

На правах рукописи

**БУРНЯШЕВА
АЛЕНА ОЛЕГОВНА**

**НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТЬ ГИППОКАМПА И ЕЁ МОДУЛЯЦИЯ
НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ПРИЗНАКОВ
БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС OXYS**

3.3.3 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Научный руководитель: кандидат биологических наук, научный сотрудник ИЦиГ СО РАН

Рудницкая Екатерина Александровна

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»

Дубровина Нина Ивановна

Доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Жданкина Анна Александровна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук (г. Москва)

Защита состоится 4 июня 2024 в 12 часов года на заседании Диссертационного совета 24.1.242.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630060, тел. 8(383) 335-97-74.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Пальчикова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Возраст – наиболее значимый фактор риска самой распространенной (>95% случаев) спорадической формы болезни Альцгеймера (БА), которая становится основной причиной сенильной деменции на фоне атрофических изменений мозга. По прогнозам, на фоне увеличения продолжительности жизни к 2050 году количество людей, страдающих деменцией, превысит 150 миллионов (World Alzheimer Report 2021). Активно обсуждается необходимость предупредить такой рост принятием мер, направленных на борьбу с БА на самых ранних этапах ее развития, при этом все чаще как критический для запуска патологических процессов период рассматривается средний возраст (Ritchie et al., 2017). Патогенез БА связан с накоплением пептида β -амилоида ($A\beta$), образованием клубков гиперфосфорилированного тау-белка, нейровоспалением, снижением плотности синапсов и гибелью нейронов, в его основе лежат характерные для старения изменения, но механизмы их перехода к патологическим процессам остаются не ясными. Эффективных подходов, способных замедлить или остановить прогрессию БА – многофакторного заболевания полигенной природы – нет. Широко применяемые для смягчения симптомов БА препараты малоэффективны и могут оказывать обратное действие, из-за чего запрещены в ряде стран (Walsh et al., 2019). Одним из факторов, лежащих в основе нарушения когнитивных функций при БА, становится нарушение нейропластичности гиппокампа – структуры, играющей ключевую роль в преобразовании кратковременной памяти в долговременную. В основе нейропластичности лежат изменения активности нейромедиаторных сигнальных систем, синаптогенез и нейрогенез (Гуляева, 2017). Основным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе (ЦНС) является глутамат, а основным тормозным – гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), которые совместно контролируют многие процессы в ЦНС, включая общий уровень возбуждения мозга. Сбалансированное взаимодействие этих систем необходимо для поддержания физиологического гомеостаза, в то время как длительный дисбаланс может способствовать развитию психических и нейродегенеративных расстройств (Hampe et al., 2018). Эксайтотоксический уровень внеклеточного глутамата и нарушение баланса глутаматергической и ГАМКергической систем выявляются в головном мозге пациентов с БА (Snowden et al., 2019), однако вопрос о том, становится ли нарушение их баланса одной из причин или следствием развития заболевания, остается открытым. Нейромедиаторные системы принимают участие в регуляции всех стадий нейрогенеза – пролиферации, миграции, дифференцировки и созревания клеток, а также селективного апоптотического отбора как в развивающемся, так и в зрелом мозге. Зубчатая извилина гиппокампа является областью головного мозга, в которой располагаются нейрональные стволовые клетки, дающие начало новым нейронам после завершения развития мозга. С возрастом и особенно при развитии нейродегенеративных процессов скорость нейрогенеза существенно снижается.

Существуют доказательства того, что нарушение нейрогенеза вносит вклад в развитие и прогрессию БА (Chen et al., 2023), однако причинно-следственная связь между ним и развитием нейродегенеративных процессов остаётся до конца не ясной.

Степень разработанности темы исследования

Исследования состояния нейрогенеза у пациентов с БА проводятся с 1997 года, однако результаты оценки его маркеров в посмертных образцах гиппокампа пациентов по-прежнему противоречивы (Choi and Tanzi, 2023). Снижение нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа зрелого мозга на ранних стадиях БА коррелирует с когнитивным статусом пациентов (Hamilton, Fernandes, 2018). Закономерно, что восстановление нейрогенеза рассматривается как перспективный терапевтический подход к профилактике и подавлению прогрессии БА. Комплексное воздействие на различные этапы нейрогенеза оказывает гиппокамп-зависимое обучение, способное влиять на пролиферацию, выживание и гибель клеток и рост дендритов (Abrous, Wojtowicz, 2015), однако остаётся не ясным, на какие звенья нейрогенеза и на каких стадиях развития БА оно способно воздействовать. Такая ситуация обусловлена невозможностью исследовать эти вопросы у людей, тем более – на ранних доклинических стадиях развития БА, а также дефицитом адекватных биологических моделей заболевания. Уникальной моделью спорадической формы БА является линия преждевременно стареющих крыс OXYS (ИЦиГ СО РАН), у которых развиваются все ключевые признаки заболевания. В возрасте 3-5 мес. у крыс OXYS выявляются изменения поведения на фоне усиления фосфорилирования тау-белка, нарушения длительной посттетанической потенциации, синаптической недостаточности и деструктивных изменений нейронов, которые прогрессируют на фоне повышения уровня белка-предшественника A β (APP), усиленного накопления A β и образования амилоидных бляшек в мозге к возрасту 12 мес. и достигают ярко выраженных стадий БА-подобной патологии к 16-18 мес. (Kolosova et al., 2014, 2017; Stefanova et al., 2014 - 2023). Исследования связи развития у крыс OXYS признаков БА с изменениями нейропластичности гиппокампа - балансом нейромедиаторов глутамата и ГАМК, особенностями нейро- и астроцитогенеза в зубчатой извилине - ранее не проводились.

Цель работы – исследовать нейропластичность гиппокампа на разных стадиях развития признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS и оценить возможность её модуляции.

Задачи исследования:

1. Оценить интенсивность нейро- и астроцитогенеза в зубчатой извилине гиппокампа крыс OXYS и Вистар (контроль) в возрасте 1.5, 3, 12 и 18 месяцев.
2. Определить уровень глутамата и ГАМК, а также содержание их ключевых ферментов синтеза, белков-транспортеров и рецепторов в гиппокампе крыс OXYS и Вистар в возрасте 1.5, 3, 12 и 18 месяцев.
3. На основании полученных ранее данных транскриптома проанализировать изменения с возрастом уровня мРНК генов, связанных с сигнальными путями

глутамата/ГАМК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар (в возрасте 20 дней, 5 и 18 месяцев).

4. Изучить особенности обучения и переобучения в тесте «водный лабиринт Морриса» крыс OXYS в возрасте 1,5, 3, 12 и 18 месяцев.

5. Оценить влияние обучения в тесте «водный лабиринт Морриса», проведенного в возрасте 1,5, 3, 12 и 18 месяцев, на интенсивность нейро- и астроцитогенеза в зубчатой извилине гиппокампа крыс OXYS и Вистар.

Научная новизна исследования

Впервые получена информация об изменениях нейро- и астроцитогенеза в зубчатой извилине гиппокампа в динамике развития признаков БА на модели наиболее распространенной спорадической формы заболевания. Установлено, что признаки БА у крыс OXYS развиваются и прогрессируют на фоне снижения интенсивности нейрогенеза и усиления астроцитогенеза в зубчатой извилине гиппокампа, что подтверждает наличие неизрасходованного пула нейрональных стволовых клеток в зубчатой извилине крыс OXYS на стадии прогрессии заболевания (18 мес.).

Показано, что с возрастом экспрессия генов сигнальных путей глутаматергического и ГАМКергического синапсов в гиппокампе крыс OXYS, как и у крыс Вистар, снижается сходными темпами. Выявлено нарушение баланса между процессами синтеза и деградации ГАМК в гиппокампе крыс OXYS при развитии и прогрессии признаков БА.

