

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СВЯЗИ ГЛАУКОМЫ И БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Мамедов Эльдар Элханович

*Ассистент кафедры Анатомии, клинической анатомии (ОХТА)
eldar_mamedov@bsmi.uz, <https://orcid.org/0009-0001-3460-4764>*

Аннотация: Главным механизмом гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях считается апоптоз. В гибели ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) при глаукоме, согласно данным множества исследователей, также участвует этот же механизм. Примерно 70 % волокон зрительного тракта, формируя ретиногеникулярные пути, заканчиваются в наружном колленчатом теле (НКТ). Общим для нейродегенеративных заболеваний является процесс трансинаптической дегенерации, при котором болезнь распространяется от поврежденного нейрона к здоровому через синаптический контакт. Этот же процесс характерен для прогрессирования глаукомной оптической нейропатии.

Ключевые слова: глаукома, болезнь Альцгеймера, апоптоз, нейродегенерация.

ВВЕДЕНИЕ

Главным механизмом гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях считается апоптоз [3]. Его роль в патогенезе таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, подтверждена клиническими и экспериментальными данными [6, 184].

Гибель ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) при глаукоме, согласно данным множества исследователей, также происходит в результате апоптоза [162]. Повышенное внутриглазное давление (ВГД) как один из основных факторов патогенеза глаукомы выступает в качестве механического агента, приводя к деформации перегородок решетчатой пластинки и вызывая компрессию аксонов ганглиозных клеток. В результате снижения аксоплазматического тока и ретроградного аксонального транспорта нарушается поступление к ГКС нейротрофических факторов. Их недостаток способствует запуску механизма апоптоза [11]. Апоптоз в этом случае идентифицируется по следующим специфическим признакам: конденсации хроматина, фрагментации геномной ДНК, обнаружению апоптозных телец [3, 150].

В современной литературе достаточно много внимания уделяется выявлению при нейродегенеративных заболеваниях повышенной активности каспаз как основных индукторов апоптоза. При изучении образцов головного мозга пациентов, умерших от болезни Альцгеймера, найден более высокий уровень активированных каспаз в клетках микроглии. В экспериментальной

модели глаукомы у крыс также установлено повышение концентрации активированных каспаз: каспаза-3 и каспаза-8 [13]. Каспаза-3 - главный эффектор апоптического каскада, активируется в ГКС и расщепляет APP (англ. Amyloid Precursor Protein) до нейротоксических фрагментов, включая β -амилоид. В «нормальных условиях» APP преимущественно секретируется в растворимой форме (sAPP α) и выполняет трофические функции. С возрастом или при наличии мутаций в гене APP происходит изменение механизма расщепления этого белка, что приводит к снижению уровня sAPP α и образованию β -формы пептида (APP β). Накопление β -амилоида приводит к патологическим изменениям в ЦНС человека, нарушая процессы клеточного транспорта. Отложение β -амилоидных бляшек является характерной чертой множества нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [7, 13, 146].

В настоящее время считается установленной роль β -амилоида в развитии апоптоза ГКС при глаукоме [9]. Как уже было отмечено, в экспериментальных моделях глаукомы у крыс обнаружен патологический процессинг APP, вызванный каспазой-3, и увеличение экспрессии β -амилоида ГКС. Также выявлено снижение уровня β -амилоида в стекловидном теле у пациентов с глаукомой (по сравнению с его отложением в сетчатке). Доказано, что экзогенный β -амилоид индуцирует апоптоз ГКС *in vivo*, причём этот эффект зависит от различных факторов [9].

Большая часть аксонов ГКС заканчиваются за пределами глазного яблока. Примерно 70 % волокон зрительного тракта, формируя ретиногеникулярные пути, заканчиваются в наружном коленчатом теле (НКТ) [3]. Ранее считалось, что оно представляет собой лишь «ретрансляционную станцию», передающую информацию от нейронов сетчатки через зрительную лучистость к коре головного мозга. В настоящее время показано, что на уровне НКТ происходит значительная и многообразная обработка зрительной информации [3]. В составе НКТ проходят зрительные пути - магноцеллюлярный, парвоцеллюлярный и кониоцеллюлярный.

