

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ МОЗГА ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ 5xFAD

© 2022 г. Н. Л. Туманова¹, Д. С. Васильев¹ *, Н. М. Дубровская¹, Н. Н. Наливаева¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*E-mail: dvasilyev@bk.ru

Поступила в редакцию 15.12.2021 г.

После доработки 02.01.2022 г.

Принята к публикации 13.01.2022 г.

В настоящем исследовании у мышей трансгенной линии 5xFAD, моделирующих патогенез болезни Альцгеймера, проводили сравнительный анализ структурных и ультраструктурных изменений в нервной ткани обонятельных луковиц, гиппокампа и энторинальной коры, а также исследовали распределение основной амилоид-деградирующей нейропептидазы неприлизина (НЕП) относительно мышей дикого типа. Исследование структуры нервной ткани показало, что у трансгенных животных, характеризующихся усиленной продукцией амилоидного пептида А β , наблюдается нарастающая гибель нейронов головного мозга, вследствие чего прерываются связи между нейронами и нарушается нейронная сеть. Кроме того, проведенное нами электронномикроскопическое исследование обнаружило у мышей линии 5xFAD снижение плотности расположения синаптических контактов и дендритных шипиков, локальные очаги поражения нервной ткани, появление аутофаголизосом в нейропиле этих структур. Были выявлены признаки, указывающие на усиление нейродегенеративных процессов по сравнению с мышами дикого типа. У мышей линии 5xFAD имеет место изменение распределения амилоид-деградирующей пептидазы НЕП в энторинальной коре и в гиппокампе, а также снижение интенсивности ее окрашивания в энторинальной коре. У трансгенных мышей в возрасте 6 мес. также наблюдалось нарушение памяти при анализе в тесте распознавания новых объектов относительно мышей дикого типа.

Ключевые слова: трансгенные мыши 5xFAD, обонятельные луковицы, гиппокамп, энторинальная кора, ультраструктура, нейродегенерация, амилоидный пептид, неприлизин, распознавание нового объекта

DOI: 10.31857/S0041377122020080

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой многофакторное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся когнитивной дисфункцией, а также патологическим накоплением в ткани мозга амилоидного пептида (А β) и гиперфосфорилированного белка тау-1 (для обзора см. Lane et al., 2018). Трансгенные модели БА на животных, в частности на мышах, экспрессируют гены человека, которые содержат мутации, характерные для ранних, “семейных” форм БА, и повторяют ключевые особенности патологии А β и тау. Они позволяют получать ценную информацию о молекулярных и поведенческих нарушениях, характерных для пациентов с БА. Трансгенные мыши линии 5xFAD экспрессируют два гена человека: APP (ген белка-предшественника амилоидного пептида) с тремя типами мутаций (шведской (K670N, M671L), флоридской (I716V) и лондонской (V717I)), а также ген пресенилина 1 с мутациями (M146L и L286V), характерными для се-

мейных форм БА (FAD). Эти мутации приводят к накоплению в ткани мозга мышей амилоидных агрегатов, гибели нейронов и когнитивному дефициту (Oakley et al., 2006; Ohno et al., 2007). Растворимый А β ₄₂ обнаруживается в ткани мозга 5xFAD мышей уже к 1.5 мес., и его уровни резко повышаются с возрастом (Ohno et al., 2007). Уровни А β ₄₀ также увеличиваются с возрастом, но повышаются медленнее и значительно ниже, чем А β ₄₂, при этом соотношение А β ₄₂/А β ₄₀ достигает порядка 3.6 у самцов в возрасте 6 мес. и коррелирует с уровнем экспрессии трансгена APP (Oakley et al., 2006). Также у этих мышей увеличена экспрессия BACE1, ключевого фермента амилоидогенного пути превращения APP (Devi et al., 2010; Maarouf et al., 2013).

Из структурных нарушений ткани мозга трансгенных животных, помимо амилоидоза, наиболее часто отмечают дегенерацию и гибель нейронов, синаптопатии и нейровоспалительные процессы. По литературным данным, у 5xFAD мышей примерно на третьем месяце жизни одновременно с образованием бляшек начинает развиваться астроглиоз и микроглиоз (Oakley et al., 2006). В возрасте 6 мес. по-

Принятые сокращения: APP – предшественник β -амилоидного пептида; БА – болезнь Альцгеймера; А β – β -амилоидный пептид; PS1 – пресенилин 1; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

казана активация микроглии в коре и гиппокампе, которую авторы связывают с нарушением нейрональных функций и пластичности мозга (Mirzaei et al., 2016). Дегенерация синапсов, оцениваемая по уровням пресинаптического маркера синаптофизина, начинается во всем мозге к 4-мес. возрасту, а уровни другого пресинаптического маркера синтаксина и постсинаптического маркера PSD-95 снижаются к 9 мес. (Shao et al., 2011). Имеется мало информации о пространственно-временном паттерне или деталях потери синапсов, хотя есть данные, что в гиппокампе 12-мес. 5xFAD мышей наблюдается почти 50%-я потеря аксо-шиповых синапсов в *stratum lacunosum-moleculare*, в то время как количество синапсов в *stratum radiatum* не отличается от мышей дикого типа (Neuman et al., 2015). При этом данные об изменениях на ультраструктурном уровне на этой модели единичны (Park et al., 2017) и в основном подтверждают данные светооптических исследований, не касаясь специфических патологических процессов в самих клетках, что требует дальнейшего изучения.

Известно, что гибель нейронов у 5xFAD мышей наблюдается во многих областях мозга. В областях с наиболее тяжелым амилоидозом – субикулуме и кортикальном слое V – гибель нейронов начинается примерно в 6-мес. возрасте и коррелирует с накоплением $A\beta_{42}$ (Oakley et al., 2006; Eimer, Vassar, 2013). В этом же возрасте наблюдается уменьшение количества холинергических нейронов в базальной части переднего мозга (Devi, Ohno, 2010).

У 5xFAD мышей также наблюдаются существенные когнитивные нарушения. С помощью теста контекстуальной обусловленности страхом, было установлено нарушение памяти у 5xFAD мышей в возрасте 4–5 мес. При этом наблюдалось поражение гиппокампа, сопровождавшееся нарушением кратковременной и долговременной памяти (Kimura, Ohno, 2009; O'Leary et al., 2020). Тестирование трансгенных мышей в водном лабиринте Морриса показало, что в возрасте 6 мес. у них наблюдается увеличение времени поиска платформы, однако уровень фосфорилирования белка тау в гиппокампе повышался намного раньше, чем регистрировались нарушения памяти (Kanno et al., 2014). Это свидетельствует о том, что изменения на молекулярном уровне начинаются раньше формирования функциональных нарушений. Поскольку патогенез БА существенным образом связан с ранним нарушением обоняния (Murphy, 2019), исследования изменений обонятельной функции в процессе взросления трансгенных мышей и развития у них патологии БА представляет большой интерес. Однако число таких исследований довольно невелико, и они весьма противоречивы. Так, имеются данные, что нарушение обоняния имеет место только у самок трансгенных 5xFAD мышей и отсутствует у самцов (Roddick et al., 2016). Также у 5xFAD мышей не наблюдалось нарушения памяти на запахи (O'Leary et al., 2020). Тем не менее, имеются данные, что в процессе развития па-

тологии у этих мышей происходит дегенерация терминальных окончаний обонятельного нерва, вызванная не столько наличием внеклеточных депозитов $A\beta$, сколько накоплением в них APP (Cai et al., 2012). Также имеются данные о нарушении у 5xFAD мышей экспрессии транскрипта обонятельного рецептора Olf110/111 в коре и гиппокампе (Gaudel et al., 2018). Это свидетельствует о необходимости сопоставления патологических изменений в периферической и центральной частях обонятельного анализатора.

