

Н. А. КОКАНОВА¹, Г. З. МИХАЙЛОВА¹, Р. Ш. ШТАНЧАЕВ¹,
Е. Н. БЕЗГИНА¹, Н. Р. ТИРАС¹, Д. А. МОШКОВ¹

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ АППЛИКАЦИИ БЕТА-АМИЛОИДА НА МАУТНЕРОВСКИЕ НЕЙРОНЫ ЗОЛОТОЙ РЫБКИ

Поступила 06.08.13

Изучали корреляцию функциональной активности и трехмерной структуры маутнеровских нейронов (МН) золотой рыбки в норме, после изолированной аппликации агрегированного фрагмента бета-амилоида 25–35 ($A\beta_{25-35}$) и сочетания такой аппликации с оптокинетической стимуляцией. Показано, что наблюдаемая в контроле выраженная коррелятивная связь структуры и функции МН сильно нарушается после воздействия агрегатов бета-амилоида. Основным механизмом такого эффекта $A\beta_{25-35}$, согласно данным последующего ультраструктурного анализа, являются деструкция цитоскелета, вакуолизация цитоплазмы МН и запустевание везикулярного аппарата афферентных синапсов. Утомляющая сенсорная оптокинетическая стимуляция рыбок на фоне действия $A\beta_{25-35}$ обуславливает дистрофию вентральных дендритов МН и формирование рядом с ними ранее отсутствовавших гипертрофированных медиальных дендритов, соизмеримых по величине с основными дендритами МН у контрольных рыбок. Полученные данные позволяют предположить, что травматическое механическое влияние агрегатов бета-амилоида на нейроны и их отростки является важным фактором в развитии нейродегенеративных заболеваний, связанных с амилоидозом, и деструкция цитоскелета может быть одним из ключевых феноменов в этом аспекте.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: золотая рыбка, моторная асимметрия, маутнеровские нейроны, аппликация бета-амилоида ($A\beta_{25-35}$), оптокинетическая стимуляция, трехмерная реконструкция, гистология, ультраструктура.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования патофизиологических, генетических, молекулярно-биологических и ряда других аспектов болезни Альцгеймера пока не позволили раскрыть полностью механизмы патологической дистрофии дендритов нейронов при данной патологии и связи таких изменений с дисфункцией нервных клеток под влиянием накопления в мозгу бета-амилоида – белка сенильных бляшек. Появление последних является наиболее известным патоморфологическим индикатором развития упомянутой болезни. Структурно-функциональные изменения в нейронах на начальных стадиях накопления бета-

амилоида растянуты во времени (происходят в течение несколько лет), что затрудняет раннюю диагностику, профилактику и лечение заболевания [1–4]. Труднопреодолимым барьером в данном аспекте является пока существующий дефицит информации о топографии и связях отдельных нейронов в функционирующих сетях мозга, опосредующих когнитивные функции. Это, в свою очередь, не позволяет выяснить с достаточной полнотой функциональные последствия наблюдаемой структурной патологии, в частности дистрофии дендритов индивидуальных нейронов при нейродегенеративных заболеваниях.

Ранее нами было показано, что адекватной в ряде отношений экспериментальной клеточной моделью амилоидоза могут служить результаты аппликации агрегированного фрагмента 25–35 бета-амилоида ($A\beta_{25-35}$) на маутнеровские нейроны (МН), расположенные симметрично в продолговатом мозгу рыб, в частности золотой рыбки [5], и играющая

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Моск. обл. (РФ).

Эл. почта: kokanchik@rambler.ru (Н. А. Коканова);
mihailova_g@rambler.ru (Г. З. Михайлова);
rshtanch@mail.ru (Р. Ш. Штанчаев);
ntiras@mail.ru (Н. Р. Тирас);
d_moshkov@mail.ru (Д. А. Мошков).

важнейшую роль в управлении движениями. В исследованиях, проводимых на данной модели, было выявлено, что аппликация бета-амилоида вызывает непредсказуемые локальные нарушения трехмерной морфологии МН на уровне их отдельных компартментов – сомы и дендритов (латерального и вентрального). Это приводит к изменению структурной асимметрии между правым и левым нейронами. Подобные гистологические изменения сопровождаются патологическими нарушениями функции МН, что проявляется в поведении рыбок как измененная моторная асимметрия. Наблюдалось нарушение характерного для интактных рыбок достаточно строгого соответствия коэффициента моторной асимметрии (КМА) двигательной активности коэффициенту структурной асимметрии (КСА) объемов компартментов нейронов. Были обнаружены изменение объемных пропорций тел и индивидуальных дендритов МН, а также уменьшение диаметра и длины данных отростков [6]. Дальнейшее изучение характеристик такой клеточной модели амилоидоза требует выявления состояния внутриклеточных компонентов, плазматических мембран, синаптических контактов и, возможно, идентификации повреждений тех структур, которые более других ответственны за аномалии трехмерной морфологии нейронов.

Целью настоящей работы было выявление тонких изменений в МН (с использованием электронной микроскопии) после аппликации агрегированного токсического компонента амилоида βA_{25-35} . Для большей информативности результатов использования предложенной нами аппликационной модели амилоидоза мы применяли сочетание воздействий аппликаций бета-амилоида и физиологической нагрузки – зрительной (оптомоторной) стимуляции рыбок в процессе реализации их моторного поведения. Ультраструктурные характеристики МН исследовали после изолированных аппликаций на них бета-амилоида и таких аппликаций в сочетании с естественной стимуляцией, которая воздействует на афферентные синапсы вентральных дендритов МН и вызывает их морфологические изменения [7].

МЕТОДИКА

Работу выполняли на мальках золотой рыбки (*Carassius auratus* L.) породы Оранда. Длина тела мальков составляла около 3.5 см, масса – порядка 2 г, возраст – около четырех месяцев. Всего было ис-

пользовано 52 рыбки.

Для каждой из рыбок контрольной и опытной групп определяли отдельно количества совершаемых ею в ходе локомоции (плавания) поворотов вправо и влево, что служит косвенным, но весьма адекватным показателем функциональной активности пары МН как двухклеточного двигательного центра. Активность левого нейрона инициирует поворот рыбки вправо, а правого нейрона – поворот влево. На основании таких данных вычисляли отношение числа поворотов в предпочитаемую сторону к сумме поворотов в обе стороны – КМА рыбок. Это позволяло выяснить, какой из двух нейронов более активен, т. е. является доминантным [8, 9]. Полученные значения КМА всех рыбок контрольной и опытной групп затем использовали для анализа корреляционных отношений со структурной асимметрией МН у тех же особей (см. ниже).