В неврологической практике известно множество нейродегенеративных заболеваний центральной нервной системы. К ним относятся болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Гентингтона, болезнь Пика и многие другие. Общим для них является процесс транссинаптической дегенерации, при котором болезнь распространяется от пораженного нейрона к здоровому через синаптический контакт. Этот же процесс характерен для прогрессирования глаукомной оптической нейропатии [17].

Маркёр глаукомного процесса — гибель ГКС вследствие повреждения их аксонов на уровне ДЗН. Однако дистрофический процесс на этом не заканчивается. По данным N. Gupta и Y. Yucel, атрофии подвергается и наружное

коленчатое тело, и зрительная кора. Дегенеративные изменения проявляются в виде сморщивания и гибели нейронов. Атрофии подвергаются все проводящие пути НКТ [2, 8, 15, 19]. При окраске срезов по Ниссию выявляют истончение слоёв НКТ, уменьшение плотности клеток, их размеров, изменение формы и увеличение депозитов липофусцина в магно- и парвоцеллюлярных слоях. Атрофия наружного коленчатого тела приводит к снижению его метаболической активности, что обнаруживается при помощи цитохромоксидазы. Интересно, что при глаукоме дегенеративные изменения затрагивают именно проводящие нейроны НКТ, в то время как вставочные нейроны остаются неизменными [19]. В 2006 году N. Gupta опубликовала первый случай глаукомы низкого давления, в котором были описаны дегенеративные изменения в головном мозге у человека на основе клинических данных и результатов аутопсий [4]. Обнаружены более выраженные атрофические изменения в интракраниальной области ЗН по сравнению с контрольной группой, а также атрофические изменения в НКТ и зрительной коре. Интересно, что полученные результаты коррелировали с клинической картиной, состоянием глазного дна и данными полей зрения, проведенными во время жизни пациента. Другим доказательством аксонопатии является выявление патологического тау-белка в сетчатке при глаукоме. Тау-белок относится к группе белков, ассоциированных с микротрубочками и отвечающих за аксональный транспорт в здоровых нервных клетках. Гиперфосфорилирование тау-белка приводит к разрушению микротрубочек, нарушению аксонального транспорта и вызывает токсическое воздействие на нейроны. Патологический тау-белок был найден в виде нейрофибриллярных клубков при болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях. Цель работы: провести сравнительный анализ морфологических изменений в центральной части зрительного анализатора, НКТ при глаукоме и болезни Альцгеймера. Методика исследования: мы изучили морфологический материал головного мозга у 7 пациентов: 2 пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера, 1 пациента с глаукомой и 4 пациентов контрольной группы без офтальмологических и неврологических заболеваний. Образцы ткани головного мозга из области НКТ и зрительной коры фиксировались в 10%-ном нейтральном растворе формалина (забуференный pH = 7,2-7,4), обезвоживались и заключались в парафин. Серийные срезы толщиной 5-15 мкм окрашивались гематоксилин-эозином. Для окрашивания по Ниссию небольшие образцы НКТ и зрительной коры фиксировались в 96%-ном растворе спирта на протяжении месяца. После фиксации материал перед заливкой в парафин обезвоживался в абсолютном спирте. Серийные срезы помещали в 0,5%-ный раствор крезилвиолета. Далее проводилась дифференциация срезов под контролем микроскопа до явного проявления ядра и зернистости нервной клетки. Затем срезы тщательно обезвоживались, просветлялись в ксилоле и заключались в

