. После депарафинирования и регидратации срезы промывали в цитратно-фосфатном буфере, pH 4.2 в течение 4 мин, окрашивали АО в концентрации 3×10^{-4} М на том же буфере в течение 10 мин по методике, описанной ранее [24].

Мономеры АО образуют комплексы с двунитевыми участками РНК, которые флуоресцируют в области 530 нм (I_{530}), а находящиеся в растворе димеры АО связываются с однотяжевыми участками РНК и флуоресцируют в области 640 нм (I_{640}). Измерения флуоресценции проводили на микроспектрофлуориметре ДМФ-2 в цитоплазме нейронов с помощью регистрирующего зонда (6.5 мкм в диаметре) при увеличении ×85 [11]. Измерения и

обработку данных выполняли с использованием оригинальной программы Microfluor (Россия). Исследовали по 100 пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа для каждого животного.

Для анализа цитоплазмы использовался коэффициент $K_\alpha = (I_{640})/(I_{530})$, представляющий собой отношение интенсивностей красной и зеленой флуоресценции.

Поскольку рРНК составляет более 80% от всей цитоплазматической РНК, то K_α отражает состояние рРНК в рибосомах. В отдельной работе ранее сопоставляли K_α и особенности ультраструктуры в нейронах с различным уровнем функциональной активности и разным содержанием в цитоплазме активных полирибосом [24]. Было показано, что в тех нейронах, в которых основная масса полирибосом диссоциирована, величина K_α низка, K_α повышается по мере увеличения активно функционирующих полирибосом. На культуре клеток нейробластомы при обработке циклогексимидом (ингибитором белкового синтеза) сравнивали флуоресцирование АО и включение меченых аминокислот, отражающее скорость синтеза белка. Была выявлена положительная корреляция между K_α и включением меченых аминокислот. Результаты исследования показали, что флуоресценция АО отражает не просто наличие полирибосом в цитоплазме, а именно функциональную активность того типа рибосом, которые превалируют в данный момент в цитоплазме пирамидных нейронов.

Световая микроскопия. Признаки дегенерации нейронов выявляли при окрашивании срезов гиппокампа крезиловым фиолетовым (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) по Нисслю. Препараты анализировали с помощью оптического микроскопа Axio Imager M1 (Zeiss, Germany).

Иммуногистохимия. Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике [21]. С целью усиления выявления бета-амилоида срезы обрабатывали 70%-ной муравьиной кислотой в течение четырех минут. Для блокады эндогенной пероксидазной активности срезы инкубировали в 0.5% H_2O_2 в этаноле и в 5%-ной нормальной козьей сыворотке. Затем срезы инкубировали с первичными антителами: кроличьи поликлональные анти-($A\beta_{1-40}$) (1 : 400, Sigma) при температуре +4° в течение 15 ч. Первичные антитела узнавали анти-кроличьими IgG (1 : 800, Sigma), которые идентифицировали StreptABComplex/HRP (Sigma), согласно указаниям производителя. Иммуногистохимическую реакцию визуализировали 3,3'-диаминобензидин (DAB) (Sigma, USA). В качестве негативного контроля первичные антитела заменяли буфером. Препараты анализировали с помощью оптического микроскопа Axio Imager M1 (Zeiss, Germany).

Электронная микроскопия. Подготовка ткани к ультраструктурному исследованию проводили рутинным методом. После обезглавливания животных срезы (0.5–1 мкм) дорзального гиппокампа были помещены на 2–4 ч в 2.5%-ный глутаральдегид, приготовленный на 0.1 М Na-какодилатном буфере (pH 7.2–7.4), с последующей постфиксацией в 1%-ном растворе OsO_4 на том же самом буфере в течение 1–2 ч. После обезвоживания в спиртах, срезы заключали в эпоксидную смолу Epon-Araldite (Agar Scientific Inc, Великобритания). Серийные ультратонкие срезы пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа, полученные с помощью алмазного ножа на микротоме Leica UM6, были окрашены уранилацетатом и свинцовой солью лимонной кислоты на сетках, покрытых пиолоформом. Исследование проводили на электронном микроскопе JEOL 1200EX (Биоорганический институт химии РАН, Пущино, Россия).

Морфометрический анализ полирибосом. Исследование количества рибосом в полирибосомах цитоплазмы с использованием просвечивающей электронной микроскопии (TEM) ограничено тем фактом, что отдельная группа рибосом в толще ультратонкого среза может представлять не полный набор рибосом наблюдаемой полирибосомы. Наиболее адекватным методом оценки рибосомального состава полирибосом цитоплазмы могла бы служить высокоразрешающая электронная томография, но в свою очередь этот метод сталкивается с такой проблемой, как наличие электронно-плотных РНП гранул, практически неотличимых от рибосомальных субъединиц. По-видимому, единственный способ оценки числа рибосом в полирибосомах с использованием TEM – это подсчет числа рибосом по длине полисомы, распластанной на плоских цистернах эндоплазматического ретикулума (ЭР) или на наружной поверхности ядерной мембраны.

Для подсчета числа рибосом в полирибосомах использовалась обычная просвечивающая микроскопия уплощенных цистерн ЭР и ядерной оболочки (рис. 4*а*), лежащих в плоскости среза на относительно толстых (100 нм или чуть более) ультратонких срезах. Микрофотографии (минимум 25 от каждого животного) перинуклеарной области цитоплазмы пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа крыс в контроле (3 крысы) и на 14-й день после интравентрикулярной инъекции амилоидного пептида Aβ (3 крысы) получали при увеличении ×12K. Негативы сканировали с разрешением 2400 dpi (сканер: Epson Perfection V700 Photo) и подсчитывали число рибосом в полирибосомах с использованием программы IGL Trace (http://synapses.clm.utexas.edu).