Растворенный в дистиллированной воде βA_{25-35} в концентрации 5 мг/мл предварительно агрегировали, превращая в протяженные бета-амилоидные ленты. Для этого коммерческий препарат («Sigma», США) выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение трех суток. Степень агрегации и образование лент контролировали с использованием электронной микроскопии, применяя метод негативного контрастирования уранилацетатом [6]. Рыбкам экспериментальной группы апплицировали на МН агрегированный бета-амилоид в объеме 4 мкл, инъецируя его в область расположения нейронов по ранее описанному методу [10, 11]. Контрольным рыбкам инъецировали дистиллированную воду. В некоторых экспериментах параллельно с агрегированным фрагментом 25–35 бета-амилоида использовали его нетоксичный аналог с обратной последовательностью аминокислотных остатков 35–25 (в неагрегированной и агрегированной формах).

Часть подопытных рыбок спустя 17 ч после аппликации βA_{25-35} на их МН подвергали 10-часовой контролаторальной оптокинетики (зрительной) стимуляции по методике, описанной ранее. Скорость вращения оптомоторного барабана составляла 30 мин⁻¹ [12]. Для стимуляции доминирующего правого МН рыбок-левшей барабан вращали по часовой стрелке, а для стимуляции доминирующего левого МН рыбок-правшей – в обратном направлении.

Для гистологических и ультраструктурных исследований рыбок декапитировали, выделяли часть их продолговатого мозга, включающую в себя МН,

и обрабатывали с применением стандартной электронно-микроскопической методики (фиксация альдегидами и четырехокисью осмия и заливка в эпон, что обеспечивало минимальную усадку ткани [13, 14]). Из залитых в эпоновые блоки фрагментов продолговатого мозга далее с помощью пирамитома («ЛКВ», Швеция) изготавливали серийные фронтальные гистологические срезы толщиной 3 мкм. Число срезов для каждой рыбки обычно составляло около 90. По таким сериям срезов выполняли трехмерную реконструкцию нейронов и определяли объемы их частей – сомы, латерального и вентрального дендритов, а также интегральные объемы правого и левого нейронов [13, 15]. Затем для каждой рыбки вычисляли индивидуальные КСА нейронов и их частей как отношение интегрального объема доминантного МН или объема его части к сумме соответствующих объемов обоих нейронов или их частей [13]. Количественные данные относительно КСА МН каждой из рыбок контрольной и опытной групп затем использовали для расчета уровня корреляции этих значений со значениями КМА у тех же рыбок.

Взаимозависимость структуры нейрона и его функциональной активности характеризовали, рассчитывая коэффициенты корреляции с использованием программы «Microsoft Excel». Для линейного регрессионного анализа данных применяли пакет средств «Microsoft Excel», иллюстрируя полученные результаты путем построения диаграмм рассеяния. Сильной положительной корреляции соответствует ярко выраженная тенденция увеличения плотности точек в виде «облака», вытянутого от левого нижнего угла графика к правому верхнему. Сильная отрицательная корреляция соответствует „облаку“ точек, вытянутому от левого верхнего угла к правому нижнему. Если представленное „облако“ точек расположено по горизонтали, по вертикали или же точки распределены более или менее равномерно, то связь между признаками, скорее всего, отсутствует.

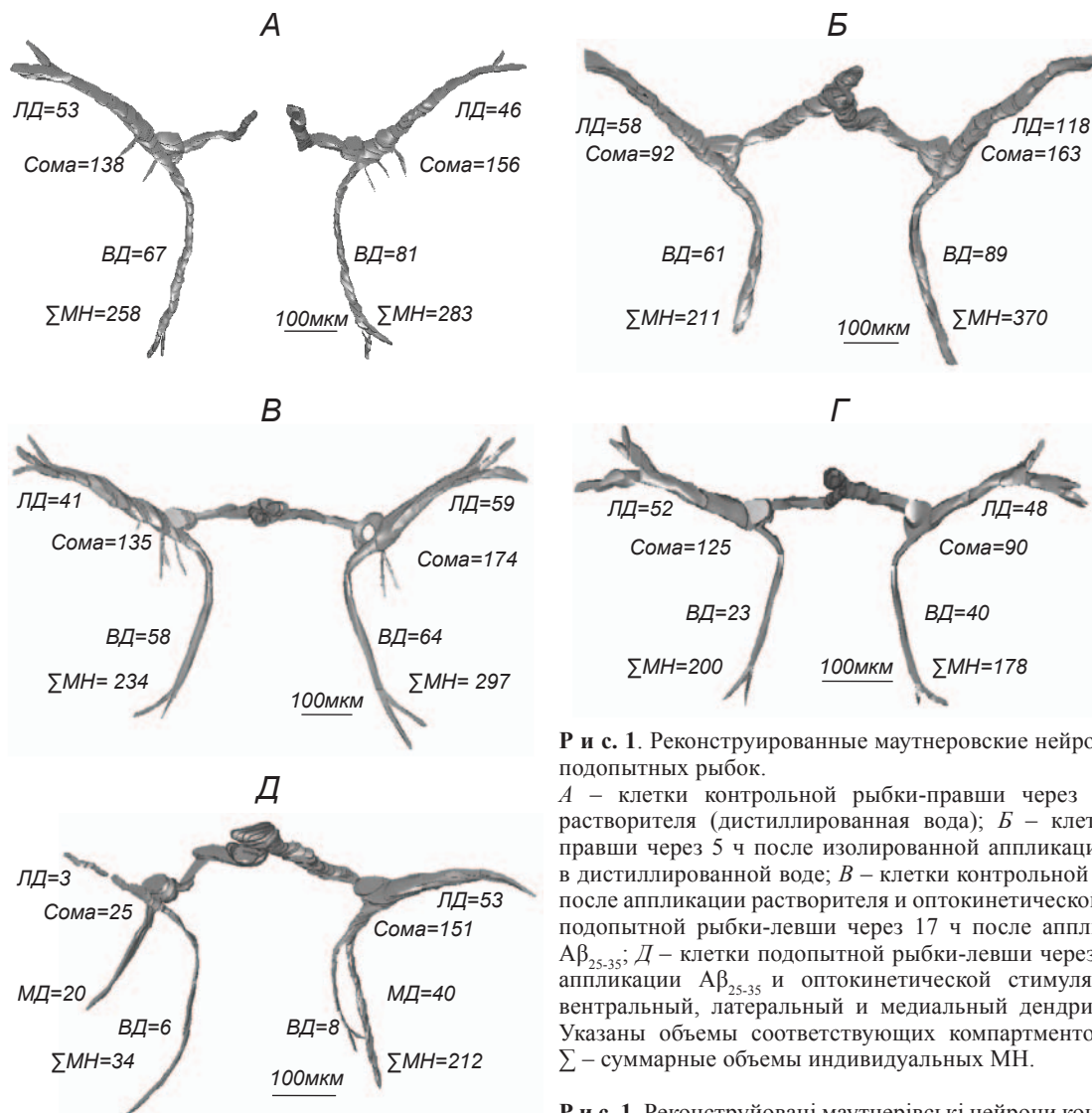
Для проведения ультраструктурного исследования использовали ряд гистологических срезов из серий, полученных для объемных реконструкций. Выбирали те срезы, которые содержали в себе участки МН, необходимые для дальнейшего прицельного исследования в электронном микроскопе, – сому, латеральный и вентральный дендриты. Выбранные срезы переклеивали на эпоновые столбики, изготавливали ультратонкие срезы на ультрамикротоме EM UC6 («Leica», ФРГ), контрастиро-

