

Особенности экспрессии Arc/Arg3.1 в ткани головного мозга при обучении животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера

М.В. Рязанова, А.С. Аверчук, А.В. Ставровская, Н.А. Розанова, С.В. Новикова, А.Б. Салмина

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Аннотация

Введение. Arc/Arg3.1 является общепризнанным маркером активации нейронов при обучении и запоминании. Некоторые экспериментальные данные свидетельствуют об экспрессии Arc/Arg3.1 в постмитотических нейронах нейрогенных ниш, однако остаётся неясной роль такой экспрессии в регуляции нейрогенеза, стимулированного процессом обучения или воспоминания, в норме и при патологии.

Цель исследования — оценить динамику экспрессии белка Arc/Arg3.1 в постмитотических нейронах и уровня пролиферативной активности клеток нейрогенных ниш у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера.

Материалы и методы. Для исследования были использованы две группы мышей линии C57Bl/6J — контрольная ($n = 15$) и опытная ($n = 15$), которым билатерально в СА1 области гиппокампа был введён физиологический раствор или олигомеры бета-амилоида 25–35 соответственно. Когнитивные функции оценивали в тесте условной реакции пассивного избегания (УРПИ) начиная с 9-х суток после оперативного вмешательства. Через 1 ч после выполнения каждой сессии теста осуществляли забор ткани головного мозга для иммуногистохимической оценки экспрессии Arc/Arg3.1 и маркера пролиферации клеток PCNA.

Результаты. В субгранулярной зоне гиппокампа на 11-е сутки достоверно увеличивалось количество Arc/Arg3.1⁺NeuN⁺-клеток. У животных с моделью нейродегенерации 1-я и 2-я сессии теста УРПИ сопровождалась существенным увеличением количества Arc/Arg3.1⁺NeuN⁺-клеток, но к 11-м суткам эксперимента их число достоверно уменьшалось. В субвентрикулярной зоне, как и в субгранулярной зоне, в контроле регистрировали увеличение числа Arc/Arg3.1⁺-клеток после 3-й сессии, а у животных с моделью болезни Альцгеймера — лишь после 2-й сессии в тесте УРПИ. Сохранность экспрессии Arc/Arg3.1 в субвентрикулярной зоне сопровождается увеличенной экспрессией маркера пролиферации PCNA, тогда как в субгранулярной зоне гиппокампа токсическое действие бета-амилоида на 9-е сутки подавляло пролиферативную активность клеток.

Заключение. Постмитотические нейроны нейрогенных ниш сохраняют способность к экспрессии Arc/Arg3.1 при активации на фоне токсического действия бета-амилоида 25–35 *in vivo*. Наши результаты демонстрируют транзиторное увеличение чувствительности постмитотических нейронов нейрогенных ниш к обучающим стимулам на ранних стадиях развития нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Ключевые слова: Arc/Arg3.1; болезнь Альцгеймера; пластичность; нейрогенез; нейрогенная ниша

Этическое утверждение. Все исследования выполняли с учётом принципов гуманного обращения с животными, протоколы были утверждены решением Локального этического комитета Научного центра неврологии (протокол № 5-3/22 от 01.06.2022).

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-15-00126, <https://rscf.ru/project/22-15-00126>

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

Адрес для корреспонденции: 105064, Россия, Москва, пер. Обуха, д. 5. ФГБНУ НЦН. E-mail: mashenka.ryazanova@list.ru. Рязанова М.В.

Для цитирования: Рязанова М.В., Аверчук А.С., Ставровская А.В., Розанова Н.А., Новикова С.В., Салмина А.Б. Особенности экспрессии Arc/Arg3.1 в ткани головного мозга при обучении животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2023;17(3):49–56.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.3.6>

Поступила 10.03.2023 / Принята в печать 22.05.2023 / Опубликовано 25.09.2023

Arc/Arg3.1 Expression in the Brain Tissues During the Learning Process in Alzheimer's Disease Animal Models

Maria V. Ryazanova, Anton S. Averchuk, Alla V. Stavrovskaya, Natalia A. Rozanova, Svetlana V. Novikova, Alla B. Salmina

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Arc/Arg3.1 is a common marker of neuronal activation for learning and memorizing. Some experimental data show the Arc/Arg3.1 expression in the post-mitotic neurons of the neurogenic niches. At the same time, we still have to understand the importance of such an expression for neurogenesis induced by the learning or memorizing processes, in health and in disease.

Objective: to evaluate the changes in Arc/Arg3.1 expression in the post-mitotic neurons and to assess the proliferative activity of the neurogenic niche cells in Alzheimer's disease animal models.

Materials and methods. We divided the C57Bl/6B mice into 2 groups: experimental ($n = 15$) and control ($n = 15$). The experimental group were injected with the amyloid- β oligomers 25–35 in their CA1 hippocampal region while the control mice received normal saline injections in the same region. Passive Avoidance Test (PAT) was used to assess the cognitive functions from the day 9 after the intervention. One hour after each test session we collected the samples of brain tissues to immunohistochemically assess them for the Arc/Arg3.1 expression and PCNA cell proliferation marker.

Results. At day 11 the count of Arc/Arg3.1⁺NeuN⁺ cells in the subgranular zone had significantly increased. In animal neurodegeneration models the 1st and 2nd PAT sessions were associated with a significant increase in Arc/Arg3.1⁺NeuN⁺ cells, although by the day 11 their count significantly decreased. The count of Arc/Arg3.1⁺ cells in the subventricular and subgranular zones had increased after the 3rd PAT session in the control group while in Alzheimer's disease animal models this was observed only after the 2nd PAT session. Preserved Arc/Arg3.1 expression in the subventricular zone is associated with the increased PCNA cell proliferation marker expression. At the same time, the toxic effect of the amyloid- β oligomers suppressed the cells' proliferative activity in the subgranular zone at day 9.