Впервые оценена динамика изменений способности к обучению, переобучению и пространственной памяти у крыс OXYS с возраста 1,5 мес. до 18 мес. Установлено, что пространственное обучение активирует нейро- и астроцитогенез в зубчатой извилине гиппокампа, его эффекты изменяются с возрастом и по мере развития признаков БА у крыс OXYS: обучение в молодом возрасте (1,5 и 3 мес.) активирует нейрональные клетки-предшественники, обучение в период развития и прогрессии нейродегенеративных изменений (возраст 12 и 18 мес.) влияет в основном на клетки астроцитарного ряда.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Полученные результаты позволяют расширить современные представления о механизмах, лежащих в основе перехода от характерных для старения изменений мозга к развитию спорадической формы БА. Показано, что изменения нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа крыс OXYS предшествуют развитию у них признаков БА, а когнитивные тренировки, начатые в молодом возрасте, стимулируют нейрогенез. Результаты исследования могут быть использованы в качестве теоретической базы при разработке основанных на когнитивных тренировках подходов к замедлению старения мозга и профилактике БА. Также полученные данные могут быть использованы в учебном процессе в курсах «Патологическая физиология» и «Неврология».

Методология и методы исследования. Диссертационная работа выполнена на крысах линии OXYS на базе ЦКП «Генофонды лабораторных животных» ИЦиГ СО

РАН. Предметом исследования явилась оценка вклада изменений нейрогенеза в гиппокампе в развитие признаков БА у крыс OXYS. Методологическую основу работы составило исследование нейрональной пластичности с использованием теста «водный лабиринт Морриса» для оценки памяти и способности животных к обучению, методов иммуногистохимического, иммуноферментного и вестерн-блот анализа, а также биоинформатический анализ данных массового параллельного секвенирования транскриптомов гиппокампа животных, анализ и синтез информации из научной литературы. Эксперименты проводились в соответствии с приказом Министерства Здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года № 199н «об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и положениями Директивы Евросоюза 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. и одобрено комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол №34 от 15.06.2016).

Вклад автора. Основные результаты работы были получены и проанализированы автором самостоятельно. Личный вклад автора диссертации заключается в непосредственном планировании и постановке экспериментов, интерпретации и обсуждении результатов, написании статей. Самостоятельно были проведены поведенческие тесты, иммуногистохимические исследования и вестерн-блот анализ, выполнен статистический анализ данных. Массовое параллельное секвенирование образцов гиппокампов крыс OXYS и Вистар проведено на платформе Illumina Genome Analyzer Пх в ОАО «Геноаналитика», Россия. Списки дифференциально экспрессирующихся генов были сформированы на основе первичного анализа транскриптома, выполненного д.б.н. Стефановой Н.А. (Stefanova et al., 2018). Анализ изменений с возрастом экспрессии генов, связанных с сигнальными путями глутамата и ГАМК, был проведен самостоятельно.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Развитие и прогрессия признаков БА у крыс OXYS происходят на фоне снижения интенсивности нейрогенеза и усиления астроцитогенеза в зубчатой извилине гиппокампа.
2. С возрастом активность глутаматергической и ГАМКергической систем снижается в гиппокампе крыс Вистар и OXYS, при этом существенных различий этих систем, связанных с развитием признаков БА у крыс OXYS, не выявлено.
3. Пространственное обучение усиливает нейро- и астроцитогенез в зубчатой извилине гиппокампа, его эффекты зависят от возраста животных и изменяются по мере развития признаков БА у крыс OXYS.

Апробация результатов. Полученные результаты работы были представлены на конференции Российского нейрохимического общества (Санкт-Петербург, 2022), международной конференции BGRS/SB-2020 и 2022 (Новосибирск, 2020, 2022), The 14th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (Лиссабон, 2019), 13th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (Геттинген, 2019), XVIII Конференции-школе Актуальные проблемы биологии развития (Москва, 2019), Международной научной студенческой конференции МНСК (Новосибирск, 2018, 2019).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 7 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата наук.

Структура диссертации. Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждение, выводы и список цитируемой литературы из 320 источников (8 отечественных и 312 иностранных). Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 21 рисунок, 2 таблицы и 1 приложение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Работа выполнена на крысах-самцах линий OXYS и Вистар (контроль). Животные содержались в стандартных условиях вивария при освещении 12 часов свет/12 часов темнота, получали гранулированный корм и воду *ad libitum*.

Иммуногистохимический анализ. Проводили количественную оценку плотности клеток нейронального и астроцитарного рядов в зубчатой извилине (ЗИ) гиппокампа крыс OXYS и Вистар в возрасте 1.5, 3, 12 и 18 мес. (n=3-6 для каждой группы); оценивали влияние обучения в тесте «водный лабиринт Морриса» на плотность клеток через 4 недели после начала обучения – срок, необходимый для созревания новообразованных нейронов – в возрасте 2.5, 4, 13 и 19 мес., соответственно (n=3-6 для каждой группы). Мозг фиксировали в 4% параформальдегиде (48 ч.), криопротекцию осуществляли в 30% растворе сахарозы (48 ч.). Сагиттальные срезы мозга (20 мкм.) изготавливали в криостате Microm HM-505N при -25°C. Срезы монтировали на предметные полилизинные стекла. Для получения флуоресценции по 3 среза от каждого животного из группы инкубировали в течение 1 часа в 1% бычьем сывороточном альбумине (BSA) в PBSTr (PBS с 0,1% Triton X100). Затем срезы инкубировали при +4°C с первичными антителами к нестину, виментину, даблкортину (DCX), NeuN, GFAP (16 ч.). После промывки в PBS срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами (1 ч.), промывали в PBS, наносили монтирующую среду с DAPI для окрашивания ядер. Флуоресценцию детектировали с помощью микроскопа AXIOSKOP 2 plus.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Содержание глутамата и ГАМК оценивали в гиппокампе крыс OXYS и Вистар в возрасте 1.5, 3, 12 и 18 мес. методом ИФА (n=6 для каждой группы), используя наборы ELISA Kit for Glutamic Acid (Glu) CES122Ge и ELISA Kit for Gamma-Aminobutyric Acid (gABA) CEA900Ge согласно протоколу производителя (Cloud-Clone Corp).

Вестерн-блот анализ. Образцы гиппокампов крыс OXYS и Вистар в возрасте 1.5, 3, 12 и 18 мес. (n=4-6 для каждой группы) гомогенизировали в лизирующем буфере (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% Triton X-100, 0,1% додецилсульфат натрия, 1% дезоксихолат натрия и 1 mM ЭДТА) с ингибиторами протеаз и фосфатаз. Гомогенат центрифугировали на 12000 g при +4°C 30 мин. Концентрацию общего белка определяли с помощью набора ThermoFisher Pierce™ BCA Protein Assay. Образцы белка в загрузочном буфере (10% SDS; 15% β-меркаптоэтанол; 50% глицерин; 0.3M трис-HCl pH 6.8;

бромфеноловый синий) наносили по 50 мкг общего белка на дорожки 8% полиакриламидного геля в трис-глициновом буфере. После переноса на нитроцеллюлозную мембрану блокировали в 5% BSA в PBS с 0,1% Tween20 (PBST). Мембраны инкубировали в течение 16 ч при +4°C с первичными антителами к GAD67, глутаминазе, глутаминсинтетазе, GABA-T, GLAST, GLT-1, GAT1, NMDAR1, NMDAR2B, GluA1, GABAR1. В качестве референсного белка использовали β -актин и GAPDH. После 3 отмывок в PBST проводили инкубацию с соответствующими вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Флуоресцентное излучение детектировали с помощью прибора ChemiDoc MP, Helicon. Интенсивность свечения бендов измеряли с помощью программы ImageJ.

Массовое параллельное секвенирование (RNA-seq) образцов гиппокампов крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 5 и 18 мес. (n=3 для каждой группы) проводили на платформе Illumina Genome Analyzer IIx в ОАО «Геноаналитика», Россия. Для каждого образца было получено ~40 млн ридов длиной 50 нуклеотидов. Риды картировали на референсный геном *Rattus Norvegicus* (версия Rnor_5.0.76) с помощью программы TopHat (v2.0.10). На основании данных RNA-Seq (Stefanova et al., 2018) при уровне значимости $P_{adj} < 0.05$ были сформированы списки дифференциально экспрессирующихся генов. Список генов, связанных с сигнальным путем глутамата, был извлечен из базы данных генома крысы (RGD; 126 генов крысы, <https://rgd.mcg.edu/>). Список генов, связанных с сигнальным путем ГАМК, был получен в базе данных KEGG pathway (89 генов человека, <http://www.genome.jp/kegg/>).

