

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 616.858

**Соотношение возбудительных и депрессорных
синаптических процессов в нейронах гиппокампа,
амигдалы и ядра Мейнерта в динамике развития
болезни Альцгеймера на модели,
индуцированной А β 25-35**

А.В. Варданян

*Институт физиологии им. Л.А.Орбели НАН РА
0025, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22*

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, гиппокамп, амигдала, ядро Мейнерта, одиночная спайковая активность

Представлены доказательства токсического разрушительного воздействия растворимых олигомеров А β на межклеточные нейротрансмиттерные сигналы, ведущие к редукции синаптической интеграции [7]. Однако неизвестно иницируют ли они торможение синаптической пластичности, потерю синапсов и гибель нейронов при болезни Альцгеймера (БА) [11]. Согласно гипотезе «амилоидного каскада», в гиппокампе (Г) и коре мозга с возрастом неравномерное распределение продукции и/или очистки А β приводит к ее аккумуляции и агрегации, содействующих нейродегенеративному каскаду с оксидативным стрессом, повреждением и потерей нейронов [6]. Показано, что олигомерные и фибриллярные формы А β вызывают нарушение длительной потенциации, синаптическую дисфункцию и ускоряют формирование нейрофибриллярных нитей [11]. Полагается, что активация компенсаторных механизмов не только способна сдерживать развитие патологического процесса, но может быть использована для профилактики и лечения БА. Компенсаторные механизмы включают образование антител к β -амилоиду, синтез нейропротекторных белков, активацию антиоксидантных систем и проонкогенов, тормозящих апоптоз, индукцию нейрогенеза, спраутинг терминалей нейронов, увеличение «плотности» рецепторов нейромедиаторов. Даже процесс образования бляшек может носить компенсаторную функцию, поскольку снижает уровень наиболее токсичных протофибрилл А β . Однако с возникновением клинических признаков компенсаторные механизмы, как правило, истощены. В частности, снижение ингибиции в гиппокампе крыс могло быть следствием селективной потери ГАМКергических нейронов

[13]. К тому же нейрогенез в зрелом мозге также находится под ГАМКергическим контролем [2]. Представляет интерес тот факт, что Г способен в течение всей жизни генерировать новые нейроны благодаря кортикостерону – наиболее мощному из содействующих этому факторов [14]. Более того, новые нейроны развивают свойства функциональных нейронов, способность запускать потенциал действия и обретать синаптические входы с вовлечением в нейрональные сети [5]. В итоге, согласно модели функциональной роли зрелого нейрогенеза в механизмах памяти: а) новые нейроны могут разрушить существующую нейрональную сеть с целью формирования новых синаптических кругов, с потерей предшествующей памяти; б) интеграция новых нейронов в нейрональную сеть, для замещения погибших, может обеспечить консолидацию памяти; в) новые нейроны могут усиливать длительную потенциацию либо повышением числа синапсов, либо подавлением ГАМКергических входов в перфорантный путь [8]. Дальнейшие изучения модуляции Аβ-индуцированных модификаций синаптической функции и пластичности нуждаются в оценке роли адаптивных изменений с учетом противоречивых данных [12].

Целью исследования явилось изучение механизмов развития синаптических процессов в структурах первичной-третичной памяти мозга, в качестве синаптической потенциации и депрессии, на амилоидной модели БА.

