

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИППОКАМПАЛЬНОМ НЕЙРОГЕНЕЗЕ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ РАСТВОРИМЫМИ ФОРМАМИ ОЛИГОМЕРОВ Аβ₁₋₄₂

Ю.К. Комлева^{1,2*}, О.Л. Лопатина^{1,2}, Я.В. Горина^{1,2}, А.И. Черных², А.Н. Шуваев², А.Б. Салмина^{1,2}

¹Кафедра биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; эл. почта: yuliakomleva@mail.ru

²НИИ молекулярной медицины и патофизиологии, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск

Болезнь Альцгеймера характеризуется потерей нейронов, накоплением внутриклеточных нейрофибриллярных клубков и внеклеточных амилоидных бляшек в головном мозге. Вместе с тем остаются противоречивыми данные о различиях в нейрогенезе в начале заболевания или до начала образования амилоидных бляшек. Поскольку растёт осознание важности предсимптомной фазы при нейродегенеративных заболеваниях в контексте ранней диагностики и патогенеза, нами были проанализированы критические периоды взрослого гиппокампального нейрогенеза на ранней стадии при действии растворимых форм Аβ₁₋₄₂. В эксперименте с использованием инъекционной модели болезни Альцгеймера на мышах с введением растворимых олигомеров Аβ были оценены пролиферация, миграция и выживаемость клеток нейрональной природы. Установлено, что инъекция растворимых олигомеров Аβ вызывает снижение пролиферации клеток в гиппокампе мышей. Несмотря на сохранение пула нейробластов у животных, получавших Аβ нарушен процесс радиальной миграции, а также отмечается увеличение апоптоза в нейрогенной нише. Таким образом, результаты данного исследования указывают на то, что введение Аβ вызывает нарушение критических стадий нейрогенеза: прогениторной, нейробластной стадии миграции, стадии интеграции незрелых нейронов и выживаемости нейронов. Полученные результаты указывают на снижение скорости пролиферации в субгранулярной зоне, которое сопровождается эктопической дифференцировкой и нарушенной миграцией, продуцируя, по-видимому, аномальные нейроны, которые имеют более низкие уровни выживаемости, что в конечном итоге может приводить к уменьшению зрелых нейронов и числа клеток в гранулярном слое зубчатой извилины.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; нейрогенез; субгранулярная зона; миграция клеток; апоптоз; стволовые клетки

DOI: 10.18097/PBMC20186404326

ВВЕДЕНИЕ

Немногие проблемы в современной медицине вызвали столько же научных интересов и общественного беспокойства, как болезнь Альцгеймера (БА). Практически неизвестная широкой публике четыре десятилетия назад, БА распространилась на 40 миллионов пациентов во всем мире. Истинное число должно быть намного выше, учитывая данные, что болезнь начинается в мозге не менее чем за 2-3 десятилетия до начала клинических проявлений. Поскольку молекулярные исследования БА начались всерьез в начале 1980-х годов, тысячи учёных и специалистов в области медицины углубились во все аспекты этого сложного многофакторного синдрома. Вместе с тем становится всё более актуальным изучение изменений, происходящих в головном мозге ещё до начала клинических проявлений, что, в конечном итоге, позволит диагностировать патологию на ранней стадии [1].

Болезнь Альцгеймера является нейродегенеративным расстройством, обусловленным обширной потерей нейронов и накоплением внутриклеточных нейрофибриллярных клубков и внеклеточных амилоидных бляшек в головном мозге. Генетические, биохимические и невропатологические данные свидетельствуют о том, что агрегация Аβ является

центральной для инициирования патогенеза БА. Однако многие изменения, характерные для БА, начинаются ещё задолго до образования нерастворимых амилоидных бляшек. Клиническая стадия БА сопровождается потерей синапсов, снижением нейротрансмиссии, селективной гибелью нейронов и нейровоспалением [2].

В контексте доминирующей в настоящее время амилоидной гипотезы патогенеза БА именно Аβ играет центральную роль в развитии БА, способствуя окислительному стрессу, синаптической/нейронной дисфункции, нарушению процессов нейрогенеза и, как следствие, нейродегенерации. Результаты недавних исследований также подчеркнули роль олигомеров Аβ в синаптических нарушениях [3].

В контексте исследования БА активно изучается взрослый гиппокампальный нейрогенез; это связано с тем, что изменения в нейрогенезе могут способствовать прогрессированию когнитивной дисфункции при деменции, а стимуляция нейрогенеза в гиппокампе может противодействовать этому процессу [4]. В гиппокампе взрослых грызунов и человека новые нейроны генерируются и интегрируются в цепи гиппокампа из так называемых нейрональных стволовых клеток (НСК) и нейрональных прогениторных клеток (НПК), которые находятся

в слое субгранулярных клеток зубчатой извилины гиппокампа. Важно отметить, что нейрогенез гиппокампа имеет важное значение в процессе обучения и формирования памяти [5].