Тест «Водный лабиринт Морриса». Способность к обучению и переобучению крыс OXYS и Вистар в возрасте 1,5, 3, 12 и 18 мес. (n=8 для каждой группы) оценивали в тесте «Водный лабиринт Морриса» (Morris, 1984) с модификациями (Vorhees, Williams, 2006). Установка представляла собой круглый бассейн, поделенный на четыре равных сектора, которые получили условную нумерацию № 1, 2, 3, 4. Квадратная платформа помещалась в середину целевого сектора. В первые 5 дней тестирования скрытую под водой платформу располагали в 1 секторе, с 6-го по 10-й дни её перемещали в противоположный 3 сектор для оценки способности животных к переобучению. Животное помещали в бассейн у стенки и предоставляли 70 сек. для того, чтобы отыскать платформу. Ежедневно каждое животное выполняло по четыре попытки нахождения платформы. Проверку памяти проводили на 11-й день, когда платформу из бассейна извлекали.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0. Использовали тест Колмогорова-Смирнова для проверки на нормальность распределений. Использовали дисперсионный анализ с последующим *post-hoc* сравнением межгрупповых средних по критерию Ньюмена-Кейлса; t-критерий Стьюдента для зависимых парных сравнений. Для динамических результатов поведенческого тестирования использовали дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным сравнением средних по критерию Фишера. Как независимые рассматривали факторы «генотип», «возраст» и «день обучения». Данные представлены как Mean \pm S.E.M. Различия считали статистически значимыми

при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление особенностей нейрогенеза и астроцитогенеза в ЗИ гиппокампа крыс OXYS на разных стадиях развития у них признаков БА

Для оценки интенсивности нейро- и астроцитогенеза в ЗИ гиппокампа крыс определяли плотность нейрональных стволовых клеток (НСК; Нестин+Виментин), способных давать начало клеткам как нейронального, так и глиального рядов, нейрональных клеток-предшественников (НКП; Нестин), способных давать начало только клеткам нейронального ряда, нейробластов (DCX), незрелых (DCX+NeuN) и зрелых нейронов (NeuN), астроцитарных клеток-предшественников (АКП; Виментин+GFAP) и астроцитов (GFAP).

Оценка плотности клеток-предшественников показала, что плотность НСК и НКП с возрастом снижается у крыс обеих линий, но у крыс OXYS - более медленными темпами. Так, если у крыс Вистар плотность НСК и НКП снижалась до возраста 18 мес., то у крыс OXYS снижение этих параметров происходило только до возраста 12 мес. В результате в возрасте 18 мес. плотность НСК в ЗИ крыс OXYS была почти втрое выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,0001$; рис.1А).

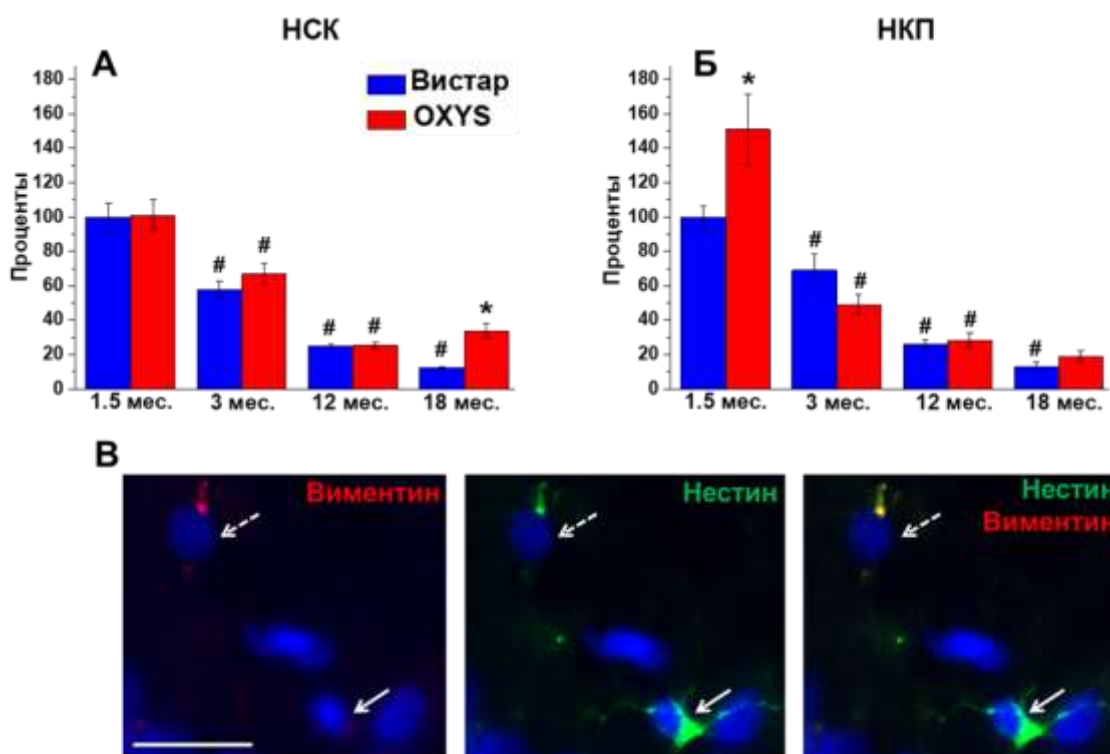


Рис. 1. Плотность НСК (А) и НКП (Б) в ЗИ гиппокампе крыс разного возраста. В – Иммуногистохимическое окрашивание клеток-предшественников: пунктирной стрелкой обозначена НСК (колокализация нестина – окрашен зелёным и виментина - красным), сплошной стрелкой – НКП (нестин, зелёный). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). За 100% взята плотность клеток у крыс Вистар в возрасте 1.5 месяцев. Масштаб: 20 мкм. Различия достоверны ($p < 0,05$): * – между линиями; # – с предыдущим возрастом.

Повышенная плотность НСК в возрасте 18 мес. свидетельствует о меньшем истощении пула стволовых клеток и может быть следствием снижения интенсивности нейрогенеза в ЗИ гиппокампа крыс OXYS в более раннем возрасте. При этом в возрасте 1,5 мес. (период полового созревания) у крыс OXYS плотность НКП была в 1,5 раза выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,03$; рис.1Б), что может быть обусловлено более интенсивным нейрогенезом в ЗИ гиппокампа в этот период.

Оценка плотности клеток нейронального ряда в ЗИ гиппокампа показала, что к возрасту 12 мес. у крыс обеих линий плотность нейробластов снижается ($p < 0,0006$ для обеих линий; рис.2А) и остается на том же уровне у 18-мес. животных. Плотность незрелых нейронов (рис. 2Б) с возрастом снижается у крыс обеих линий и к возрасту 18 мес. становится более чем в 20 раз меньше, чем у 1,5-месячных крыс ($p < 0,0002$). Межлинейных различий по этому показателю не выявлено. Плотность зрелых нейронов у крыс Вистар повышается к возрасту 3 мес. ($p < 0,0006$; рис. 2В) и остаётся на этом уровне в 12 и 18 мес. При этом в возрасте 1,5 мес. плотность зрелых нейронов у крыс OXYS была втрое выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,03$), и значимо не изменялась вплоть до возраста 18 мес (рис. 2В). Это может быть обусловлено повышенным запросом на созревание нейронов и их интеграцию в нейрональную сеть гиппокампа для его успешного функционирования в условиях нейродегенеративных изменений и усиленной гибели нейронов (Stefanova et al., 2014). Снижение с возрастом плотности нейробластов и незрелых нейронов и увеличение плотности зрелых нейронов в ЗИ гиппокампа крыс обеих линий отражает замедление темпов нейрогенеза в ЗИ с возрастом и при старении.