Материал и методы

Эксперименты проводили на 23 половозрелых крысах-самцах Альбино, массой 200–250 г, в 2 сериях экспериментов: 1 – на интактных (n=8); 2 – на модели БА, индуцированной билатеральным интрацеребровентрикулярным (ИЦВ) введением А_{25–35} (n=15). Проведено изучение активности нейронов Г, амигдалы (Ам) и ядра Мейнерта (ЯМ) на высокочастотную стимуляцию (ВЧС) энторинальной коры мозга (ЭК) и Г. Все эксперименты проводили согласно «Правилам ухода за лабораторными животными» (публикации NIH за № 85-23, исправленной в 1985 году). Для создания модели БА билатерально ИЦВ инъецировали токсический олигомер Аβ_{25–35}, согласно координатам стереотаксического атласа [9] (AP–1, L±1.5, DV+3.5 мм), по 3 мкл 10^{–9} М фрагментов А_{25–35} (1 мг/мл при t 37°C, агрегированного в течение 4 дней) (Maurice, 1998) и выдерживали до острого эксперимента 12–28 нед. Операции проводили под пентобарбиталовым наркозом (40 мг/кг, в/б), операционное поле обрабатывали 0,1 % бициллином. В остром опыте животных дополнительно обездвиживали 1% дитилином (25 мг/кг, в/б) и переводили на искусственное дыхание. После краниотомии стереотаксически ориентированный раздражающий электрод вживляли в ипсилатеральную ЭК (AP–11, L±3.5, DV+4.0 мм) и Г (AP–3.5, L±2.0, DV+4.0 мм), а стеклянный отводящий микроэлектрод с диаметром

кончика 1 мкм, заполненный 2М раствором NaCl, погружали в Г (AP–3.5, $L \pm 2.0$, $D \pm 4.0$ мм), Ам – Rostral amygdalopiriform area (AP–3.24, $L \pm 5.4$ –5.8, $DV \pm 9.5$ –10.2 мм) и ЯМ (AP–1.8, $L \pm 3.0$, $DV \pm 7.4$ мм). В целом, была зарегистрирована активность 876 нейронов: из Г (236), Ам (382) и ЯМ (258). ВЧС (100 Гц в течение 1 сек) ЭК и CA1 Г осуществляли посредством прямоугольных толчков тока длительностью 0,05 мс и силой 0.10–0.16 и 0.16–0.18 мА.

Проводили программный математический анализ одиночной спайковой активности нейронов Г (31), Ам (89), ЯМ (80) в норме и на модели БА нейронов Г (205), Ам (293), ЯМ (178). On-line регистрацию производили на основе программы, обеспечивающей селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации, с последующим выводом «растеров» пре- и постстимульного спайкинга от множества нейронов, а также диаграмм усредненной частоты спайков (разработчик В.С. Каменецкий). Импульсный поток после селекции подвергался программному математическому анализу. Для избираемых сравниваемых групп спайкинга нейрональной активности строили суммированные и усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average). Для определения статистической достоверности различий в длительности межспайковых интервалов до и после действия стимула использовался непараметрический критерий проверки однородности двух независимых выборок – двухвыборочный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon-Mann-Whitney test). Так как число регистрируемых спайков было достаточно велико (до нескольких сотен спайков за 20-секундный интервал после действия стимула), использовалась разновидность указанного теста, учитывающая его асимптотическую нормальность – z-тест. Сравнение критических значений с табличными значениями нормального распределения при уровнях значимости 0.05, 0.01 и 0.001 (для различных испытаний), показывает, что в результате ВЧС для большинства выборок спайкинга нейрональной активности имеется статистически значимое изменение, как минимум с уровнем значимости 0.05.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов Г, Ам и ЯМ в норме ($n=200$) и на модели БА спустя 12–28 нед. ($n=676$) выявил формирование возбуждательных и депрессорных ответов в нейронах Г и Ам на ВЧС ЭК, нейронов Ам и ЯМ на ВЧС Г, в виде тетанической потенциации (ТП) и депрессии (ТД), с последующими посттетаническими смешанными одно- и разнонаправленными проявлениями активности в виде ПТП и ПТД, исчисляемых на основе усредненного количества спайков (PETH) с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average).