Из подсчета числа рибосом в полирибосоме исключали полирибосомы, лежащие на границе поверхности срезанной цистерны ER (на рис. 4 отмечены как “и” – исключенные и “в” – включенные в подсчет). Также в подсчет включали не все поли-

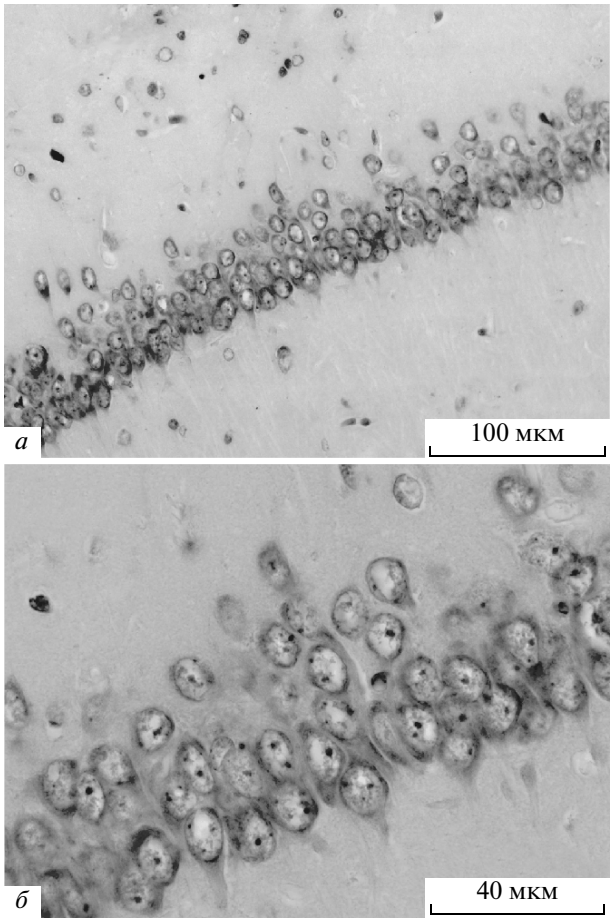


Рис. 1. Микрофотографии гиппокампа крысы (поле CA1), окрашенного крезиловым фиолетовым в контроле (интактное животное).

рибосомы состоящие из 3–4 рибосом, но только те, которые формировали изогнутую цепочку, подобно тому, что образуют связанные с ЭР тяжелые полирибосомы. В среднем у каждой крысы контрольной группы было подсчитано число рибосом в 142 ± 16 полирибосомах и в 197 ± 82 у каждой крысы после воздействия Aβ, наименьшее количество включенных в подсчет составляло 107 полисом.

Статистическая обработка. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ±SD. Интенсивность флуоресценции оценивали по *t* критерию Стьюдента, различия считались достоверными на уровне значимости $p < 0.01$. Межгрупповые различия числа рибосом в полирибосомах определяли дисперсионным анализом (one-way ANOVA) на уровне значимости $p < 0.01$ и ранговым критерием Вилкоксона на уровне значимости $p < 0.05$ с использованием статистического пакета Stadia 8.0 (http://statsoft.msu.ru). Поскольку использовалось минимально возможное количество животных в каждой группе ($n = 3$) для анализа на уровне значимости $p < 0.05$ (95%), программно вычисленные значения статистики Вилкоксона сравнивали с табличными критическими значениями (таблица).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интравентрикулярное введение. В норме, при окраске крезиловым фиолетовым, пирамидные клетки, которые составляют основную массу нейронов поля CA1 гиппокампа [31], имели равномерно окрашенную цитоплазму, четко выраженные ядрышко, плазматическую и ядерную мембраны (рис. 1*а*, *б*).

Спустя 14 дней после введения $A\beta_{25-35}$ морфологическая картина большинства пирамидных нейронов, окрашенных крезиловым фиолетовым, на всем поле CA1 практически не отличалась от контроля (рис. 2*а*, *б*). Однако значение K_α значи-

Детальный анализ распределения рибосом в цитоплазме пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа контрольных и опытных крыс на 14-й день после интравентрикулярного введения $A\beta_{25-35}$, представленных на рис. 4 и попарное сравнение содержания рибосом в различных фракциях полирибосом. Стрелки обозначают повышение (↑) и снижение (↓) соотношения % максимум/% минимум

Рибосомы в полисомах	Контроль, % от общего количества рибосом, среднее отклонение ± S.D., $n = 3$	Опыт, % от общего количества рибосом, среднее отклонение ± ± S.D., $n = 3$	Соотношение, % максимум/% минимум	Сумма рангов, вычисленных по ранговому критерию Вилкоксона
3–5	10.5 ± 2.3	2.6 ± 2.6	4.5*↓	15
6–7	25.9 ± 5.4	9.4 ± 5.7	2.8*↓	15
8–9	33.1 ± 3.4	30.1 ± 4.8	1.1	12
10–11	17.5 ± 4.2	25.8 ± 1.5	1.5*↑	6
12–13	7.1 ± 2.7	15.0 ± 4.8	2.1*↑	6
14–15	3.3 ± 0.4	9.2 ± 4.6	2.8*↑	6
16–19	1.4 ± 2.5	6.8 ± 4.2	4.7↑	7
20–25	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.6	1.0	10.5
3–7	36.4 ± 7.7	11.9 ± 8.3	3.1*↓	15
10–19	29.3 ± 9.7	56.8 ± 12.3	1.9*↑	6