Исследования нейрогенеза при БА и на животных моделях БА дали неоднозначные результаты [6]. Тем не менее, подавляющее большинство исследований сообщают о снижении нейрогенеза в моделях мышей с БА, часто коррелирующем с формированием патологических бляшек Аβ. Например, взрослый гиппокампальный нейрогенез снижается у трансгенных мышей, экспрессирующих белок-предшественник Аβ (APP) человека (Swedish мутация). На мышинных моделях с экспрессией APP и мутантным геном PS1 также наблюдали снижение уровня нейрогенеза [7]. Повышение нейрогенеза обнаружено у мышей с прогрессирующим нарушением памяти и усилением отложения амилоидных бляшек [8]. Напротив, в модели болезни Альцгеймера, экспрессирующей мутантный APP (мутации Swedish и Indiana), было обнаружено увеличение нейрогенеза [9]. У пациентов с БА число клеток, экспрессирующих маркеры молодых незрелых нейронов, было увеличено по сравнению с контролируемыми по возрасту здоровыми людьми [10]. Описанные различия могут быть обусловлены разными генотипами модельных мышей с БА, разными методами, используемыми для изучения нейрогенеза на разных стадиях прогрессирования заболевания. Однако мало известно о различиях в нейрогенезе в начале заболевания или до начала образования амилоидных бляшек.

Поскольку растёт осознание важности предсимптомной фазы при нейродегенеративных заболеваниях в контексте ранней диагностики и патогенеза, мы проанализировали критические периоды взрослого гиппокампального нейрогенеза на ранней стадии при действии растворимых форм Аβ₁₋₄₂.

МЕТОДИКА

Животные

В эксперименте использованы мыши-самцы линии CD1 в возрасте 4 месяцев (n=14), весом 25-30 г. Все исследования проведены в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС) и с разрешения биоэтической комиссии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Мышей содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму при регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь.

Стереотаксическая хирургия

Анестезию осуществляли инъекцией хлоралгидрата внутривентриально (400 мг/кг) и ксилазина (10 мг/кг) внутримышечно. После достижения необходимого уровня анестезии проводили оперативный доступ и инъекцию бета-амилоида, как это описано ранее [11]. Аβ₁₋₄₂ ("Sigma-Aldrich", США) растворяли в стерильном 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS) (pH 7,4) и готовили раствор в концентрации 50 мкМ.

Для получения растворимых олигомеров бета-амилоида Аβ₁₋₄₂ агрегировали путём инкубации при 37°C в течение 7 дней перед введением. Полученные олигомеры Аβ₁₋₄₂ вводили с помощью микрошприца "Hamilton" (Швейцария) интрагиппокампально в СА1 зону по стереотаксическим координатам с двух сторон. Для введения бета-амилоида мыши операцию проводили в стереотаксической рамке ("Neurostar", Германия). Животным опытной группы вводили 1 мкл Аβ₁₋₄₂, животным контрольной группы инъецировали 1 мкл PBS для исключения влияния стресса операции.

Введение BrdU

Для изучения радиальной миграции нейробластов в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа мышам экспериментальной и контрольной групп внутривентриально вводили BrdU ("Sigma", США). Чтобы идентифицировать мигрирующие нейробласты в субгранулярной зоне и степень их миграции в гранулярный слой, BrdU (50 мг/кг, внутривентриально) вводили два раза в день в течение 3 последовательных дней, начиная с 4-го дня после инъекции Аβ или PBS [12]. Эвтаназию животных проводили три дня спустя (то есть через 9 дней после введения Аβ).

Подготовка тканей для анализа

Животным, глубоко анестезированным с помощью хлоралгидрата (500 мг/кг), вводили транскардиально через восходящую аорту 20 мл PBS, а затем 20 мл фиксирующего раствора 4% параформальдегида ("Sigma"), приготовленного в 0,1 М PBS. Мозг извлекали и фиксировали в том же фиксирующем растворе в течение ночи при 4°C и затем помещали на 48 ч при 4°C в 20% сахарозу, растворённую в PBS (pH 7,4), содержащем 0,01% азид натрия ("Sigma"). Срезы изготавливали толщиной 50 мкм с помощью вибратора "Thermo Scientific", США).

Иммуногистохимия

Иммуногистохимическое окрашивание проводили методом свободно плавающих срезов. Такие срезы блокировали в PBS, содержащем 10% нормальную козью сыворотку, 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,2% Triton X-100 и 0,1% азид натрия (все "Sigma") в течение 1 ч при комнатной температуре. В случае иммуногистохимии с BrdU срезы головного мозга были предварительно обработаны 2 М HCl для обнаружения эпитопа BrdU, инкорпорированного в ДНК пролиферирующих клеток. Для оценки экспрессии BrdU и NeuN срезы инкубировали в течение ночи в растворе первичных антител 1:1000 с антителами против BrdU ("Abcam" (Великобритания), ab6326, rat) и анти-NeuN антителами ("Merck Millipore" (США), MAB377, mouse); для определения количества пролиферирующих клеток использовали раствор первичных антител 1:1000, содержащий анти-Ki67 ("Spring Bioscience Corp." (США), M3062, rabbit) и анти NeuN антитела ("Merck Millipore", MAB377, mouse). Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i (Япония).

Подсчёт колокализации экспрессии маркеров

В срезах головного мозга определяли процент колокализации BrdU и NeuN в клетках субгранулярного и гранулярного слоёв зубчатой извилины гиппокампа. Оценивали семь полей зрения. Был определён коэффициент корреляции Пирсона, отражающий средние интенсивности каналов каждого маркера. Его значения варьируют от -1,0 до 1,0, где 1 указывает на полное перекрытие, а -1,0 свидетельствует о полной отрицательной корреляции [13].