По сравнению с престаимпульным уровнем депрессорные постстимульные проявления активности нейронов Г на ВЧС ЭК выявлялись в следующих пределах. Спустя 12 нед. после введения Аβ 25-35 ТД в депрессорной последовательности исчислялась в пределах 3-кратного занижения престаимпульной активности, равного норме (3-кратного), в депрессорно-возбудительной последовательности – выше нормы порядка 4-кратного; спустя 15-16 нед. ТД нейронов Г в ТД ПТД достигала 3-кратного занижения, равного норме; через 28 нед. – 4-кратного занижения, выше нормы (рис. 1 А). ТД в ТД ПТП спустя 12 нед. определялась порядка 4-кратного занижения, выше нормы (3-кратного) и 3-кратного – через 15-16 и 28 нед., равного норме (рис. 1 Б). Спустя 12 нед. ТД в ТД ПТД нейронов Ам на ВЧС ЭК исчислялась в пределах 23-кратного занижения, в то время как в норме она достигала 4.25-кратного, т.е. намного ниже, а в ТД ПТП – 22-кратного, также выше нормы (10-кратного) (рис. 1 В, Г). В нейронах Ам на ВЧС Г спустя 12, 13, 16 и 18 нед. ТД в ТД ПТД определялась порядка 3.5-, 2-, 3- и 3-кратного занижения, соответственно, что оказалось преимущественно выше нормы (2-кратного); ТД в ТД ПТП – в пределах 3-, 1-, 2- и 2-кратного занижения, соответственно, что в сравнении с нормой (2-кратного) сначала превысила ее, затем достигла уровня нормы (рис. 1 Д, Е). Наконец, в нейронах ЯМ на ВЧС Г ТД в ТД ПТД спустя 12 нед. достигала 2.5-кратного занижения, через 22 нед. 2-кратного уровня, спустя 28 нед. – 2.5-кратного, что в сравнении с нормой (4-кратного), с удлинением срока испытания так и не превысила ее; ТД в ТД ПТП спустя 12, 22 и 28 нед. достигла значений 2.5-, 2- и 3-кратного, соответственно, с той же тенденцией прогрессии во времени, но уже с превышением нормы (порядка 2-кратного) (рис. 1 Ж, З). Таким образом, в соответствующих посттетанических последовательностях тетанические депрессорные процессы в нейронах Г на ВЧС ЭК нарастали с удлинением сроков испытаний, превышая норму и приравниваясь к ней, со значительным превалированием в нейронах Ам на ВЧС ЭК, с относительно низким превалированием и приравниванием к норме на ВЧС Г и ниже и выше нормы в нейронах ЯМ на ВЧС Г (рис. 1).

Возбудительные постстимульные тетанические реакции (рис. 2) изменялись следующим образом. ТП в возбудительной последовательности (ТП ПТП) в нейронах Г на ВЧС ЭК спустя 12 нед. после введения Аβ 25-35 достигла превышения престаимпульного уровня 8.5-кратно, что оказалось намного выше нормы (3-кратно), через 15-16 и 28 нед. превышение престаимпульного уровня определялось в пределах 2 и 1 раза, соответственно, что было ниже нормы; ТП в возбудительно-депрессорной последовательности (ТП ПТД) в указанные периоды испытаний достигла 3-, 2.25- и 3-кратного превышения, соответственно, намного ниже нормы (12.5-кратного) (рис. 2 А, Б). В нейронах Ам на ВЧС ЭК через 12 нед. ТП в ТП ПТП исчислялась в пределах 10.25-кратного превышения, выше нормы