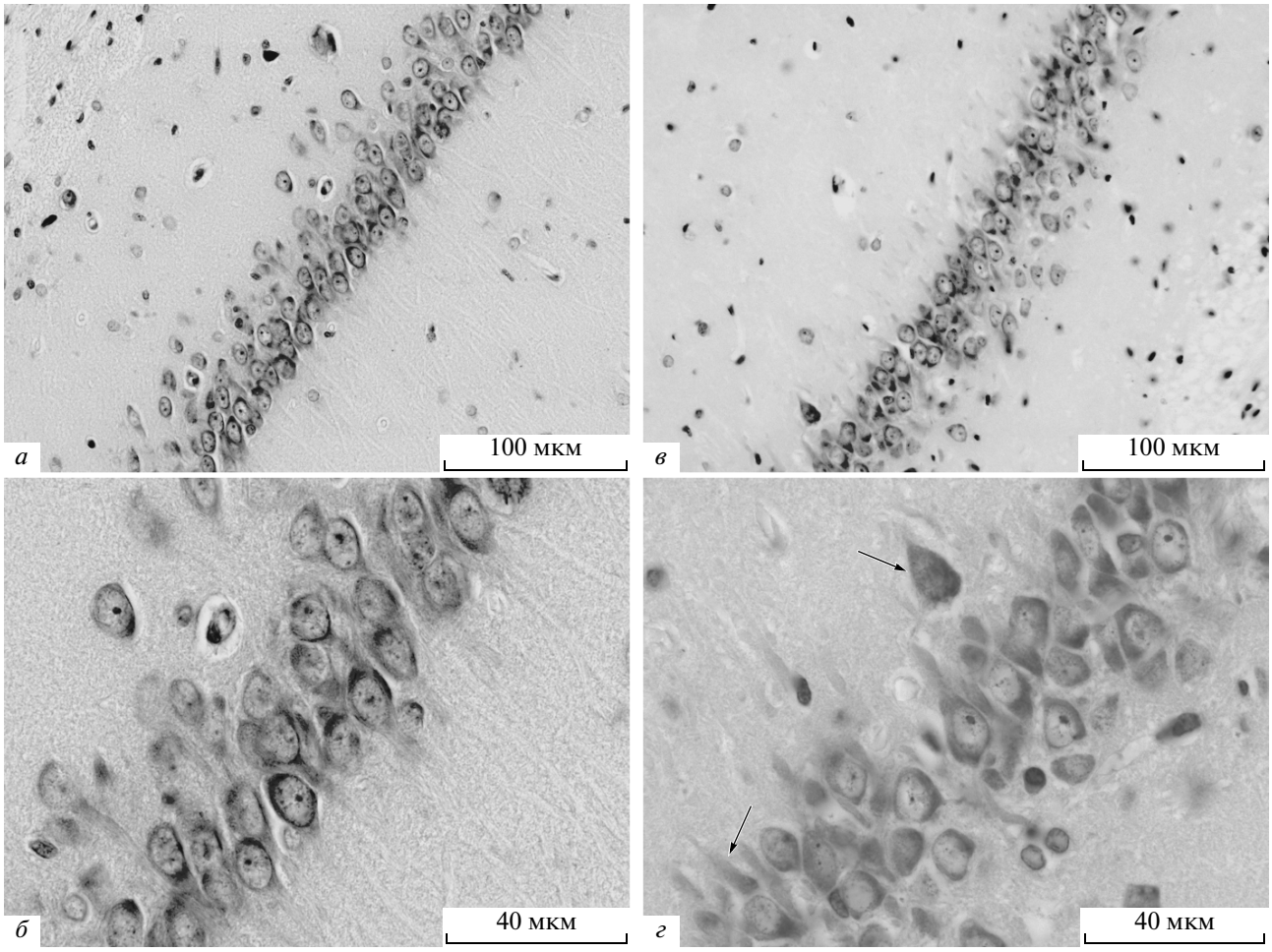


Рис. 2. Микрофотографии гиппокампа крысы (поле CA1), окрашенного крезиловым фиолетовым после микроинъекции $A\beta_{25-35}$ (1.6 мМ) в боковые желудочки мозга. Декапитация на 14-й день (*а*, *б*) и на 30-й день после введения препарата. Стрелками указаны темные и дегенеративные клетки.

тельно снизилось и составляло 36% от контроля (рис. 3*а*).

Через 30 дней после введения $A\beta_{25-35}$ в поле CA1 гиппокампа на фоне морфологически интактных клеток появляются темные и дегенеративные клетки (рис. 2*в*, *г*). Значение величины K_α при этом составляла 56% от контрольного уровня.

Введение физиологического раствора не вызывало изменений K_α и сохранялось на уровне контроля (интактные животные) на 14-й и 30-й дни.

Ультраструктурный анализ цитоплазмы пирамидных нейронов поля CA1 показал, что в контроле число полирибосом, содержащих от 3 до 7 рибосом в 3 раза больше, а число полирибосом, содержащих от 10 до 19 в 2 раза меньше по сравнению с опытом (рис. 4, таблица). Иммуногистохимический анализ не выявил присутствие депозитов Aβ в цитоплазме нейронов в исследуемые сроки.

Интрагиппокампальное введение. Введение $A\beta_{25-35}$ непосредственно в гиппокамп позволяет исследовать прямое действие вещества на нейроны гиппокампа, однако в этом случае необходимо учесть наличие локальной травмы, полученной в результате микроинъекции.

На 1-й день после интрагиппокампального введения во всех группах оперированных животных наблюдали незначительное количество поврежденных клеток в месте инъекции в поле CA1 (рис. 5*а*, *б*) при окраске крезиловым фиолетовым.

Результаты исследования нейронов гиппокампа, окрашенных АО, показали, что на 1-й день после введения AB_{25-35} во всех исследуемых нейронах поля CA1 наблюдалось снижение величины K_α до 55% от контрольного значения (рис. 3*б*). После введения физиологического раствора значение K_α составило 86%.