Накопление $A\beta$ в ткани мозга тесно связано с дефицитом содержания и активности в нервной ткани амилоид-деградирующего фермента неприлизина (НЕП) (для обзора см. Nalivaeva, Turner, 2019; Nalivaeva et al., 2020), который также является основным ферментом, регулирующим действие нейромедиатора соматостатина в обонятельной луковице (Nocera et al., 2019). Ранее нами было показано, что пренатальная гипоксия у крыс приводит к существенным изменениям структурной организации и архитектоники энторинальной коры, теменной коры и гиппокампа, в которых наблюдается снижение экспрессии НЕП как на уровне мРНК, так и белка, что коррелирует с нарушением их обоняния и когнитивных функций (Туманова и др., 2021; Vasilev et al., 2021). У трансгенных 5xFAD мышей также наблюдается снижение содержания НЕП в ткани мозга, коррелирующее с уровнем накопления $A\beta$ (Hüttenrauch et al., 2015), однако характер экспрессии НЕП в структурах конечного мозга этих мышей не изучался.

Цель настоящего исследования заключалась в проведении сравнительного анализа структурных и ультраструктурных изменений в обонятельных луковицах, гиппокампе и энторинальной коре, а также содержания и распределения в них НЕП, как у трансгенных мышей линии 5xFAD, так и у мышей дикого типа. Выбор для изучения структур конечного мозга был обусловлен их вовлеченностью в механизмы памяти (кора, гиппокамп) и работу обонятельного анализатора (обонятельные луковицы, энторинальная кора, гиппокамп) у грызунов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. В работе использовали самцов мышей двух линий C57Bl (C57Bl/6 – дикий тип) и 5xFAD (C57Bl6 – гемизиготы (Tg(APP^{SwFlon}, PSEN1*^{M146L}*^{L286V}) 6799Vas/J) – модель патологии альцгеймеровского типа) в возрасте 6 мес. из питомника “Черноголовка”. Животных содержали в стандартных условиях вивария ИЭФБ РАН при световом режиме (12 ч день/12 ч ночь) по 4–5 особей в клетке, со свободным доступом к воде и пище. Эксперименты осуществляли согласно протоколу использования лабораторных животных ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН, основанному на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Com-

munities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

Исследование памяти в тесте “Распознавание новых объектов”. В тестировании участвовали 6 мышей дикого типа и 10 мышей линии 5xFAD в возрасте 6 мес. В начале тестирования мышей в течение 5 мин адаптировали к условиям эксперимента, для чего их помещали на специальную площадку 500 × 500 мм², ограниченную непрозрачными стенками 200 мм высотой. Через 2 ч после адаптации, на экспериментальной площадке проводили тренировочное предъявление животному двух предметов в течение 5 мин. При последующем тестировании один объект заменяли новым предметом, а другой объект оставляли неизменным, но при этом меняли место его расположения. Через 1 и 24 ч после тренировки оценивали долговременную память, для чего животному предъявляли пару объектов, состоящую из известного и нового предметов. Регистрировали время, проведенное в непосредственном тактильном или обонятельном контакте животного с каждым объектом, и вычисляли индекс дискриминации, как отношение времени обнюхивания неизвестного (нового) предмета к времени обнюхивания известного:

$$\text{индекс дискриминации} = t_{\text{нового}}/t_{\text{известного}}$$

Все предметы были сделаны из толстого стекла, и после каждого предъявления их и экспериментальную площадку протирали 50%-ным раствором этилового спирта.

Световая микроскопия. Светооптическое исследование ткани мозга проводили на мышках дикого типа ($n = 8$) и линии 5xFAD ($n = 8$) в возрасте 6 мес. Ткань мозга фиксировали методом транскардиальной перфузии 10%-ным нейтральным формалином на фосфатном буфере (PBS, 4°C, pH 7.4). Замороженные фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм изготов-

ливали на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (4.0–2.5 мм от bregma), гиппокампа и энторинальной коры мозга (2.0–3.3 мм от bregma в каудальном направлении) (Paxinos, Franklin, 2001) (рис. 1а–в) и проводили комбинированное окрашивание по Нислю и красителем Конго Ред (4%-й водный раствор). С использованием микроскопа ImagerA (Zeiss, Германия) оценивали состояние нервной ткани мозга. Количественное сравнение клеток поля CA1 гиппокампа и энторинальной коры проводили на серии срезов толщиной 20 мкм; первый срез серии выбирался случайно, расстояние между последующими срезами в серии составляло 40 мкм. При проведении анализа использовали программу Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). По срезам (6 на каждое животное), содержащим дорсальный гиппокамп или энторинальную кору вычисляли средние величины общего количества клеток и количества нейронов (на участке ткани площадью 10000 мкм²) для каждого животного дикого типа (WT, $n = 8$) и линии 5xFAD ($n = 8$).

Электронная микроскопия. Для анализа мозг мышей (C57Bl $n = 5$, 5xFAD $n = 4$) фиксировали методом транскардиальной перфузии смесью 1%-го глутарового альдегида и 1%-го формальдегида на 0.1 М PBS, pH 7.4. Блоки, содержащие обонятельную луковицу, энторинальную кору или гиппокамп дополнительно фиксировали 1%-м OsO₄, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в аралдит по стандартному протоколу (Туманова и др., 2018). На ультратоме Leica (Leica Microsystems, Германия) изготавливали срезы исследуемых структур толщиной 500Å, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, США).

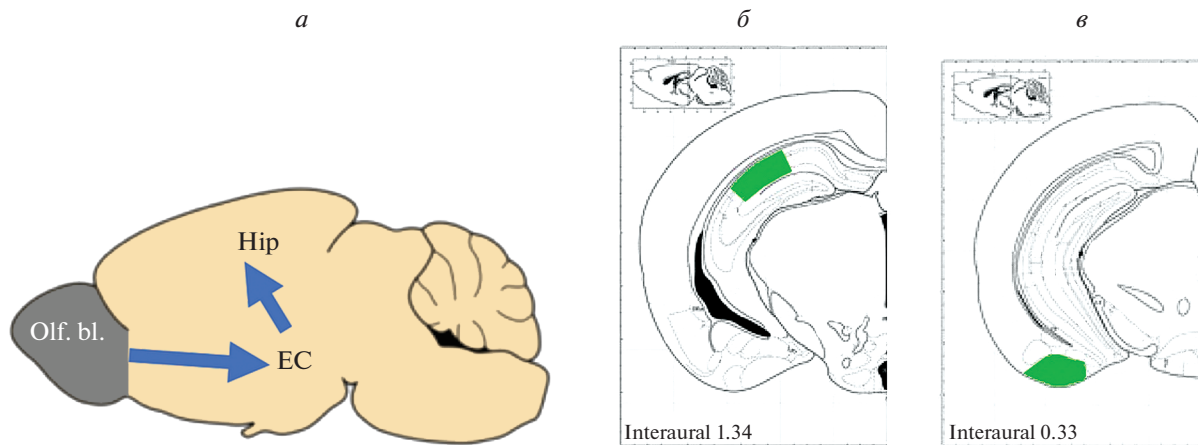


Рис. 1. Области интереса в обонятельных луковицах (Olf. bl.), энторинальной коре (EC) и гиппокампе (Hip) мозга мышей. Синими стрелками (а) показан восходящий путь от обонятельных луковиц к энторинальной коре и гиппокампу; светло-зеленым цветом обозначены области гиппокампа (б) и энторинальной коры (в), в которых исследовали экспрессию НЭП и амилоидоз.