Оценка апоптоза методом TUNEL

Метод основан на выявлении апоптотических клеток по характерным разрывам ДНК. При этом на 3'-ОН концы с помощью фермента помещаются искусственно созданные нуклеотиды. Процедура выполнялась также на свободно плавающих срезах головного мозга. Регистрация апоптоза осуществлялась с помощью метода TUNEL и набора In situ Direct DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit ("Abcam") в соответствии со стандартным протоколом производителя. Срезы инкубировали с компонентами реакционной смеси, включающей TdT и FITC-меченые нуклеотиды. Детекцию ядерного материала осуществляли контрастированием пропидия йодидом (ПЙ). При микроскопии регистрировали участки специфической межнуклеосомной фрагментации ДНК, соответствующие местам включения меченых нуклеотидов в цепочку ДНК. В срезах головного мозга было подсчитано количество FITC- и ПЙ-позитивных клеток в гранулярном и субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа. Изображения оценивали по пяти полям зрения.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики с использованием программы GraphPad Prism6 ("GraphPad Software", США). В пределах каждой выборки определяли среднее арифметическое и ошибку среднего. Сравнение средних осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инъекция растворимых олигомеров $A\beta$ вызывает снижение пролиферации клеток в гиппокампе мышей

Иммунореактивное окрашивание против Ki67 маркирует клетки во всех фазах митоза, кроме фазы G_0 , то есть данный маркер окрашивает только пролиферирующие клетки и не окрашивает те, которые находятся в состоянии покоя. Мы использовали данный маркер для идентификации делящихся клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины. В субгранулярной зоне (СГЗ) экспрессия Ki67-позитивных клеток статистически значимо снизилась ($2,3 \pm 0,9$) после введения $A\beta$ по сравнению с группой контроля ($7,2 \pm 1,7$) ($p = 0,0256$) (рис. 1А,Б).

Нарушения радиальной миграции клеток из-за действия растворимых олигомеров $A\beta$

Эффект инъекции $A\beta$ на дифференцировку клеток нейрональной природы изучали методом иммуногистохимии после трёхдневной инъекции BrdU (50 мг/кг) дважды в день (рис. 2).

Мы исследовали количество вновь образованных клеток в субгранулярном слое и характер их миграции. Мыши были выведены из эксперимента с соблюдением принципов гуманности на третий день после последней инъекции BrdU, то есть на шестой день после первой инъекции BrdU. Поскольку хорошо известно, что миграция во взрослом мозге в гиппокампе проходит в два этапа. Сначала клетки радиальной глии дают рост промежуточным прогениторным клеткам. Этот первый этап происходит в течение трёх дней. На следующий (четвёртый) день клетки становятся пролиферирующими нейробластами и начинается процесс радиальной миграции. Через 6-7 дней вновь образованные нейроны развиваются до зрелых нейронов, экспрессирующих NeuN. Эту двухступенчатую модель миграции мы использовали для оценки результатов миграции клеток [14].

Мы обнаружили, что инъекция $A\beta$ олигомеров в гиппокамп мышей не приводит к изменению общего количества клеток в субгранулярной зоне и гранулярном слое, экспрессирующих BrdU, по сравнению с группой контроля (рис. 3А,Б). Вместе с тем, следует отметить, что у контрольной группы животных образовавшиеся новые клетки за исследуемый период мигрировали в гранулярный слой зубчатой извилины и уже колокализуются с маркером зрелых нейронов NeuN. Это подтверждается преимущественным положением BrdU+ клеток в гранулярном слое и высоким коэффициентом корреляции Пирсона (BrdU и NeuN) у контрольной группы мышей ($0,79 \pm 0,04$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($0,15 \pm 0,03$) ($p < 0,0001$) (рис. 3В).

Таким образом, у животных с инъекцией $A\beta$, несмотря на сохранение пула нейробластов, нарушен процесс радиальной миграции и, по всей видимости, созревания нейронов.

Влияние инъекции растворимых олигомеров $A\beta$ на апоптоз в нейрогенной нише

В связи с выявленным снижением уровня пролиферации в СГЗ, нарушенной миграцией, по-видимому, образовавшиеся клетки могут иметь более низкие уровни выживаемости, поэтому проводили определение уровня апоптоза у исследуемых групп.

Нами был изучен апоптоз в ткани головного мозга у ложно-оперированных животных и у животных с инъекцией бета-амилоида. Результаты представлены как процент апоптотических клеток в общей популяции клеток в ткани.

При моделировании болезни Альцгеймера было отмечено значимое увеличение ($p < 0,05$) апоптоза в зубчатой извилине гиппокампа ($14,24 \pm 0,65(\%)$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($6,93 \pm 0,27(\%)$) ($p < 0,0001$) (рис. 4А,Б).