На 14-й день после введения в гиппокамп $A\beta_{25-35}$ при окрашивании крезиловым фиолетовым в нейронах поля CA1 обнаружились значительное набухание цитоплазмы, ее вакуолизация,

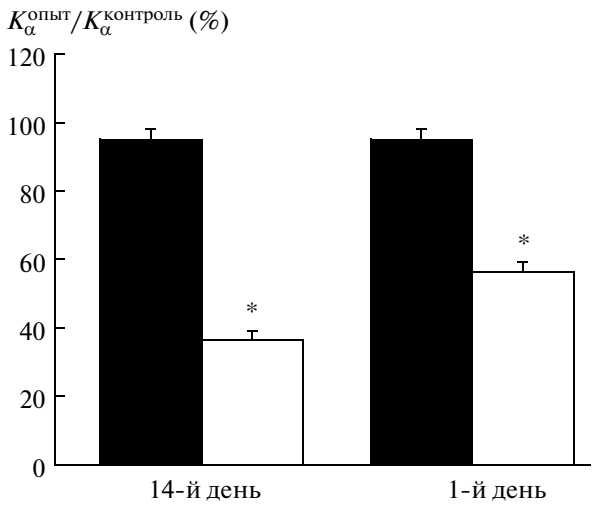


Рис. 3. Изменение величины относительного индекса $K_\alpha^{опыт}/K_\alpha^{контроль}$ (%) (mean ± SD), коррелирующего с изменением интенсивности белкового синтеза в пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа: (*а*) на 14-й день после интравентрикулярного введения $A\beta_{25-35}$, (*б*) на 1-й день после интрагиппокампального введения (концентрация 1.6 мМ). Исследования проводили на 300–400 клетках с 3–4 животными в каждой точке. * указывает на значительное различие в величине индекса для нейронов одной и той же временной точки ($p < 0.001$). Темные колонки – контроль, белые – опыт.

многочисленные расплывчатые, нечеткие и темные, а также полностью разрушенные клетки, что является явными признаками некроза (рис. 5*в*, *г*). Аналогичную картину дегенерации в нейронах поля CA1 гиппокампа наблюдали при гипоксии и ишемии [31–33]. После введения NaCl отличий от контрольного уровня не наблюдалось.

Иммуногистохимический анализ выявил в цитоплазме пирамидных нейронов поля CA1 на 14-й день после инъекции присутствие диффузных депозитов Aβ, которые идентифицировались антителами к $A\beta_{1-40}$ и их отсутствие на 1-й день (рис. 6).

Переживающие срезы гиппокампа. Через 20 мин после инкубирования срезов в $A\beta_{25-35}$ при окраске крезиловым фиолетовым наблюдалась сильно выраженная дегенерация пирамидных нейронов поля CA1 (рис. 7*б*, *г*), а иммуногистохимический анализ выявил в цитоплазме этих клеток присутствие диффузных депозитов Aβ, которые идентифицировались антителами к $A\beta_{1-40}$ В контроле ни признаков дегенерации (рис. 7*а*, *д*), ни наличия диффузных депозитов Aβ не наблюдалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

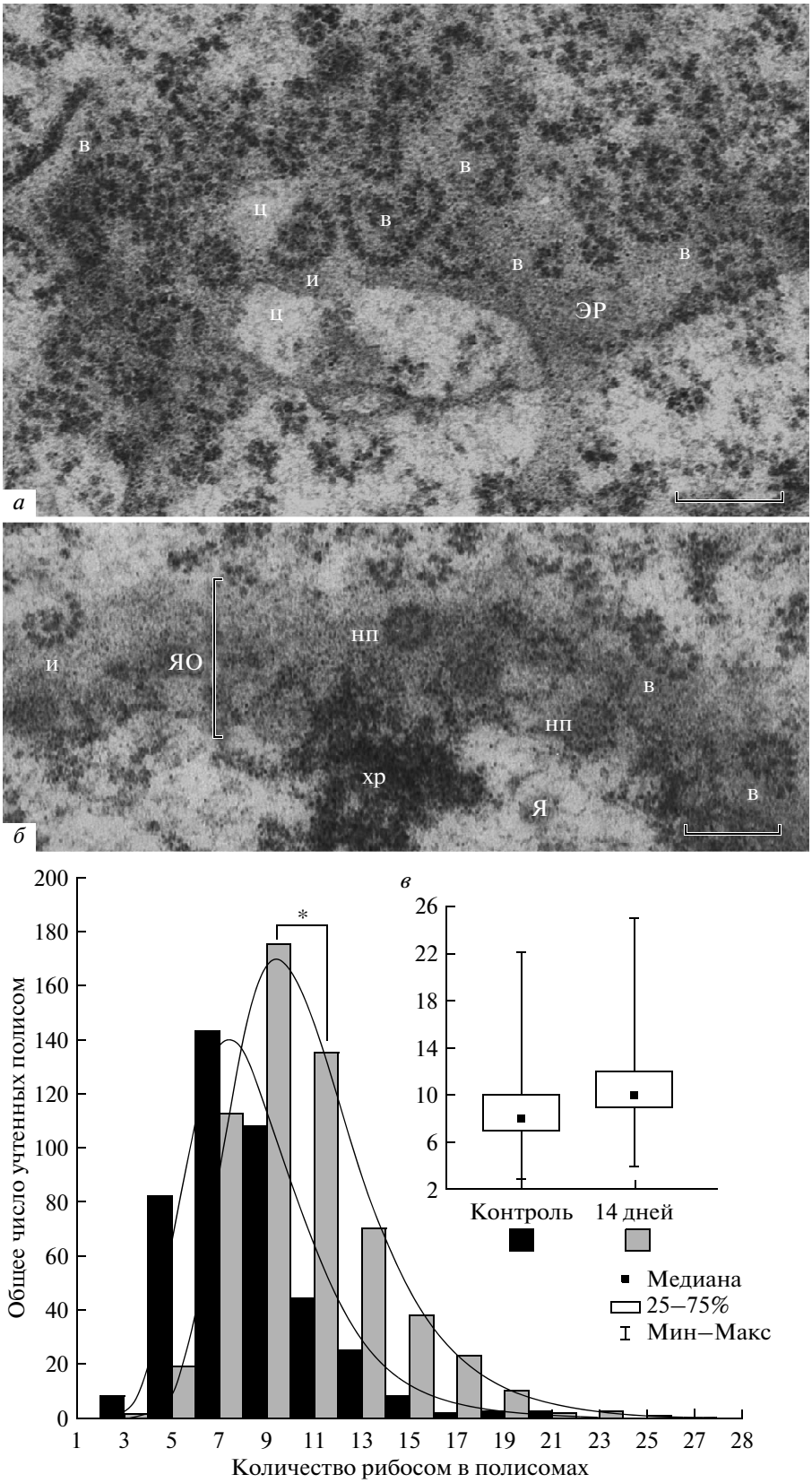
Выявились изменения в состоянии отдельных пирамидных нейронов поля CA1 дорзального гиппокампа на ранней стадии после центрального введения агрегированного $A\beta_{25-35}$.