канадский бальзам. В результате зернистость в цитоплазме приобретала синевато-фиолетовый цвет, а ядрышки становились темно-синими. Нейрогистологическое исследование проводилось по методике Бильшовского. Образцы ткани фиксировались в 10 % нейтральном формалине на срок до 6 месяцев. Замороженные срезы толщиной 15-20 мкм обрабатывались 50 % спиртом с 1 % аммиачной водой. После тщательной промывки дистиллированной водой, срезы помещались в раствор азотнокислого серебра без доступа света. Далее срезы промывались, обезвоживались в спиртах возрастающей концентрации, просветлялись в ксилоле и заключались в полистирол. Иммуногистохимическое исследование проводилось на срезах НКТ у двух пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера и пациента с глаукомой для идентификации нейродегенеративного процесса. Исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 3-4 мкм с использованием полимерно-протеинового-пероксидазного метода по стандартной методике с применением системы визуализации NOVOLINK (Novocastra, UK), tau Ab-3 (Rabbit Polyclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific). Рабочие растворы в разведении 1:25 готовились из лиофилизированных концентратов Amyloid A4 (Clone BAM01, Thermo Fisher Scientific), tau Ab-3 (Rabbit Polyclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific), предварительно разведенных в 100 мкл Antibody Diluent (Novocastra). После депарафинизации и обезвоживания для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывались 0,3 % H₂O₂ в течение 20 минут, затем промывались в дистиллированной воде и для демаскировки антигенных детерминант подвергались температурной обработке в буферном растворе с pH = 9,0 (Epitope Retrieval Solutions pH 9, Novocastra) в течение 30 минут при t = 98°. После отмывания в Buffer Solution (Novocastra, UK) трижды по 5 минут наносились рабочие разведения концентратов первичных антител Amyloid A4 (Clone BAM01, Thermo Fisher Scientific), tau Ab-3 (Rabbit Polyclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific). Инкубация с первичными антителами проводилась в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации с первичными антителами срезы промывались в отмывочном буферном растворе, приготовленном из концентрата Bond Wash Solution 10X Concentrate (Novocastra) трижды по 5 минут, затем наносилась система детекции полимерно-протеинового-пероксидазного комплекса NOVOLINK (Novocastra, UK) на 30 минут при комнатной температуре. Выявление антигенных эпитопов осуществлялось с помощью DAB и DAB Enhancer (Novocastra, UK). Исследование проводилось с помощью иммуноштейнера Leica BOND-MAX с применением Covertile технологии (Leica Biosystems).

Результаты исследования и их обсуждение. Изучение нейронных параметров на различных уровнях зрительного пути в пределах ЦНС было осуществлено с использованием полуавтоматизированной системы анализа изображений «MINI-MOP» (OPTON, Германия), полученных через

«Photomicroscop-NI» (Zeiss, Германия). Проводили 40 измерений нейрона и его ядра в каждом из анализируемых слоев: магноцеллюлярном и параклеточном слоях НКТ и в зрительной коре. Выполнялся сравнительный анализ площади нейрона (S_n , $\mu\text{км}^2$) и площади ядра нейрона (S_y , $\mu\text{км}^2$) в трех исследуемых группах. Ядерно-цитоплазматическое соотношение (Y/C) рассчитывалось по следующей формуле: S_y . Изучение гистологических препаратов у пациентов с глаукомой и болезнью Альцгеймера, окрашенных по методике Ниссля, продемонстрировало выраженную атрофию нервной ткани по сравнению с контрольной группой. При болезни Альцгеймера и глаукоме наблюдалось заметное сокращение площади нейронов во всех исследованных областях по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$; критерий Манна-Уитни). Самые низкие значения этого параметра были зарегистрированы при глаукоме: средние значения площади нейрона отличались от нормальных на 32,5 % в магноцеллюлярных слоях, 38 % в параклеточных слоях и 35,0 % в зрительной коре. При болезни Альцгеймера отмеченные различия были чуть менее выраженными. Доказано уменьшение площади нейрона в магноцеллюлярных слоях на 20,8 %, в параклеточных слоях на 38,5 %, в зрительной коре на 26,0 %. В сравнении с контрольной группой средние значения площади ядра нейрона при болезни Альцгеймера были выше в магноцеллюлярных слоях НКТ - на 42,0 %, в параклеточных слоях на 9,7 %. Эти различия были статистически значимыми ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни). В зрительной коре размеры ядер практически не отличались от нормы ($p > 0,05$). В случае глаукомы также наблюдалось небольшое увеличение площади ядер нейронов в магноцеллюлярных слоях НКТ на 8,5 %, в параклеточных слоях и зрительной коре наблюдалось сокращение их размеров на 35,5 и 18,3 % соответственно. Все различия были статистически значимыми ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни). Соответственно изменялось и ядерно-цитоплазматическое соотношение в анализируемых слоях НКТ и зрительной коре. В нашем исследовании на примере двух нейродегенеративных заболеваний мы наблюдаем следующие характерные формы изменений нейронов: аксональная реакция и трансинаптическая атрофия. Аксональная реакция или первичное повреждение Ниссля - частая форма патологии нейрона, вызванная разрывом или гибелью аксона. При данной форме патологии тело нейрона вначале увеличивается (отек), округляется, а затем уменьшается в размере и сморщивается. Ядро смещается к периферии (эктопия) клетки, и становится более округлым и светлым, что в сочетании с центрально расположенным ядрышком придает ему сходство с глазом рыбы или птицы. Глыбки Ниссля подвергаются центральному хроматолизу. Все это является результатом выраженного увеличения метаболической активности пораженной клетки и рассматривается как компенсаторный механизм. Подобные изменения были зафиксированы при исследовании гистологических образцов НКТ и зрительной коры у пациентов с болезнью Альцгеймера. Уменьшение объема