Иммуногистохимия. Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (4.0–2.5 мм от bregma, рис. 1а), энторинальной области коры и поля CA1 дорзального гиппокампа (на уровне 2.0–3.3 и 4.5–5.5 мм от bregma соответственно, рис 1б, в) (Paxinos, Franklin, 2001) животных дикого типа ($n = 8$) и линии 5xFAD ($n = 8$). Мозг фиксировали раствором 10%-ного нейтрального формалина на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), затем изготавливали срезы на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Для снижения аутофлуоресценции срезы инкубировали в 0.1 М растворе глицина (SIGMA, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) под визуальным контролем до максимального ослабления свечения в диапазоне длин волн 490–550 нм. Блокировку неспецифического связывания антител осуществляли путем часовой инкубации в 2%-м растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), в который добавляли 0.01% Triton X-100 для пермеабиллизации клеточных мембран. Для иммуногистохимического исследования распределения НЕП использовали поликлональные антитела кролика Anti-CD10 (EPR5904, ab126593; Abcam, Великобритания, разведение 1 : 100). Визуализацию осуществляли с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител против IgG кролика (ab96902; Abcam, Великобритания, разведение 1 : 500). В качестве негативного контроля неспецифического связывания ставили иммунохимическую реакцию в отсутствие первичных антител для исследуемых областей мозга у каждого животного. В качестве позитивного контроля использовали ткань печени, характеризующейся высоким содержанием НЕП, взятой от мыши дикого типа. Иммунофлюоресцентное исследование выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флюорохрома FITC осуществляли светом He/Ar лазера при длине волны 488 нм. Свечение FITC регистрировали в диапазоне длин волн 496–537 нм. Яркость свечения FITC на поле нервной ткани площадью 10000 мкм² оценивали при помощи программы Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). Для каждого животного вычисляли среднее значение по 6 срезам. Нормировку полученных значений для каждого животного осуществляли путем вычета среднего значения для негативного контроля (иммунохимическая реакция в отсутствие первичных антител) и сравнивали средние нормированные значения уровня сигнала FITC для мышей дикого типа и линии 5xFAD.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ “SigmaStat 3.0”, используя непарный двусторонний t -критерий (unpaired two-tailed t -test), и непараметрический критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney U -test). Множественное сравнение проводили методом однофакторного

дисперсионного анализа (one-way ANOVA with Dunn’s post-hoc). Результаты представлены как среднее \pm SEM. Значимыми считались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологическое исследование структур мозга мышей дикого типа и линии 5xFAD. Обонятельные луковицы. При комбинированном окрашивании срезов мозга методом Ниссля и Конго Ред в обонятельных луковицах трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа были выявлены существенные различия в строении нервной ткани. На рис. 2б, в показаны сферические образования (амилоидные бляшки) размером от 0.1 до 1.3 мм, которые наблюдались либо в слое митральных клеток, либо в волокнистых слоях обонятельных луковиц у трансгенных мышей. У мышей дикого типа (рис. 2а) таких сферических образований не отмечено. Амилоидные образования были окружены большим количеством глиальных клеток. На рис. 2в внутри амилоидных образований заметны признаки деструкции клеточных тел и их отростков. На периферии этих образований наблюдались кровеносные сосуды. На электроннограммах обонятельной луковицы у трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа заметны локальные очаги поражения нервной ткани с признаками клеточной гибели: деструкция ядерной и цитоплазматической мембраны, разрушение митохондрий и других клеточных органелл и появление большого количества глиальных клеток. На рис. 2е, ж заметны расширения ЭПР у трансгенных мышей. В нейронах и нейропиле обонятельных луковиц этих мышей видно большое количество аутофаголisosом различных форм и размеров. Синаптических контактов в нейропиле обонятельных луковиц трансгенных мышей наблюдалось намного меньше, чем у мышей дикого типа (рис. 2г, д).

Поле CA1 дорзального гиппокампа. На препаратах, окрашенных комбинированным методом Ниссля и Конго Ред, в поле CA1 дорзального гиппокампа трансгенных мышей, по сравнению с мышами дикого типа, также выявлены различия в строении нервной ткани. На рис. 3б, в заметны амилоидные образования сферической формы. В гиппокампе амилоидные бляшки небольшого размера, около 0.1 мм и находятся, в основном, в волокнистых слоях. В пирамидном слое гиппокампа они встречаются реже. У мышей дикого типа они отсутствуют (рис. 3а). В гиппокампе трансгенных животных увеличено количество глиальных клеток. Внутри амилоидных образований заметны признаки деструкции клеточных тел и отростков нейронов, и глиальные клетки. Вблизи этих образований находятся кровеносные сосуды (рис. 3в). На электроннограммах поля CA1 дорзального гиппокампа у трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа отмечены очаги локального поражения нервной ткани с признаками

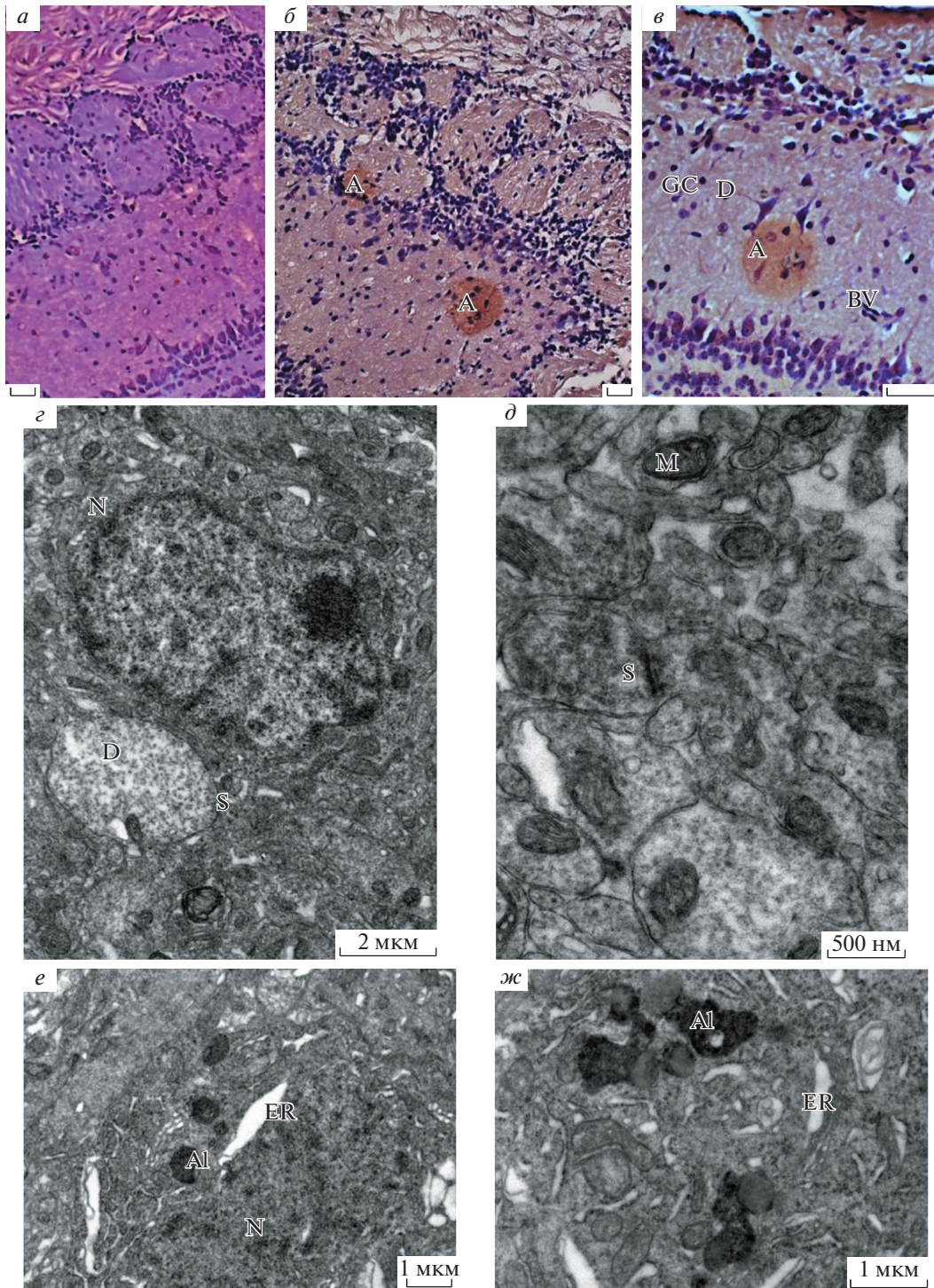


Рис. 2. Обонятельные луковицы у мышей дикого типа (*a, z, d*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*б, в, e, ж*) в возрасте 6 мес. *a–в* – Окраска Конго красным, масштабные отрезки – 30 мкм; *z–ж* – электроннограммы участков нейропиля с нейронами обонятельной луковицы. Обозначения: А – амилоидные образования (бляшки), D – дендриты, BV – кровеносные сосуды, GC – глиальные клетки, N – нейроны, S – синаптические контакты, M – митохондрии, ER – ЭПР, Al – аутофаголизосомы.

