

НЕЙРОГЕНЕЗ В НЕЙРОГЕННЫХ НИШАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА ДОСИМПТОМАТИЧЕСКОЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

© 2023 г. А. С. Аверчук^{1, *}, М. В. Рязанова¹, Н. А. Розанова¹, Н. А. Колотьева¹,
А. В. Ставровская¹, С. В. Новикова¹, А. Б. Салмина¹

¹Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

*E-mail: antonaverchuk@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.03.2023 г.

После доработки 22.04.2023 г.

Принята к публикации 25.04.2023 г.

Расшифровка механизмов развития нейродегенерации на досимптоматической стадии – актуальная задача, решение которой позволит оптимизировать методы ранней диагностики и профилактики болезни Альцгеймера (БА). В настоящей работе изучены особенности нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга при экспериментальной БА на досимптоматической стадии нейродегенерации. Было осуществлено моделирование БА *in vivo* у экспериментальных животных (мышей-самцов, C57BL/6 в возрасте 8 мес.). Для этого контрольной группе ($n = 30$) в поле CA1 гиппокампа вводили по 2 мкл раствора 0.9%-ного NaCl, а экспериментальной группе, ($n = 30$) – 1М раствор (2 мкл билатерально) олигомеризованного бета-амилоида 25–35 (A β 25–35). Оценку нарушений когнитивных функций у животных осуществляли с использованием теста условной реакции пассивного избегания (УРПИ). Для иммуногистохимического исследования использовали замороженные срезы головного мозга, в которых анализировали изменения экспрессии маркеров Nestin, Pax6, NeuroD1, VEGFR2; апоптоз клеток оценивали по протоколу TUNEL в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) и субвентрикулярной зоне (SVZ). Были установлены разнонаправленные изменения экспрессии маркеров нейрогенеза, неоангиогенеза и выраженность апоптоза в SGZ и SVZ в период 9–17 сут после интрагиппокампального введения A β 25–35. На 9-е сут развития нейродегенерации альцгеймеровского типа была увеличена экспрессия Pax6 и VEGFR2 в SGZ и Nestin в SVZ. Последующее применение протокола УРПИ с предъявлением аверсивного раздражителя (10-е сут) или соответствующего контекста (11- и 17-е сут) приводило к динамическим изменениям экспрессии маркеров клеток, находящихся на разных стадиях нейрогенеза. Таким образом, на досимптоматической стадии развития нейродегенерации альцгеймеровского типа зоны SGZ и SVZ проявляют признаки aberrантного нейрогенеза, связанного с нарушением пула стволовых и прогениторных клеток и подавлением производства нейробластов (незрелых нейронов) в период, предшествующий формированию когнитивной дисфункции.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, нейрогенез, нейрогенная ниша, субгранулярная зона, субвентрикулярная зона

DOI: 10.31857/S004137712304003X, **EDN:** ZFKNDM

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее дегенеративное заболевание центральной нервной системы. Это одно из наиболее распространенных неврологических патологий, часто встречающихся у пожилых людей. Основными клиническими проявлениями являются прогрессирующая деменция, снижение памяти и когнитивных функций. Ключевыми патологическими признаками являются внеклеточное накопление β -амилоида

(A β) и внутриклеточная аккумуляция тау-белка, индуцирующие или сопровождающие развитие митохондриальной дисфункции, кальциевый дисбаланс, окислительный стресс, клеточную гибель, нарушения пластичности (Jack et al., 2013). Нейрогенез головного мозга взрослых млекопитающих происходит в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) и в субвентрикулярной зоне (SVZ), чье микроокружение, в том числе формируемое клетками глиальной и эндотелиальной природы, регулирует поддержание пула нейральных стволовых клеток (НСК), их пролиферацию и дифференцировку с последовательным образованием нейральных прогениторных клеток (НПК), нейробла-

Принятые сокращения: БА – Болезнь Альцгеймера; НПК – нейральные прогениторные клетки; НСК – нейральные стволовые клетки; УРПИ – условная реакция пассивного избегания; A β 25–35 – β -амилоид 25–35; SGZ – субгранулярная зона гиппокампа; SVZ – субвентрикулярная зона.

стов, постмитотических незрелых и зрелых нейронов (Ning et al., 2021).

Подавление нейрогенеза при болезни Альцгеймера является экспериментально доказанным феноменом (Моргун и др., 2019), что связывают с прямым токсическим действием олигомеров A β на стволовые клетки нейрогенных ниш (Scora et al., 2020), нарушением продукции гуморальных регуляторов нейрогенеза (Eu et al., 2021) и процессов миграции нейробластов и незрелых нейронов в ткани мозга (Esteve et al., 2022). Вместе с тем зарегистрированы и признаки интенсификации нейрогенеза при развитии болезни Альцгеймера у экспериментальных животных (Steinman et al., 2021), что связывают с запуском компенсаторных механизмов на ранних этапах нейродегенерации.

Цель исследования заключалась в изучении особенности нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера на стадии развития нейродегенерации, предшествующей проявлению когнитивного дефицита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Эксперименты проведены на мышах в возрасте 8 мес. линии C57BL/6 (самцах весом 25–30 г) из питомника филиала “Андреевка” (Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России). Животных содержали в условиях вивария с неограниченным количеством пищи и воды при 12-часовом режиме освещенности.