цитоплазмы и ядра при сохранности их «светоскопической» структуры, утолщение и складчатость ядерной мембраны, умеренный гиперхроматоз ядра и цитоплазмы, конденсация хроматина, сморщивание цитоплазмы - все эти морфологические признаки в контексте глаукомы указывают на вовлечение в апоптоз нейронов НКТ и зрительной коры. Это может служить доказательством центростремительного транссинаптического распространения патологического процесса от глаза к центральным отделам зрительного анализатора. Транснейрональная атрофия нейронов в данном случае обусловлена недостаточным притоком афферентных импульсов в связи с утратой синаптических связей (асинапсия). При исследовании препаратов, импрегнированных серебром, зрительной коры больших полушарий головного мозга и НКТ пациентов с болезнью Альцгеймера были обнаружены нейрофибриллярные образования различной толщины, заполняющие цитоплазму нейронов и их отростков. Другие нейрофибриллы располагались вокруг ядер и имели вид клубка (классические альцгеймеровские нейрофибриллы). В отдельных случаях нейрофибриллы принимали форму «корзин», «локонов», «кос», «теннисных ракеток». При болезни Альцгеймера в патологический процесс прежде всего вовлекаются белки нейрофиламентов - основного компонента цитоскелета нейрона. Эти белки выполняют несколько функций, включая поддержку формы клетки, диаметра аксона и участвуют в аксональном транспорте. Нейрофиламенты особенно многочисленны в крупных нейронах с длинным аксоном, которыми богата зрительная кора больших полушарий. Следовательно, «альцгеймеровские нейрофибриллы» обнаруживаются не только в патогномичных для этого заболевания областях мозга, но и в центральном отделе зрительного анализатора. Подобные изменения в нейронах как зрительной коры, так и НКТ мы наблюдали также в головном мозге пациента с глаукомой. Патологические изменения охватывали внутренние структуры нейронов. Следует отметить эктопию ядра, пикноз, перичеселлюлярный отек, уменьшение объема цитоплазмы, конденсацию хроматина и сморщивание нейронов. Изменения в нейронах, наблюдаемые нами в результате инактивации при болезни Альцгеймера и глаукоме, в определенной степени напоминают морфологические особенности апоптоза. Интерес представляют результаты, полученные в ходе иммуногистохимического анализа срезов НКТ. При этой методике был использован амилоид А4 - р-амилоидный пептид, извлеченный из амилоида р-белка-предшественника. Его выявление считается надежным маркером нейродегенеративных процессов. Как внеклеточный, так и цитоплазматический р-амилоид был обнаружен в НКТ у пациентов с болезнью Альцгеймера и глаукомой. Это ключевой компонент амилоидного белка в нейронных бляшках, а также в нейрофибриллярных клубках. Другим важным маркером для идентификации болезни Альцгеймера и глаукомы как нейродегенеративных