Conclusions. Despite the toxic effect of the amyloid- β oligomers 25–35, the post-mitotic neurons of the neurogenic niches retained the ability to express Arc/Arg3.1 in vivo. The obtained results show a transient increase in sensitivity of the post-mitotic neurons of the neurogenic niches for the learning stimuli in the early stages of the Alzheimer-type neurodegeneration.

Keywords: Arc/Arg3.1; Alzheimer's disease; plasticity; neurogenesis; neurogenic niche

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol No. 5-3/22, June 1, 2022).

Source of funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00126, <https://rscf.ru/project/22-15-00126>.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, Obukha per., 5. Research Center of Neurology. E-mail: mashenka.ryazanova@list.ru. Ryazanova M.V.

For citation: Ryazanova M.V., Averchuk A.S., Stavrovskaya A.V., Rozanova N.A., Novikova S.V., Salmina A.B. Arc/Arg3.1 expression in the brain tissues during the learning process in Alzheimer's disease animal models. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2023;17(3):49–56. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.3.6>

Received 10.03.2023 / Accepted 22.05.2023 / Published 25.09.2023

Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) — одна из форм нейродегенерации, которая характеризуется специфическими изменениями в продукции бета-амилоида (A β) и его аккумуляции во внеклеточном пространстве, накоплением фосфорилированного тау-белка в нейронах, приводящим к повреждению и гибели клеток головного мозга, нарушением нейрон-глиальных взаимодействий, повреждением гематоэнцефалического барьера, активацией микроглии и развитием нейровоспаления, а также изменением процессов нейрогенеза, существенно снижающим регенеративный потенциал ткани [1–3].

Нейрогенез во взрослом зрелом мозге признается важным механизмом пластичности [4]. В так называемых классических нейрогенных нишах, к числу которых относятся субгранулярная зона гиппокампа (SGZ) и субвентрикулярная зона (SVZ), осуществляется поддержание популяции нейральных стволовых и прогениторных клеток, а также их рекрутинг с пролиферацией, дифференцировкой и миграцией вновь образованных незрелых клеток нейрональной природы в различные регионы мозга [5]. Из SGZ зоны незрелые клетки мигрируют в гранулярный слой гиппокампа и встраиваются в предсуществующие нейронные ансамбли, чья активность важна для реализации процессов обучения, запоминания [6], из SVZ незрелые клетки направляются у грызунов по ростральному миграционному тракту к обонятельным луковицам, а также в поврежденные регионы головного мозга для восполнения тканевого дефекта [7].

Основными стимулами, индуцирующими нейрогенез в постнатальном периоде, являются обучение, обработка информации и её запоминание, пребывание в обогащенной (многостимульной) среде, физическая активность, дей-

ствие некоторых фармакологических агентов, что значительно меняет состав микроокружения в нейрогенной нише [8–10]. Несмотря на то, что SVZ традиционно рассматривается как источник новых нейронов для восстановления ткани при повреждении, а SGZ — как продуцент новых клеток для формирования памяти, некоторые данные свидетельствуют о том, что вклад SVZ в процессы опыт-индуцированной пластичности мозга может быть не менее актуален [7]. Старение и хроническая нейродегенерация нарушают процессы нейрогенеза в SGZ и SVZ, что может быть ключевой причиной развития и прогрессирования когнитивной дисфункции, нарушений сложных форм поведения и несостоятельности репаративных пластических механизмов [5, 11–13]. Активация зрелых нейронов в процессе обучения, формирования памяти и при индукции воспоминаний маркируется экспрессией генов немедленного раннего ответа (immediate early genes, IEGs), например, *c-fos*, *Arc/Arg3.1* [14]. В частности, экспрессия гена *Arc/Arg3.1*, регистрируемая в нейронах гиппокампа, миндалевидного тела и некоторых других регионах мозга, важна для обеспечения механизмов формирования долговременной памяти [15]. В нейронах *Arc/Arg3.1* формирует синаптическую пластичность, влияя на структуру цитоскелета, эндоцитоз АМРА-рецепторов, регулирует экспрессию генов через модуляцию ацетилирования гистоновых белков хроматина, участвует в регуляции протеолиза белка-предшественника амилоида и Notch [16, 17]. Некоторые специфические свойства *Arc/Arg3.1*, определяемые его способностью к транспорту из клетки в клетку за счёт ретровирус-подобного механизма [18], вероятно, дополняют широкий спектр функциональной активности *Arc/Arg3.1*, важной для «маркировки» или «отбора» постмитотических нейронов, способных консолидировать и длительно воспроизводить информацию. В этом контексте интерес представляют нейроны нейрогенных ниш — как молодые, вновь образованные NeuN⁺-

нейробласты/нейроны, так и зрелые постмитотические NeuN⁺-нейроны, которые не только активируются при обучении и запоминании, но и способны регулировать процессы нейрогенеза [19]. В последние годы активно обсуждается роль aberrантной экспрессии Arc в патогенезе хронической нейродегенерации, что может быть связано с нарушением механизма формирования долговременной потенциации/депрессии, дизрегуляцией синаптической передачи [20–22].

Нейрогенез — постоянный процесс в зрелом головном мозге, в течение которого клетки претерпевают значительные морфологические, метаболические, функциональные и электрофизиологические изменения [23]. Эти события можно регистрировать по последовательным изменениям экспрессии белков, маркирующих стволовые и прогениторные клетки (например, Nestin, Pax6), нейробласты (NeuroD1), тогда как стадия созревания вновь сформированных нейронов сопровождается появлением в них экспрессии белка NeuN [24]. В работе [25] показано, что молодые нейроны, образующиеся в нейрогенных нишах головного мозга, начиная с 1-го дня постмитотического периода развития экспрессируют Arc/Arg3.1, но не другие IEGs, и, вероятно, такая ранняя экспрессия Arc в молодых клетках маркировала ту субпопуляцию, которая имела самую высокую выживаемость и способность встраиваться в предсуществующие нейрональные ансамбли. Кроме того, экспрессия *Fos* и *Zif268* в молодых нейронах значимо меняется при моделировании судорожного синдрома [26], а нейрогенез и экспрессия *Fos* в молодых нейронах зубчатой извилины гиппокампа коррелируют с её восстановлением после повреждения [27]. Таким образом, экспрессия IEGs в постмитотических нейронах нейрогенных ниш может характеризовать сохранность механизмов нейрогенеза и интеграции постмитотических нейронов в новые нейрональные ансамбли при действии стимулов, влияющих на обучение и запоминание.