Моделирование нейродегенерации *in vivo*. Было осуществлено моделирование БА *in vivo* у животных с применением стереотаксической операции (экспериментальная и контрольная группы) с использованием рамы двойного лабораторного стереотаксического манипулятора (Stoelting, США). Анестезировали животных с помощью Золетила-100 (Virbac Sante Animale, Франция) и раствора Ксила (Interchemie Werken “de Adelaar” BV”, Нидерланды), разведенных в физиологическом растворе в соотношении 1 : 4 (1.5 мг действующего вещества на 25 г веса животного) и 1 : 2 (0.6 мг действующего вещества на 25 г веса животного) соответственно. Контрольной группе из 30 животных (ложно-оперированных) через просверленные в черепе отверстия в соответствии с координатами атласа мозга мышей (AP – 2.0; ML – 1.9; DV – 1.3; билатерально) в поле CA1 гиппокампа вводили по 2 мкл раствор 0.9%-ного NaCl. Экспериментальной группе ($n = 30$) вводили по 2 мкл билатерально 1 М раствора олигомеризованного бета-амилоида A β 25–35 (Sigma-Aldrich, США) в 0.9%-ном NaCl по соответствующим координатам. Общее время наблюдения за животными обеих групп составило 38 сут с момента интрагиппокампального введения пептида или растворителя.

Верификацию модели и оценку формирования когнитивного дефицита осуществляли с использованием теста условной реакции пассивного избегания (УРПИ) и программы ShutAvoid 1.8.03 на установке Panlab Harvard Apparatus (Испания) по стандартному протоколу. На 10-е сут моделирования БА животное получало неизбегаемое болевое воздействие. Применение электрического шока умеренной интенсивности (0.2 мА, 3 с) в темном отсеке обеспечивает обучение животного подавлению естественного поведения для грызунов и предотвращает переход их в темную зону из светлой. На следующий день (11-е сут после моделирования БА) и далее на 17-, 24-, 38-е сут оценивали нарушение памяти, учитывали время перехода мыши из светлой зоны камеры в темную (контекстная память без предъявления аверсивного раздражителя). В каждую временную точку (через 1 ч после теста УРПИ) производили выведение животных из эксперимента методом цервикальной дислокации в виварии под наблюдением ветеринарного врача и осуществляли забор биоматериала для последующего исследования.

Приготовление срезов и иммуногистохимия. Мозг фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине (Histoline, Россия). Образцы хранили при 4°C в холодильнике. Для иммуногистохимического исследования использовали замороженные срезы головного мозга толщиной 10 мкм для максимального прокрашивания, изготовленные при помощи криостата (Tissue-Tek® Cryo3; Sakura-Finetek, Япония), в которых идентифицировались зоны SGZ и SVZ.

Срезы ткани на стекле отмывали по 5 мин в фосфатно-солевом буфере (PBS), после чего пермеабелизовали в 0.1%-ном растворе Тритона X-100 (Calbiochem Biochemicals, США) в PBS и 2%-ного бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma, США) 1 ч при комнатной температуре. Затем трехкратно промывали в PBS и в течение ночи при 4°C инкубировали с антителами (Abcam, Великобритания): мышинными моноклональными против маркера стволовых клеток Nestin (ab254048; разведение 1 : 500); с кроличьими моноклональными против маркера пролиферирующих клеток Pax6 (ab195045; 1 : 500); с кроличьими моноклональными против NeuroD1 (ab109224; 1 : 500) и кроличьими поликлональными против VEGFR2 (ab39638; 1 : 75) и разведенными в ИНС Diluent (Novocastra, Leica, Великобритания) для блокировки неспецифического связывания. Затем срезы промывали в 0.1%-ном растворе Тритона X-100 в PBS три раза по 5 мин с последующим 2-часовым инкубированием со вторичными конъюгированными с Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594 ослиными и козыми антителами против кроличьего и мышинного IgG (Abcam, Великобритания, 1 : 500) соответственно. Срезы заключали под покровное стекло с помощью Fluoroshield with DAPI (Sigma, США). Установление факта апоптоза клеток в замороженных срезах осу-

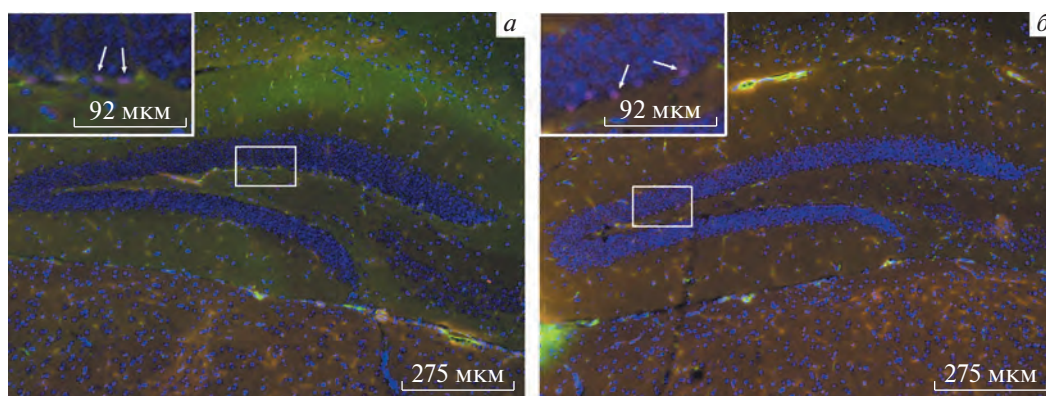


Рис. 1. Изменение количества Pax6-иммунопозитивных клеток в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) головного мозга животных в контроле и при экспериментальной болезни Альцгеймера. *a* – контроль, *б* – модель нейродегенерации альцгеймеровского типа, 9 сут. Стрелками показаны Pax6-иммунопозитивные клетки, ядра окрашены DAPI.