вали водными растворами уранилацетата и цитрата свинца и затем исследовали в электронном микроскопе Тесла БС-500 (“Tesla”, Чехословакия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Различные качественные и количественные характеристики функциональных и структурных изменений МН, подвергнутых действию агрегированного фрагмента $A\beta_{25-35}$ или $A\beta_{35-25}$, а также (для сравнения) соответствующие результаты функционального и структурного анализа МН контрольных рыбок были описаны нами ранее [6, 14]. Ниже мы приводим типичные примеры изменчивости КМА отдельных рыбок, входивших в две указанные группы и использованных в настоящей работе, а также значения КСА их МН с тем, чтобы проследить далее сдвиги в ультраструктуре тех же нейронов (подвергнутых ранее трехмерной реконструкции). Эти данные показывают, как меняются моторная асимметрия рыбок и трехмерная структура их МН после микроинъекций дистиллированной воды и бета-амилоида, разведенного на воде. Кроме латерализации поведения и структурной асимметрии МН контрольных и опытных рыбок-правшей, исследованных спустя 5 ч после указанного воздействия, мы исследовали также упомянутые характеристики рыбок-левшей в контроле (через 17 ч после аппликации дистиллированной воды) и в опыте после 17-часового изолированного воздействия бета-амилоида и сочетания такого воздействия с длительной контралатеральной оптокинетической стимуляцией. Было впервые обнаружено, что данные воздействия также приводят к заметным изменениям соответствующих показателей. Эти типичные результаты позволяют видеть, какие изменения вносят сама аппликация бета-амилоида и (дополнительно) прицельная зрительная стимуляция на фоне действия данного агента.

В исследовании моторной асимметрии контрольной рыбки-правши (исходное значение КМА = 0.54) через 5 ч после аппликации дистиллированной воды было установлено, что сдвиг латерализации поведения при таком воздействии отсутствует (КМА оставался равным 0.54). Результаты изучения структуры 3D-реконструированных МН этой рыбки в отдаленные сроки после воздействия дистиллированной воды (рис. 1, А) свидетельствовали о полной идентичности структуры таких МН структуре клеток интактных рыбок, о чем неоднократно упо-



Р и с. 1. Реконструированные маутнеровские нейроны (МН) контрольных и подопытных рыбок.

А – клетки контрольной рыбки-правши через 5 ч после аппликации растворителя (дистиллированная вода); *Б* – клетки подопытной рыбки-правши через 5 ч после изолированной аппликации $A\beta_{25-35}$, растворенного в дистиллированной воде; *В* – клетки контрольной рыбки-левши через 17 ч после аппликации растворителя и оптокинетической стимуляции; *Г* – клетки подопытной рыбки-левши через 17 ч после аппликации агрегированного $A\beta_{25-35}$; *Д* – клетки подопытной рыбки-левши через 17 ч после комбинации аппликации $A\beta_{25-35}$ и оптокинетической стимуляции. *ВД*, *ЛД* и *МД* – вентральный, латеральный и медиальный дендриты МН соответственно. Указаны объемы соответствующих компартов МН в тысячах $\mu\text{м}^3$, Σ – суммарные объемы индивидуальных МН.

Р и с. 1. Реконструйовані маутнерівські нейрони контрольних і піддослідних рыбок.

миналось ранее [8, 12, 15]. Тем не менее, необходимо подчеркнуть, что оценки структурных критериев, несмотря на видимую интактность структуры правого и левого МН и пропорций их частей, указывали на легкую инверсию КСА. Этот индекс приобретал значение 0.48, что соответствует таковому у рыбки со слабо выраженными признаками левши.

Результаты исследования эффекта аппликации βA_{25-35} (спустя 5 ч) показали, что после такого воздействия индекс моторной асимметрии у рыбки-правши сдвигался от 0.73 до 0.60. Параметры структуры МН заметно изменялись по сравнению с контрольными значениями. Объемы различных частей левого и правого нейронов составляли соответственно у сомы 92 и 163 тыс. $\mu\text{м}^3$, латерального дендрита – 58 и 118 тыс. $\mu\text{м}^3$, вентрального ден-

дрита – 61 и 89 тыс. $\mu\text{м}^3$ (рис. 1, *Б*). В целом КСА нейронов становился равным 0.36, т. е. структурная асимметрия МН после воздействия бета-амилоида полностью инвертировалась. По указанному структурному признаку рыбка начинала соответствовать ярко выраженной левше. Происходило это из-за сильного изменения пропорций частей индивидуальных нейронов – увеличения объема сомы правого нейрона на 80 % и двукратного увеличения объема латерального дендрита при сохранении прежних размеров вентральных дендритов.

Исследование моторной асимметрии контрольных рыбок-левшей (исходное значение КМА = 0.51) через 17 ч после аппликации дистиллированной воды выявило некоторое увеличение КМА (до значения 0.60). Последующая контралатеральная оп-

токинетическая стимуляция приводила к практическому сглаживанию латерализации поведения рыбки, о чем свидетельствовала величина КМА (0.51). Объемная реконструкция МН таких рыбок после воздействия воды не выявляла заметных отклонений от интактных значений (не иллюстрируется); не было обнаружено также каких-то значительных отклонений в структуре и пропорциях отдельных частей правого и левого нейронов после воздействия длительной оптокинетической стимуляции (рис. 1, В). Правый нейрон у этой рыбки был на четверть крупнее левого, а в целом значение КСА у данных нейронов составляло 0.56, что полностью соответствует структурным критериям рыбки-левши.