Поэтому целью нашей работы стала оценка экспрессии Arc/Arg3.1 в постмитотических нейронах и маркера пролиферации — PCNA в NeuN⁺-клетках нейрогенных ниш при формировании долговременной памяти у животных с экспериментальной моделью БА.

Материалы и методы

Животные

В эксперименте использовали 30 мышей C57BL/6 (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, филиал «Андреевка») массой 30–35 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария с неограниченным доступом к пище и воде, с 12-часовым чередованием суточной освещённости.

Для анестезии использовали золетил-100 («Virbac Sante Animale»), разведение исходного раствора (100 мг/мл) физиологическим раствором в соотношении 1 : 4, который вводили внутримышечно из расчёта 1,5 мг действующего вещества на 25 г веса, и ксилу («Interchemie werken «De Adelaar» B.V.»), разведение исходного раствора физиологическим раствором в соотношении 1 : 2, которую вводили внутримышечно из расчёта 0,6 мг на 25 г веса. Мышам 1-й группы ($n = 15$) через просверленные в их черепе отверстия билатерально, в поле CA1 гиппокампа, вводили по 2 мкл 1M раствора A β_{25-35} («Sigma-Aldrich Co.») в физиологиче-

ском растворе, 2-й группы ($n = 15$) — растворитель в том же объёме по аналогичным стереотаксическим координатам билатерально (AP — 2,0; ML — 1,9; DV — 1,3).

Все исследования выполняли с учётом принципов гуманного обращения с животными, протоколы были утверждены решением Локального этического комитета Научного центра неврологии (протокол № 5-3/22 от 01.06.2022).

Протокол обучения животных и получения биологического материала

Оценку механизмов опыт-индуцированной пластичности мозга осуществляли с использованием теста условной реакции пассивного избегания (УРПИ) и программы «ShutAvoid 1.8.03» на установке «Panlab Harvard Apparatus» по стандартному протоколу начиная с 9-х суток после операции и далее (11, 17, 24, 38-е сутки), как описано нами ранее [28]. Для интегральной оценки сохранности или нарушения когнитивной/запоминания учитывали время перехода мыши из освещённого отсека камеры в тёмный отсек. На 9-е сутки (1-я сессия) животные находились в камере для привыкания к обстановке (реакция «привыкание»), на 10-е сутки (2-я сессия) животные получали неизбежное болевое воздействие (0,2 мА, 3 с) после захода в тёмный отсек (реакция «обучение» в ответ на действие аверсивного раздражителя), на 11-е сутки (3-я сессия) и далее (до 38 сут) после операции выполняли оценку когнитивной функции (реакция «воспоминание»).

В каждой временной точке выполняли забор биологического материала (ткань головного мозга) от 5 животных 1-й и 2-й групп через 1 ч после оценки когнитивных функций [28].

Иммуногистохимическое исследование

Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации в виварии под наблюдением ветеринара и сотрудника вивария. Полученный биоматериал фиксировали в 10% формалине («Histoline»). Образцы хранили при 4°C. Затем при помощи криостата «Tissue-Tek® Cryo3» («Sakura-Finetek») изготавливали срезы мозга толщиной 10 мкм. Через 1 сут проводили иммуногистохимическое окрашивание образцов, для чего срезы трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) по 5 мин, обрабатывали 20 мин 0,1% раствором Triton X-100 («Calbiochem Biochemicals») с PBS на шейкере, проводили трёхкратную промывку PBS и инкубацию срезов с первичными антителами: anti-NeuN («Abcam», ab104224, разведение 1 : 200, мышинные моноклональные), anti-ARC/ARG3.1 («FineTest», 1 : 100, кроличьи поликлональные), мышинные моноклональные PCNA («Abcam», ab29, разведение 1 : 20 000) в течение ночи при 4°C. Для того чтобы блокировать неспецифичное связывание, разведение антител проводили в «IHC Diluent» («Leica»). На следующий день трижды производили промывку в PBS, а затем в 0,1% растворе Triton X-100 с PBS, срезы инкубировали со вторичными антителами: ослиные анти-мышинные антитела, меченные «Alexa Fluor 488» («Abcam», ab150105, разведение 1 : 500), козьи анти-кроличьи антитела, меченные «Elab Fluor 594» («Elabscience», E-AB-1060, разведение, 1 : 200) в течение 2 ч. Затем последовательно промывали в Triton X-100 с PBS, PBS и дистиллированной воде 3 раза по 5 мин и заключали под покровное стекло с помощью «Fluoroshield Mounting with DAPI» («Sigma Aldrich», F6057), данная монтирующая жидкость параллельно осуществляет окрашивание ядер DAPI.

Визуализацию производили с использованием системы визуализации «EVOS M7000» («Thermo Fisher Scientific»). Изображения обрабатывали плагином для программы «ImageJ» [29].