шестволяли с помощью набора TUNEL *in situ* по протоколу производителя (Elabscience, США).

Цифровые изображения получали с помощью системы визуализации EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США) и обрабатывали в программе ImageJ с помощью плагина для подсчета флуоресцентных меток на микрофотографиях.

Количество маркеров нейрогенеза и неангиогенеза характеризовали количеством клеток, окрашенных на соответствующий маркер, а для оценки уровня апоптоза подсчитывали общее количество TUNEL-позитивных клеток, нормированных на 100 DAPI-позитивных клеток в нейрогенной нише и представляли в виде среднего числа с указанием стандартного отклонения.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 13.3 (StatSoft Inc., Россия). Результаты теста УРПИ обрабатывали с использованием однофакторного анализа ANOVA и теста Фишера, результаты иммуногистохимии – с помощью критерия *U*-теста Манна-Уитни. Результаты считали значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка динамики прогрессирования когнитивного дефицита позволяет не только верифицировать развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа у экспериментальных животных, но и определять сроки ее появления. Выполненный нами ранее анализ результатов теста УРПИ показал, что тенденция к появлению нарушений когниции (запоминания) у экспериментальных животных фиксируется на 24-е сут после интрагиппокампального введения Aβ25–35, а на 38-е сут изменения по результатам тестирования становятся достоверно отличными от контрольной группы ($p = 0.0449$) (Аверчук и др., 2023).

С помощью иммуногистохимического протокола мы проанализировали, как изменяется содержание некоторых маркеров нейрогенеза – Nestin, Pax6, NeuroD1 (Roybon et al., 2009) и неангиогенеза – VEGFR2 (Рудько и др., 2017), а также выраженность апоптоза в нейрогенных нишах (зонах SGZ и SVZ) у животных в период, предшествующий появлению когнитивной дисфункции (в период 9–17-е сут с момента введения пептида в ткань гиппокампа).

К 9-м сут развития нейродегенерации мы зарегистрировали существенные отличия профиля экспрессии обеих нейрогенных ниш у животных с моделью БА по сравнению с контролем: в зоне SGZ гиппокампа значительно увеличилось количество Pax6-иммунопозитивных (рис. 1) и VEGFR2-иммунопозитивных клеток, тогда как в SVZ – только количество Nestin-иммунопозитивных клеток (табл. 1).

В SGZ гиппокампа ложно-оперированных животных уровень Nestin (маркер НСК) и Pax6 (маркер НСК и НПК) остается стабильным на протяжении всего периода наблюдения и значимо не меняется после тренинга (обучения) в тесте УРПИ (10-е сут развития нейродегенерации) (рис. 2). Примечательно, что содержание NeuroD1 (маркера нейробластов и незрелых нейронов) прогрессивно увеличивается, достигая максимума к 17-м сут наблюдения (рис. 2). Напротив, с 11-х до 17-х сут наблюдения регистрируется снижение экспрессии VEGFR2 (рис. 2).

Таким образом, у животных контрольной группы применение неизбежного болевого стимула (10-е сут) индуцирует увеличение количества нейробластов без значимого влияния на процессы мобилизации НСК или НПК с последующей вероятной редукцией VEGFR2-опосредованного нейрогенеза или неангиогенеза. Интересно, что последующая сессия в тесте УРПИ, регистрирующая реконсолидацию долговременной памяти (17-е сут наблюдения), также способствует значительному дополнительному увеличению числа нейробластов в SGZ гиппокампа.

Таблица 1. Содержание маркеров нейрогенеза и неоангиогенеза в субгранулярной (SGZ) и субвентрикулярной (SVZ) зонах головного мозга животных в контроле и в начальной стадии (9-е сут) развития экспериментальной БА

Маркер	SGZ, % (M ± SD)			SVZ, % (M ± SD)		
	Контроль	БА	<i>p</i>	Контроль	БА	<i>p</i>
Nestin	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.21	0.5127	7.2 ± 4.8	22.9 ± 7.2	0.0495
Рах6	4.9 ± 0.5	12.8 ± 1.9	0.0495	4.9 ± 0.5	8.3 ± 5.3	0.5127
NeuroD1	1.5 ± 0.27 × 10 ⁻¹⁵	1.6 ± 0.4	0.5127	3.6 ± 1.2	7.6 ± 3.0	0.0809
VEGFR2	5.9 ± 2.5	9.2 ± 0.5	0.0495	10.8 ± 0.22 × 10 ⁻¹⁴	9.2 ± 1.9	0.5127