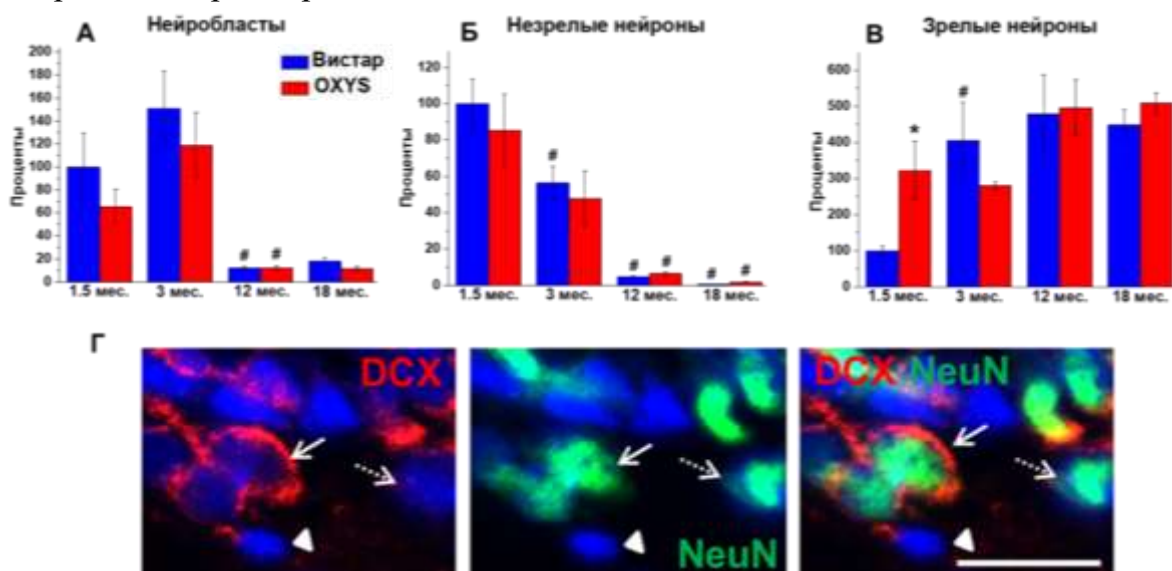


Рис. 2. Плотность нейробластов (А), незрелых (Б) и зрелых (В) нейронов в ЗИ гиппокампа крыс OXYS и Вистар разного возраста. (Г) – Иммуногистохимическое окрашивание клеток нейронального ряда: треугольником обозначен нейробласт (DCX-позитивный, красный), стрелкой обозначен незрелый нейрон (колокализация DCX (красный) и NeuN (зеленый)), пунктирной стрелкой обозначен зрелый нейрон (NeuN-позитивный, зеленый). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). За 100% взята плотность клеток у крыс Вистар в возрасте 1,5 месяцев. Масштаб: 20 мкм. Достоверные различия ($p < 0,05$): * – между линиями; # – с предыдущим возрастом.

Оценка плотности клеток астроцитарного ряда в ЗИ гиппокампа показала, что плотность АКП снижается с возрастом у крыс обеих линий, но у крыс OXYS - медленнее (рис.3А). В возрасте 12 мес. плотность АКП у крыс OXYS оставалась на уровне 3-мес. животных и была почти вдвое выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,005$; рис.3А). Плотность астроцитов у крыс Вистар увеличивалась к 3 мес. ($p < 0,0002$; рис.3Б), значимо не изменялась до 12 мес. и снижалась к возрасту 18 мес. до уровня 1.5-мес. животных. У крыс OXYS плотность астроцитов к 3 мес. повышалась более чем вдвое по сравнению с 1.5-мес. животными ($p < 0,002$), затем снижалась к 12 мес. ($p < 0,02$), снова возрастала к 18 мес. ($p < 0,0003$) и становилась в 1,6 раз выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,0002$; рис.3Б). Повышенная плотность астроцитов у крыс OXYS в возрасте 18 мес. на фоне увеличения плотности АКП в период активной прогрессии признаков БА может быть реакцией на нейродегенеративные изменения в мозге. Однако является ли эта реакция компенсаторной или, напротив, усугубляет нейродегенерацию, ещё предстоит выяснить.

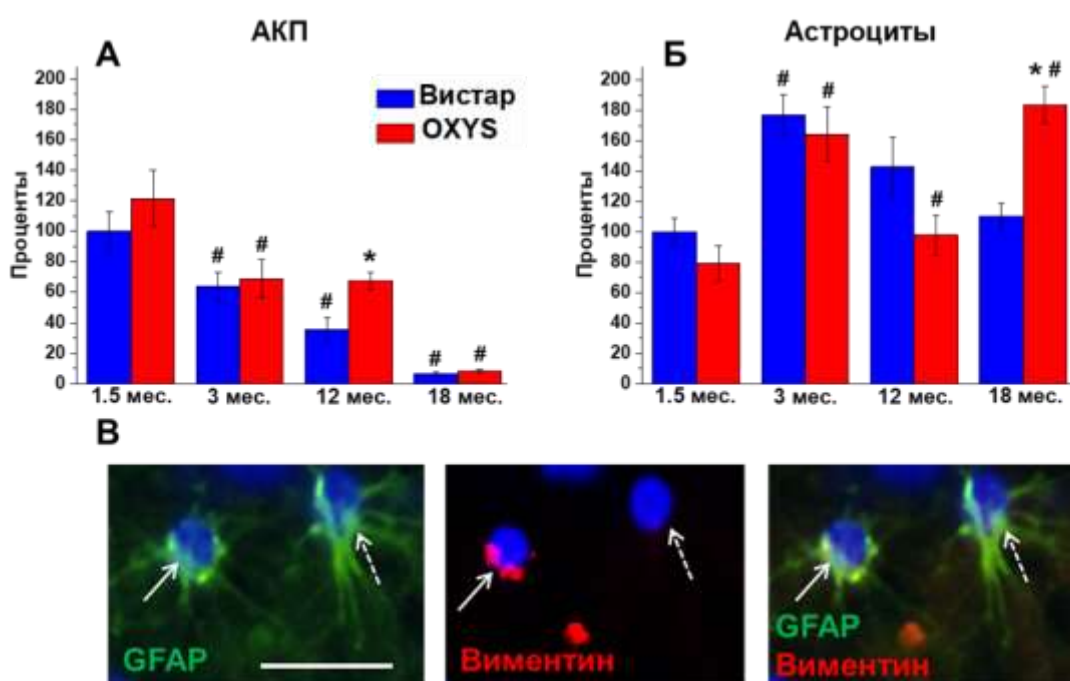


Рис. 3. Плотность АКП (А) и астроцитов (Б) в ЗИ гиппокампа крыс OXYS и Вистар разного возраста. В – иммуногистохимическое окрашивание клеток астроцитарного ряда: АКП (сплошная стрелка; колокализация GFAP - зелёный - и виментина - красный). Пунктирной стрелкой обозначен зрелый астроцит (GFAP-позитивный, зелёный). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). За 100% взята плотность клеток у крыс Вистар в возрасте 1.5 месяцев. Масштаб: 20 мкм. Достоверные различия ($p < 0,05$): * – между линиями; # – с предыдущим возрастом.

Выявление особенностей глутаматергической и ГАМКергической систем в гиппокампе крыс OXYS на разных стадиях развития у них признаков БА

Исследование содержания свободных глутамата (рис.4А) и ГАМК (рис.4Б) в гиппокампе крыс Вистар и OXYS не выявило достоверных изменений с возрастом и межлинейных различий в уровне нейромедиаторов.