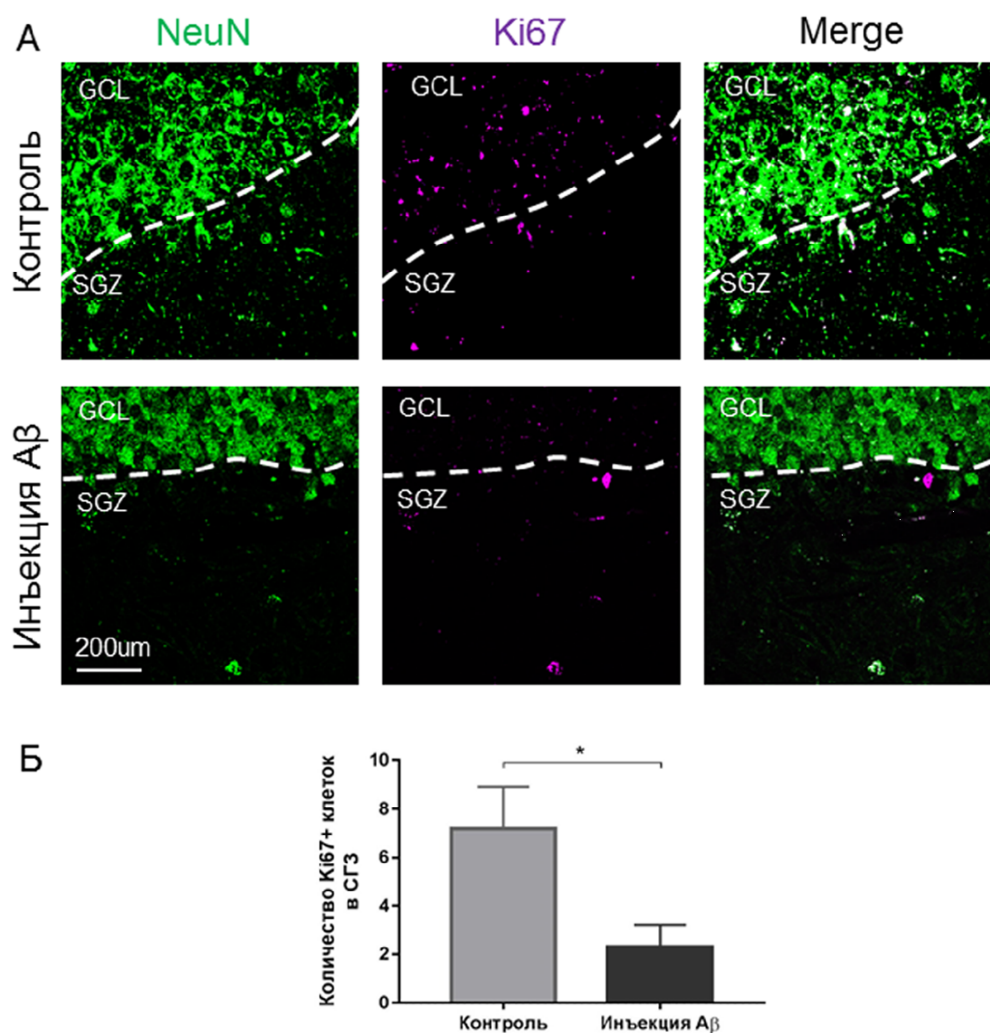


Рисунок 1. А - Экспрессия Ki67 и NeuN в зубчатой извилине гиппокампа головного мозга контрольных животных и мышей после инъекции Aβ. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке экспрессия NeuN+клеток (зелёный), во второй колонке - Ki67+клеток (фиолетовый), в третьей колонке представлено наложение сигналов (Merge). Сокращения: GCL - гранулярный слой, SGZ - субгранулярная зона. Ядра не представлены на рисунке. Б - Количество Ki67+ клеток в субгранулярной зоне (SGZ) зубчатой извилины гиппокампа; * p<0,05.

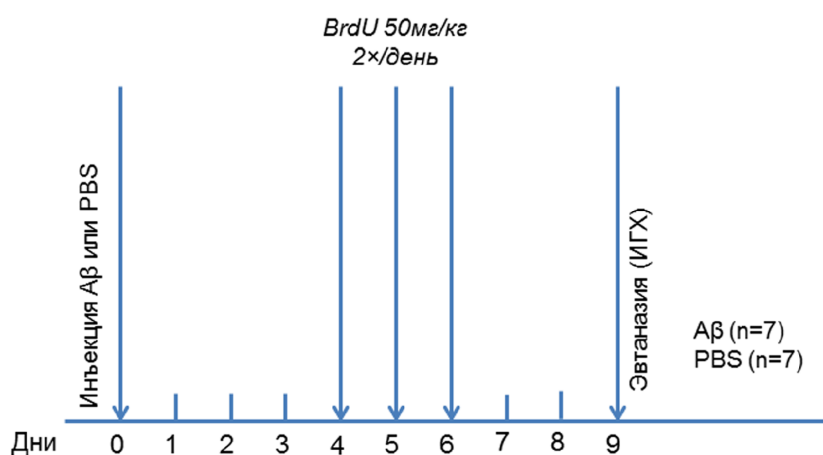


Рисунок 2. Дизайн эксперимента. На рисунке представлена временная шкала хода эксперимента. На 0-й день эксперимента мыши были прооперированы с введением Aβ (экспериментальная группа) или PBS (контрольная группа). Для идентификации мигрирующих клеток животным вводили BrdU (50 мг/кг, внутривенно) два раза в день в течение 3 последовательных дней, начиная с 4-го дня после инъекции бета-амилоида или PBS. Эвтаназию животных проводили три дня спустя, то есть на 9 день после операции. Головной мозг исследовали методом иммуногистохимии для идентификации искомым маркеров.