У животных с экспериментальной моделью нейродегенерации альцгеймеровского типа мы зарегистрировали существенные отличия динамики содержания перечисленных маркеров: количество Nestin-иммунопозитивных клеток возрастало сразу после первой сессии обучения (неизбегаемый болевой стимул, 10-е сут) к 10 сут и далее оставалось стабильно высоким, а количество Рах6-иммунопозитивных НПК снижалось на 10-е сут и сохранялось на низком уровне до 17-х сут наблюдения; аверсивный раздражитель (10-е сут) вызывал увеличение числа NeuroD1-иммунопозитивных нейробластов. Однако последующее наблюдение не выявило дополнительного увеличения количества NeuroD1-иммунопозитивных нейробластов на 17 сут развития нейродегенерации, в отличие от контроля. Так же, как и в контроле, в период 11–17-е сут количество клеток, экспрессирующих VEGFR2, в SGZ гиппокампа (рис. 2) снижается. Примечательно, что в SGZ в период, предшествующий появлению первых признаков когнитивного нарушения (17-е сут эксперимента), была зарегистрирована интенсификация процессов апоптоза ($p = 0.049535$) (рис. 3).

В другой нейрогенной нише – SVZ – у животных контрольной группы применение неизбежного болевого стимула (10-е сут) приводило к существенно росту содержания NeuroD1, и последующая сессия в тесте УРПИ на 17-е сут наблюдения вызывала

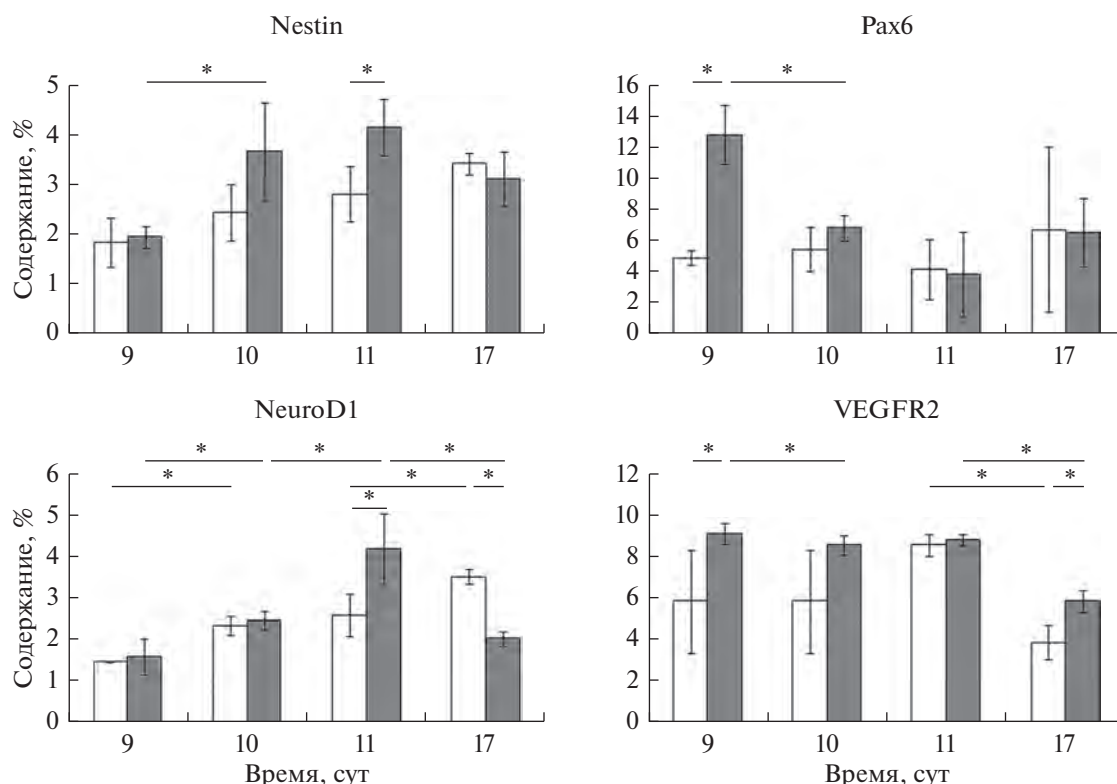


Рис. 2. Динамика изменения содержания маркеров Nestin, Рах6, NeuroD1, VEGFR2 в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) головного мозга животных в контроле (белые столбцы) и при экспериментальной болезни Альцгеймера (черные столбцы). Различия достоверны (*) при $p < 0.05$.

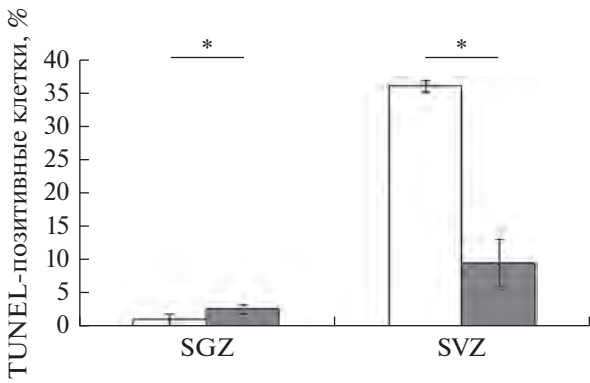


Рис. 3. Динамика изменения относительного количества TUNEL-позитивных клеток в субгранулярной (SGZ) и субвентрикулярной (SVZ) зонах головного мозга в контроле (белые столбцы) и при экспериментальной болезни Альцгеймера (черные столбцы).