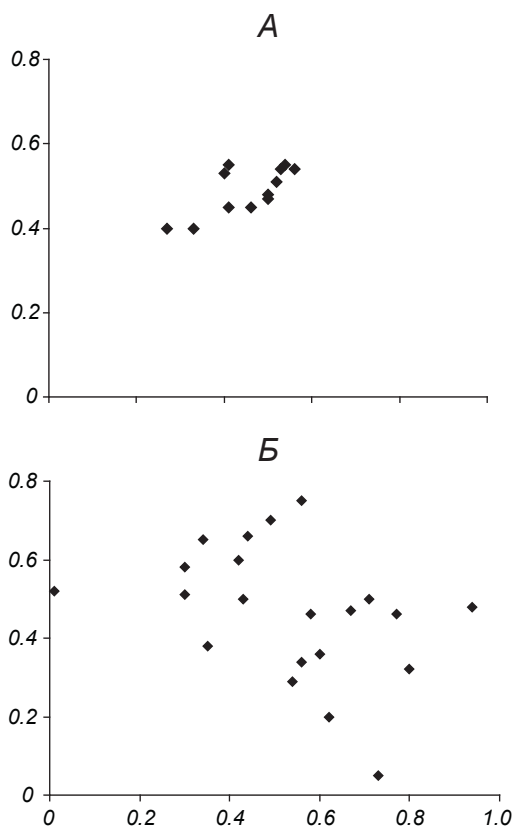
Результаты исследования отдаленного эффекта аппликации βA_{25-35} (спустя 17 ч) у МН рыбки-левши показали, что до аппликации и после нее индекс моторной асимметрии равнялся 0.51 и 0.53 соответственно. Структура МН по сравнению с контролем заметно изменялась. Значения объемов различных частей правого и левого нейронов составляли соответственно: сомы – 90 и 125 тыс. $\mu\text{м}^3$, латерального дендрита – 48 и 52 тыс. $\mu\text{м}^3$, а вентрального дендрита – 40 и 23 тыс. $\mu\text{м}^3$; КСА = 0.47 (рис. 1, Г). В целом структурная асимметрия МН после воздействия бета-амилоида слегка инвертировалась – по указанному структурному признаку рыбка начинала соответствовать слабо выраженной правше. Происходило это из-за сильного искажения пропорций частей индивидуальных нейронов – роста объема сомы левого нейрона почти на 40 % при сохранении практически на одном (соответствующем контролю) уровне размеров латеральных дендритов и почти двукратном уменьшении размера левого вентрального дендрита по сравнению с размером зеркального двойника.

В исследовании функционального состояния МН после аппликации агрегированного фрагмента $A\beta_{25-35}$ в сочетании с утомляющей оптокинетической стимуляцией было установлено, что КМА последовательно изменялся от 0.60 у интактной рыбки до 0.78 через 17 ч после аппликации бета-амилоида и до 0.25 после длительной контралатеральной оптокинетической стимуляции. Объемная реконструкция нейронов после упомянутого двойного воздействия выявляла весьма значительные изменения структуры МН и пропорций их частей (рис. 1, Д). Объем сомы левого нейрона уменьшался в шесть раз по сравнению с прежним, свойственным контролю, значением, объем его латерального дендри-

та уменьшался почти в 18 раз по сравнению с сохранившим прежние размеры правым дендритом. Объемы вентральных дендритов становились почти одинаковыми, но их значения, однако, оказались крайне небольшими – всего 6 и 8 тыс. $\mu\text{м}^3$ соответственно у левого и правого нейронов. Наиболее ярким и необычным структурным изменением структуры МН после сочетанного действия амилоида и естественной оптокинетической стимуляции оказалось формирование больших медиальных дендритов (в норме отсутствующих), которые отходили от сомы вблизи выхода вентрального дендрита. По своей величине данные медиальные дендриты были соизмеримы с вентральными дендритами МН контрольных особей и экспериментальных рыбок, не подвергнутых стимуляции. В целом соответственно структурной асимметрии рыбка сохраняла свой статус левши (КСА = 0.86), но это резко диссонировало с показателем моторной асимметрии (КМА), показывающим, что она реально стала ярко выраженной правшой.

Результаты исследования изменений функционального состояния МН и их структуры после аппликации агрегированного фрагмента $A\beta_{25-35}$ в сочетании с утомляющей билатеральной вестибулярной стимуляцией, активирующей в первую очередь статоакустические и (в определенной мере) зрительные афферентные входы к МН, позволили провести корреляционный анализ зависимости соответствующих показателей функции и структуры (рис. 2). Анализ морфометрических данных рыбок контрольной группы показал наличие корреляции функциональной асимметрии МН (КМА) с их структурной асимметрией (КСА); при этом значение коэффициента корреляции (КК) составляло 0.82 (значимость $F = 0.008$, $n = 12$) (А). Изменения функционального состояния МН и их структурных сдвигов, вызванных аппликацией агрегированного фрагмента $A\beta_{25-35}$, демонстрировали слабую связь (значение КК -0.37 , $F = 0.1$, $n = 21$) (Б).

Очевидный интерес представляло сравнение действия агрегированного бета-амилоида с прямой аминокислотной последовательностью, обеспечивающего яркие морфофункциональные эффекты, с действием его аналога с обратной последовательностью (35–25), считающегося нетоксичным. После аппликации неагрегированного фрагмента $A\beta_{35-25}$ корреляция функциональной асимметрии МН с их структурной асимметрией сохранялась (КК = 0.7, $F = 0.05$, $n = 7$; не иллюстрируется). У группы рыбок, которым апплицировали на МН агрегирован-



Р и с. 2. Корреляционные поля значений коэффициентов моторной асимметрии рыбок (ось абсцисс) и коэффициентов структурной асимметрии их маутнеровских нейронов (ось ординат) после аппликации дистиллированной воды (*A*, $n = 12$) и амилоида $A\beta_{25-35}$ (*B*, $n = 21$), сопровождаемых сенсорной оптокинетической стимуляцией.