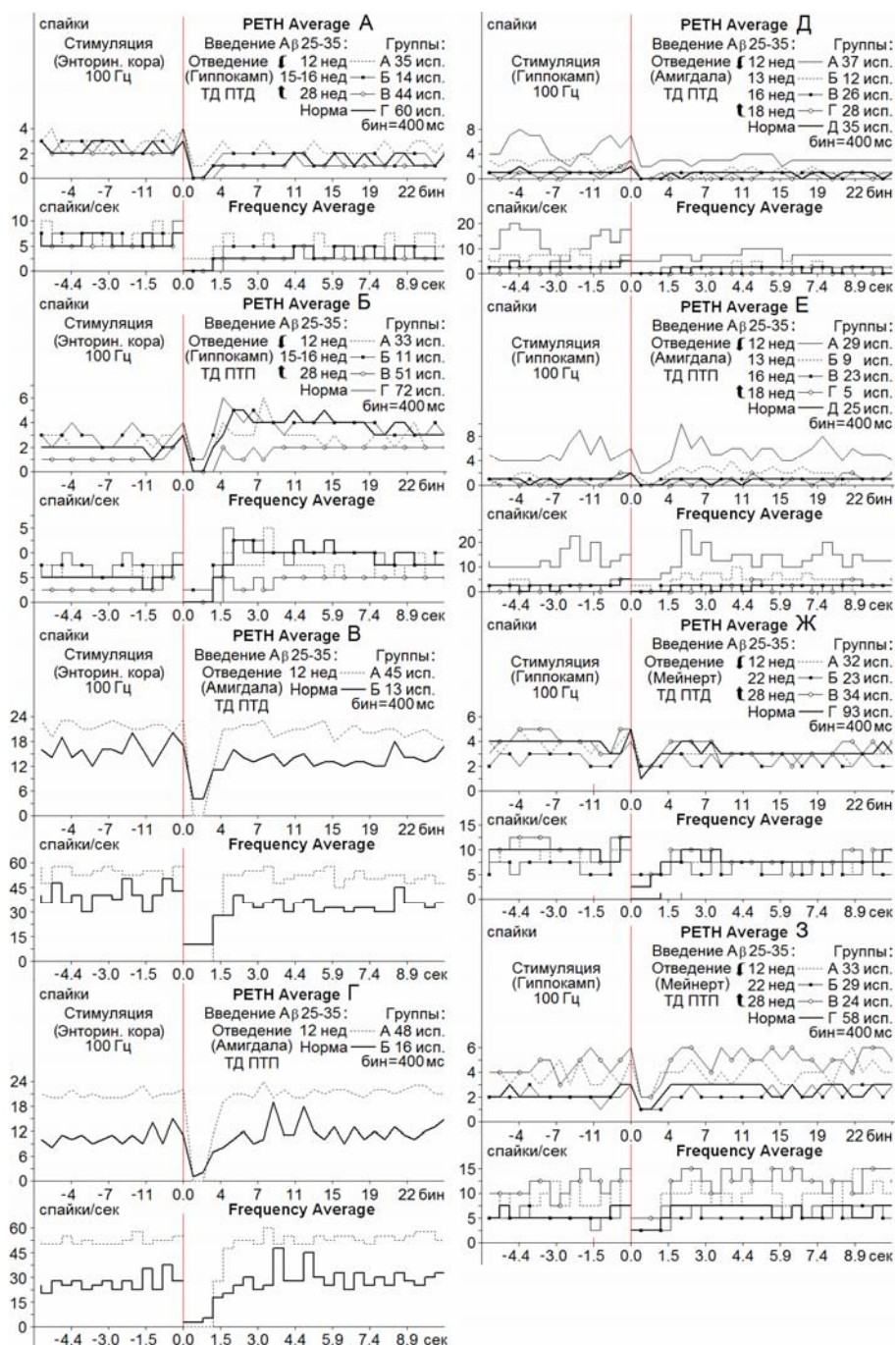


Рис. 1. А-З – комплексные усредненные перистимульные (PETN Average) и гистограммы частоты (Frequency Average) постстимульной тетанической депрессорной спайковой активности нейронов гиппокампа (А, Б), амигдалы (В-Е) и ЯМ (Ж, З) на ВЧС ЭК (А-Г) и гиппокампа (Д-З), в сравнении с нормой (А-З) на модели БА. Остальные обозначения на рисунке