Статистический анализ

Данные поведенческого тестирования обрабатывали с использованием однофакторного анализа ANOVA и теста Фишера, статистическую обработку результатов иммуногистохимического исследования проводили с использованием критерия U-теста Манна–Уитни в программном пакете для статистического анализа «Statistica v. 12.0» («StatSoft Inc.»). Результаты считали значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

Результаты

Как мы показали ранее, в период до 24 сут развития нейродегенерации в указанных условиях эксперимента формирование когнитивного дефицита у животных ещё не наблюдается, но формируется тенденция к нарушению процессов запоминания, которая становится достоверно значимой по сравнению с ложнооперированными животными к 38 сут

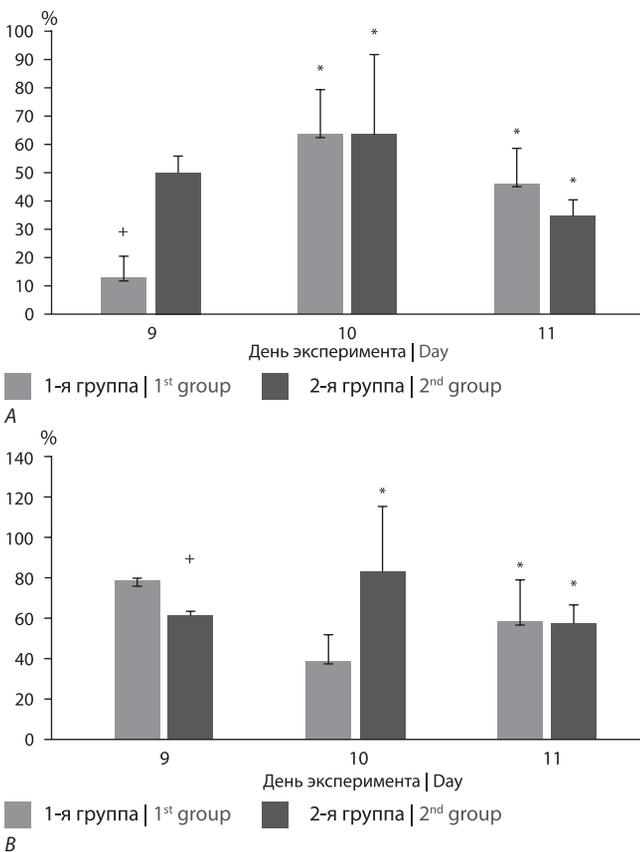


Рис. 1. Изменение экспрессии NeuN⁺-клеток (из расчёта на 100 DAPI⁺-клеток) в SGZ (A) и в SVZ (B) головного мозга исследуемых животных.
 $*p < 0,05$ по сравнению с 9-ми сутками; $+p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой.
Fig. 1. Changes in NeuN⁺ cells expression (per 100 DAPI⁺ cells) in the subgranular (A) and subventricular (B) zones: the experimental (1st) and control (2nd) groups.
 $*p < 0.05$ comparing to day 9; $+p < 0.05$ comparing to the 2nd group.

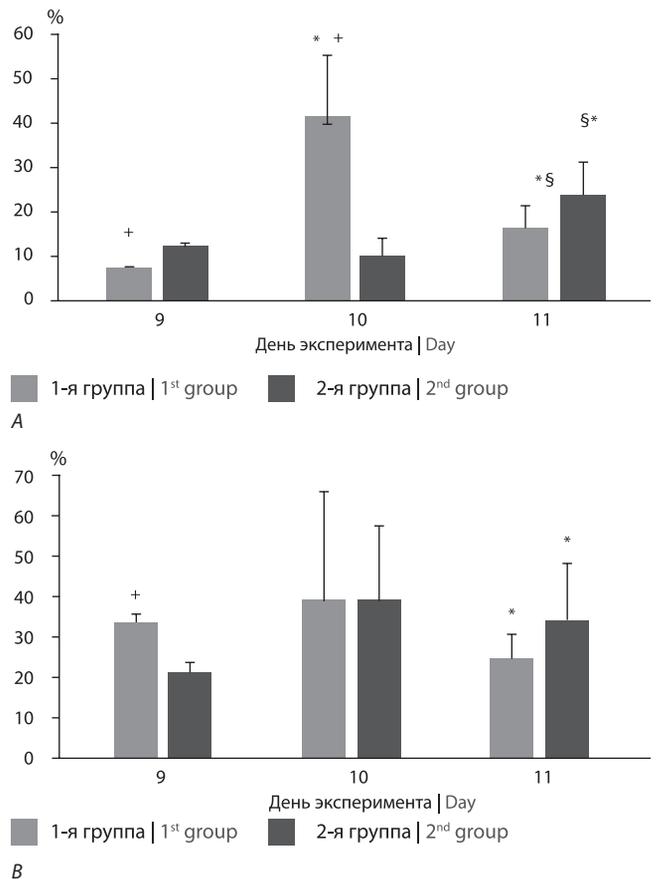


Рис. 2. Изменение экспрессии Arc/Arg3.1⁺-клеток (из расчёта на 100 DAPI⁺-клеток) в SGZ (A) и в SVZ (B) головного мозга исследуемых животных.
 $*p < 0,05$ по сравнению с 9-ми сутками; $§p < 0,05$ по сравнению с 10-ми сутками; $+p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой
Fig. 2. Changes in Arc/Arg3.1⁺ cells expression (per 100 DAPI⁺ cells) in the subgranular (A) and subventricular (B) zones: the experimental (1st) and control (2nd) groups.
 $*p < 0.05$ comparing to day 9; $§p < 0.05$ comparing to day 10; $+p < 0.05$ comparing to the 2nd group.

[28]. Вместе с тем интересно было установить, какие изменения могут регистрироваться в нейрогенных нишах экспериментальных животных на самой ранней стадии развития нейродегенерации альцгеймеровского типа (первые 11 сут после введения Аβ в ткань головного мозга). Мы зарегистрировали, что общее количество постмитотических нейронов в SGZ гиппокампа у животных контрольной группы изначально существенно превышало таковое при действии Аβ_{25–35}. Число NeuN⁺-клеток после 1-й сессии в тесте УРПИ (адаптация к новому контексту) и после 2-й сессии в тесте УРПИ (применение неизбежного болевого раздражителя как авersive сигнала) значимо не менялось по сравнению с контролем на раннем этапе развития нейродегенерации (рис. 1, A), что свидетельствует об отсутствии нейротоксического эффекта Аβ в отношении постмитотических нейронов в нейрогенных нишах. Примечательно, что число постмитотических нейронов в SVZ было повышено у животных экспериментальной группы уже на 9-е сутки развития нейродегенерации и, в отличие от контроля, применение авersive раздражителя на 10-е сутки не сопровождалось увеличением числа NeuN⁺-клеток в SVZ (рис. 1, B).