Р и с. 2. Кореляційні поля значень коефіцієнтів моторної асиметрії рыбок (вісь абсцис) і коефіцієнтів структурної асиметрії їх маутнерівських нейронів (вісь ординат) після аплікації дистильованої води (*A*, $n = 12$) та амілоїду $A\beta_{25-35}$ (*B*, $n = 21$), які супроводжувалися сенсорною оптокінетичною стимуляцією.

ный фрагмент $A\beta_{35-25}$, отмечалось небольшое расхождение взаимосвязи функциональной и структурной асимметрии, гораздо более слабое, чем наблюдаемое после действия агрегированного бета-амилоида 25–35 ($KK = 0.50$, $F = 0.11$, $n = 12$).

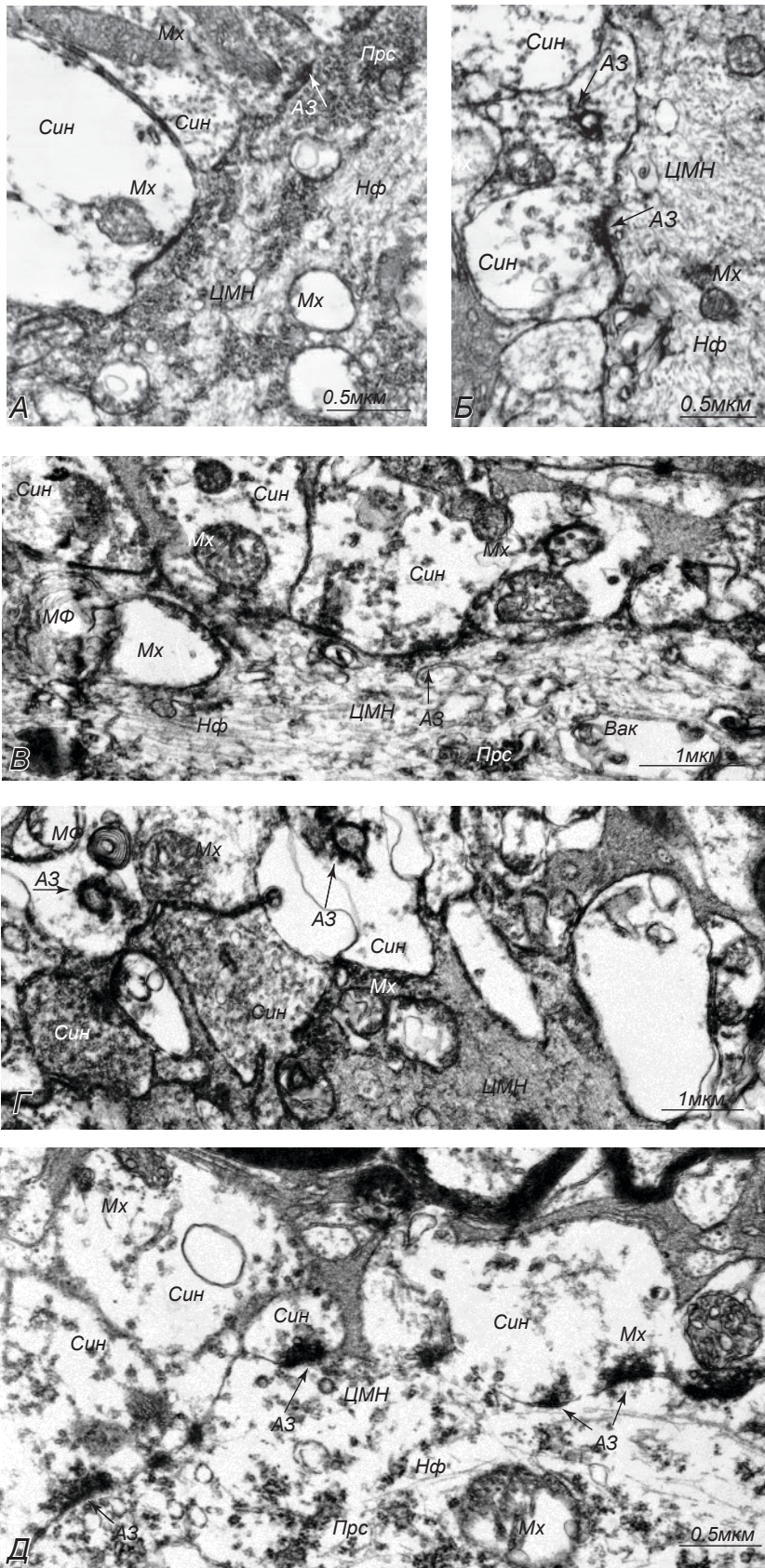
Эффекты аппликации агрегированных форм амилоида более наглядно проявлялись при изучении ультраструктуры МН подопытных рыбок.

Микроскопирование МН контрольных рыбок показало, что ультраструктурная организация этих клеток не проявляет видимых отличий от таковой нейронов интактных рыбок. Гладкая и ровная плазматическая мембрана сомы и дендритов образовывала с аксонными окончаниями многочисленные синаптические контакты химического типа, имею-

щие вид бутонов (рис. 3, *A*, *B*). Реже наблюдались электрические синаптические контакты с аксонными окончаниями булавовидного типа. В бутонах присутствовали в различных количествах (от одного до семи) профили митохондрий с нормальными морфологическими характеристиками. Многочисленные синаптические везикулы были более или менее диффузно рассредоточены в бутонах; часть везикул несколько концентрировалась у активных зон. Последние образовывались, как правило, плавными изгибами плазматической мембраны нейрона. На вентральном дендрите активные зоны находились на головках шипикоподобных выростов (узких выпячиваний цитоплазмы МН в бутон), и их плотность была выше, чем на соме (*B*). Такое структурное своеобразие связано, по-видимому, с многочисленностью тормозных синапсов, располагающихся на поверхности вентрального дендрита [7, 16, 17]. Эти синапсы относятся к гребешковому типу, т. е. имеют «шипикоподобную» организацию [18]. Постсинаптическая цитоплазма была пронизана филаментами цитоскелета. Протяженные нити и пучки соответствовали нейрофиламентам, а более тонкие короткие нити, очевидно, являлись актиновыми филаментами, которые вместе с нейрофиламентами отделяют большие участки скопления полисом. Микротрубочки в виде отдельно и редко расположенных недлинных фрагментов встречались редко. Присутствовали мелкие и средних размеров вакуоли и немногочисленные слегка набухшие митохондрии. Такой паттерн митохондрий, видимо, обусловлен особенностями фиксации гигантских клеток, каковыми являются МН. В дендритах нейрофиламенты были расположены по их ходу; митохондрии, как правило, находились в постсинаптических зонах. Полирибосомы присутствовали только в проксимальных отделах вентральных дендритов; в среднем и дистальном отделах дендрита их не наблюдалось.