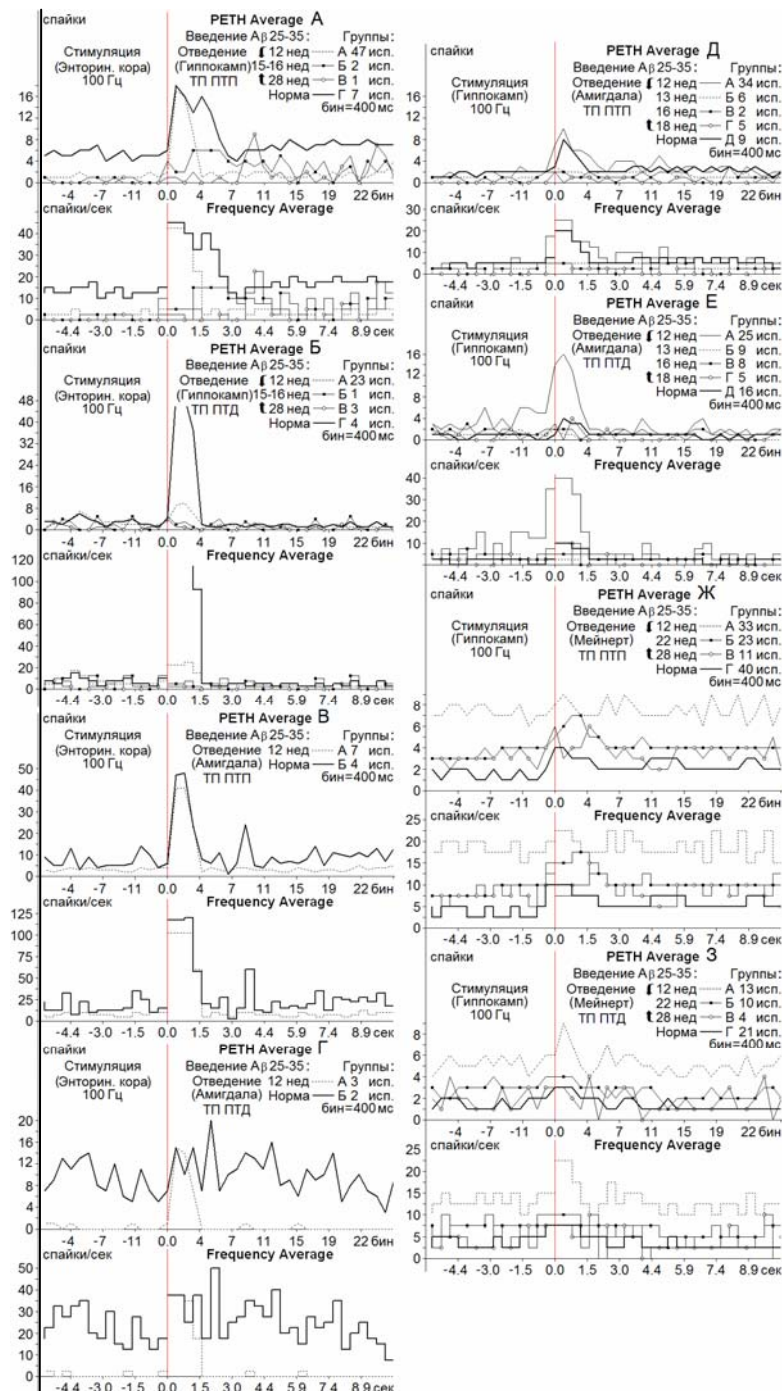


Рис. 2. А-3 – комплексные усредненные перистимульные (PETH Average) и гистограммы частоты (Frequency Average) постстимульной тетанической возбудительной спайковой активности нейронов гиппокампа (А, Б), амигдалы (В-Е) и ЯМ (Ж, 3) на ВЧС ЭК (А-Г) и гиппокампа (Д-3), в сравнении с нормой (А-3) на модели БА. Остальные обозначения на рисунке