гибели клеток и их отростков (рис. 3*e, ж*). В цитоплазме нейронов замечены расширенные каналцы ЭПР. В нервных клетках, особенно в нейропиле гиппокампа, появляются аутофаголизосомы разных

размеров и форм (рис. 3*e, ж*). Синаптические контакты и шипики в нейропиле гиппокампа трансгенных мышей встречаются редко, в отличие от мышей дикого типа (рис. 3*z, d*).

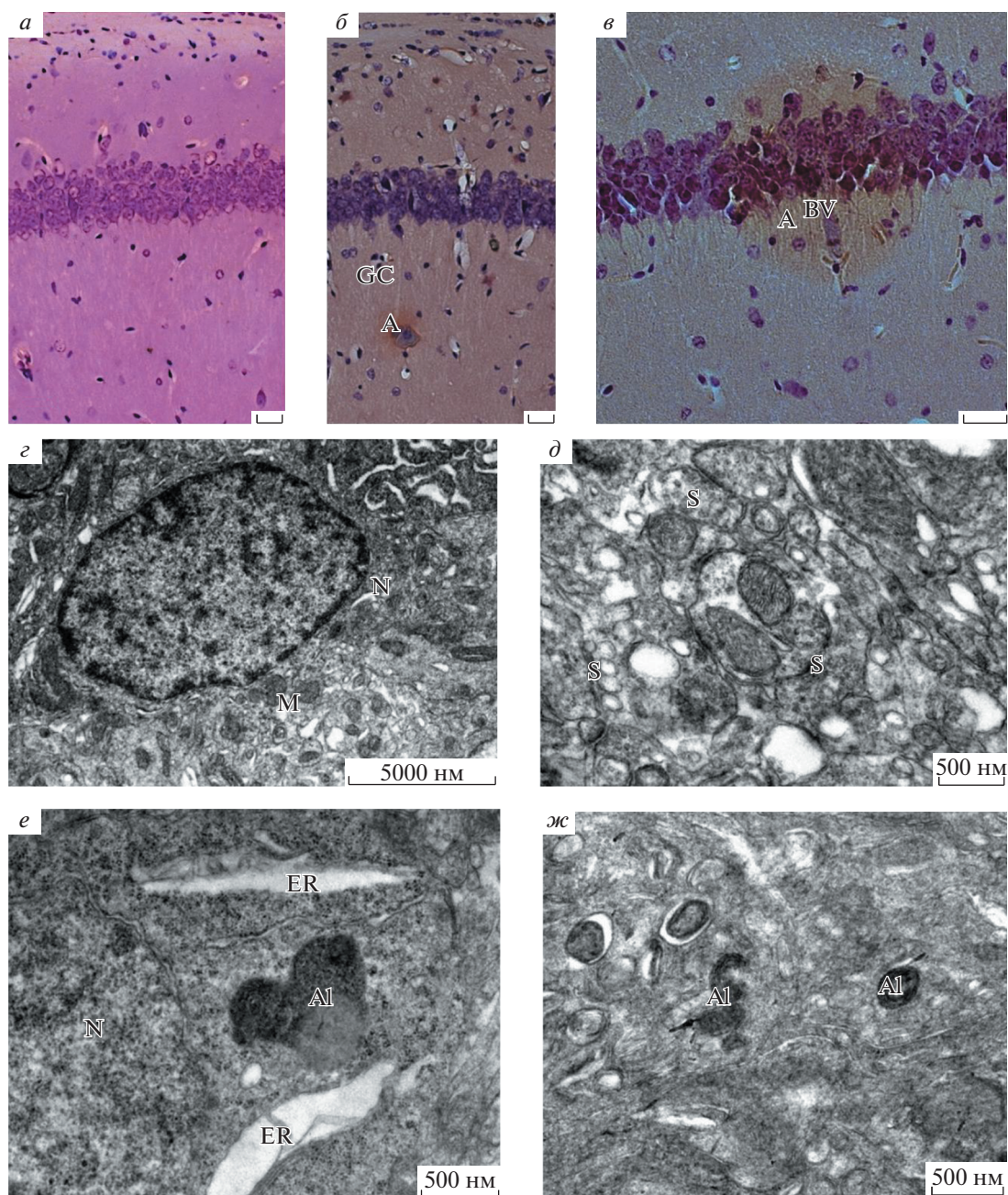


Рис. 3. Гиппокамп у мышей дикого типа (*a, z, d*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*б, в, e, ж*) в возрасте 6 мес. *a–в* – Окраска Конго Ред, масштабные отрезки 30 мкм; *z–ж* – электроннограммы участков нейропиля с нейронами гиппокампа мышей дикого типа (*z, d*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*e, ж*) с амилоидными образованиями и аутофаголизосомами (AI). Обозначения: A – амилоидные образования (бляшки), BV – кровеносные сосуды, GC – глиальные клетки, N – нейроны, S – синаптические контакты, M – митохондрии, ER – ЭПР, AI – аутофаголизосомы.

Энторинальная кора. Светооптическое исследование с использованием комбинированного окрашивания по методу Ниссля и Конго Ред выявило существенные различия в строении нервной ткани трансгенных мышей и мышей дикого типа. На рис. 4б–г в нервной ткани энторинальной коры заметно большее количество крупных амилоидных образований сферической формы. Их количество намного боль-

ше, чем в гиппокампе, и располагаются они, в основном, в клеточном слое. Заметно увеличение количества глиальных клеток (рис. 4б–г) по сравнению с мышами дикого типа (рис. 4а). На рис. 4б–г в крупных амилоидных образованиях представлены дегенеративные изменения нейронов, изогнутые потерявшие форму дендриты и глиальные клетки. На периферии амилоидных образований располагаются