недугов является тау-белок, который мы обнаружили в НКТ у больных этими заболеваниями. Этот белок отвечает за поддержание структурной стабильности микротрубочек. При болезни Альцгеймера и глаукоме тау-белок становится гиперфосфорилированным, что приводит к его неспособности связываться с микротрубочками. Вместо этого фосфорилированные тау-белки соединяются между собой, образуя «шнуры» - парные спиральные волокна. Две спирали тау-белка, скрученные друг с другом, известны как нейрофибриллярные клубки. Нейроны, заполненные такими клубками вместо функционирующих микротрубочек, вскоре погибают. Таким образом, каскадное действие при болезни Альцгеймера и глаукоме, по нашему мнению, можно представить следующим образом: образование р-амилоида - амилоидные бляшки - нейрофибриллярные клубки (тау-белок) - гибель нейрона. Заключение. Морфологическое исследование аутопсийного материала мозга показало атрофию нервной ткани в наружном коленчатом теле и зрительной коре: сморщивание и смерть нейронов, перичеллюлярный отек, эктопия ядра и ядрышка, хроматолиз. Наиболее выраженные атрофические изменения наблюдались при глаукоме. Иммуногистохимический анализ НКТ выявил маркеры нейродегенерации: р-амилоид и тау-белок. Это подтверждает вовлеченность центральных отделов зрительного анализатора в нейродегенеративный процесс при этих патологиях. Исходя из морфологических данных, поддержанных результатами комплексного клинического обследования, можно говорить о более агрессивном воздействии нейродегенеративного процесса на структуры зрительного пути при глаукоме по сравнению с болезнью Альцгеймера. При прогрессировании глаукомной оптической нейропатии патологический процесс распространяется от ганглиозных клеток сетчатки к центральным отделам зрительного анализатора.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Вит В. В. Строение зрительной системы человека / В. В. Вит. - Одесса: Астропринт, 2003. - 664 с.
2. Волков В. В. Глаукома при псевдонормальном давлении: Руководство для врачей / В. В. Волков. - М.: Медицина, 2001. - 352 с.
3. Ярилин А. А. Апоптоз и его роль в целостном организме / А. А. Ярилин // Глаукома. - 2003. - № 1. - С. 46-54.
4. Adalbert, R. Abeta, tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection / R. Adalbert, J. Gilley, M. P. Coleman // Trends Mol. Med. - 2007. - Vol. 13, № 4. - P. 135-142.

5. Atrophy of relay neurons in mango- and par-vocellular layers in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma / H. YQcel [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 2001. - Vol. 42, № 13. - P. 3216-3222.
6. Effects of retinal ganglion cell loss on mango-, parvo-. Koniocellular pathway in the lateral geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma / H. YQcel [et al.] // Prog. Retin. Eye Res. - 2003. - Vol. 22, № 4. - P. 465-481.
7. Gupta, N. Glaucoma and the brain / N. Gupta, Y. H. Yucel // J. Glaucoma. - 2001. - Vol. 10. - P. 28-29.
8. Hardy, J. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease / J. Hardy, D. Allsop // Trends Pharmacol. Sci. - 1991. - Vol. 12, № 10. - P. 383-388.
9. Human glaucoma and neuronal degeneration in the intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus and visual cortex of the brain / N. Gupta [et al.] // Br. J. of Ophthal. -2006. - Vol. 90. - P. 674-678.
10. Koniocellular pathway damage in glaucoma / Y. H. YQcel [et al.] // Glaucoma Today. - 2004. - Vol. 2. -P. 12-14.
11. Ley, N. Apoptosis and Parkinson's disease / N. Ley, E. Melamed, D. Offen // Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry. - 2003. - Vol. 27, № 2. - P. 245-250.
12. Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma / Y. H. YQcel [et al.] // Arch. Ophthalmol. - 2000. - Vol. 118, № 3. - P. 378-384.
13. McKinnon S. J. Glaucoma: ocular Alzheimer's disease? / S. J. McKinnon // Front Biosci. - 2003. - Vol. 8. -P. 1140-1156.
14. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases / G. B. Irvine [et al.] // Molecular medicine. - 2008. - Vol. 14. -No. 7-8. - P. 451-464.
15. Quigley H. A. Ganglion cell death in glaucoma: pathology recapitulates ontogeny / H. A. Quigley // Aust. NZJ Ophthalmol. - 1995. - Vol. 23, №. 2. - P. 85-91.
16. Quigley H. A. Neuronal death in glaucoma / H. A. Quigley // Prog. Retin. Eye Res. - 1999. - Vol. 18. -P. 39-57.
17. Reduced axonal transport and increased excitotoxic retinal ganglion cell degeneration in mice transgenic for human mutant P301S tau / N. D. Bull [et al.] // PLoS One. - 2012. - Vol. 7. - e34724.
18. Shimohama S. Apoptosis in Alzheimer's disease / S. Shimohama // Apoptosis. - 2000. - Vol. 5. - P. 9-16.
19. Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment / L. Guo [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2007. -Vol. 104. - P. 13444-13449.