(9.4-кратно); ТП в ТП ПТД достигла 14-кратного превышения, соответственно, намного выше нормы (2.14-кратного) (рис. 2 В, Г). В нейронах АМ на ВЧС Г 12 нед. спустя ТП в ТП ПТП выявлялась порядка 1.43-кратного превышения, 13 и 16 нед. спустя – 1.5-кратного превышения, через 18 нед. – 3-кратного, что было несколько выше нормы (2.66-кратного); ТП в ТП ПТД в те же сроки исчислялась в пределах 1.14-, 1-, 1- и 1-кратного, соответственно, что оказалось намного ниже нормы (3-кратного) (рис. 2 Д, Е). В нейронах ЯМ на ВЧС Г ТП в ТП ПТП через 12, 22 и 28 нед. исчислялась в пределах 1.1-, 1.2- и 1.5-кратного превышения, не достигая нормы (2-кратного); ТП в ТП ПТД в те же сроки – достигала 1.5-, 1.33- и 1.5-кратного превышения, приближаясь к норме (1.5-кратного) (рис. 2, Ж. З). Иными словами, в нейронах Г на ВЧС ЭК возбуждающие тетанические эффекты через 12 нед. оказались в обеих последовательностях значительно выше и ниже нормы, соответственно, через 15-16 и 28-й нед. – превышение достигало уровня ниже и намного ниже нормы в тех же последовательностях. В нейронах АМ на ВЧС ЭК через 12 нед. ситуация оказалась обратной – с незначительным превышением и намного выше нормы. В нейронах АМ и ЯМ на ВЧС Г, в целом, изменения определялись в незначительных пределах. В АМ на ВЧС Г ТП в возбуждающей последовательности, будучи ниже нормы к 12, 13 и 16 нед. испытаний, несколько превысила ее к 18-й нед., а в смешанной – на все время испытаний так и не достигла нормы. Наконец, в нейронах ЯМ на ВЧС Г от 12 до 28 нед., наоборот, превышение не достигало нормы в возбуждающей последовательности, а в смешанной – исчислялось в пределах нормы.

Таким образом, естественным механизмом противодействия нейродегенерации выступает депрессия, которая вначале углубляется, затем спадает. Создается необходимость ее протекторной поддержки с удлинением действия вплоть до восстановления возбуждающих эффектов. Представляет интерес тормозной механизм протекции, опосредованный, в частности, ГАМК, содействующий восстановлению исходного соотношения синаптических процессов. Углубление депрессорных реакций, очевидно, является следствием выдвижения их в качестве протекторных в начальной стадии восстановления. Согласно собственным данным, депрессорные реакции интенсивнее вовлекаются как при неспецифической, так и специфической нейродегенерации [3, 4, 10 и др.]. Более того, изучения на клеточном и сетевом уровнях доказывают, что синаптическое торможение не может оцениваться лишь в качестве противостоящего возбуждению, а обслуживает высоко специфические функции в нервной системе млекопитающих [1]. Отсутствие выраженной депрессии в настоящем исследовании полагает необходимость привлечения фармакологической интервенции с целью ее усиления.

Поступила 22.12.14

**Դրող և արգելակող սինապսային պրոցեսների
հարաբերությունը հիպոթալամուսի, ամիգդալայի և Մեյներտի
կորիզի նեյրոններում Ալցհեյմերի հիվանդության զարգացման
դինամիկայում՝ Aβ 25-35-ով առաջացրած մոդելի վրա**