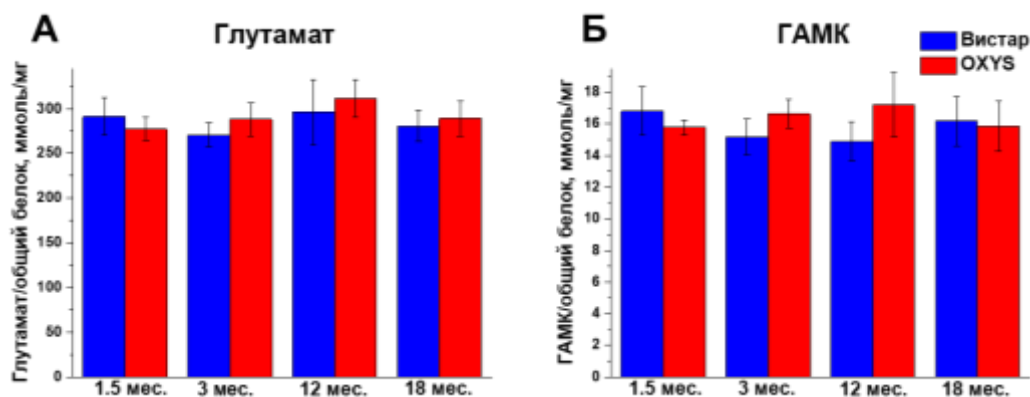


Рис. 4. Содержание глутамата (А) и ГАМК (Б) в гиппокампе крыс OXYS и Вистар разного возраста (n = 5).

Также не было выявлено межлинейных различий в содержании в гиппокампе ключевых ферментов синтеза глутамата - белков глутаминазы (рис.5А) и глутаминсинтетазы (рис.5Б). Уровень этих белков значимо не изменялся и с возрастом как у крыс OXYS, так и у крыс Вистар.

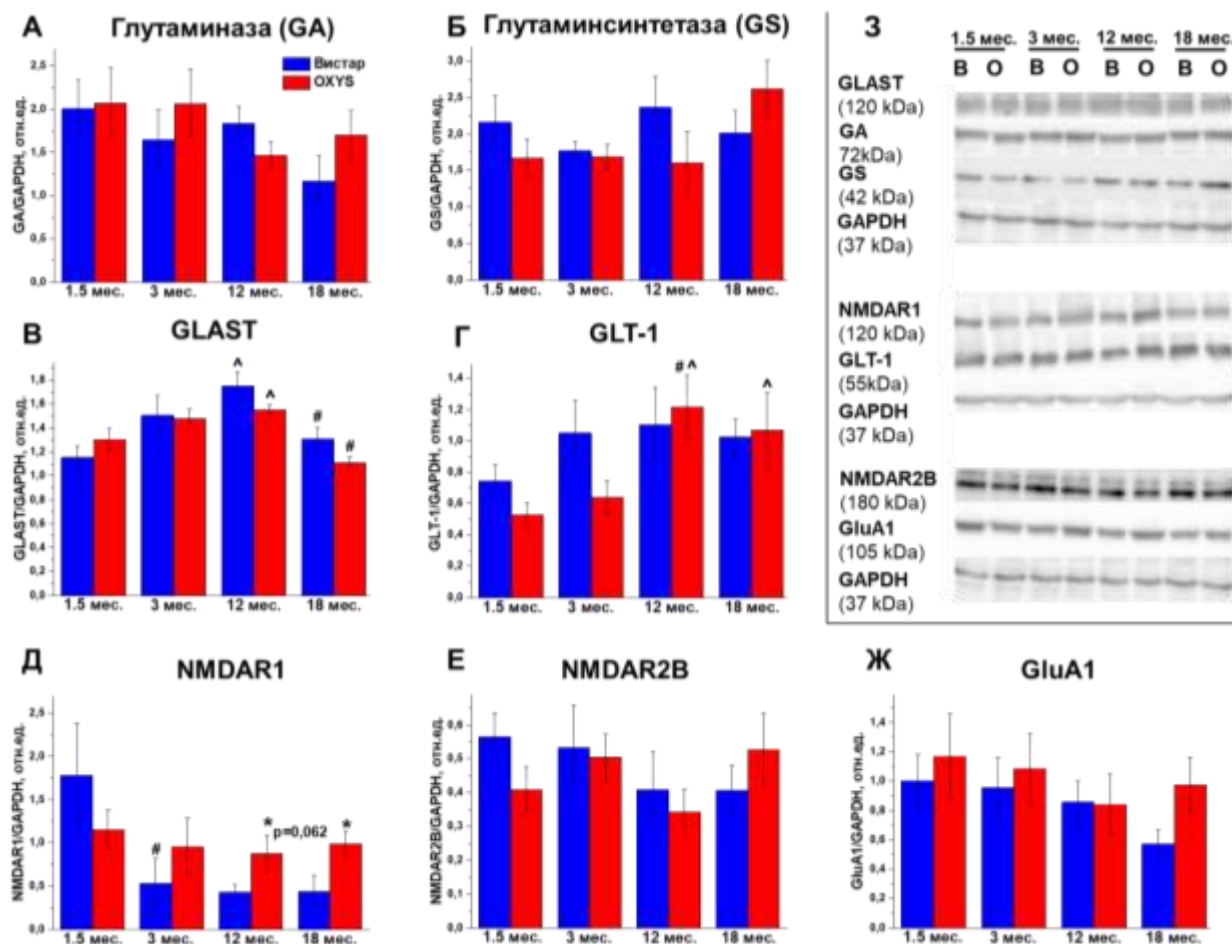


Рис. 5. Изменения глутаматергической системы в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. GA - глутаминаза (А), GS - глутаминсинтетаза (Б), белки-транспортеры GLAST (В) и GLT1 (Г), субъединицы рецепторов NMDAR1 (Д), NMDAR2B (Е) и GluA1 (Ж). (3) – репрезентативные изображения белков, полученные методом вестерн-блот анализа. Различия достоверны (p<0,05): * - между линиями, # - с предыдущим возрастом, ^ - с 1.5-мес. животными. (n=4–6). В-Вистар, О-OXYS.

У крыс обеих линий содержание белка-транспортера глутамата GLAST к возрасту 12 мес. повышалось, а к 18 мес. снижалось до уровня 1.5 мес. ($p < 0,05$; рис.5В). Содержание белка-транспортера глутамата GLT-1 у крыс Вистар с возрастом значимо не изменялось, тогда как у крыс OXYS повышалось с 3 до 12 мес. и оставалось на том же уровне в 18 мес. (рис.5Г).

Уровень NMDAR1, субъединицы NMDA рецептора глутамата, у крыс Вистар к возрасту 12 мес. снижался ($p < 0,05$ по сравнению с 1.5-мес. животными; рис.5Д), у крыс OXYS с возрастом значимо не изменялся. В результате в возрасте 12 мес. наблюдалась тенденция к его повышению ($p = 0,062$), а в 18 мес. уровень NMDAR1 в гиппокампе крыс OXYS был достоверно выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$; рис.5Д). Не было выявлено значимых изменений с возрастом и межлинейных различий в содержании NMDAR2B - субъединицы NMDA рецептора глутамата (рис.5Е). Уровень субъединицы рецептора глутамата GluA1 также не различался у крыс Вистар и OXYS и не менялся с возрастом (рис. 5Ж). Таким образом, мы не обнаружили значимых межлинейных различий в содержании ключевых белков глутаматергической системы в гиппокампе животных, за исключением повышенного содержания NMDAR1 на поздних стадиях развития признаков БА у крыс OXYS.

GAD67 катализирует преобразование глутамата с помощью декарбоксилирования в ГАМК, а разрушение ГАМК до глутамина катализируется ГАМК-трансаминазой (GABA-T) (Govindpani et al., 2017). Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что уровень GAD67 у крыс OXYS повышен ($F_{1,38} = 4,2$, $p < 0,05$; рис.6А), а уровень GABA-T – снижен ($F_{1,39} = 6,3$, $p < 0,02$; рис.6Б) по сравнению с крысами Вистар, при этом влияния фактора «возраст» выявлено не было. Такие результаты указывают на повышенный запрос на образование ГАМК в гиппокампе крыс OXYS.