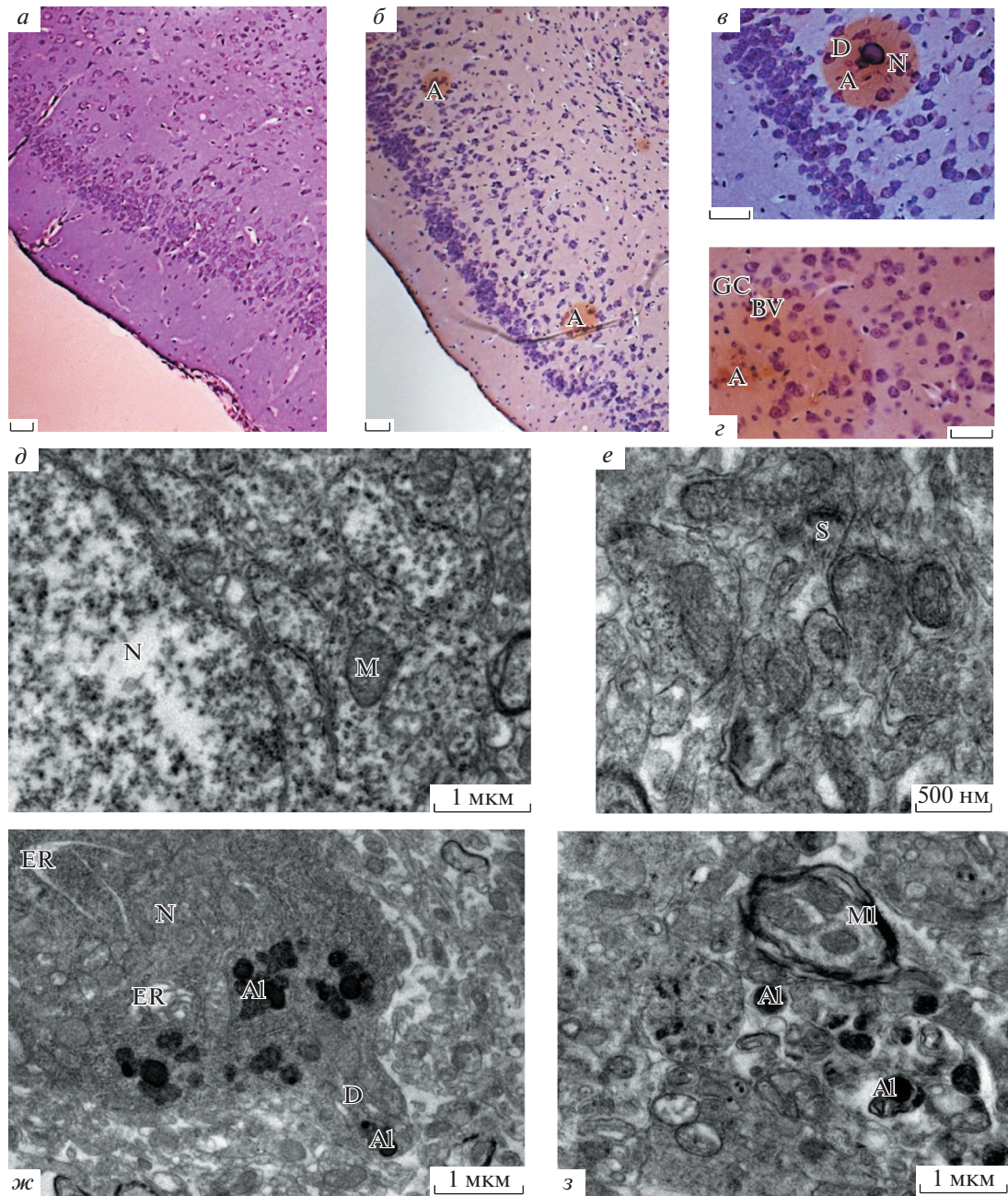


Рис. 4. Энторинальная кора у мышей дикого типа (*a, d, e*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*б–г, ж, з*) в возрасте 6 мес. *a–г* – Окраска Конго красным, масштабные отрезки – 30 мкм; *д–з* – электроннограммы участков нейропиля с нейронами энторинальной коры мышей дикого типа (*д, e*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*ж, з*) с амилоидными образованиями с аутофаголизосомами (Al). Обозначения A – амилоидные образования (бляшки), D – дендриты, BV – кровеносные сосуды, GC – глиальные клетки, N – нейроны, S – синаптические контакты, M – митохондрии, ER – ЭПР, MI – миелиновые волокна, Al – аутофаголизосомы.

кровеносные сосуды. На электроннограммах нервной ткани энторинальной коры трансгенных мышей при сравнении с мышами дикого типа обнаружены очаги локального поражения нервной ткани, которые выражаются в усилении нейродегенеративных изменений. На рисунке 4ж представлен нейрон сходящим от его тела дендритом с многочисленными

аутофаголизосомами. В нейропиле энторинальной коры трансгенных мышей в большом количестве также выявлены аутофаголизосомы различной формы (рис. 4ж, з). Более того, в этой части мозга заметно наличие расслоения миелиновой оболочки нервных отростков. Синаптических контактов и шипиков в энторинальной коре трансгенных мышей