Ա.Վ. Վարդանյան

Ինտակտ Ալբինո առնետների (n=8) և Ալցհեյմերի հիվանդության (ԱՀ) ամիլոդայն մոդելի վրա (n=15) կիսախրոնիկ փորձերում 12-28 շաբաթ անց կատարվել է հիպոկամպի (Հ), ամիգդալայի (Ամ) միայնակ նեյրոնների ակտիվության գրանցումը էնտորինալ կեղևի (ԷԿ), Ամ-ի, Մեյներտի կորիզի (Մկ) բարձր հաճախականության գրգռման (ԲՀԳ) ժամանակ: Օn line ընտրությամբ և ծրագրային մաթեմատիկական վերլուծությամբ, ճնշիչ և արգելակիչ տետանիկ (ՏԴ և ՏՊ) և հետտետանիկ (ՏԴ ՊՏԴ և ՏՊ ՊՏՊ) էֆեկտների հիման վրա, կատարվել է Հ-ի, Ամ-ի, Մկ-ի նեյրոնների (n=200) իմպուլսային ակտիվության համեմատական վերլուծություն նորմայում և 12-28 շաբաթ անց (n=676) ԱՀ մոդելի վրա: Ընդհանուր առմամբ գրանցված է 886 նեյրոնների ակտիվություն՝ Հ-ից (n=236), Ամ-ից (n=319) և Մկ-ից (n=258): Տետանիկ ճնշման պրոցեսները համապատասխան հետտետանիկ հաջորդականությամբ Հ-ի նեյրոններում ԷԿ-ի ԲՀԳ ժամանակ աճել են ըստ փորձարկման ժամկետների երկարացման՝ գերազանցելով նորմային և հավասարվելով նրան, նշանակալի գերազանցելով Ամ-ի նեյրոններում ԷԿ-ի ԲՀ գրգռման, համեմատաբար ցածր գերակշռությամբ նորմայի հետ համեմատած Հ-ի ԲՀ-ի գրգռման ժամանակ և ցածր ու բարձր նորմայից ՄԿ-ի նեյրոններում Հ-ի ԲՀ գրգռման ժամանակ: Դրդիչ տետանիկ էֆեկտները Հ-ի նեյրոններում ԷԿ ԲՀԳ ժամանակ 12 շաբաթ անց երկու հաջորդականություններում լինում են նշանակալի բարձր և նորմայից ցածր, համապատասխանաբար 15-16 և 28 շաբաթ անց գերազանցումը հասնում է նորմայից ցածր և առավել ցածր նորմայի մակարդակից՝ միևնույն հաջորդականությամբ: ԷԿ-ի ԲՀԳ ժամանակ Ամ-ի նեյրոններում 12 շաբաթում եղել է հակառակը՝ նորմայից աննշան բարձր: Հ-ի ԲՀԳ ժամանակ Ամ-ի նեյրոններում տետանիկ պոտենցիալի բարձրացումը դրդական հաջորդականությամբ նորմայից ցածր էր 12-13 և 16 շաբաթների փորձարկումների ժամանակ, որոշ չափով գերազանցում էր 18 շաբաթում, իսկ խառնակազմ հաջորդականություններում փորձերի բոլոր ժամանակներում նորմայի չէր հասնում: Վերջապես, Հ-ի ԲՀԳ ժամանակ Մկ-ի նեյրոններում 12-ից մինչև 28 շաբաթվա ընթացքում, ընդհակառակը, բարձրացումը նորմայի չէր հասնում դրդող հաջորդականություններում, իսկ խառնակազ-

մում՝ նորմայի սահմաններում: Ներդրողներացիայի հակազդեցության ցուցանիշները, մասնավորապես, տետանիկ ճնշման խորացման օրինակով, հիմնականում աճում էին փորձարկումների ժամկետների երկարացման դեպքում՝ գերազանցելով նորմային և հավասարվելով նրան:

Correlation of excitatory and depressor synaptic processes in hippocampal, amygdalar and Meynert nucleus neurons in dynamics of development of Alzheimer's disease induced by A β 25-35