На рис. 3, *B* представлена ультраструктура правого (доминантного) нейрона рыбки спустя 5 ч после аппликации дистиллированной воды. Результаты исследования другого «зеркально» расположенного нейрона показали, однако, что он имел аналогичное строение (не представлено). Можно констатировать, что и общая ультраструктура левого и правого нейронов, и структура их афферентных синапсов практически не демонстрировали различий.

В исследовании МН рыбки экспериментальной группы были выявлены ряд особенностей ультраструктуры соматических отделов и вентральных



Р и с. 3. Электронные микрофотографии компартментов маутнеровских нейронов (МН) золотой рыбки и афферентных синаптических окончаний на их мембране.

А и Б – сома (А) и проксимальный участок ventрального дендрита (Б) доминантного правого МН контрольной рыбки-левши после аппликации дистиллированной воды; *В* – сома меньшего по объему левого МН; *Г* – проксимальный участок ventрального дендрита правого МН рыбки-правши через 17 ч после аппликации агрегированного фрагмента $A\beta_{25-35}$. Синапсы содержат в себе мало везикул; плотность филаментов цитоскелета уменьшена. *Д* – дистрофические изменения в проксимальном участке ventрального дендрита левого МН рыбки-правши, инвертированной в левшу через 17 ч после аппликации $A\beta_{25-35}$ и последующей зрительной стимуляции. Разрушение цитоскелета, опустошение везикулярного аппарата синаптических бутонов. Каждый синаптический бутон окружен узким слоем межклеточного пространства, наполненного осmioфильным зернистым материалом – амилоидом. *АЗ* – активная зона (указана стрелкой), *Вак* – вакуоль, *Мх* – митохондрия, *МФ* – миелиновая фигура, *Нф* – нейрофиламенты, *Прс* – полирибосомы, *Син* – синаптическое окончание, *ЦМН* – цитоплазма маутнеровского нейрона.

Р и с. 3. Електронні мікрофотографії компартментів маутнерівських нейронів золотієї риби та аферентних синаптичних закінчень на їх мембрані.

дендритов этих клеток. Такие особенности появились после воздействия бета-амилоида в течение 17 ч (рис. 3, Г). Для обоих нейронов были характерны изменения их поверхности. Контур плазматической мембраны был менее гладким по сравнению с таковым в контроле, появлялись неровности и изгибы. У нейрона наблюдались выпячивания участков поверхности, проникающие в межсинаптические области. Из-за этого создавалось впечатление, что синаптические окончания довольно глубоко погружены в цитоплазму. Вокруг таких окончаний находились темные осмиофильные крупнозернистые межклеточные включения (согласно нашим прежним данным они, очевидно, представляют собой агрегаты $A\beta_{25-35}$ [6]). Для обоих нейронов было характерно запустевание афферентных синаптических окончаний. Опустевшие бутоны (пять-шесть на поле зрения) располагались кластерами, что было более выражено у синапсов левого нейрона. Кроме таких бутонов встречались окончания, в которых везикулы, агглютинируясь, образовывали группы, полностью заполняющие пространство бутона. Хорошо идентифицировались специализированные контактные структуры – активные зоны, десмосомоподобные и щелевые контакты. Небольшого размера митохондрии в синаптических окончаниях сохранялись, но в цитоплазме форма митохондриальных профилей не соответствовала норме. Такие профили имели перетяжки, становились гантелевидными, удлинялись. Крупные и среднего размера митохондрии выглядели набухшими, часть крист исчезали. В постсинаптических отделах встречались «миелиновые фигуры» (среднего размера и крупные). Становилась явно выраженной вакуолизация цитоплазмы. Сoma правого нейрона включала в себя большие локусы, заполненные полисомами. Нейрофиламенты как в соме, так и в вентральном дендрите были расположены достаточно плотно. В ядре хроматин распределялся неравномерно; более крупные глыбки находились у ядерной мембраны, меньшего размера – в толще ядра. В отличие от правого нейрона в ядре левого МН хроматин был однообразным и распределялся равномерно. В цитоплазме этого нейрона также наблюдалось значительное количество зон, содержащих в себе полисомы, однако разделяющие их филаменты располагались рыхло. В левом вентральном дендрите плотность элементов цитоскелета была более высокой, чем в соме (с хорошо выраженным продольно-поперечным эндоплазматическим ретикуломом).

Ряд изменений оказались в равной мере характерными для ультраструктуры обоих нейронов. Так, синапсы, полностью заполненные везикулами, встречались крайне редко. В основном окончания содержали в себе мало везикул; «пустые» синапсы располагались кластерами. Постсинаптическая цитоплазма выглядела еще более вакуолизированной. Митохондрии демонстрировали признаки повреждения, в них появлялись темные включения. В соматической части правого нейрона пространства, заполненные скоплениями полисом, как и в контроле, перемежались пучками нейрофиламентов. Расстояние между отдельными нитями в соме почти не отличалось от такового в контроле, однако уже в проксимальном отделе вентрального дендрита эти промежутки были более значительными, и цитоскелет выглядел более рыхлым. В левом нейроне весьма многочисленные области, заполненные полисомами, отделялись друг от друга, как правило, редкими одиночными нейрофиламентами. Тем не менее, филаменты в вентральном дендрите сохраняли плотную упаковку и продольную ориентацию относительно плазматической мембраны.