На 1-й день после интрагиппокампального введения $A\beta_{25-35}$, существенное уменьшение величины K_α наблюдалось в большинстве морфологически интактных клеток по сравнению с контролем. Аналогичное явление имело место и на 14-й день после интравентрикулярного введения. Следовательно, изменение величины K_α не связано с процессом нейродегенерации. В предыдущей работе было показано, что K_α является индикатором интенсивности белкового синтеза и коррелирует с долей транслирующих полирибосом [24]. Метод электронной микроскопии позволил выявить превалирующее количество тяжелых полирибосом в цитоплазме нейронов поля CA1 гиппокампа при интравентрикулярном введении $A\beta_{25-35}$. Таким образом, именно преобладание тяжелых полирибосом является причиной снижения белоксинтезирующей активности в исследуемых клетках.

Данные результаты коррелируют с исследованиями Чана и соавторов, которые на культуре первичных нейронов показали, что в первый день после введение Aβ в морфологически интактных клетках значительно снижалась скорость белкового синтеза. Причиной такого снижения было формирование превалирующего количества тяжелых полирибосом [34].

На этом основании можно предположить, что и на 1-й день после интрагиппокампального введе-

Рис. 4. Репрезентативные фрагменты уплощенной цистерны ЭР и наружной ядерной мембраны с расположенными на них полирибосомами, использованными для оценки числа рибосом в полирибосомах. (*а*) – уплощенная цистерна ER усеяна хорошо различимыми полирибосомами. (*б*) – тангенциальный срез ядерной мембраны с полирибосомами. Не все полирибосомы были использованы для подсчета числа составляющих их рибосом; “в” – включенные в подсчет полирибосомы, “и” – исключенные, лежащие на границе срезанной цистерны ЭР. ЭР – эндоплазматический ретикулум, ц – цитоплазма, ЯО – ядерная оболочка; нп – ядерная пора; хр – хроматин. Масштабные отрезки составляют 200 нм. (*в*) – количественное распределение полирибосом в зависимости от числа составляющих их рибосом. Для наглядности сдвига распределения дополнены соответствующими функциями экстремальных значений и диаграммой свойств двух распределений (медиана, минимальное и максимальное значения, верхний и нижний квартили) в контроле и на 14-й день после интравентрикулярной инъекции Aβ. После инъекции Aβ количество рибосом в полирибосомах было выше (10.9 ± 3.2, $n = 591$) и достоверно отличалось от значений в контроле (8.7 ± 2.9, $n = 427$) (one-way ANOVA, $p < 0.01$, отмечено звездочкой).


в
в
ц
в
в
в
и
ЭР
ц
а
и
ЯО
нп
в
нп
хр
Я
в
б
в
Общее число учтенных полисом
Количество рибосом в полисомах
*
Контроль
14 дней
Медиана
25–75%
Мин–Макс