дополнительное увеличение этого показателя (рис. 4). Динамика изменения числа NeuroD1-иммунопозитивных клеток в SVZ, в целом, повторяла таковую в SGZ гиппокампа. В SVZ контрольных животных мы зарегистрировали снижение количества VEGFR2-иммунопозитивных клеток к 17-м сут наблюдения (рис. 4).

У животных с экспериментальной моделью БА высокий уровень содержания маркера Nestin в SVZ на 9-е сут развития нейродегенерации сменялся его снижением уже после 1-ой сессии обучения в протоколе УРПИ, что может свидетельствовать о сокращении пула НСК в ответ на действие аверсивного раздражителя (когнитивной нагрузки) (рис. 4). Примечательно, что число NeuroD1-иммунопозитивных клеток в SVZ, как и в SGZ гиппокампа, значительно возрастало на 11-е сут наблюдения, но, в отличие от контрольных животных, редуцировалось на 17-е сут. В отличие от зоны SGZ, в SVZ количество VEGFR2⁺-клеток возрастало после 1-ой сессии в протоколе УРПИ (10-е сут) и далее возвращалось к исходному уровню (рис. 4).

Оценка апоптоза в SVZ на момент манифестации когнитивного дефицита у животных показала значительное снижение гибели клеток ($p = 0.049535$) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом важности идентификации механизмов и информативных маркеров досимптоматической стадии болезни Альцгеймера, особую значимость приобретают исследования нарушений нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга экспериментальных животных на ранних стадиях развития нейродегене-

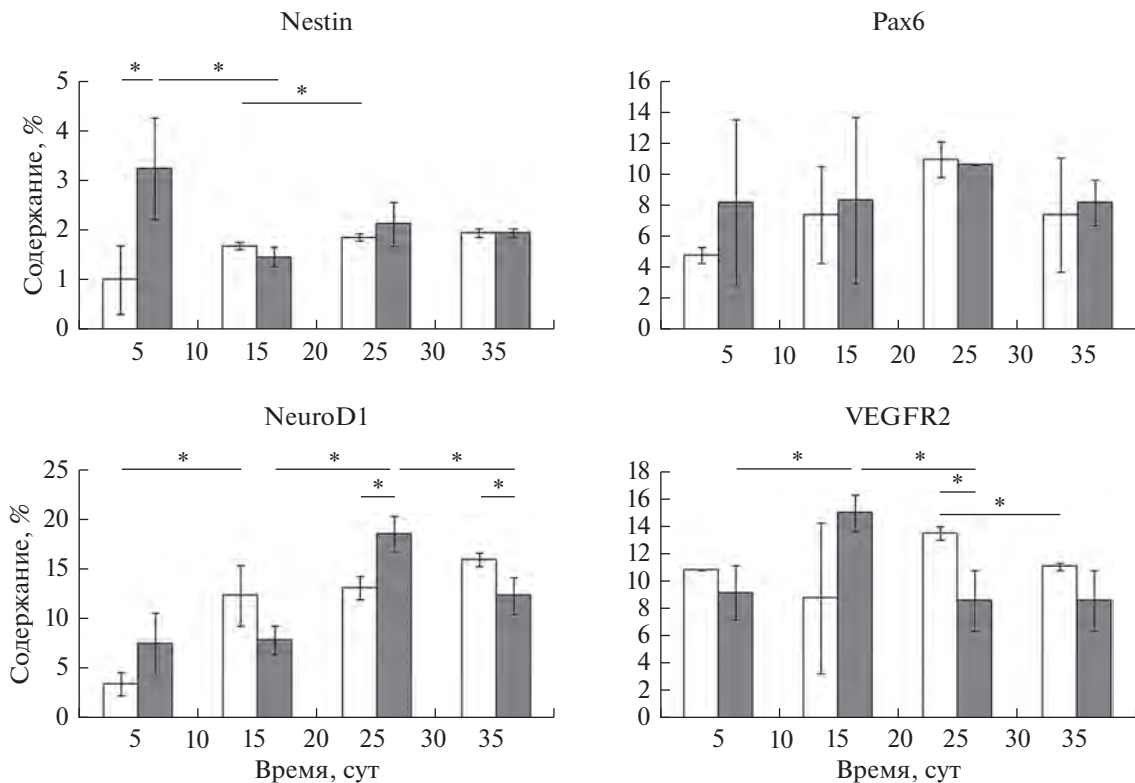


Рис. 4. Динамика изменения содержания маркеров Nestin, Pax6, NeuroD1, VEGFR2 в субвентрикулярной зоне (SVZ) головного мозга животных в контроле (белые столбцы) и при экспериментальной болезни Альцгеймера (черные столбцы). Различия достоверны (*) при $p < 0.05$.

рации альцгеймеровского типа, когда когнитивный дефицит еще не выражен. Некоторые наблюдения свидетельствуют о том, что нарушения пролиферации и дифференцировки НСК — ранние проявления аберрантного нейрогенеза в зоне SVZ при экспериментальной болезни Альцгеймера (Scora et al., 2020), тогда как зона SGZ в этот период может демонстрировать признаки интенсификации нейрогенеза с последующим его подавлением (López-Toledano, Shelanski, 2007), что нами и было зафиксировано на 9-е сут после введения A β 25–35 (табл. 1). Однако феномен интенсификации нейрогенеза при действии A β был описан только для A β 1–40, но не A β 25–35 (López-Toledano, Shelanski, 2004).