GAT1 является транспортером, удаляющим ГАМК из синаптической щели. Мы не выявили межлинейных различий в содержании GAT1 и его значимых изменений с возрастом в гиппокампе крыс OXYS и Вистар (рис. 6В). В возрасте 3 мес. уровень рецептора ГАМК GABAAR1 был у крыс OXYS выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$; рис.6Г). К 12 мес. его уровень значительно увеличивался ($p < 0,0001$ для крыс Вистар и $p < 0,006$ для OXYS), а к возрасту 18 мес. GABAAR1 существенно снижался у крыс обеих линий и был при этом у крыс OXYS выше, чем у одновозрастных крыс Вистар ($p < 0,02$; рис.6Г).

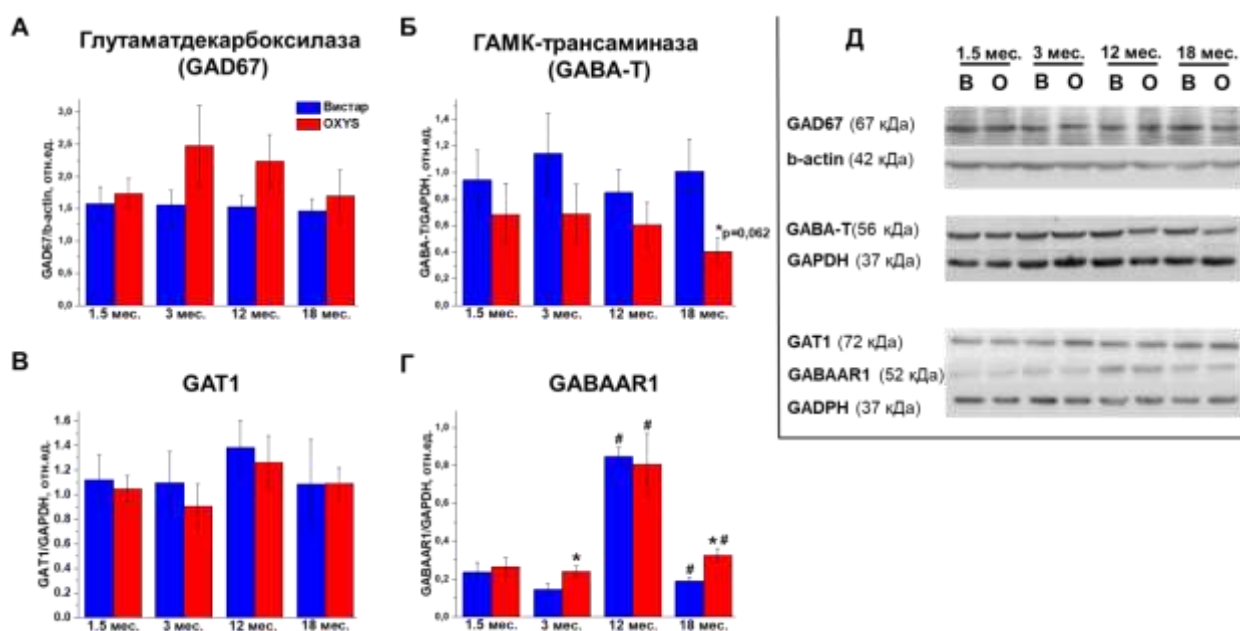


Рис. 6. Изменения ГАМКергической системы в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. GAD67 – глутаматдекарбоксилаза (А), GABA-T – ГАМК-трансаминаза (Б), транспортер ГАМК GAT1 (В) и рецептор ГАМК GABAAR1 (Г). (Д) – репрезентативные изображения белков, полученные методом вестерн-блот анализа. Различия достоверны ($p<0,05$): * - между линиями; # - с предыдущим возрастом ($n=4-6$). В-Вистар, О-OXYS.

У крыс OXYS с возраста 20 дней до 5 мес. изменялась экспрессия 29 из 126 генов, связанных (согласно RGD) с сигнальным путем глутамата, а у крыс Вистар – 34 генов. С возраста 5 до 18 мес. у крыс OXYS изменялась экспрессия 56, а у крыс Вистар – 51 гена (рис.7А). Анализ экспрессии генов, связанных с ГАМКергическим синапсом (согласно базе данных KEGG pathway), показал, что у крыс OXYS с возраста 20 дней до 5 мес. изменялась экспрессия 13 из 89, а у крыс Вистар – 21 гена. С возраста 5 до 18 мес. у крыс OXYS изменялась экспрессия 41 гена, а у Вистар – 37 генов (рис.7Б).

В возрасте 20 дней экспрессия только 4 генов, связанных с глутаматергическим синапсом, у крыс OXYS отличалась от таковой у крыс Вистар: уровень мРНК *Grin3b*, *Grm6* и *Slc1a2* был повышен, а *Pla2g5* – снижен ($padj < 0.05$). В 5 мес. у крыс OXYS повышена экспрессия генов *Grin3b* и *Pla2g2d*, в возрасте 18 мес. - повышена экспрессия гена *Pla2g6*, а экспрессия генов *Gng12*, *Grm6*, *Ppp3r1* и *Slc1a1* – снижена. Только в возрасте 18 мес. выявлены изменения экспрессии генов, связанных с ГАМКергическим синапсом: уровень мРНК генов *Gad2*, *Gng12*, *Plcl1* и *Trak2* был снижен у крыс OXYS. Таким образом, основные изменения экспрессии генов, связанных с сигнальными путями глутамата и ГАМК, происходят у крыс обеих линий с возрастом, при этом уровень мРНК подавляющего большинства из них закономерно снижается.