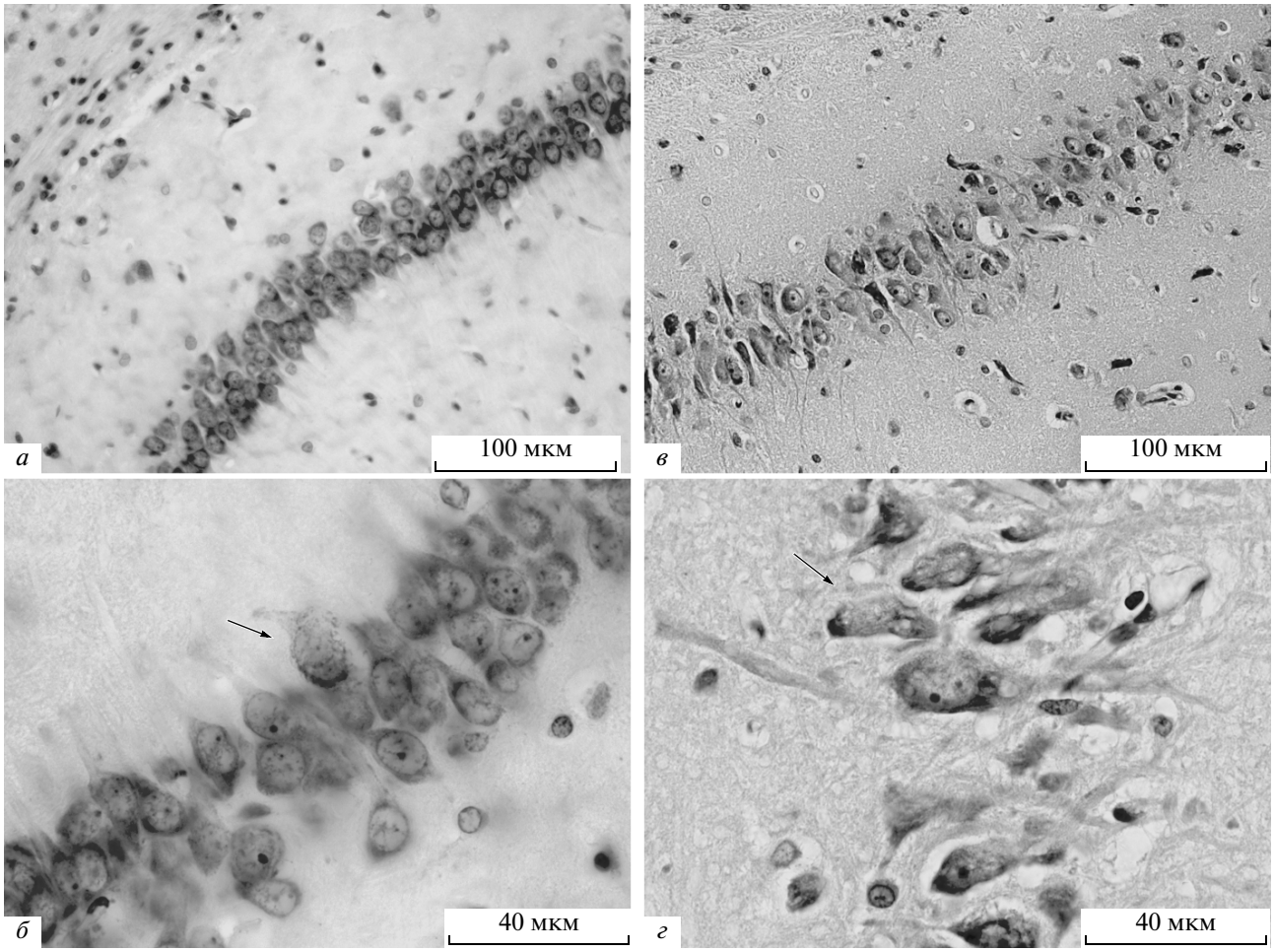


Рис. 5. Микрофотографии гиппокампа крысы (поле CA1), окрашенного крезиловым фиолетовым после микроинъекции в гиппокамп: $A\beta_{25-35}$ (1.6 мМ). Декапитация на 1-й (*а*, *б*) и 14-й день (*в*, *г*) после введения. Стрелками указаны темные и дегенеративные клетки.

ния Аβ причиной снижения белкового синтеза могло быть формирование превалирующего количества тяжелых полирибосом, как это имело место на 14-й день после интравентрикулярной инъекции Аβ.

Согласно исследованиям Динга и соавторов, на ранних стадиях БА в гомогенатах различных структур мозга способность полирибосомальных комплексов синтезировать белок нарушается. Авторы полагают, что окислительный стресс может быть причиной снижения белкового синтеза. Нарушение белкового синтеза рассматривается как основной фактор начала и развития БА [13].

Эксперименты на культуре первичных нейронов показали, что уже через несколько часов после воздействия Аβ в клетках индуцируется окислительный стресс [34–37]. Реактивные кислородные радикалы индуцируют повреждения во всех компонентах системы белкового синтеза (мРНК, рибосомы, тРНК, хроматин), что и является причиной формирования тяжелых полирибосом [34, 38].

В опытах *in vitro* было показано, что окислительный стресс увеличивает экспрессию β- и γ-секретаз, которые усиливают продукцию эндогенного Аβ [35–37].

Возможно, эти два процесса, вызванные окислительным стрессом: нарушение белкового синтеза и активация продукции эндогенного Аβ, – разнесены во времени. Так, на 1-й день после интрагиппокампального введения Аβ в морфологически интактных нейронах значительно снижается активность белкового синтеза, но в цитоплазме еще нет депозитов Аβ. На 14-й день в цитоплазме дегенеративных клеток депозиты уже наблюдаются. Депозиты Аβ наблюдали и в поврежденных нейронах переживающих срезов гиппокампа. Накопление Аβ в нейронах, вероятно, может происходить как в результате проникновения

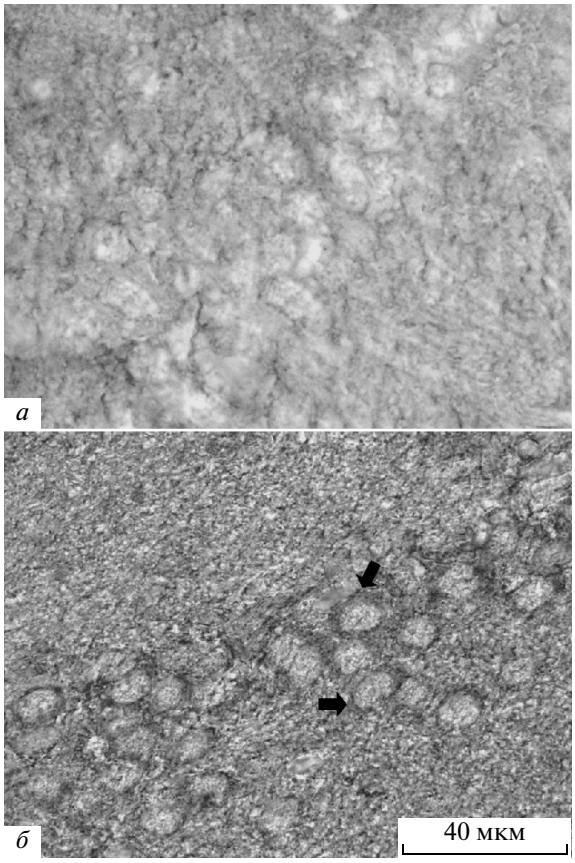


Рис. 6. Микрофотографии поля CA1 крысы. Депозиты амилоида идентифицировались антителами к $A\beta_{1-40}$. (*а*) – в контроле; (*б*) – на 14-й день после введения в гиппокамп $A\beta_{25-35}$ (1.6 мМ). Толстые стрелки указывают на диффузные амилоидные депозиты в цитоплазме нейронов.

экзогенного Aβ вследствие повреждения клеточной мембраны, так и в результате формирования эндогенного Aβ [16]. Однако в данной работе в цитоплазме нейронов накапливается, по-видимому, эндогенный Aβ, поскольку животным был введен A_{25-35}, а в цитоплазме депозиты Aβ идентифицировались антителами к $A\beta_{1-40}$.

Таким образом, можно предположить, что центральное введение Aβ вызывает цепь событий: окислительный стресс, увеличение экспрессии β- и γ-секретаз, накопление депозитов эндогенного Aβ.