Оптокинетическая 10-часовая стимуляция рыбок, проведенная спустя 17 ч после аппликации $A\beta_{25-35}$, приводила к значительным изменениям морфологии и функции исследуемых нейронов. В левом МН таких рыбок наблюдались существенные изменения ультраструктуры (рис. 3, Д). Специализированные синаптические контакты идентифицировались не везде. Количество везикул в афферентных окончаниях было явно уменьшенным. В некоторых окончаниях везикулы сосредотачивались только у активных зон. Лишь по этому морфологическому признаку такое образование можно было считать синаптическим бутонем, настолько обеднялось его содержимое. Повсюду прослеживалась сильная вакуолизация цитоплазмы. Небольшие области, занятые конгломератами полисом, были отделены друг от друга редкими короткими одиночными нитями цитоскелета. Цитоплазма просветлялась из-за появления больших участков, где не наблюдалось ни одного из элементов цитоскелета МН (т. е. цитоплазма обводнялась). В соме и проксимальном отделе вентрального дендрита редкие недлинные нейрофиламенты располагались на значительном расстоянии друг от друга. В сердцевине дистального отдела вентрального дендрита нейрофиламенты шли параллельно; более длинные, чем в соме, они располагались ближе друг к другу и пересекались поперечно ориентированными цистернами

гладкого эндоплазматического ретикулула. Ближе к периферии, у аксонных окончаний, такой порядок нарушался, и короткие филаменты в постсинаптической области локализовались неупорядоченно. Результаты сравнения ультраструктурных изменений цитоскелета в нейронах после аппликации на них бета-амилоида через 5 и 17 ч показали, что цитоскелет разрыхляется вначале в соме и лишь затем – в проксимальном отделе вентрального дендрита. После аппликации и зрительной стимуляции (суммарная длительность воздействия составляла 27 ч) разрушение цитоскелета обнаруживалось повсеместно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы провели исследование ультраструктуры индивидуально идентифицированных центральных нейронов продолговатого мозга рыбки (МН) в условиях экспериментального амилоидоза, вызванного воздействием агрегатов амилоидного пептида (аппликации искусственной амилоидной бляшки). Как предполагалось ранее, дистрофический характер морфологических изменений МН и последующая неадекватность их функции обусловлены механическим влиянием жестких лент бета-амилоида, способных пережимать, сдавливать и деформировать нейроны в разных неконтролируемых локусах [6, 14]. На это указывали результаты объемной реконструкции нейронов, подвергнутых аппликационному воздействию бета-амилоида. Полученные данные свидетельствовали о нарушении закономерной корреляционной взаимосвязи моторной асимметрии рыбок со структурной асимметрией их МН, характерной для интактных и контрольных рыбок [19]. Очевидно, что эффект аппликации амилоида в условиях нашей модели проявляется как нарушение соответствия моторной асимметрии рыбки и структурной асимметрии ее МН, обусловленное механическим структурным повреждением нейронов и отростков жесткими лентами амилоидного белка (как и предполагалось ранее [4]).

Такая патология МН, сопровождаемая определенными функциональными сдвигами, находит отражение и в ультраструктурных сдвигах. В МН прослеживаются ряд неспецифических реакций, которые характерны для нейронов, находящихся в условиях химического или естественного стимулирующего воздействия. Это изменение контуров клеточной поверхности, появление миелиноподобных

фигур, вакуолизация цитоплазмы, патологические изменения митохондрий [20]. Однако специфическим для ранних сроков амилоидоза, на наш взгляд, является сочетание двух процессов – редукции числа везикул в синаптических окончаниях и прогрессирующего разрушения цитоскелета. Опустошение везикулярного аппарата синапсов происходит достаточно быстро и затрагивает афферентный синаптический аппарат обоих нейронов. Такой эффект $A\beta_{25-35}$ подобен результатам действия на МН колхицина, прерывающего аксонный транспорт [21]. С другой стороны, запустевание афферентных аксонных окончаний является следствием длительной стимуляции, приводящей к истощению нейронов и синапсов [20]. Стимуляция сама по себе обуславливает уплотнение цитоскелета вентрального дендрита доминирующего нейрона [7]. При амилоидозе, однако, наблюдается противоположный эффект – цитоскелет разрушается, причем в первую очередь у нейрона, который функционально определяется как доминантный, но имеет существенно меньший объем, чем другой парный нейрон. С учетом этих данных можно предположить, что усиленное функционирование такого нейрона может быть связано с его непрерывным раздражением амилоидными фибриллами, окружающими и сдавливающими отростки и соматические части нейронов. Указания на весьма большую жесткость таких фибрилл [22] делают предположение о высокой травматичности их воздействия достаточно вероятным. Важно отметить, что использование дополнительной физиологической нагрузки на МН позволило отчетливее выявить «слабое звено» нейрона в условиях амилоидоза – цитоскелет. Очевидно, что именно деструкция цитоскелета является основной причиной дистрофии вентрального дендрита и других частей МН при амилоидозе. Возможно, те структурные патологические сдвиги в нейронах коры головного мозга, их дендритах и шипиковом аппарате, которые выявляются в условиях болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний, а также в соответствующих моделях [3, 4], могут проявляться на ранних стадиях развития амилоидоза мозга, задолго до наступления массовой гибели нейронов, и обусловлены они, прежде всего, именно изменениями цитоскелета. На цитоскелет как на существенную мишень указывают также наши недавние данные о влияниях на МН дофамина и адаптации к повторным стимуляциям. Оказалось, что воздействия дофамина и адаптации, индуцирующие полимеризацию нейронного актина, не только нор-

мализуют морфофункциональное состояние МН в условиях утомляющей стимуляции, но и защищают структуру и функцию МН как в случае изолированного действия амилоида, так и после проводимой на этом фоне последующей утомляющей стимуляции [14].

Таким образом, впервые становится очевидным, что именно воздействие агрегированных фрагментов амилоида нарушает связь между структурой и функцией нейронов. Указанный фактор является основным в эффектах агрегированных фрагментов $A\beta_{25-35}$ на клеточном уровне. Эти данные согласуются с результатами исследований других авторов [23]. Было обнаружено, что агрегация фрагмента $A\beta_{25-35}$ является критически важным процессом, обуславливающим его токсический и метаболический эффекты. Как было показано, именно фибриллярные, а не глобулярные формы бета-амилоидного фрагмента 25–35 усиливают метаболические процессы в астроцитах и нарушают взаимодействия «нейрон–астроцит».

Авторы настоящей статьи – Н. А. Коканова, Г. З. Михайлова, Р. Ш. Штанчаев, Е. Н. Безгина, Н. Р. Тирас и Д. А. Мошков – подтверждают, что у них отсутствует конфликт интересов.

Н. А. Коканова¹, Г. З. Михайлова¹, Р. Ш. Штанчаев¹,
Е. Н. Безгина¹, Н. Р. Тирас¹, Д. А. Мошков¹

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ НАСЛІДКИ АПЛІКАЦІЇ БЕТА-АМІЛОЇДУ НА МАУТНЕРІВСЬКІ НЕЙРОНИ ЗОЛОТОЇ РИБКИ

¹ФДБУН Інститут теоретичної та експериментальної біофізики РАН, Пушино, Моск. обл. (РФ).