Известно, что в физиологических условиях в головном мозге млекопитающих происходит постоянный нейрогенез в нейрогенных нишах на протяжении всего периода постнатального развития, с последующим прогрессирующим подавлением в стареющем головном мозге (Riddle, Lichtenwalner, 2007). Мы использовали протокол обучения животных с применением неизбежного болевого воздействия с последующим тестированием памяти (с помощью теста УРПИ) (Ögren, Stiedl, 2013), который дает возможность интерпретировать степень сохранности и степень адаптивности нейрогенеза в нейрогенных нишах (SGZ и SVZ) (Dermon et al., 2002), исходя из продолжительности латентного периода, соответствующего сформированному “следу” эмоциональной памяти страха (Иноземцев, 2013).

Мы обнаружили, что важным отличием динамики экспрессионного профиля и в зоне гиппокампа SGZ, и в SVZ головного мозга животных на досимптоматической стадии развития нейродегенерации (по сравнению с животными контрольной группы) является отсутствие стимул-индуцированной интенсификации образования NeuroD1-иммунопозитивных клеток в период, непосредственно предшествующий проявлению когнитивной дисфункции.

В SGZ это наблюдение, в совокупности с данными о количестве Nestin⁺- и Pax6⁺-клеток, означает, что в указанной нейрогенной нише изначально остаются сохранными процессы мобилизации НСК (НПК) и образования нейробластов (незрелых постмитотических нейронов), но затем, к началу формирования когнитивного дефицита, возможности генерации пула NeuroD1⁺-клеток в ответ на предъявление соответствующего контекста истощаются. Одной из возможных причин может быть трехкратная (по сравнению с контролем) интенсификация процессов апоптоза в SGZ к 17-м сут развития нейродегенерации.

Интересно, что при развитии A β 25–35-индуцированной нейродегенерации возможным механизмом (дополнительным к пролиферации нейробластов, регистрируемой у животных контрольной группы), обеспечивающим стимуляцию нейрогенеза в протоколе УРПИ, становится рекрутинг НСК в SGZ

гиппокампа. Совпадающее по времени с мобилизацией NeuroD1⁺-нейробластов и Nestin⁺-НСК уменьшение количества Pax6⁺-НПК, вероятно, отражает быстрое истощение пула прогениторных клеток у животных с нейродегенерацией альцгеймеровского типа, несмотря на то, что изначально их количество у животных с моделью БА было выше, чем у животных контрольной группы. Подобный феномен — прогрессирующее уменьшение количества Pax6-иммунопозитивных НПК в нейрогенных нишах головного мозга — был ранее зарегистрирован при старении и трансгенных животных с экспериментальной БА (Polis et al., 2020).

В зоне SVZ токсическое действие A β 25–35 на ранней стадии проявилось в том, что общее количество Nestin⁺-клеток было изначально увеличено, но при применении протокола УРПИ уже после 1-ой сессии их число значительно сокращалось. Не исключено, что это обусловлено либо запуском процессов репаративного нейрогенеза, либо высокой чувствительностью НСК этой нейрогенной ниши к токсическому действию A β 25–35.

Иными словами, если применение аверсивного раздражителя в зоне SGZ животных с нейродегенерацией проявлялось снижением числа Pax6⁺-НПК, то Nestin⁺-НСК в зоне SVZ демонстрировали аналогичную динамику. Логично предположить, что в зоне гиппокампа (в SGZ) развитие нейродегенерации сопровождается преимущественной мобилизацией НПК, а в SVZ — НСК, популяции которых максимально чувствительны к дополнительной функциональной нагрузке на соответствующую нейрогенную нишу.

Интересно, что у животных контрольной группы динамика изменения числа NeuroD1⁺-нейробластов, простимулированных применением неизбежного стимула и (или) нахождением животных в соответствующей обстановке, способствующей проявлению условной реакции пассивного избегания, в SVZ и SGZ была практически идентичной. Следует отметить, что участие SVZ-генерируемых нейронов в механизмах обучения и запоминания, оцениваемых в тесте УРПИ, было показано ранее (Fiore et al., 2002), поэтому зарегистрированная нами однонаправленность изменений числа NeuroD1⁺-НПК в зонах SGZ и SVZ не удивительна.

Экспрессия VEGFR2 может быть характерна не только для клеток эндотелия, но и для пролиферирующих нейробластов нейрогенных ниш (Jin et al., 2002). Коль скоро мы обнаружили, что к 17-м сут наблюдения количество VEGFR2-иммунопозитивных клеток в SGZ снизилось у животных и контрольной, и экспериментальной групп, а в SVZ она не изменялась на протяжении всего периода наблюдения, логично предположить, что в нейрогенной нише, сохраняющей относительно интактными процессы нейрогенеза на раннем этапе развития нейродегенерации (SGZ), вклад VEGFR2-опосредованных меха-

низмов регуляции нейрогенеза и неоангиогенеза постепенно редуцируется.

Еще в меньшей степени изучены особенности неоангиогенеза в нейрогенных нишах, однако существующие экспериментальные находки и полученные нами результаты оценки апоптоза позволяют предполагать вклад aberrантного микрососудистого окружения в нарушение генерации новых нейронов при развитии хронической нейродегенерации (Steinman et al., 2021).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что SGZ и SVZ в раннем периоде развития нейродегенерации, индуцированной действием Aβ_{25–35}, когда еще не очевидны нарушения формирования следа эмоциональной памяти страха, присутствуют различные проявления нарушенного нейрогенеза.