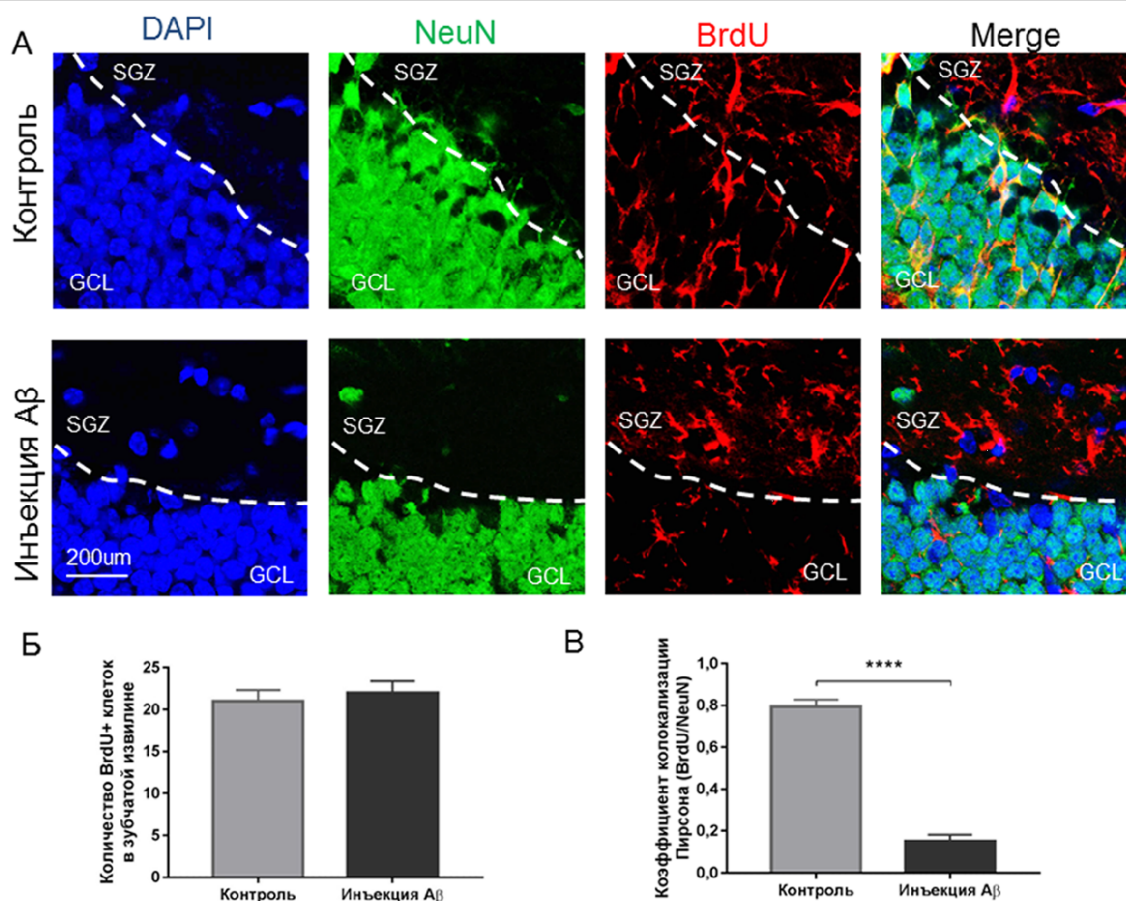


Рисунок 3. А - Экспрессия BrdU и NeuN в зубчатой извилине гиппокампа головного мозга контрольных животных и мышей после инъекции $A\beta$. Тройное иммунофлюоресцентное окрашивание: в первой колонке окрашены ядра клеток (DAPI - голубой), во второй колонке - экспрессия NeuN+клеток (зелёный), в третьей колонке - BrdU+клетки (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). Сокращения: GCL - гранулярный слой, SGZ - субгранулярная зона. Б - Количество BrdU+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. В - Коэффициент колокализации Пирсона (BrdU+/NeuN), **** p<0,0001.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы проводится много исследований, посвященных изучению изменений нейрогенеза при БА с использованием различных моделей этой патологии. Результаты многих исследований свидетельствуют об изменении нейрогенеза при БА, при этом значительная часть работ показывает, что отложение $A\beta$ отрицательно влияет на стволовые клетки [15], хотя противоположные данные также существуют [9, 16, 17].

Согласно полученным нами данным, в СГЗ зубчатой извилины гиппокампа происходит снижение количества пролиферирующих клеток, которое мы определили по снижению уровня маркера Ki67. Такое снижение может быть показателем сокращения стволовых клеток в нейрогенной нише и, как следствие, сокращения регенеративного потенциала. Исследования Naughey и соавт. [16] выявили корреляцию между развитием отложений $A\beta$ и подавлением пролиферации нейрональных прогениторных клеток. Однако, по данным других авторов, подавление пролиферации происходит на стадиях, предшествующих отложению $A\beta$, когда растворимые олигомеры $A\beta$ уже обнаруживаются

в головном мозге [17]. Кроме того, наблюдается устойчивая корреляция между уровнями растворимого $A\beta$ и степенью синаптической потери и тяжести когнитивных нарушений. Эти клинические данные подтверждаются и доклиническими исследованиями, демонстрирующими, что когнитивные функции, по-видимому, ухудшаются именно из-за растворимых олигомерных $A\beta$, а не отложений $A\beta$ [18]. В линии трансгенных мышей Tg2576, которая сверхэкспрессирует мутантную форму человеческого APP (изоформа 695) со шведской мутацией, растворимые олигомерные $A\beta_{1-42}$ формы могут быть обнаружены по меньшей мере за 3 месяца до отложения нерастворимого $A\beta$ (в возрасте 9 месяцев) [18]. На этой стадии до отложения $A\beta$ скорость пролиферации нейрональных прогениторных клеток в зубчатой извилине была уже уменьшена, как это было на более поздних стадиях, когда стали появляться отложения $A\beta$ [19]. Аналогичным образом, у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный APP человека как с шведской, так и с лондонской мутациями, было обнаружено снижение пролиферации клеток и нейробластов в СГЗ, зафиксированное также в возрасте 3 месяцев, когда наблюдались отложения $A\beta$ в лобной коре, но не в гиппокампе [20].