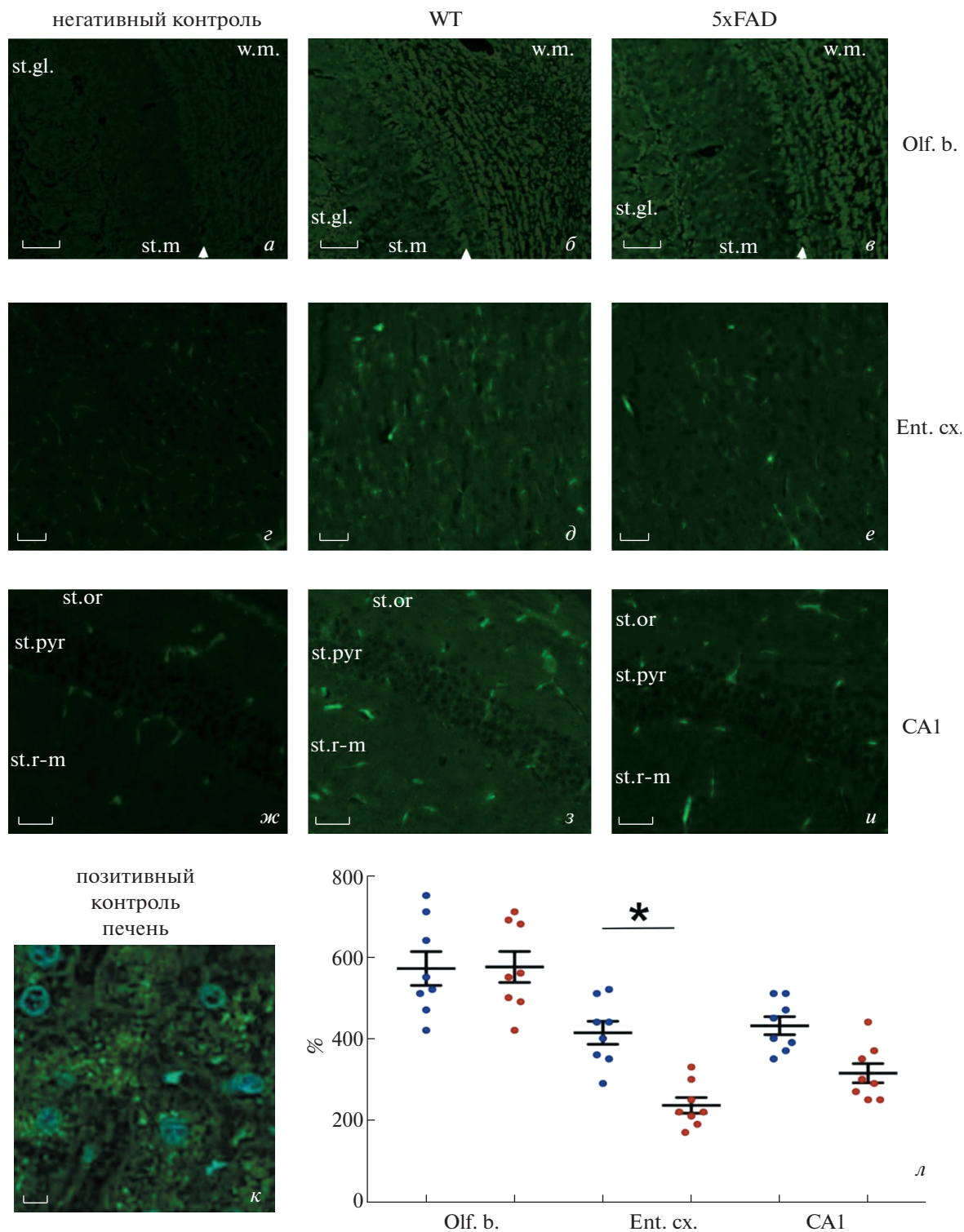


Рис. 5. Распределение металлопептидазы неприлизина (FITC-позитивный сигнал зеленого цвета) в ткани обонятельных луковиц (Olf. b., *a–в*), энторинальной коры (Ent. cx., *г–е*) и поля CA1 гиппокампа (CA1, *ж–и*) у 6-мес. мышей дикого типа (*б, д, з*) и мышей линии 5xFAD (*в, е, и*). *а, г, ж* – Негативный контроль иммуногистохимического окрашивания ткани мозга (в отсутствие первичных антител к неприлизу (НЕП) иммунохимическая реакция не наблюдается), *к* – позитивный контроль иммунохимической реакции на НЕП в ткани печени мыши дикого типа. Печень характеризуется высоким содержанием НЕП (зеленый цвет FITC-сигнала); ядра окрашены неспецифическим ядерным красителем DAPI (синий цвет). *л* – Результаты денситометрического анализа яркости свечения FITC-позитивных структур в ткани энторинальной коры (Ent. cx.), поля CA1 гиппокампа (CA1) и обонятельной луковицы (Olf. b.) мышей дикого типа (синие точки, *n* = 8) и мышей линии 5xFAD (красные точки, *n* = 8); данные представлены в виде среднего значения и его ошибки в % от уровня среднего значения свечения FITC в ткани негативного контроля; различия между группами животных достоверны при **p* < 0.05 (one-way ANOVA with Dunn’s post-hoc). Масштабные отрезки: 70 (*a–в*) и 50 (*г–и*) мкм.

намного меньше по сравнению с мышами дикого типа (рис. 4д, е).

Иммуногистохимическое исследование распределения НЭП. В обонятельных луковицах, энторинальной коре и гиппокампе мышей дикого типа и трансгенных животных линии 5xFAD выявлены статистически значимые различия в интенсивности иммуногистохимического окрашивания НЭП (Kruskal–Wallis test, $F_{5,47} = 34.7, p < 0.01$) (рис. 5). В энторинальной коре трансгенных мышей линии 5xFAD обнаружено статистически значимое снижение уровня флуоресцентного сигнала по сравнению с мышами дикого типа (Dunn’s post-hoc $p = 0.0088$). При этом достоверных различий в уровне сигнала в ткани поля СА1 гиппокампа ($p = 0.0711$) и обонятельных луковиц ($p = 0.99$) выявить не удалось. В обонятельных луковицах мышей из обеих групп наиболее выраженное иммунное окрашивание НЭП отмечалось в нейропиле белого вещества, телах и отростках митральных клеток, а также мелких клеток, диффузно располагающихся в молекулярном слое и по краям гламерул (рис. 5б, в). Следует отметить, что в энторинальной коре мышей дикого типа, помимо относительно равномерного окрашивания нейропиля, наблюдались многочисленные НЭП-позитивные тела пирамидных нейронов (рис. 5з), а у мышей линии 5xFAD таких нейронов было заметно меньше, и их количество составляло $44.5 \pm 6.1\%$ от уровня контроля (Mann–Whitney test $U = 21, p = 0.02$). В дорсальном гиппокампе мышей обеих исследованных групп иммунопозитивными были преимущественно интернейроны, тогда как в пирамидном слое поля СА1 отмечались лишь единичные иммунопозитивные клетки (рис. 5ж, з). Разницы в общем количестве иммунопозитивных клеток между группами не отмечалось (Mann–Whitney test $U = 3, p = 0.25$).

Исследование долговременной памяти в тесте “Распознавание новых объектов”. Сравнительный анализ поведения мышей линии 5xFAD и мышей дикого типа при предъявлении известных и новых объектов показал, что у трансгенных мышей в возрасте 6 мес. нарушена долговременная память. Было выявлено, что мыши дикого типа уделяли больше внимания исследованию новых объектов, при этом через 1 ч после тренировочного предъявления объектов индекс дискриминации составлял 2.44, а через 1 сут снижался (Mann–Whitney test $U = 138.5, p = 0.013$) до 1.30. В то же время у трансгенных мышей индекс дискриминации был ниже по сравнению с диким типом: на 55% через 1 ч (Mann–Whitney test $U = 25, p = 0.006$) и на 44% через 24 ч после тренировки (t -test $t = 2.3, p = 0.037$) и приближался к 1, что свидетельствует об отсутствии предпочтения между новыми и известными объектами (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное исследование нервной ткани обонятельных луковиц, а также входящих в общий гиппо-

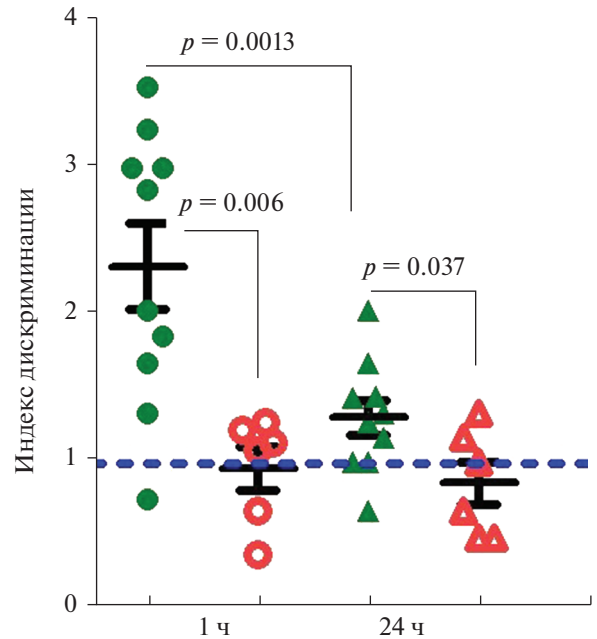


Рис. 6. Сравнительный анализ уровня исследовательской деятельности в отношении нового объекта у мышей линии 5xFAD ($n = 10$) и дикого типа ($n = 6$). По вертикали – индекс дискриминации, вычисленный как частное чисел, отражающих время обнюхивания неизвестного (нового) и известного предметов. По горизонтали – время, прошедшее после тренировочного предъявления пары объектов. Над горизонтальными линиями, соединяющими сравниваемые группы животных, обозначен уровень значимости выявленных межгрупповых различий. Данные о животных дикого типа показаны зелеными кружками (1 ч) и треугольниками (24 ч), данные по животным линии 5xFAD представлены белыми кружками (1 ч) и треугольниками (24 ч) с красными границами. Пунктирной горизонтальной линией обозначен уровень, при котором наблюдается равнозначное предпочтение нового и известного объектов.

кампальный комплекс гиппокампа и энторинальной коры у мышей линии 5xFAD и дикого типа (рис. 1), с использованием светооптического, электронномикроскопического и иммуногистохимического методов показало наличие существенных различий в их ультраструктуре. У трансгенных мышей 5xFAD в возрасте 6 мес. в этих трех структурах на светооптическом уровне были обнаружены амилоидные сенильные бляшки, как в клеточных, так и в волокнистых слоях, которые не наблюдались у мышей дикого типа. У 5xFAD мышей в очагах поражения головного мозга, где концентрируются бляшки, увеличено количество глиальных клеток, свидетельствующее о нейровоспалительном процессе. Нейроны и их дендриты подвергаются дегенеративным изменениям, происходит гибель клеток и прерываются межнейронные связи. Кроме того, проведенное нами электронномикроскопическое исследование обнаружило локальные очаги поражения нервной ткани,

появление аутофаголизосом в этих структурах, которые еще раз указывают на усиление нейродегенеративных процессов. У трансгенных мышей, по сравнению с мышами дикого типа, уменьшается число синаптических контактов и шипиков. Все эти изменения, обнаруженные нами, свидетельствуют об очевидном нарушении функционирования нейрональной сети как обонятельных луковиц, так и энторинальной коры и гиппокампа. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов, показавших гибель нейронов во многих областях мозга (Oakley et al., 2006; Eimer, Vassar, 2013), а также развитие астро- и микроглиоза, которое идет параллельно с образованием амилоидных бляшек (Oakley et al., 2006).