Резюме

Вивчали кореляцію функціональної активності і тривимірної структури маутнерівських нейронів (МН) золотої рибки в нормі, після ізольованої аплікації агрегованого фрагмента бета-амілоїду 25–35 ($A\beta_{25-35}$) і поєднання такої аплікації з оптокінетичною стимуляцією. Показано, що наявний у контролі виражений корелятивний зв'язок структури та функції МН значно порушується після дії агрегатів бета-амілоїду. Основним механізмом такого ефекту $A\beta_{25-35}$ згідно з даними наступного ультраструктурного аналізу, є деструкція цитоскелета, вакуолізація цитоплазми МН і запустіння везикулярного апарату аферентних синапсів. Стомлююча сенсорна оптокінетична стимуляція рибок на тлі дії $A\beta_{25-35}$ зумовлює дистрофію вентральних дендритів МН і формування поряд з ними раніше відсутніх гіпертрофованих медіальних дендритів, співмірних за величиною з основними

дендритами МН у контрольних рибок. Отримані дані дозволяють припустити, що механічний вплив агрегатів бета-амілоїду на нейрони та їх відростки є важливим фактором у розвитку нейродегенеративних захворювань, пов'язаних із амілоїдозом, і деструкція цитоскелета може бути одним із ключових феноменів у цьому аспекті.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. С. Преображенская, Н. Н. Яхно, “Возрастная когнитивная дисфункция: диагностика и лечение”, *Журн. неврологии и психиатрии*, **106**, № 11, 33-38 (2006).
2. M. P. Mattson, “Pathways towards and away from Alzheimer’s disease,” *Nature*, **430**, 631-639 (2004).
3. J. I. Luebke, C. M. Weaver, A. B. Rocher, et al., “Dendritic vulnerability in neurodegenerative disease: insights from analyses of cortical pyramidal neurons in transgenic mouse models,” *Brain Struct. Funct.*, **214**, 181-199 (2010).
4. R. B. Knowles, C. Wyart, S. V. Buldyrev, et al., “Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer’s disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5274-5279 (1999).
5. H. Korn and D. S. Faber, “The Mauthner cell half a century later: a neurobiological model for decision-making?” *Neuron*, **40**, No. 1, 13-28 (2005).
6. Н. А. Коканова, Г. З. Михайлова, Р. Ш. Штанчаев и др., “Морфофункциональные изменения в маутнеровских нейронах золотой рыбки после аппликации бета-амилоида”, *Морфология*, **136**, № 6, 72-77 (2009).
7. И. Б. Михеева, Н. Ю. Цаплина, Е. Е. Григорьева и др., “Ультраструктура маутнеровских нейронов при оптокинетиической стимуляции и энуклеации глаза”, *Морфология*, **139**, № 3, 30-35 (2011).
8. Г. З. Михайлова, А. В. Арутюнян, И. М. Санталова и др., “Асимметрия моторного поведения золотой рыбки в узком канале”, *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **37**, № 1, 52-60 (2005).
9. Г. З. Михайлова, В. Д. Павлик, Н. Р. Тирас, Д. А. Мошков, “Корреляция размеров Маутнеровских нейронов с предпочтением золотых рыбок поворачиваться вправо или влево”, *Морфология*, **127**, № 2, 16-19 (2005).
10. Н. Р. Тирас, Д. А. Мошков, “Поведенческое и ультраструктурное исследование влияния аппликации колхицина на маутнеровские нейроны золотой рыбки *Carassius auratus*”, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **14**, № 5, 486-491 (1978).
11. S. G. Kolaeva, T. P. Semenova, I. M. Santalova, et al., “Effects of L-thyrosyl-L-arginine (kyotorphin) on the behavior of rats and goldfish,” *Peptides*, **21**, No. 9, 1331-1336 (2000).
12. Р. Ш. Штанчаев, Г. З. Михайлова, Н. Ю. Дектярева и др., “Влияние оптокинетиической стимуляции на моторную асимметрию у золотой рыбки”, *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **39**, № 2, 133-145 (2007).
13. Г. З. Михайлова, Н. А. Коканова, Н. Р. Тирас, Д. А. Мошков, *Трехмерная реконструкция и определение объема нейрона*, Книж. дом «ЛИБРОКОМ», Москва (2012).
14. Н. А. Коканова, Г. З. Михайлова, Р. Ш. Штанчаев и др., “Индукция морфологической устойчивости нейронов к бета-амилоиду”, *Морфология*, **141**, № 1, 23-28 (2012).
15. Е. Е. Григорьева, Р. Ш. Штанчаев, Г. З. Михайлова и

- др., “Изменения моторной асимметрии золотых рыбок и структуры их маутнеровских нейронов после энуклеации глаза”, *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **24**, № 3, 225-237 (2010).
16. И. Б. Михеева, Е. Е. Григорьева, Г. З. Михайлова и др., “Серотонинергические синапсы на вентральном дендрите маутнеровского нейрона (ультраструктурное исследование с использованием иммунозолотой метки)”, *Морфология*, **143**, № 1, 11-15 (2013).
 17. D. A. Moshkov, R. S. Shtanchaev, I. M. Mikheeva, et al., “Visual input controls the functional activity of goldfish Mauthner neuron through the reciprocal synaptic mechanism,” *J. Integrat. Neurosci.*, **12**, No. 1, 17-33 (2013).
 18. T. Seitanidou, A. Triller, and H. Korn, “Distribution of glycine receptors on the membrane of a central neuron: an immunoelectron microscopy study,” *J. Neurosci.*, **8**, No. 11, 4319-4333 (1988).
 19. D. A. Moshkov, G. Z. Mikhailova, E. E. Grigorieva, and R. S. Shtanchaev, “Role of different dendrites in the functional activity of the central neuron controlling goldfish behavior,” *J. Integrat. Neurosci.*, **8**, No. 4, 441-451 (2009).
 20. Д. А. Мошков, *Адаптация и ультраструктура нейрона*, Наука, Москва (1985).
 21. Н. Р. Тирас, Д. А. Мошков, “Поведенческое и ультраструктурное исследование влияния аппликации колхицина на маутнеровские нейроны золотой рыбки *Carassius auratus*”, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **14**, № 5, 486-491 (1978).
 22. A. W. Fitzpatrick, S. T. Park, and A. H. Zewail, “Exceptional rigidity and biomechanics of amyloid revealed by 4D electron microscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, No. 27, 10976-10981 (2013).
 23. I. Allaman, M. Gavillet, M. Bélanger, et al., “Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability,” *J. Neurosci.*, **30**, No. 9, 3326-3338 (2010).