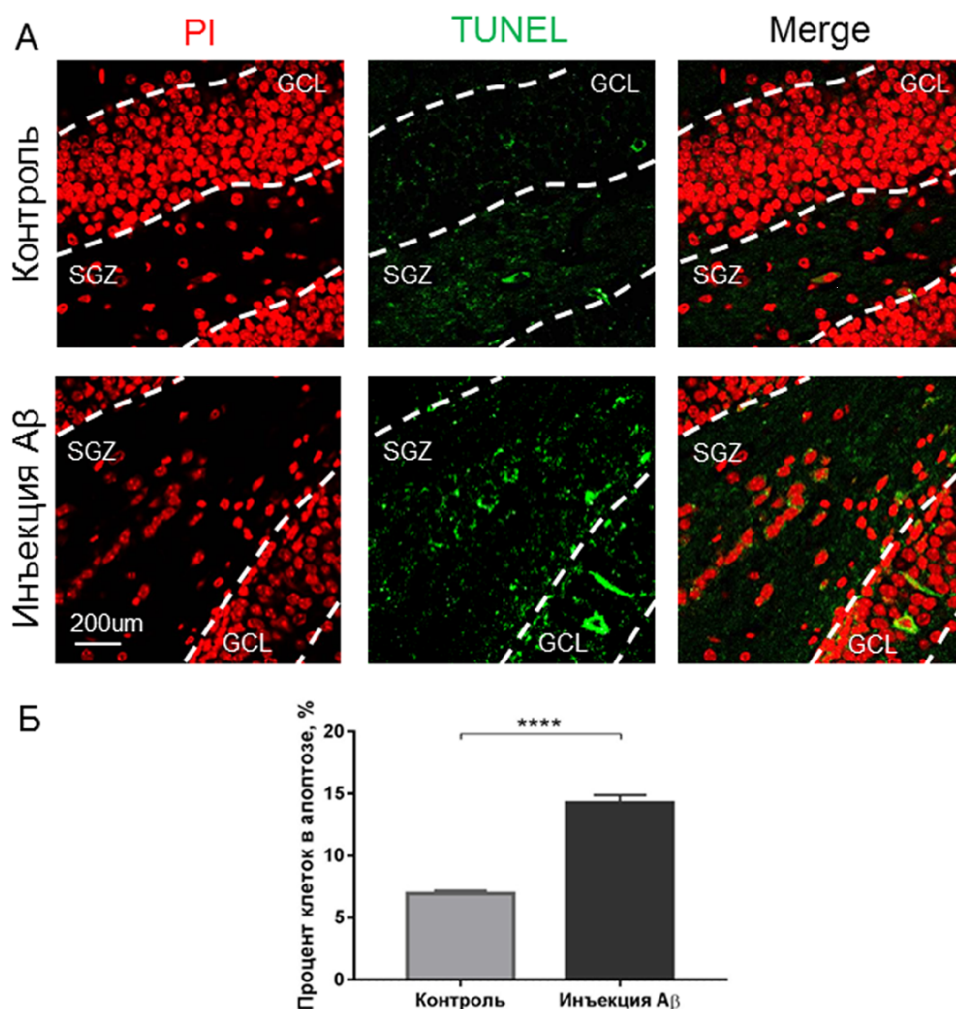


Рисунок 4. А - Результаты PI/TUNEL исследования апоптоза в зубчатой извилине гиппокампа головного мозга контрольных животных и мышей после инъекции бета-амилоида Аβ. В первой колонке представлены изображения ядер клеток - PI (красный), во второй колонке - апоптотические тельца (TUNEL - зелёный), в третьей колонке - наложение сигналов (Merge). Сокращения: GCL - гранулярный слой, SGZ - субгранулярная зона. Б - Апоптоз был определен как процент числа TUNEL+ клеток к общему числу клеток в поле зрения. **** $p < 0,0001$.

Согласно другой точке зрения, пролиферация нейрональных стволовых/прогениторных клеток и нейрогенез в целом усиливаются в присутствии Аβ. При посмертном исследовании мозга пациентов с БА было обнаружено увеличение нейрогенеза в гиппокампе. Экспрессия маркеров ранних этапов нейрогенеза (нейробласты – TUC-4 и DCX) была увеличена в SGZ, а также в гранулярной зоне гиппокампа [9]. Дальнейшие исследования с использованием трансгенных моделей на мышах подтвердили эти результаты и продемонстрировали значительно большее количество BrdU-иммуноположительных клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины трёхмесячных мышей, а также у годовалых трансгенных мышей.

Аналогичные результаты усиленного нейрогенеза были получены в исследованиях *in vitro* с культивируемыми НСК из стриатума и гиппокампа крысы и мыши [21]. Клетки обрабатывали различными концентрациями Аβ пептида в разные моменты времени. Наблюдалось в среднем трёхкратное увеличение числа нейронов. Однако

было отмечено, что увеличение было временным и зависимым от дозы. Кроме того, скорость распространения пролиферирующих НСК в культуре оставалась неизменной, что свидетельствует о том, что Аβ действует на нейрональные предшественники, а не на нейрональные стволовые клетки. Эти результаты показывают, что отложение Аβ может заставить нейрональные стволовые/прогениторные клетки дифференцировать, а не пролиферировать, что в конечном итоге может истощать пул стволовых клеток [22].