В проведенном нами исследовании выявлено нарушение долговременной памяти у трансгенных мышей в тесте распознавание нового объекта (NOR), который широко используется для исследования изменений памяти у животных (Antunes, Biala, 2012). Общеизвестно, что на результаты NOR тестирования влияют как гиппокампальные, так и кортикальные нарушения (Cohen, Stackman, 2015). Исследования на приматах и грызунах показали, что для распознавания визуальных объектов очень важны парагиппокампальные области височной доли, а именно периринальная, энторинальная и нижняя височная кора (Hammond et al., 2004). В нашем исследовании у мышей линии 5xFAD были обнаружены существенные ухудшения долговременной памяти при распознавании визуальных объектов вместе с структурными изменениями, наблюдаемыми в энторинальной коре и гиппокампе.

Наличие существенных изменений в исследованных структурах мозга указывает на то, что у 5xFAD мышей имеет место нарушение нейрональных связей, что не может не сказаться на формировании их обонятельной функции. Полученные нами данные также свидетельствуют, о том, что у 5xFAD мышей имеет место нарушение распознавания запаха масла валерианы (Vasilev et al., 2022), один из составляющих компонентов которого – изовалериановая кислота, имеет феромональную значимость для мышей (Мельник и др., 2009).

Полученные нами данные об изменении распределения амилоид-деградирующего фермента НЕП в ткани исследуемых нами структур мозга мышей линии 5xFAD по сравнению с диким типом позволяют предположить, что снижение уровня содержания НЕП в энторинальной коре может быть одной из причин нарушения деградации растворимых форм амилоидного пептида, который при его накоплении активно образует амилоидные агрегаты (Nalivaeva, Turner, 2019). Кроме того, в структурах мозга трансгенных мышей нами выявлено нарушение числа синаптических контактов, которые, по имеющимся представлениям, являются основными местами локализации и действия НЕП (Наливаева и др., 2020), что может нарушать нормальное функционирование

этого фермента и доступность его субстратов, к числу которых относятся А β и соматостатин. С этой точки зрения представляет также интерес в будущем проанализировать уровень содержания и распределения соматостатина в обонятельном анализаторе 5xFAD мышей, поскольку есть данные, что у пациентов с БА имеет место нарушение его распределения в переднем обонятельном ядре (Saiz-Sanchez et al., 2010).

Проведенное нами исследование является важным шагом на пути к пониманию молекулярно-клеточных нарушений при патологии нервной ткани, вызванной накоплением амилоидного пептида. Особый интерес представляют результаты электронно-микроскопического исследования ткани мозга трансгенных мышей, показавшего, что накопление амилоидных отложений сопровождается развитием аутофагии, о чем свидетельствует наличие большого числа аутофаголизосом различных форм и размеров во всех исследованных нами участках мозга. Существует ряд гипотез о том, что в ходе развития БА происходит нарушение молекулярных механизмов образования аутофаголизосом (Reddy, Oliver, 2019), которое приводит к их накоплению в теле и отростках нейрона (Wang et al., 2018). Данные литературы согласуются с наблюдаемым нами накоплением аутофагосом и аутофаголизосом в нервных клетках. Однако доказательство активации аутофагии в нейронах у мышей линии 5xFAD требует проведения специального исследования с привлечением данных о динамике специфических маркерных белков (Atg-комплекс, Beclin-1, Lamp-1, Lamp-2, LC3 и др.). Так или иначе, результаты проведенного исследования впервые четко показывают накопление аутофаголизосом в нейронах кортикальных структур мозга мышей линии 5xFAD и свидетельствуют о вовлечении аутофагии в механизмы нейродегенеративных процессов у таких животных, что указывает на перспективность исследования аутофагии на данной модели.

Еще одним новым наблюдением в нашем исследовании является обнаружение различного характера клеточной локализации НЕП в исследуемых структурах, свидетельствующее, что в гиппокампе мышей НЕП-позитивными являются преимущественно интернейроны, а в энторинальной коре – тела пирамидных нейронов. При этом в обонятельных луковицах НЕП имеет более широкую локализацию: в нейропиле белого вещества, в телах и отростках митральных клеток и в мелких клетках гломерулярного слоя. Все это указывает на то, что локализация НЕП в разных популяциях клеток и структурах мозга различна, что, вероятно, отражает специфический характер распределения его субстратов. Различия в распределении НЕП у трансгенных животных и мышей дикого типа может свидетельствовать о нарушении его внутриклеточного транспорта и локализации, что наблюдалось нами в нервных клетках при гипоксии (Fisk et al., 2007).

Несмотря на то, что различные трансгенные модели БА различаются по своим характеристикам и не могут полностью отражать патогенез БА у человека, они дают возможность исследовать основополагающие молекулярные механизмы нарушений, вызываемых усиленной продукцией и накоплением амилоидного пептида, что делает их важным инструментом для исследований и тестирования фармакологических препаратов (Yang et al., 2017).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Центру коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований (ЦКП) ИЭФБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00232) и частично Госзадания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ АААА-А18-118012290373-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом использования лабораторных животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, основанным на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86 / 609 for the Care of Laboratory Animals).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Т.Н.Л.: морфологические исследования, написание статьи; В.Д.С.: морфологические и иммуногистохимические исследования, статистическая обработка данных; Д.Н.М.: поведенческие эксперименты и статистическая обработка данных, Н.Н.Н.: анализ данных, написание и редактирование текста статьи, общее руководство выполнением работы. Текст и графические изображения статьи одобрены всеми соавторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н. 2009. Возрастные изменения обонятельной чувствительности самцов мышей к запаху изовалериановой кислоты. Сенс. Сист. Т. 23. P. 151. (Melnik S.A., Gladysheva O.S., Krylov V.N. 2009. Age-related changes in the olfactory sensitivity of male mice to the smell of isovaleric acid. Sensory Systems. V. 23. P. 151.)

Наливаева Н.Н., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Turner A.J., Журавин И.А. 2020. Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory. Рос. физиол. журнал. им. И.М. Сеченова. Т. 106. № 10. С. 1191. (Nalivaeva N.N., Vasiliev D.S., Dubrovskaya N.M., Turner A.J., Zhuravin I.A. 2020. Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory. Russian J. Physiol. V. 106. P. 1191.)

Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Журавин И.А. 2018. Ультраструктурные изменения в сенсомоторной коре при отставании развития двигательного поведения в раннем онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию. Цитология. Т. 60. № 5. С. 390. (Tumanova N.L., Vasiliev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. 2018. Changes in ultrastructure of the sensorimotor cortex accompanied by the motor behavior dysfunctions in the early ontogenesis of rats subjected to the prenatal hypoxia. Tsitologiya. V. 60. P. 390.)

Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н., Журавин И.А. 2021. Влияние пренатальной гипоксии на цитоархитектонику и ультраструктурную организацию структур мозга, связанных с обонятельной функцией у крыс. Цитология. Т. 63. № 2. С. 163. (Tumanova N.L., Vasiliev D.S., Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A. 2021. Effect of prenatal hypoxia on cytoarchitectonics and ultrastructural organisation of brain regions related to olfaction in rats. Tsitologiya. V. 63. P. 193.)

Antunes M., Biala G. 2021. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn. Process. V. 13. P. 93.

Cai Y., Xue Z.Q., Zhang X.M., Li M.B., Wang H., Luo X.G., Cai H., Yan X.X. 2012. An age-related axon terminal pathology around the first olfactory relay that involves amyloidogenic protein overexpression without plaque formation. Neuroscience. V. 215. P. 160.

Cohen C.J., Stackman R.W. Jr. 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. Behav. Brain Res. V. 285. P. 105.

Devi L., Alldred M.J., Ginsberg S.D., Ohno M. 2010. Sex- and brain region-specific acceleration of β -amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. Mol. Brain. V. 3. P. 34.

Devi L., Ohno M. 2010. Phospho-eIF2 α level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. PLoS One. V. 5. P. e12974.