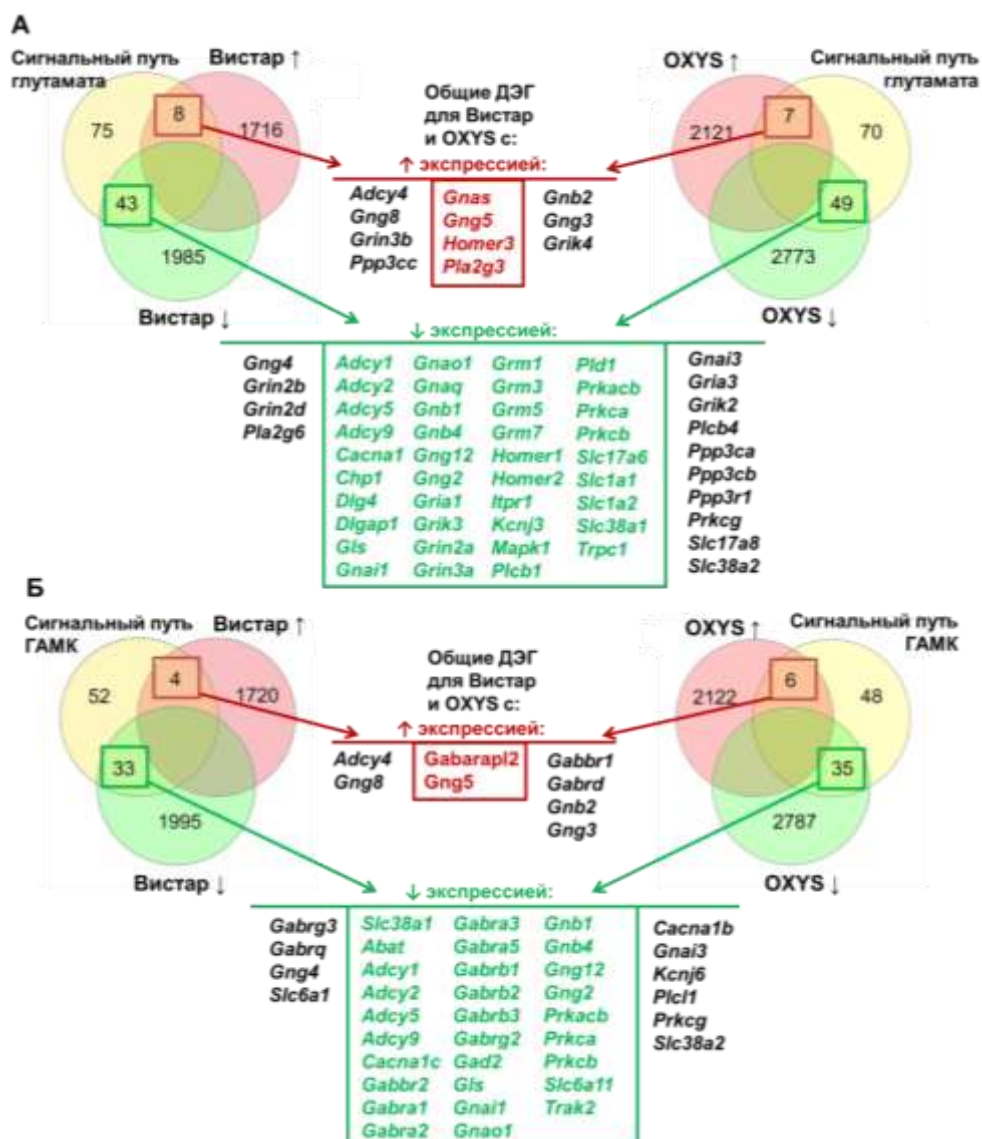


Рис. 7. Диаграммы Венна для дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) сигнальных путей глутамата (А) и ГАМК (Б) в гиппокампе крыс Вистар и ОХYS с возраста 5 до 18 мес. В красном и зеленом прямоугольниках приведены гены, уровень мРНК которых однонаправленно изменялся у крыс Вистар и ОХYS с возрастом. Стрелка вниз - экспрессия снижена, вверх - повышена.

Согласно Сох (2022), снижение глутаматергической передачи может служить биомаркером перехода от физиологического к патологическому старению. В целом полученные нами результаты свидетельствуют о том, что с возрастом активность глутаматергической и ГАМКергической систем в гиппокампе крыс Вистар и ОХYS снижается. При этом у крыс ОХYS не выявлено существенных изменений этих систем, связанных с развитием характерных для БА нейродегенеративных процессов.

Исследование пространственной памяти, способности к обучению и переобучению крыс OXYS на разных стадиях развития у них признаков БА

В возрасте 1.5 мес., начиная со 2-ого дня обучения, крысы Вистар научились находить местоположение скрытой платформы ($p < 0,001$), тогда как крысы OXYS – только на 3-й день ($p < 0,0001$; рис.8А). Перемещение платформы в противоположный сектор на 6-й день обучения закономерно увеличило латентный период её нахождения у крыс обеих линий. Однако уже на 7-й день обучения крысы Вистар находили новое местоположение платформы ($p < 0,007$), тогда как крысы OXYS – только на 8-ой день ($p < 0,0003$; рис.8А). Таким образом, 1.5-месячные крысы успешно справляются с поставленной задачей, хотя крысы OXYS обучались несколько медленнее, чем крысы Вистар. При проверке долговременной памяти на 11-й день крысы Вистар проводили значительно больше времени в 3 секторе, где находилась платформа с 5-го-10-й дни, по сравнению с другими секторами ($p < 0,04$ для всех остальных секторов), что указывает на успешное переобучение животных (рис. 8Б). В то же время крысы OXYS проводили больше времени в 1 секторе, в котором платформа располагалась до перемещения, что свидетельствует об успешном обучении, но нарушении способности к переобучению животных (рис. 8Б).

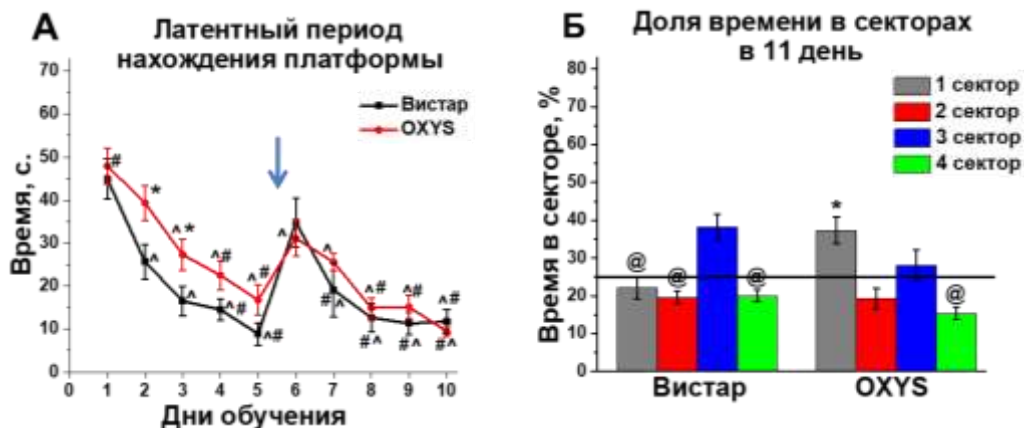


Рис. 8. Оценка способности к обучению и переобучению (А) и долговременной памяти (Б) крыс OXYS и Вистар в возрасте 1.5 мес. в водном лабиринте Морриса. Достоверны различия ($p < 0,05$): * - между линиями; ^ - с 1-м днём обучения; # - с 6-м днём обучения. @ - с долей времени в 3 секторе. Стрелка указывает момент перемещения платформы из 1-го в 3-й сектор. Черная горизонтальная линия обозначает долю времени, которую крысы проводили бы в каждом из четырех секторов при случайном перемещении между секторами.

В возрасте 3 мес. крысы OXYS обучаются медленнее, чем крысы Вистар. Если крысы Вистар находили скрытую платформу, начиная со 2-го дня ($p < 0,0001$), то крысы OXYS – только с 3-го дня обучения ($p < 0,03$; рис. 9А).

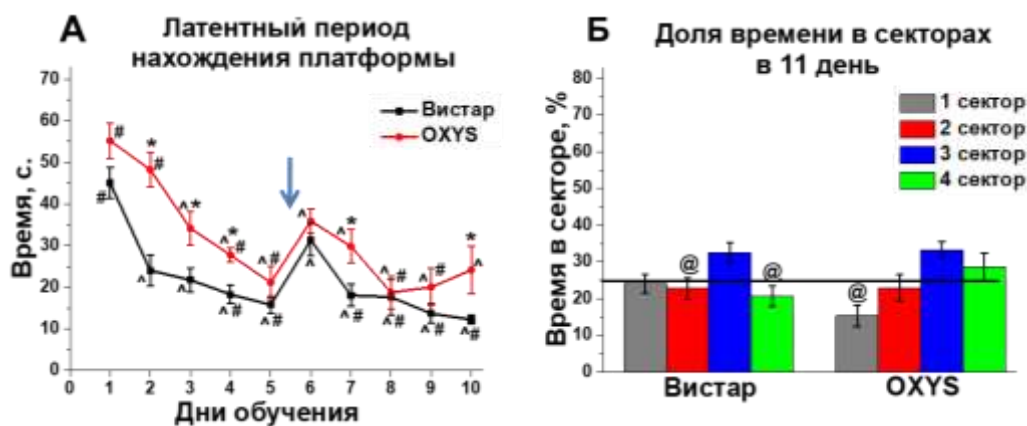


Рис. 9. Оценка способности к обучению, переобучению (А) и долговременной памяти (Б) крыс OXYS и Вистар в возрасте 3 мес. в водном лабиринте Морриса. Достоверны различия ($p < 0,05$): * - между линиями; ^ - с 1-м днём обучения; # - с 6-м днём обучения, @ - с долей времени в 3 секторе. Стрелка указывает момент перемещения платформы из 1-го сектора в 3-й. Черная горизонтальная линия обозначает долю времени, которую крысы проводили бы в каждом из четырех секторов при случайном перемещении между секторами.

Перемещение платформы в противоположный сектор на 6-й день обучения закономерно привело к увеличению латентного периода её нахождения у крыс обеих линий ($p < 0,0003$ для крыс Вистар; $p < 0,001$ для OXYS; рис. 9А). Крысы Вистар обучались находить новое местоположение скрытой платформы на 7-й ($p < 0,002$), тогда как крысы OXYS – только на 8-й день обучения ($p < 0,0002$; рис.9А). На 10-й день время нахождения платформы у крыс OXYS было вдвое больше, чем у Вистар ($p < 0,05$), что указывает на снижение у них способности к переобучению. При проверке долговременной памяти на 11-ый день обучения крысы Вистар демонстрировали предпочтение 3 сектора, в котором располагалась платформа с 6-го по 10-й дни обучения, 2 и 4 секторам ($p < 0,03$ и $p < 0,05$, соответственно; рис. 9Б). Крысы OXYS проводили в 3 секторе значительно больше времени, чем в 1-м ($p < 0,005$), но не в других секторах (рис.9Б). Такие результаты свидетельствуют об успешном переобучении крыс обеих линий, а также о некоторой задержке темпов обучения и переобучения крыс OXYS в этом возрасте.