A.V. Vardanyan

In semichronic experiments in intact Albino rats (n=8) on amyloid model of Alzheimer's disease (AD) (n=15) after 12-28 weeks activity registration of single neurons of hippocampus (H) and amygdala (Am) to high frequency stimulation (HFS) of entorhinal cortex (EC), neurons of Am and Meynert nucleus (NM) to HFS of H, by means of on-line selection and software mathematical analysis, based on depressor and excitatory tetanic (TD and TP) and post tetanic (TD PTD and TD PTP) effects, a comparative analysis of impulse activity of neurons H, Am and NM in norm (n=200) and on the model of AD after 12-28 weeks (n=676) was conducted. On the whole, the activity of 886 neurons was registered: from H (236), Am (319) and NM (258). Tetanic depressor processes in corresponding post tetanic successions in neurons of H with elongation of trial periods increased, exceeding the norm and approaching it, with significant prevalence in Am neurons at EC HFS, with relatively low prevalence and equalization to the norm at H HFS and below, and above the norm in NM neurons at H HFS. The excitatory tetanic effects in neurons of H at EC HFS after 12 weeks in both sequences considerably above and below the norm were proved, respectively, after 15-16 and 28 weeks, exceeding the level below and above the norm in the same successions. In neurons of Am at EC HFS after 12 weeks the situation was reverse – their activity was insignificantly and considerably above the norm. In Am and NM neurons at H HFS, on the whole, the changes in insignificant limits were determined. In Am neurons at H HFS the prevalence of tetanic potentiation in excitatory sequences below the norm up to 12, 13 and 16 weeks of trials, to 18 weeks some exceeding were found, and in mixed – at all time of trials did not approach the norm. Finally, in NM neurons at H HFS from 12 up to 28 weeks, conversely, the exceeding in excitatory succession didn't approach the norm and in mixed ones was in the limits of norm. In conclusion, the indicators of counteraction of neurodegeneration, in particular, similar to deepening of tetanic depression, with elongation of trial periods increased, exceeding the norm or equating to it.

Литература

1. Birke G., Draguhn A. No Simple Brake – the Complex Functions of Inhibitory. *Pharmacopsychiatry*, 2010, vol. 43, S1, p. 21–31.
2. Earnheart J.C., Schweizer C., Crestani F. et al. GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J. Neurosci.*, 2007, vol. 27, 14, p. 3845–3854.
3. Galoyan A.A., Khalaj N., Hambardzumyan L.E. et al. Protective effects of hypothalamic proline-rich peptide and cobra venom Naja Naja Oxiana on dynamics of vestibular compensation following unilateral labyrinthectomy. *Neurochem. Res.*, 2010, vol. 35, p. 1747–1760.
4. Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Chavushyan V.A. et al. Neuroprotection by hypothalamic peptide proline-rich peptide-1 in Abeta 25-35 model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dement.*, 2008, vol. 4, 5, p. 332–344.
5. Galvan V., Bredezen D.E. Neurogenesis in the Adult Brain: Implications for Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2007, vol. 6, p. 303–310.
6. Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, vol. 297, p. 353–356.
7. Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W. et al. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 2007, vol. 27, p. 796–807.
8. Lu B., Chang J.H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins: implications in hippocampus-dependent memory. *Neuron Glia Biology*, 2005, vol. 1, p. 1–8.
9. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, Academic Press, 5th ed., 2005.
10. Sarkissian J.S., Chavushyan V.A., Meliksetyan I. et al. Protective effect of Naja naja oxiana cobra venom in rotenone-induced model of Parkinson's disease: electrophysiological and histochemical analysis. *New Armenian Medical Journal*, 2007, vol. 1, p. 43–56.
11. Shankar G., Li S., Mehta T.H., Garcia-Munoz A. et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 2008, vol. 14, p. 837–842.
12. Small D.H. Network dysfunction in Alzheimer's disease: Does synaptic scaling drive disease progression? *Trends in Molecular Medicine*, 2008, vol. 14, p. 103–108.
13. Tsunashima K., Schwarzer C., Kirchmair E., Sieghart W., Sperk G. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus III: altered messenger RNA expression in kainic acid-induced epilepsy. *Neuroscience*, 1997, vol. 80, 4, p. 1019–1032.
14. Wossink J., Karst H., Mayboroda O., Joels M. Morphological and functional properties of rat dentate granule cells after adrenalectomy. *Neuroscience*, 2001, vol. 108, 2, p. 263–272.