Eimer W.A., Vassar R. 2013. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. Mol. Neurodegener. V. 8. P. 2.

Fisk L., Nalivaeva N.N., Boyle J.P., Peers C.S., Turner A.J. 2007. Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes. Neurochem. Res. V. 32. P. 1741.

Gaudel F., Stephan D., Landel V., Sicard G., Féron F., Guiraudie-Capraz G. 2018. Expression of the cerebral olfactory recep-

- tors Olfr110/111 and Olfr544 is altered during aging and in Alzheimer's disease-like mice. *Mol. Neurobiol.* V. 56. P. 2057.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1196-4>
- Hammond R.S., Tull L.E., Stackman R.W. 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* V. 82. P. 26.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005>
- Hüttenrauch M., Baches S., Gerth J., Bayer T.A., Weggen S., Wirths O. 2015. Nprilysin deficiency alters the neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* V. 44. P. 1291.
<https://doi.org/10.3233/JAD-142463>
- Kanno T., Tsuchiya A., Nishizaki T. 2014. Hyperphosphorylation of Tau at Ser396 occurs in the much earlier stage than appearance of learning and memory disorders in 5XFAD mice. *Behav. Brain Res.* V. 274. P. 302.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.034>
- Kimura R., Ohno M. 2009. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol. Dis.* V. 33. P. 229.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.006>
- Lane C.A., Hardy J., Schott J.M. 2018. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* V. 25. P. 59.
<https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Maarouf C.L., Kokjohn T.A., Whiteside C.M., Macias M.P., Kalback W.M., Sabbagh M.N., Beach T.G., Vassar R., Roher A.E. 2013. Molecular differences and similarities between Alzheimer's disease and the 5XFAD transgenic mouse model of amyloidosis. *Biochem. Insights.* V. 6. P. 1.
<https://doi.org/10.4137/BCI.S13025>
- Mirzaei N., Tang S.P., Ashworth S., Coello C., Plisson C., Passchier J., Selvaraj V., Tyacke R.J., Nutt D.J., Sastre M. 2016. In vivo imaging of microglial activation by positron emission tomography with [(11)C]PBR28 in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. *Glia.* V. 64. P. 993.
<https://doi.org/10.1002/glia.22978>
- Murphy C. 2019. Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* V. 15. P. 11.
<https://doi.org/10.1038/s41582-018-0097-5>
- Nalivaeva N.N., Turner A.J. 2019. Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.* V. 176. P. 3447.
<https://doi.org/10.1111/bph.14593>
- Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A., Turner A.J. 2020. Nprilysin expression and functions in development, ageing and disease. *Mech. Ageing Dev.* V. 192. P. 111363.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111363>
- Neuman K.M., Molina-Campos E., Musial T.F., Price A.L., Oh K.J., Wolke M.L., Buss E.W., Scheff S.W., Mufson E.J., Nicholson D.A. 2015. Evidence for Alzheimer's disease-linked synapse loss and compensation in mouse and human hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct. Funct.* V. 220. P. 3143.
<https://doi.org/10.1007/s00429-014-0848-z>
- Nocera S., Simon A., Fiquet O., Chen Y., Gascuel J., Datiche F., Schneider N., Epelbaum J., Viollet C. 2019. Somatostatin serves a modulatory role in the mouse olfactory bulb: Neuroanatomical and behavioral evidence. *Front. Behav. Neurosci.* V. 13. P. 61.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00061>
- O'Leary T.P., Stover K.R., Mantolino H.M., Darvesh S., Brown R.E. 2020. Intact olfactory memory in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease from 3 to 15 months of age. *Behav. Brain Res.* V. 393. P. 112731.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112731>
- Oakley H.O., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vassar R. 2006. Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* V. 26. P. 10129.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Ohno M., Cole S.L., Yasvoina M., Zhao J., Citron M., Berry R., Disterhoft J.F., Vassar R. 2007. BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* V. 26. P. 134.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.008>
- Park S.W., Im S., Jun H.O., Lee K., Park Y.J., Kim J.H., Park W.J., Lee Y.H., Kim J.H. 2017. Dry age-related macular degeneration like pathology in aged 5XFAD mice: Ultrastructure and microarray analysis. *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 40006
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16967>
- Paxinos G., Franklin K.B.J. 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd Edition, Academic Press, San Diego.
- Reddy P.H., Oliver D.M. 2019. Amyloid β and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease. *Cells.* V. 8. P. 488.
<https://doi.org/10.3390/cells8050488>
- Roddick K.M., Roberts A.D., Schellinck H.M., Brown R.E. 2016. Sex and genotype differences in odor detection in the 3 \times Tg-AD and 5XFAD mouse models of Alzheimer's disease at 6 months of age. *Chem. Senses.* V. 41. P. 433.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjw018>
- Saiz-Sanchez D., Ubeda-Bañon I., de la Rosa-Prieto C., Argandoña-Palacios L., García-Muñozguren S., Insausti R., Martínez-Marcos A. 2010. Somatostatin, tau, and β -amyloid within the anterior olfactory nucleus in Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* V. 223. P. 347.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.010>
- Shao C.Y., Mirra S.S., Sait H.B., Sacktor T.C., Sigurdsson E.M. 2011. Postsynaptic degeneration as revealed by PSD-95 reduction occurs after advanced A β and tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* V. 122. P. 285.
<https://doi.org/10.1007/s00401-011-0843-x>
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A., Nalivaeva N.N. 2021. Developmental profile of brain neprilysin expression correlates with olfactory behaviour of rats. *J. Mol. Neurosci.* V. 71. P. 1772.
<https://doi.org/10.1007/s12031-020-01786-3>
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Nalivaeva N.N. 2022. Analysis of expression of the amyloid-degrading enzyme neprilysin in brain structures of 5xFAD transgenic mice. *J. Evol. Biochem. Physiol.* V. 108. P. 417.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022010173>
- Wang C., Telpoukhovskaia M.A., Bahr B.A., Chen X., Gan L. 2018. Endo-lysosomal dysfunction: A converging mechanism in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurobiol.* V. 48. P. 52.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.005>
- Yang Z., Kuboyama T., Tohda C. 2017. A systematic strategy for discovering a therapeutic drug for Alzheimer's disease and its target molecule. *Front. Pharmacol.* V. 8. P. 340.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00340>

Morphofunctional Changes in the Brain Tissue of 5xFAD Transgenic Mice**N. L. Tumanova^a, D. S. Vasiliev^{a, *}, N. M. Dubrovskaya^a, and N. N. Nalivaeva^a**^a*Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia***e-mail: dvasilyev@bk.ru*

In the present study, we performed a comparative analysis of structural and ultrastructural changes in the nervous tissue of the olfactory bulbs, hippocampus, and entorhinal cortex in 5xFAD transgenic mice that model the pathogenesis of Alzheimer's disease, and also investigated the distribution of the main amyloid-degrading neuropeptidase neprilysin (NEP) relative to wild-type mice. The study of the structure of the nervous tissue showed, that in transgenic animals characterized by increased production of amyloid peptide A β , there is an increasing death of brain neurons, as a result of which the neural network is disrupted. In addition, electron microscopy study revealed in 5xFAD mice a decrease of the density of synaptic contacts and dendritic spines, local foci of the nervous tissue damage, the appearance of autophagolysosomes in the neuropil of the tissue. Some features of the neurodegenerative processes were shown compared to wild-type mice. In 5xFAD mice, there were a change in the distribution of amyloid-degrading peptidase NEP in the entorhinal cortex and in the hippocampus, as well as a decrease in the intensity of its staining in the entorhinal cortex. In transgenic mice at the age of 6 months, some memory impairment was observed when analyzed in a novel object recognition test relative to wild-type mice.

Keywords: 5xFAD transgenic mice, olfactory bulbs, hippocampus, entorhinal cortex, ultrastructure, neurodegeneration, amyloid peptide, neprilysin, novel object recognition test