Результаты исследований показали различия в динамике состояния нейронов после интравентрикулярного и интрагиппокампального введения Aβ. Показателем разной скорости проникновения Aβ в нейроны при этих двух способах введения может служить сравнение состояния клеток на 14-й день. Если при интрагиппокампальном введении наблюдается некроз основной массы нейронов и наличие депозитов в них, то при интравентрикулярном введении видим только максимальное снижение интенсивности белкового синтеза в морфологически интактных нейронах, как это имело место на 1-й день после интрагиппокампального введения. Следует отметить, что существенная нейродегенерация после интравентрикулярной инъекции Aβ была показана только через 3 мес. [19].

Таким образом, динамика повреждения пирамидных нейронов гиппокампа при различных способах центральных инъекций Aβ имеет общие черты, но различается по скорости процессов.

Цитологические методы исследования позволили выявить, что ранним проявлением действия Aβ в пирамидных нейронах поля CA1 дорзального гиппокампа является нарушение белкового синтеза в результате формирования превалирующего количества тяжелых полирибосом. В дальнейшем развивающаяся дегенерация нейронов, вероятно, является результатом накопления в цитоплазме эндогенного Aβ.

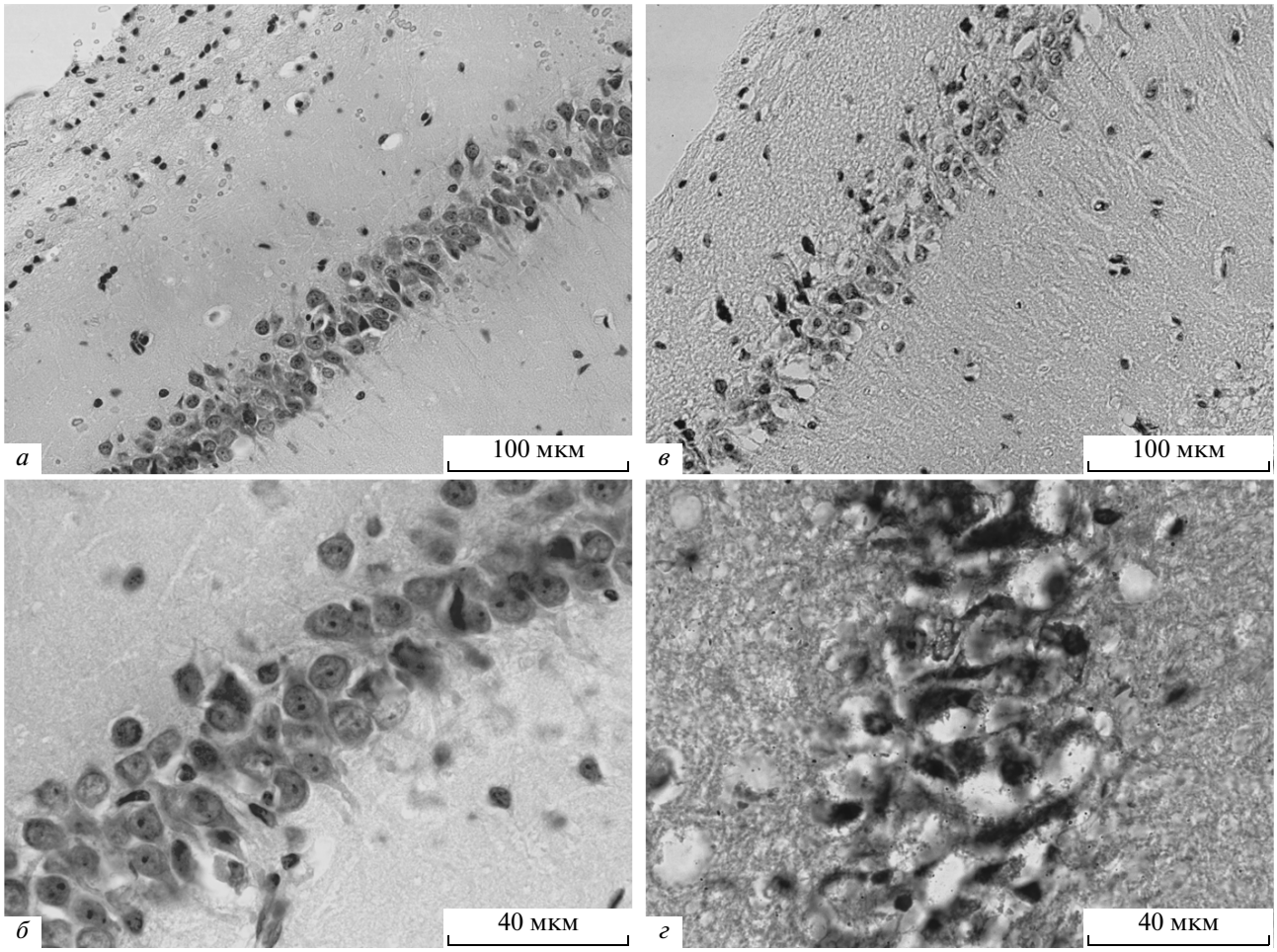


Рис. 7. Микрофотографии переживающих срезов гиппокампа крысы (поле CA1), инкубированных в среде Кребса–Рингера (*а*, *б*), с $A\beta_{25-35}$ (200 нМ) (*в*, *г*), окраска крезиловым фиолетовым.