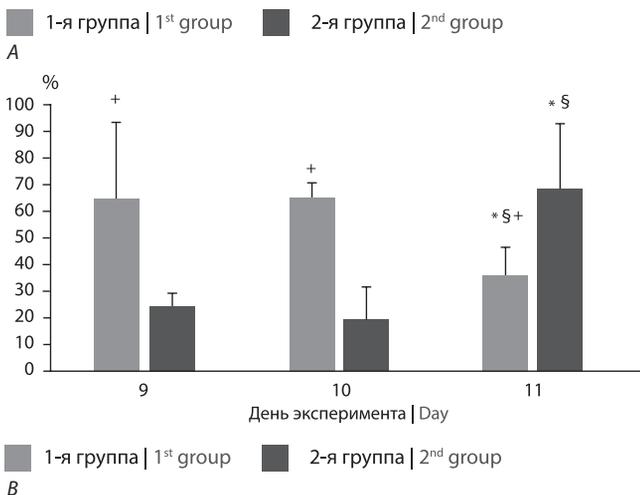
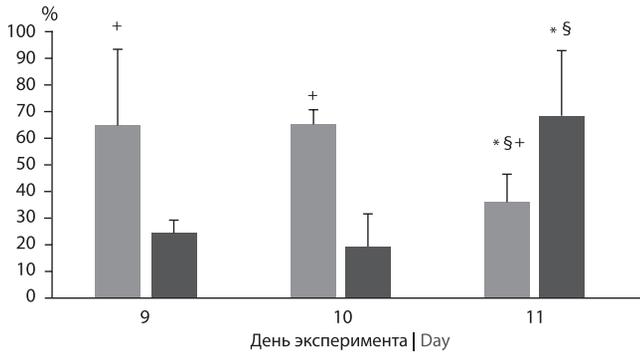


Рис. 3. Коэкспрессия Arc/Arg3.1 и NeuN в клетках SGZ (A) и SVZ (B) головного мозга исследуемых животных.

* $p < 0,05$ по сравнению с 9-ми сутками; § $p < 0,05$ по сравнению с 10-ми сутками; * $p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой.

Fig. 3. The Arc/Arg3.1 and NeuN cells co-expression in the subgranular (A) and subventricular (B) zones: the experimental (1st) and control (2nd) groups.

* $p < 0.05$ comparing to day 9; § $p < 0.05$ comparing to day 10; * $p < 0.05$ comparing to the 2nd group.

Мы проанализировали какое количество клеток в обеих нейрогенных нишах экспрессировало Arc/Arg3.1 и каков вклад постмитотических нейронов в эту экспрессию. При оценке общего количества Arc/Arg3.1⁺-клеток в SGZ обращает на себя внимание значительное увеличение их числа у животных 1-й группы после 2-й сессии (аверсивный раздражитель) (рис. 2, A). У животных 2-й группы существенный рост Arc/Arg3.1⁺-клеток регистрировали лишь к 3-й сессии (пребывание животного в условиях, призванных индуцировать эмоциональный след памяти страха, но без неизбежного болевого раздражителя). В SVZ мы зарегистрировали лишь исходное увеличение числа Arc/Arg3.1⁺-клеток у животных 1-й группы — после пребывания в новом контексте (9-е сутки эксперимента), но после действия аверсивного раздражителя (10-е сутки) их число значимо не менялось, как и во 2-й группе (рис. 2, B).

Наиболее показательной оказалась динамика числа клеток, в которых регистрировали коэкспрессию Arc/Arg3.1 и NeuN: в SGZ гиппокампа возвращение животных в условия, индуцирующие след эмоциональной памяти страха (3-я сессия в протоколе УРПИ, 11-е сутки эксперимента), вызывало достоверное увеличение Arc/Arg3.1⁺NeuN⁺-

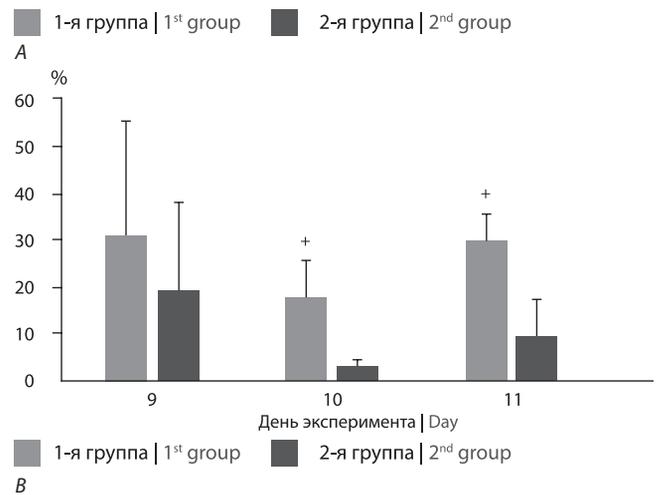
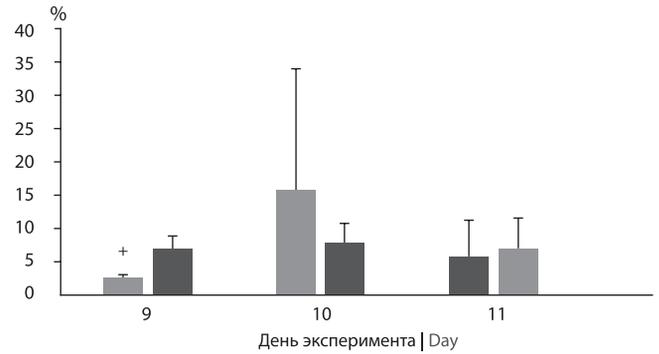


Рис. 4. Изменение пролиферирующих PCNA⁺-клеток в в SGZ (A) и в SVZ (B).