Таким образом, с учётом данных литературы, наши результаты могут свидетельствовать об истощении пула стволовых клеток в SGZ гиппокампа при токсическом действии растворимых олигомерных форм Аβ ещё до появления его нерастворимых отложений.

На следующем этапе мы изучили процесс миграции вновь образованных клеток. Для этого был использован протокол с введением бромдезоксисуридина, что позволяет более точно оценить характер миграции и определить местоположения вновь образованных клеток. Полученные нами данные,

свидетельствуют о том, что количество вновь образованных клеток не снижалось, поскольку количество BrdU-позитивных клеток не сокращалось по сравнению с группой контроля.

Следует отметить, что большинство исследований было посвящено изучению только этапов распространения и дифференцировки без данных о формировании новых зрелых нейронов и их дальнейшей судьбы. Поскольку пролиферация и дифференцировка являются всего лишь двумя этапами в процессе нейрогенеза, а большой процент новорожденных нейронов в зубчатой извилине не доживает до зрелости, изменения в скоростях этих двух шагов могут не иметь никакого отношения к функциональному исходу, если число и функциональный статус зрелых нейронов не изменяются. Вместе с тем, наиболее важным на сегодняшний день является изучение критических точек в нейрогенезе [23]. У трансгенных мышей PDAPP, несущих APP-мутацию, скорость пролиферации в СГЗ была неизменной в возрасте 2 месяцев, но значительно уменьшилась в возрасте 1 года, когда появились бляшки. Однако количество пролиферирующих клеток не коррелировало с образованием бляшек, что указывает на то, что снижение пролиферации не зависело от накопления нерастворимого A β или бляшек. Важно отметить, что уменьшение пролиферации сопровождалось уменьшением общего числа нейробластов (DCX+) в СГЗ [23]. В нашем же исследовании не было отмечено снижение вновь образованных клеток. Но, поскольку мы изучали ещё и характер миграции, то, согласно классической схеме радиальной миграции в гранулярный слой зубчатой извилины, клетки, экспрессирующие BrdU, должны быть обнаружены и в наружном гранулярном слое. Удивительно, но в наружном гранулярном слое, который граничит с СГЗ, и в который мигрируют вновь образованные клетки из СГЗ, количество 6-дневных BrdU+ было статистически значимо ниже по сравнению с группой контроля. Это весьма нетипично для нормального нейрогенеза и может свидетельствовать о нарушении процесса радиальной миграции, несмотря на сохраненное образование новых клеток. Таким образом, клетки остаются в субгранулярном слое или же происходит их миграция вдоль субгранулярной зоны, поэтому эта находка указывает на нарушенную миграцию и эктопическую дифференцировку нейронов. А значит и на патологичную, по всей видимости, выживаемость нейронов.

В предыдущих исследованиях были обнаружены ориентационные, морфологические и другие особенности вновь образованных клеток в гранулярной зоне зубчатой извилины у животных с моделью БА. Кроме того, нарушение развития нейронов у таких мышей было подтверждено уменьшенным объёмом гранулярного слоя и числа клеток. Следует отметить, что уменьшенный объём зубчатой извилины также предшествовал формированию бета-амилоидных бляшек [24]. Кроме того, мы зафиксировали увеличение апоптоза в субгранулярном и гранулярном слое зубчатой извилины, а также в хилусе.

Предыдущие исследования продемонстрировали также, что БА напрямую связана с клетками гиппокампа, а связи между нейронным апоптозом в корковых областях и гиппокампе наблюдаются в клинических исследованиях и экспериментах на животных. Кроме того, такие исследования также показали, что процесс апоптоза играет ключевую роль в истощении клеток гиппокампа и способствует ухудшению когнитивных функций [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование представляет собой результаты, указывающие на повреждение критических этапов нейрогенеза: прогениторной, нейробластной стадии миграции, стадии интеграции незрелых нейронов и выживаемости нейронов, которые наблюдаются при действии растворимых форм олигомеров A β ₁₋₄₂. Полученные данные указывают на снижение скорости пролиферации в СГЗ, которое сопровождается эктопической дифференцировкой и нарушенной миграцией, продуцируя, по-видимому, аномальные нейроны, которые имеют более низкие уровни выживаемости, что в конечном итоге может приводить к уменьшению зрелых нейронов и числа клеток в гранулярном слое зубчатой извилины.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (НШ-6240.2018.7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Selkoe D.J., Hardy J. (2016) EMBO Mol. Med., **8**(6), 595-608.
2. Holtzman D.M., Morris J.C., Goate A.M. (2011) Science Transl. Med., **3**(77), 77sr1. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002369
3. Anand R., Gill K.D., Mahdi A.A. (2014) Neuropharmacology, **76 Pt A**, 27-50.
4. Salmin V.V., Komleva Y.K., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Khilazheva E.D., Lopatina O.L., Pozhilenkova E.A., Shapovalov K.A., Uspenskaya Y.A., Salmina A.B. (2017) Frontiers Aging Neurosci., **9**, 245.
5. Vukovic J., Borlikova G.G., Ruitenbergh M.J., Robinson G.J., Sullivan R.K., Walker T.L., Bartlett P.F. (2013) J. Neurosci., **33**(15), 6603-6613.
6. Krezywon A., Richetin K., Halley H., Roybon L., Lassalle J.M., Francès B., Verret L., Rampon C. (2013) PLoS ONE, **8**(9), e76497. DOI: 10.1371/journal.pone.0076497
7. Hamilton A., Holscher C. (2012) Brain Res., **1449**, 83-93.
8. Yu Y., He J., Zhang Y., Luo H., Zhu S., Yang Y., Zhao T., Wu J., Huang Y., Kong J., Tan Q., Li X.M. (2009) Hippocampus, **19**(12), 1247-1253.
9. Jin K., Galvan V., Xie L., Mao X.O., Gorostiza O.F., Bredesen D.E., Greenberg D.A. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**(36), 13363-13367.
10. Jin K., Peel A.L., Mao X.O., Xie L., Cottrell B.A., Henshall D.C., Greenberg D.A. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**(1), 343-347.