В целом, результаты экспериментальной оценки состояния нейрогенеза свидетельствуют о том, что уже на досимптоматической стадии развития нейродегенерации альцгеймеровского типа процессы нейрогенеза в зоне SGZ и SVZ нарушены: процессы мобилизации НСК при предъявлении аверсивного раздражителя и индукции процесса запоминания в SGZ относительно сохранены, тогда как в SVZ изначально увеличенный пул НСК, вероятно, обеспечивающих процессы репаративного нейрогенеза при повреждении ткани мозга, демонстрирует их высокую чувствительность к повреждающему действию Aβ_{25–35} и когнитивной нагрузке. В обеих нейрогенных нишах наблюдается утрата стимул-индуцированной генерации нейробластов и незрелых нейронов в период, непосредственно предшествующий проявлению когнитивного дефицита.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00126; <https://rscf.ru/project/22-15-00126>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты выполнялись с учетом принципов гуманного обращения с животными и на основании решения Локального этического комитета Научного центра неврологии (протокол № 5-3/22 от 01.06.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.С. Аверчук: дизайн исследования, сбор материала, статистическая обработка материала, анализ полученных данных, написание текста статьи; М.В. Рязанова, Н.А. Розанова, А.В. Ставровская, С.В. Новикова: сбор и обработка материала; Н.А. Колотьева: обработка материала; А.Б. Салмина: концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

А.С. Аверчук, М.В. Рязанова, Т.И. Баранич, А.В. Ставровская, Н.А. Колотьева, С.В. Новикова, А.Б. Салмина: концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Averchuk A.S., Ryazanova M.V., Baranich T.I., Stavrovskaya A.V., Rozanova N.A., Novikova S.V., Salmina A.B. 2023. The neurotoxic effect of beta-amyloid is accompanied with changes in the mitochondrial dynamics and autophagy in neurons and brain endothelial cells in the experimental model of Alzheimer's disease. *Bulletin Exper. Biol. Med.* V. 175. № 3. P. 291. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-175-3-291-297>

Иноземцев А.Н. 2013. Анализ природы следа памяти в условной реакции пассивного избегания. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* № 1. С. 3 (*Inozemtsev A.N.* 2013. The analysis of the memory trace nature in passive avoidance response. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya.* № 1. С. 3.)

Моргун А.В., Осипова Е.Д., Бойцова Е.Б., Шуваев А.Н., Комлева Ю.К., Труфанова Л.В., Вайс Е.Ф., Салмина А.Б. 2019. Астроцит-опосредованные механизмы регуляции нейрогенеза в модели нейрогенной ниши *in vitro* при действии Aβ_{1–42}. *Биомедицинская химия.* Т. 65. № 5. С. 366. (*Morgun A.V., Osipova E.D., Boytsova E.B., Shuvaev A.N., Komleva Yu.K., Trufanova L.V., Weiss E.F., Salmina A.B.* 2019. Astrocyte-mediated regulation of cell development in the model of neurogenic niche *in vitro* treated with Aβ_{1–42}. *Biomed. Chemistry.* V. 65. № 5. P. 366.) <https://doi.org/10.18097/PBMC20196505366>

Рудько А.С., Эфендиева М.Х., Будзинская М.В., Карпилова М.А. 2017. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на ангиогенез и нейрогенез. *Вестник офтальмологии.* Т. 133. № 3. С. 75. (*Rud'ko A.S., Efendieva M.Kh., Budzinskaia M.V., Karpilova M.A.* 2017. Influence of vascular endothelial growth factor on angiogenesis and neurogenesis. *Vestnik Oftalmologii.* V. 133. № 3. P. 75.) <https://doi.org/10.17116/oftalma2017133375-80>

Dermon C.R., Zikopoulos B., Panagis L., Harrison E., Lancashire C.L., Mileusnic R., Stewart M.G. 2002. Passive avoidance training enhances cell proliferation in 1-day-old chicks. *Eur. J. Neurosci.* V. 16. P. 1267. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02177.x>

Esteve D., Molina-Navarro M.M., Giraldo E., Martínez-Varea N., Blanco-Gandia M.C., Rodríguez-Arias M., García-Verdugo J.M., Viña J., Lloret A. 2022. Adult neural stem cell migration is impaired in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* V. 59. P. 1168. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02620-6>