* $p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой.

Fig. 4. Changes in PCNA⁺ cell proliferation marker in the subgranular (A) and subventricular (B) zones.

* $p < 0.05$ comparing to the 2nd group.

клеток (рис. 3, A). У животных с моделью нейродегенерации 1-я и 2-я сессии сопровождались существенным увеличением количества Arc/Arg3.1⁺NeuN⁺-клеток, но к 11-м суткам эксперимента их число достоверно уменьшалось (рис. 3, A). В SVZ исходное количество Arc/Arg3.1⁺NeuN⁺-клеток было незначительно выше у животных 1-й группы, но в целом динамика изменения числа постмитотических нейронов с экспрессией Arc/Arg3.1 не отличалась от таковой во 2-й группе (рис. 3, B).

Далее мы проанализировали количество пролиферирующих клеток в обеих нейрогенных нишах. В 1-й группе, по сравнению со 2-й группой, пролиферация была подавлена на 9-е сутки и далее восстанавливалась до контрольного уровня в SGZ (рис. 4, A). В SVZ число PCNA⁺-клеток на 10-е и 11-е сутки эксперимента было достоверно выше у животных с моделью БА (рис. 4, B).

Обсуждение

Оценка экспрессии Arc/Arg3.1, как правило, осуществляется с целью идентификации нейронов, активируемых в процессе обучения или запоминания и демонстрирующих изменения синаптической пластичности, характерной для этих событий [16, 17]. Имеются единичные наблюдения о том, что экспрессия этого белка регистрируется в ранних,

вновь образованных постмитотических нейронах клеток нейрогенных ниш, что связывают с увеличенной способностью таких клеток к выживанию и последующей интеграции в нейронные сети [25]. Вместе с тем недавние наблюдения говорят о том, что и зрелые нейроны в составе нейрогенных ниш участвуют в регуляции нейрогенеза [19] и, вероятно, могут быть вовлечены в механизмы его индукции при действии соответствующих стимулов. Мы предположили, что число постмитотических (как юных, так и зрелых) NeuN⁺-нейронов, экспрессирующих Arc/Arg3.1, в нейрогенных нишах головного мозга должно изменяться при формировании и воспроизведении долговременной памяти, а при развитии нейродегенерации — характеризовать сохранившийся пул клеток, обеспечивающих пластичность головного мозга.

Используя модель БА с интрагиппокампальным введением Аβ, которая позволяет оценить события, протекающие на самых ранних — досимптоматических — этапах развития нейродегенерации, и тест УРПИ, регистрирующий формирование долговременной памяти в ответ на предьявление контекста и неизбегаемого авersiveного (болевого) раздражителя, мы оценили динамику экспрессии Arc/Arg3.1 и сопоставили её с общим числом пролиферирующих PCNA⁺-клеток в нейрогенных нишах животных. Общее число постмитотических нейронов и пролиферативный потенциал были подавлены в SGZ гиппокампа к 9-м суткам развития патологического процесса, но далее эти параметры сохранялись на уровне контроля после 2-й и 3-й сессий УРПИ (обучение и воспоминание в исходном контексте соответственно). Таким образом, у животных с экспериментальной моделью БА на ранней стадии формирования нейродегенерации сохранены пластические возможности SGZ гиппокампа, что, вероятно, следует расценивать как адекватную адаптацию к прогрессирующему снижению функционально активных синапсов в зубчатой извилине гиппокампа уже на ранней стадии развития БА [30].

Показательными стали результаты оценки экспрессии Arc/Arg3.1 в SGZ у животных с ранней стадией нейродегенерации альцгеймеровского типа: по сравнению с контролем они демонстрировали раннее (2-я сессия УРПИ — предьявление авersiveного раздражителя) значительное увеличение экспрессии этого белка в клетках SGZ в целом. В постмитотических NeuN⁺-нейронах мы регистрировали ещё более выраженное увеличение экспрессии уже после 1-й сессии (знакомство с новым контекстом). Однако пребывание в заданном контексте (3-я сессия УРПИ, регистрирующая длительность латентного периода как индикатора сформированного следа памяти страха) у этих животных, в отличие от контроля, сопровождалось снижением числа Arc/Arg3.1-экспрессирующих клеток, в том числе постмитотических нейронов.

Список источников / References

1. Scopa C., Marrocco F., Latina V. et al. Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular Aβ oligomers. *Cell Death Differ.* 2020;27(3):934–948. DOI: 10.1038/s41418-019-0409-3
2. Бурнашева А.О., Стефанова Н.А., Рудницкая Е.А. Нейрогенез в зрелом головном мозге: изменения при старении и развитии болезни Альцгеймера. *Успехи геронтологии.* 2020;33(6):1080–1087. Burnyashva A.O., Stefanova N.A., Rudnitskaya E.A. Adult neurogenesis: alterations with aging and Alzheimer's disease development. *Advances in gerontology.* 2020;33(6):1080–1087. DOI: 10.34922/AE.2020.33.6.008

Из этого следуют два важных заключения:

- а) постмитотические нейроны в SGZ гиппокампа при экспозиции к Аβ демонстрируют повышенную способность к активации и экспрессии Arc/Arg3.1 при действии нового окружения или болевого раздражителя;
- б) формированию выраженного когнитивного дефицита — к 38-м суткам развития нейродегенерации [28] — предшествует подавление экспрессии Arc/Arg3.1 в NeuN⁺-клетках SGZ гиппокампа.

Недавние исследования, выполненные на трансгенных животных с экспериментальной БА, впервые показали, что периоду пониженной активности гиппокампальных и кортикальных нейронов при токсическом действии Аβ предшествует их гиперактивность *in vitro* [31]. Наши результаты свидетельствуют об аналогичном феномене в SGZ гиппокампа *in vivo* уже на самой ранней стадии развития нейродегенерации: высокая ответная реакция нейронов на внешние стимулы (новое окружение или обучение) быстро трансформируется в подавление ответа.