11. Черных А.И., Комлева Ю.К., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Пащенко С.И., Салмина А.Б. (2018) Фунд. клин. мед., **3**(1), 6-15.
12. Sui Y., Horne M.K., Stanić D. (2012) PLoS ONE, **7**(2), e31549. DOI: 10.1371/journal.pone.0031549
13. Zinchuk V., Zinchuk O., Okada T. (2007) Acta Histochem. Cytochem., **40**(4), 101-111.
14. Sun G.J., Zhou Y., Stadel R.P., Moss J., Yong J.H., Ito S., Kawasaki N.K., Phan A.T., Oh J.H., Modak N., Reed R.R., Toni N., Song H., Ming G.L. (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **112**(30), 9484-9489.
15. Kim J.A., Ha S., Shin K.Y., Kim S., Lee K.J., Chong Y.H., Chang K.A., Suh Y.H. (2015) Cell Death Disease, **6**, e1789-e1789.
16. Haughey N.J., Nath A., Chan S.L., Borchard A.C., Rao M.S., Mattson M.P. (2002) J. Neurochem., **83**(6), 1509-1524.
17. Walsh D.M., Selkoe D.J. (2007) J. Neurochem., **101**(5), 1172-1184.
18. Meilandt W.J., Cisse M., Ho K., Wu T., Esposito L.A., Searce-Levie K., Cheng I.H., Yu G.Q., Mucke L. (2009) J. Neurosci., **29**(7), 1977-1986.
19. Dong H., Goico B., Martin M., Csernansky C.A., Bertchume A., Csernansky J.G. (2004) Neuroscience, **127**(3), 601-609.
20. Rockenstein E., Mallory M., Mante M., Alford M., Windisch M., Moessler H., Masliah E. (2002) J. Neural. Transm. Suppl., **62**, 327-336.
21. López-Toledano M.A., Shelanski M.L. (2007) J. Alzheimers. Dis., **12**(3), 229-240.
22. Tincer G., Mashkaryan V., Bhattarai P., Kizil C. (2016) Neural stem/progenitor cells in Alzheimer's disease. Yale J. Biol. Med., **89**(1), 23-35.
23. Donovan M.H., Yazdani U., Norris R.D., Games D., German D.C., Eisch A.J. (2006) J. Comp. Neurol., **495**(1), 70-83.
24. Redwine J.M., Kosofsky B., Jacobs R.E., Games D., Reilly J.F., Morrison J.H., Young W.G., Bloom F.E. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**(3), 1381-1386.
25. Hu X., Song C., Fang M., Li C. (2017) Exp. Ther. Med., **15**(2), 1795-1802.

Поступила: 17. 04. 2018.
Принята к печати: 11. 05. 2018.

EARLY CHANGES IN HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS INDUCED BY SOLUBLE A β ₁₋₄₂ OLIGOMERS

Yu.K. Komleva^{1,2}, O.L. Lopatina^{1,2}, Ya.V. Gorina^{1,2}, A.I. Chernykh², A.N. Shuvaev², A.B. Salmina^{1,2}

¹Department of Biochemistry, Medical, Pharmaceutical, and Toxicological Chemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky,
1 Partizana Zheleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022 Russia; e-mail: yuliakomleva@mail.ru

²Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk, Russia

Alzheimer's disease is characterized by the loss of neurons, the accumulation of intracellular neurofibrillary tangles and extracellular amyloid plaques in the brain. However, there are contradicting data on differences in neurogenesis at the onset of the disease or before the formation of amyloid plaques. As awareness of the importance of the pre-symptom phase in neurodegenerative diseases grows in the context of early diagnosis and pathogenesis, we analyzed the critical periods of adult hippocampal neurogenesis at an early stage under the action of soluble A β ₁₋₄₂ beta-amyloid. The proliferation, migration and neuronal cells survival were evaluated in mice with an injection of soluble amyloid beta-oligomers. It was found that the injection of A β ₁₋₄₂ oligomers causes a decrease in cell proliferation in the mouse hippocampus. Despite the preservation of the neuroblast pool in animals after beta-amyloid injection, the process of radial migration is disrupted, and an increase in apoptosis in the neurogenic niche was revealed. Thus, our results demonstrate damage of neurogenesis critical stages: the progenitor cells, neuroblast migration, the integration of immature neurons, and the survival of neurons under application of soluble beta-amyloid oligomers. The obtained data indicate decline in proliferation rate in the subgranular zone, that is accompanied by ectopic differentiation and disturbed migration, producing, apparently, abnormal neurons that have lower survival rates. That could lead to a decrease in mature neurons numbers and the number of cells in the granular layer of the dentate gyrus.

Key words: Alzheimer's disease; neurogenesis; subgranular zone; cell migration; apoptosis; stem cells