Работа была поддержана грантами Президиума АН РАН “Фундаментальные науки – медицине” и Министерства образования и науки РФ № Р1052.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haass C., Selkoe D.J.* // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007. V. 8. P. 101–112.
2. *Li H., Wolfe M.S., Selkoe D.J.* // Structure. 2009. V. 17. P. 326–334.
3. *Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P., Abraham W.C.* // Prog. Neurobiol. 2003. V. 70. P. 1–32.
4. *Citron M.* // Nat. Rev. Drug. Discov. 2010. V. 9. P. 387–398.
5. *Jin M., Shepardson N., Yang T., Chen G., Walsh D., Selkoe D.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 14. P. 5819–5824.
6. *Sajdel-Sulkowska E.M., Marotta C.A.* // Science. 1984. V. 225. P. 947–949.
7. *Langstrom N.S., Anderson J.P., Lindroos H.G., Winblad B., Wallace W.C.* // Mol. Brain Res. 1989. V. 5. P. 259–269.
8. *Chang R.C., Wong A.K., Ng H.K., Hugon J.* // Neuroreport. 2002. V. 13. P. 2429–2432.
9. *Ferrer I.* // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2002. V. 28. P. 441–451.
10. *An W.L., Cowburn R.F., Li L., Braak H., Alafuzoff I., Iqbal K., Winblad B., Pei J.J.* // Am. J. Pathol. 2003. V. 163. P. 591–607.
11. *Li X., An W.L., Alafuzoff I., Soininen H., Winblad B., Pei J.J.* // Neuroreport. 2004. V. 15. P. 2237–2240.
12. *Mann D.M., Neary D., Yates P.O., Lincoln J., Snowden J.S., Stanworth P.* // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1981. V. 44. P. 97–102.
13. *Ding Q., Markesbery W.R., Chen Q., Li F., Keller J.N.* // J. Neurosci. 2005. V. 25. P. 9171–9175.
14. *Selkoe D.J.* // Behav. Brain. Res. 2008. V. 192. P. 106–113.
15. *Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Mitrokhina O.S., Moiseeva Y.V., Lazareva N.A., Victorov I.V., Gulyaeva N.V.* // Neurochimiya. 2000. V. 17. P. 278–293, (in Russian).

16. *Klementiev B., Novikova T., Novitskaya V., Walmod P.S., Dmytriyeva O., Pakkenberg B., Berezin V., Bock E.* // Neuroscience. 2007. V. 145. P. 209–224.

17. *Lin H.B., Yang X.M., Li T.J., Cheng Y.F., Zhang H.T., Xu J.P.* // Psychopharmacology (Berl). 2009. V. 204. P. 705–714.

18. *Ruan C.J., Zhang L., Chen D.H., Li Z., Du G.H., Sun L.* // Neurosci. Res. 2010. V. 67. P. 209–214.

19. *Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В.* Инъекционные модели болезни Альцгеймера. Нейродегенеративные заболевания / Под ред. Угрюмова М.В. М.: Наука, 2010. С. 364–371.

20. *Díaz A., De Jesús L., Mendieta L., Calvillo M., Espinosa B., Zenteno E., Guevara J., Limo'n I.D.* // Neurosci. Lett. 2010. V. 468. P. 151–155.

21. *Huang H.J., Liang K.C., Chen C.P., Chen C.M., Hsieh-Li H.M.* // Neurobiol. Learn. Mem. 2007. V. 87. P. 483–494.

22. *Cleary J.P., Walsh D.M., Hofmeister J.J., Shankar G.M., Kuskowski M.A., Selkoe D.J., Ashe K.H.* // Nat. Neurosci. 2005. V. 8. P. 79–84.

23. *Podolski I.Ya., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A., Mugantseva E.A., Makarova E.G., Marsagishvili L.G., Shpagina M.D., Kaminsky Yu.G., Andrievsky G.V.* Klochkov V.K. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2007. V. 7. P. 1479–1485.

24. *Gordon R.Ya., Bocharova L.S., Kruman I.I., Popov V.I., Kazantsev A.P., Khutzian S.S., Karnaukhov V.N.* // Cytometry. 1997. V. 29. P. 215–221.

25. *Walsh D.M., Townsend M., Podlisny M.B., Shankar G.M., Fadeeva J.V., El Agnaf O., Hartley D.M., Selkoe D.J.* // J. Neurosci. 2005. V. 25. P. 2455–2462.

26. *Paxinos G., Watson C.* / The Rat in Stereotaxic Coordinates. Sydney: Academic Press, 1982. 321 p.

27. *Кордонец О.Л., Годухин О.В., Подольский И.Я., Чайлахян Л.М.* // Докл. биол. наук. 2008. Т. 423. С. 382–384.

28. *Chen Q.S., Kagan B.L., Hirakura Y., Xie C.W.* // J. Neurosci. Res. 2000. V. 60. P. 65–72.

29. *Отмахов Н.А.* / Переживающие срезы мозга. Метод. рекомендации. Пущино: АН СССР, Пущин. научн. центр, 1987. 71 с.

30. *Карнаухов В.Н.* / Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды. М.: Наука, 2001. 185 с.

31. *Monje M.L., Chatten-Brown J., Hye S.E., Raley-Susman K.M.* // Brain Res. 2000. V. 857. P. 172–182.

32. *Chopp M., Chen H., Dereski M.O., Garcia J.H.* // Stroke. 1991. V. 22. P. 37–43.

33. *Wasterlain C.G., Adams L.M., Wichmann J.K., Sofia R.D.* // Stroke. 1996. V. 27. P. 1236–1240.

34. *Shan X., Chang Y., Lin C.L.* // FASEB J. 2007. V. 21. P. 2753–2764.

35. *Tamagno E., Guglielmotto M., Aragno M., Borghi R., Autelli R., Giliberto L., Muraca G., Danni O., Zhu X., Smith M.A., Perry G., Jo D.G., Mattson M.P., Tabaton M.* // J. Neurochem. 2008. V. 104. P. 683–695.

36. *Tamagno E., Parola M., Bardini P., Piccini A., Borghi R., Guglielmotto M., Santoro G., Davit A., Danni O., Smith M.A., Perry G., Tabaton M.* // J. Neurochem. 2005. V. 92. P. 628–636.

37. *Tong Y., Zhou W., Fung V., Christensen M.A., Qing H., Sun X., Song W.* // J. Neural. Transm. 2005. V. 112. P. 455–469.

38. *Ding Q., Dimayuga E., Keller J.N.* // Curr. Alzheimer Res. 2007. V. 4. P. 73–79.

Поступила в редакцию
12.12.2011 г.