В SVZ общее число клеток и постмитотических нейронов, экспрессирующих Arc/Arg3.1, аналогичным образом увеличивается после 1-й сессии УРПИ (знакомство с новым окружением) у животных с моделью нейродегенерации по сравнению с животными контрольной группы. Как и в SGZ, в контроле мы регистрировали увеличение числа Arc/Arg3.1⁺-клеток после 3-й сессии, а у животных с моделью БА — увеличение количества Arc/Arg3.1⁺NeuN⁺-клеток после 2-й сессии в тесте УРПИ. С учётом доминирующего вклада SVZ в процессы восстановления ткани головного мозга мы можем предполагать активацию репаративного нейрогенеза и увеличение числа Arc/Arg3.1⁺-клеток в этой нейрогенной нише вследствие повреждения. Действительно, было показано, что в непосредственной близости от амилоидных бляшек нейроны демонстрируют парадоксально увеличенную экспрессию Arc [32]. С учётом роли белка Arc/Arg3.1 в регуляции многих физиологических процессов в клетках [33] логично расширять изменения экспрессии Arc/Arg3.1 в SVZ как маркер сохранности популяции нейронов с высокой жизнеспособностью [25] и, очевидно, важных для процессов восстановления. Однако уже после 10-х суток общее число Arc/Arg3.1⁺-клеток в SVZ у животных с нейродегенерацией снижается, что может отражать истощение такого механизма компенсации.

В целом, полученные нами результаты свидетельствуют о транзитном увеличении чувствительности постмитотических (образованных на разных этапах онтогенеза) NeuN⁺-нейронов SGZ гиппокампа и SVZ к действию когнитивных стимулов на ранних стадиях развития нейродегенерации альцгеймеровского типа.

3. Komleva Y.K., Lopatina O.L., Gorina Y.V. et al. Expression of NLRP3 inflammasomes in neurogenic niche contributes to the effect of spatial learning in physiological conditions but not in Alzheimer's type neurodegeneration. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2022;42(5):1355–1371. DOI: 10.1007/s10571-020-01021-y
4. Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Komleva Y.K. et al. Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain. *Rev. Neurosci.* 2017;28(4):397–415. DOI: 10.1515/revneuro-2016-0071
5. Salmiva A.B., Kapkaeva M.R., Vetchinova A.S., Illarishkin S.N. Novel approaches used to examine and control neurogenesis in Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(17):9608. DOI: 10.3390/ijms22179608