- Eu W.Z., Chen Y.J., Chen W.T., Wu K.Y., Tsai C.Y., Cheng S.J., Carter R.N., Huang G.J. 2021. The effect of nerve growth factor on supporting spatial memory depends upon hippocampal cholinergic innervation. *Transl. Psychiatry*. V. 11. P. 162.
https://doi.org/10.1038/s41398-021-01280-3
- Fiore M., Triaca V., Amendola T., Tirassa P., Aloe L. 2002. Brain NGF and EGF administration improves passive avoidance response and stimulates brain precursor cells in aged male mice. *Physiol. Behav.* V. 77. P. 437.
https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00875-2
- Jack C.R., Knopman D.S., Jagust W.J., Petersen R.C., Weiner M.W., Aisen P.S., Shaw L.M., Vemuri P., Wiste H.J., Weigand S.D., Lesnick T.G., Pankratz V.S., Donohue M.C., Trojanowski J.Q. 2013. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* V. 12. P. 207.
https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70291-0
- Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 99. P. 11946.
https://doi.org/10.1073/pnas.182296499
- López-Toledano M.A., Shelanski M.L. 2004. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J. Neurosci.* V. 24. P. 5439.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0974-04.2004
- López-Toledano M.A., Shelanski M.L. 2007. Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP (Sw, Ind). *J. Alzheimers Dis.* V. 12. P. 229.
https://doi.org/10.3233/jad-2007-12304
- Ning W.J., Lv R.J., Xu N., Hou X.Y., Shen C., Guo Y.L., Fan Z.Y., Cao N., Liu X.P. 2021. Lycopene-loaded microemulsion regulates neurogenesis in rats with A β -induced Alzheimer's disease rats based on the Wnt/ β -catenin pathway. *Neural Plast.* V. 6. P. e5519330.
https://doi.org/10.1155/2021/5519330
- Ögren S.O., Stiedl O. 2013. Passive avoidance. *Encyclopedia of psychopharmacology*. V. 3. P. 960.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-27772-6_160-2
- Polis B., Srikanth K.D., Gurevich V., Bloch N., Gil-Henn H., Samson A.O. 2020. Arginase inhibition supports survival and differentiation of neuronal precursors in adult Alzheimer's disease mice. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 1133.
https://doi.org/10.3390/ijms21031133
- Riddle D.R., Lichtenwalner R.J. 2007. Neurogenesis in the adult and aging brain. *brain aging: models, methods, and mechanisms*. V. 131.
https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.07.006
- Roybon L., Hjalt T., Stott S., Guillemot F., Li J.Y., Brundin P. 2009. Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One.* V. 4. P. e4779.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004779
- Scopa C., Marrocco F., Latina V., Ruggeri F., Corvaglia V., La Regina F., Ammassari-Teule M., Middei S., Amadoro G., Meli G., Scardigli R., Cattaneo A. 2020. Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular A β oligomers. *Cell Death Differ.* V. 27. P. 934.
https://doi.org/10.1038/s41418-019-0409-3
- Scopa C., Marrocco F., Latina V., Ruggeri F., Corvaglia V., La Regina F., Ammassari-Teule M., Middei S., Amadoro G., Meli G., Scardigli R., Cattaneo A. 2020. Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular A β oligomers. *Cell Death Differ.* V. 27. P. 934.
https://doi.org/10.1038/s41418-019-0409-3
- Steinman J., Sun H.S., Feng Z.P. 2021. Microvascular alterations in Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* V. 14. P. 618986.
https://doi.org/10.3389/fncel.2020.618986

Neurogenesis in Brain Neurogenic Niches in Experimental Alzheimer's Disease at the Presymptomatic Stage of Neurodegeneration

A. S. Averchuk^{a, *}, M. V. Ryazanova^a, N. A. Rozanova^a, N. A. Kolotyeva^a, A. V. Stavrovskaya^a, S. V. Novikova^a, and A. B. Salmina^a

^aResearch Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

*e-mail: antonaverchuk@yandex.ru

Deciphering the mechanisms of development of neurodegeneration at the presymptomatic stage is an urgent task. It's solving allows optimizing the methods of early diagnostics and prevention of Alzheimer's disease (AD). Goal of the study: to study the features of neurogenesis in brain neurogenic niches in experimental Alzheimer's disease at the presymptomatic stage of neurodegeneration. Modeling of AD *in vivo* was carried out in experimental animals (male mice, C57BL/6, 8 months old) as follows: the control group, $n = 30$, animals were injected with 2 μ l of a 0.9% NaCl solution in the CA1 field of the hippocampus; the experimental group, $n = 30$, animals were injected with a 1M solution of oligomerized beta-amyloid 25–35 (A β 25–35) (2 μ l bilaterally). Cognitive impairments have been assessed with the passive avoidance task (PAT). For immunohistochemical studies, we identified the subgranular zone of the hippocampus (SGZ) and the subventricular zone (SVZ) in frozen sections of the brain tissue. We have analyzed the expression of markers – Nestin, Pax6, NeuroD1, VEGFR2, as well as apoptosis (TUNEL protocol) in neurogenic niches. In the period preceding the manifestation of cognitive dysfunction (from 9 to 17 days after intrahippocampal administration of A β 25–35), we registered multidirectional changes in the expression of markers of neurogenesis,

neoangiogenesis and the severity of apoptosis in the SGZ of the hippocampus and in the SVZ. At 9th day since the beginning of development of Alzheimer's type neurodegeneration, we found elevated expression of Pax6 and VEGFR2 in the SGZ and higher number of Nestin+ cells in the SVZ. Subsequent application of the PAT protocol with the presentation of an aversive stimulus (day 10) or the corresponding context (days 11 and 17) resulted in dynamic changes in the expression of cell markers at different stages of neurogenesis. In sum, at the presymptomatic stage of the Alzheimer's type neurodegeneration, SGZ and SVZ show signs of aberrant neurogenesis associated with a disruption in the pool of stem and progenitor cells and suppression of the production of neuroblasts/immature neurons in the period preceding the evident cognitive dysfunction.

Keywords: Alzheimer's disease, neurogenesis, subgranular zone, subventricular zone