6. Pan Y.W., Storm D.R., Xia Z. Role of adult neurogenesis in hippocampus-dependent memory, contextual fear extinction and remote contextual memory: new insights from ERK5 MAP kinase. *Neurobiol. Learn Mem.* 2013;105:81–92. DOI: 10.1016/j.nlm.2013.07.011
7. Cutler R.R., Kokovay E. Rejuvenating subventricular zone neurogenesis in the aging brain. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2020;50:1–8. DOI: 10.1016/j.coph.2019.10.005
8. Lopatina O.L., Malinovskaya N.A., Komleva Y.K. et al. Excitation/inhibition imbalance and impaired neurogenesis in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Rev. Neurosci.* 2019;30(8):807–820. DOI: 10.1515/revneuro-2019-0014
9. Salmin V.V., Komleva Y.K., Kuvacheva N.V. et al. Differential roles of environmental enrichment in Alzheimer's type of neurodegeneration and physiological aging. *Front. Aging Neurosci.* 2017;9:245. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00245
10. Costa V., Lugert S., Jagasia R. Role of adult hippocampal neurogenesis in cognition in physiology and disease: pharmacological targets and biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015;228:99–155. DOI: 10.1007/978-3-319-16522-6_4
11. Berg D.A., Cho K.O., Jang M.H. Adult neurogenesis as a regenerative strategy for brain repair. *Front. Mol. Neurosci.* 2022;15:1041009. DOI: 10.3389/fnmol.2022.1041009
12. Моргун А.В., Осипова Е.Д., Бойцова Е.Б. и др. Астроцит-опосредованные механизмы регуляции нейрогенеза в модели нейрогенной ниши in vitro при действии Аβ 1–42. *Биомедицинская химия.* 2019;65(5):366–373. Morgun A.V., Osipova E.D., Boytsova E.B. et al. Astroglia-mediated regulation of cell development in the model of neurogenic niche in vitro treated with Aβ1–42. *Biomed. Khim.* 2019;65(5):366–373. DOI: 10.18097/PBMC20196505366
13. Trinchero M.F., Herrero M., Schinder A.F. Rejuvenating the brain with chronic exercise through adult neurogenesis. *Front. Neurosci.* 2019;13:1000. DOI: 10.3389/fnins.2019.01000
14. Minatohara K., Akiyoshi M., Okuno H. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Front. Mol. Neurosci.* 2016;8:78. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00078
15. Tzingounis A.V., Nicoll R.A. Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron.* 2006;52(3):403–407. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.10.016
16. Epstein I., Finkbeiner S. The Arc of cognition: signaling cascades regulating Arc and implications for cognitive function and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018;77:63–72. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.09.023
17. Wall M.J., Corrêa S.A. The mechanistic link between Arc/Arg3.1 expression and AMPA receptor endocytosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018;77:17–24. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.09.005
18. Ashley J., Cordy B., Lucia D. et al. Retrovirus-like Gag protein Arc1 binds RNA and traffics across synaptic boutons. *Cell.* 2018;172(1–2):262–274. DOI: 10.1016/j.cell.2017.12.022
19. Saito K., Koike T., Kawashima F. et al. Identification of NeuN immunopositive cells in the adult mouse subventricular zone. *J. Comp. Neurol.* 2018;526(12):1927–1942. DOI: 10.1002/cne.24463
20. Morin J.P., Díaz-Cintra S., Bermúdez-Rattoni F., Delint-Ramírez I. Decreased levels of NMDA but not AMPA receptors in the lipid-raft fraction of 3xTg-AD model of Alzheimer's disease: relation to Arc/Arg3.1 protein expression. *Neurochem. Int.* 2016;100:159–163. DOI: 10.1016/j.neuint.2016.09.013
21. Wilkerson J.R., Albanesi J.P., Huber K.M. Roles for Arc in metabotropic glutamate receptor-dependent LTD and synapse elimination: Implications in health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018;77:51–62. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.09.035
22. Wu J., Petralia R.S., Kurushima H. et al. Arc/Arg3.1 regulates an endosomal pathway essential for activity-dependent β-amyloid generation. *Cell.* 2011;147(3):615–628. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.036
23. McAvoy K., Besnard A., Sahay A. Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. *Front. Syst. Neurosci.* 2015;9:120. DOI: 10.3389/fnsys.2015.00120
24. Attardo A., Fabel K., Krebs J. et al. Tis21 expression marks not only populations of neurogenic precursor cells but also new postmitotic neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cereb. Cortex.* 2010;20(2):304–314. DOI: 10.1093/cercor/bhp100
25. Kuipers S.D., Tiron A., Soule J. et al. Selective survival and maturation of adult-born dentate granule cells expressing the immediate early gene Arc/Arg3.1. *PLoS One.* 2009;4(3):e4885. DOI: 10.1371/journal.pone.0004885
26. Kalinina A., Maletta T., Carr J. et al. Spatial exploration induced expression of immediate early genes Fos and Zif268 in adult-born neurons is reduced after pentylentetrazole kindling. *Brain Res. Bull.* 2019;152:74–84. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.07.003
27. Aguilar-Arredondo A., Zepeda A. Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus. *Brain. Struct. Funct.* 2018;223(6):2859–2877. DOI: 10.1007/s00429-018-1664-7
28. Аверчук А.С., Рязанова М.В., Баранич Т.И. и др. Нейротоксическое действие бета-амилоида сопровождается изменением митохондриальной динамики и аутофагии нейронов и клеток церебрального эндотелия в экспериментальной модели болезни Альцгеймера. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023;175(3):2–8. Averchuk A.S., Ryazanova M.V., Baranich T.I. et al. The neurotoxic effect of β-amyloid is accompanied by changes in the mitochondrial dynamics and autophagy in neurons and brain endothelial cells in the experimental model of Alzheimer's disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2023;175(3):315–320.
29. Патент РФ № 2020612777. Плагин для программы ImageJ для подсчета флуоресцентных меток на микрофотографиях / В.В. Салмин, А.Б. Салмина, А.В. Моргун. Бюл. № 3. Опубликовано 03.03.2020. Patent of the Russian Federation No. 2020612777. Plug-in for the ImageJ program for counting fluorescent marks on microphotographs / V.V. Salmin, A.B. Salmina, A.V. Morgun. Bull. No. 3. Published 03.03.2020.
30. Scheff S.W., Price D.A., Schmitt F.A., Mufson E.J. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging.* 2006;27(10):1372–1384. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.012
31. Martinsson I., Quintino L., Garcia M.G. et al. Aβ/amyloid precursor protein-induced hyperexcitability and dysregulation of homeostatic synaptic plasticity in neuron models of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2022;14:946297. DOI: 10.3389/fnagi.2022.946297
32. Rudinskiy N., Hawkes J.M., Betensky R.A. et al. Orchestrated experience-driven Arc responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 2012;15(10):1422–1429. DOI: 10.1038/nn.3199
33. Penrod R.D., Kumar J., Smith L.N. et al. Activity regulated cytoskeleton associated protein (Arc/Arg3.1) regulates anxiety and novelty related behaviors. *Genes Brain Behav.* 2019;18(7):e12561. DOI: 10.1111/gbb.12561

Информация об авторах

Рязанова Мария Владимировна — аспирант, лаборант-исследователь, лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0700-4912>

Аверчук Антон Сергеевич — к.б.н., доцент, лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1284-6711>

Ставровская Алла Вадимовна — к.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы и нейрофармакологии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Розанова Наталья Александровна — лаборант-исследователь, лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9619-4679>

Новикова Светлана Викторовна — м.н.с. лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0008-3905-1928>

Салмина Алла Борисовна — д.м.н., профессор, г.н.с., зав. лаб. нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4012-6348>

Вклад авторов. *Рязанова М.В.* — разработка дизайна, выполнение тестирования и иммуногистохимических исследований, написание рукописи; *Аверчук А.С.* — выполнение иммуногистохимических исследований, обработка данных; *Розанова Н.А., Новикова С.В.* — подготовка срезов, выполнение иммуногистохимических исследований; *Ставровская А.В.* — выполнение операции, тестирование животных, обработка данных; *Салмина А.Б.* — создание концепции исследования, разработка дизайна, обработка полученных данных, редактирование рукописи.

Information about the authors

Maria V. Ryzanova — postgraduate student, research assistant, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0700-4912>

Anton S. Averchuk — Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1284-6711>

Alla V. Stavrovskaya — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system and neuropharmacology, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Natalia A. Rozanova — research assistant, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9619-4679>

Svetlana V. Novikova — junior researcher, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0008-3905-1928>

Alla B. Salmina — D. Sci. (Med.), Prof., chief researcher, Head, Laboratory of neurobiology and tissue engineering, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4012-6348>

Author contribution. *Ryzanova M.V.* — design development, testing and immunohistochemical staining, manuscript writing; *Averchuk A.S.* — performing immunohistochemical staining, data processing; *Rozanova N.A., Novikova S.V.* — preparation of slices, performing immunohistochemical staining; *Stavrovskaya A.V.* — performing surgery, animal testing, data processing; *Salmina A.B.* — creation of the research concept, design development, processing of the received data, editing of the manuscript.