Примечательно, что в возрасте 12 мес. мы не выявили различий в способности к обучению крыс OXYS и Вистар: начиная со 2-го дня животные обеих линий запоминали местоположение платформы ($p < 0,0001$ для обеих линий; рис. 10А). На 11-й день обучения крысы Вистар проводили вдвое больше времени в 3 секторе, где находилась платформа с 6-го по 10-й дни обучения (рис. 10Б), по сравнению с другими секторами ($p < 0,05$), тогда как время, проведенное крысами OXYS в 3 секторе, достоверно не отличалось от времени, проведенного в 1 секторе, где находилась платформа на 1-5-й дни обучения. Это может быть обусловлено тем, что в возрасте 12 мес. – в период усиленного накопления А β в головном мозге крыс OXYS - подключаются компенсаторные механизмы и мобилизуются резервы организма, направленные на поддержание нормальной работы мозга.

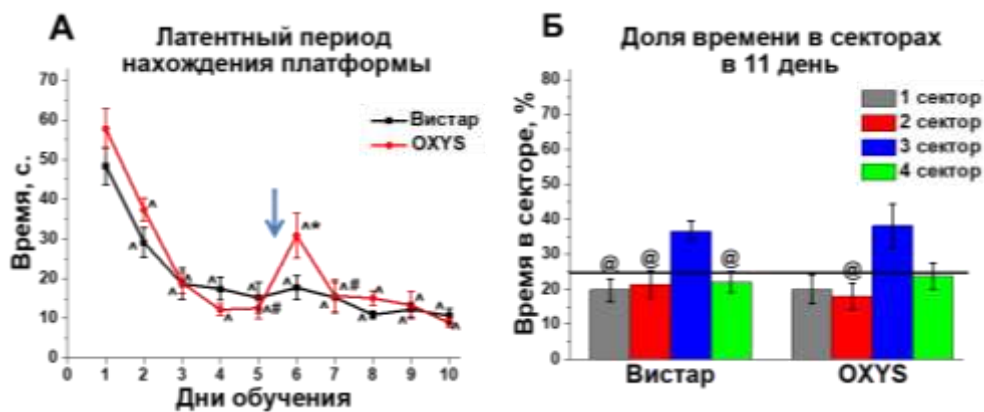


Рис.10. Оценка способности к обучению и переобучению (А) и долговременной памяти (Б) крыс OXYS и Вистар в возрасте 12 мес. в водном лабиринте Морриса. Достоверные различия ($p < 0,05$): * - межлинейные различия; ^ - с 1-м днём обучения; # - с 6-м днём обучения, @ - с долей времени в 3 секторе. Стрелка указывает момент перемещения платформы из 1-го сектора в 3-й. Горизонтальная линия обозначает долю времени, которую крысы проводили бы в каждом из четырех секторов при случайном перемещении между секторами.

В возрасте 18 мес. крысы Вистар обучались находить скрытую платформу, начиная со 2-го дня обучения ($p < 0,0009$) и демонстрировали дальнейшее сокращение латентного периода нахождения платформы в течение последующих дней тестирования ($p < 0,0001$). Время нахождения платформы крысами OXYS значимо не менялось в течение первых пяти дней обучения ($p > 0,05$; рис.11А), период нахождения платформы был больше, чем у крыс Вистар, (рис. 11А). Крысы OXYS обучались находить новое местоположение платформы только к 8-му дню обучения ($p < 0,0001$ по сравнению с 6-м днем обучения; рис.11А). Проверка долговременной памяти животных показала, что крысы Вистар предпочитали всем другим секторам 3 сектор, в котором располагалась платформа с 6-го по 10-й дни обучения, и проводили в нем достоверно больше времени, чем во 2 секторе, тогда как крысы OXYS проводили равную долю времени во всех 4 секторах (рис. 11Б).

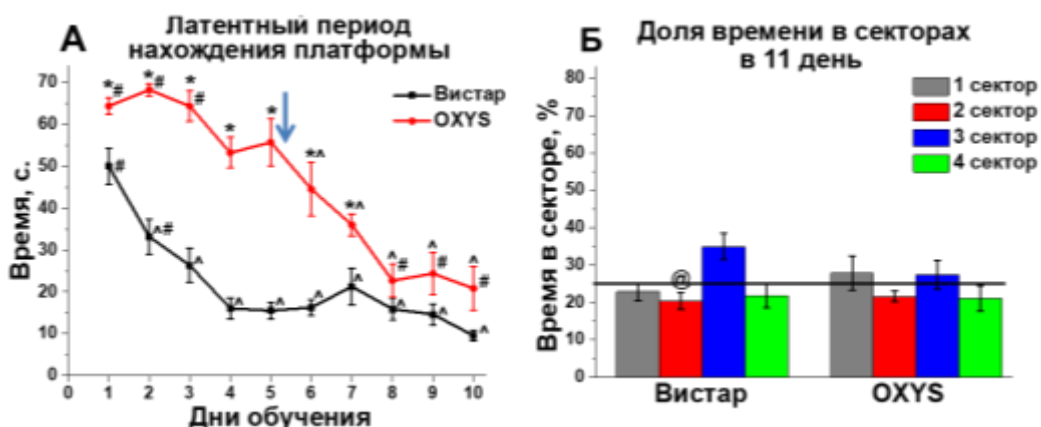


Рис. 11. Оценка способности к обучению и переобучению (А) и долговременной памяти (Б) крыс OXYS и Вистар в возрасте 18 мес. в водном лабиринте Морриса. Различия достоверны ($p < 0,05$): * - между линиями; ^ - с 1-м днём обучения; # - с 6-м днём обучения, @ - с долей времени в 3 секторе. Стрелка указывает момент перемещения платформы из 1-го сектора в 3-й. Горизонтальная линия обозначает долю времени, которую крысы проводили бы в каждом из четырех секторов при случайном перемещении между секторами.

Таким образом, в возрасте 18 мес. способность к обучению у крыс Вистар оставалась на уровне молодых животных, но они хуже запоминали местоположение платформы после её перемещения и/или изъятия, что указывает на снижение воспроизведения долговременной памяти. Крысы OXYS в возрасте 18 мес. – в период усиленной прогрессии признаков БА - демонстрировали нарушение пространственной памяти и способности к обучению не только по сравнению с одновозрастными крысами Вистар, но и по сравнению с 3-месячными животными этой линии.

Влияние обучения на нейрогенез и астроцитогенез в ЗИ гиппокампа крыс OXYS на разных стадиях развития у них признаков БА

Как показало наше исследование, пространственное обучение в тесте «водный лабиринт Морриса» повлияло на нейрогенез и астроцитогенез в ЗИ гиппокампа крыс, при этом его эффекты зависели от возраста, в котором оно было начато, и от генотипа животных. Обучение, проведенное в возрасте 1.5 мес., привело к усилению у крыс OXYS нейрогенеза – снижению плотности НСК ($p < 0,004$) и увеличению плотности активированных НКП ($p < 0,05$) (рис.12А,Б). При этом у крыс Вистар плотность НКП снизилась ($p < 0,0009$; рис.12Б). Обучение, проведенное в возрасте 3 мес., также привело к снижению плотности НКП у крыс Вистар ($p < 0,00001$; рис.12Б) и не изменило её у крыс OXYS. Обучение, проведенное в молодом возрасте (1,5 и 3 мес.), активировало нейрогенез в ЗИ крыс OXYS – вызвало сдвиг в направлении от НСК к НКП. У крыс Вистар наблюдалось снижение плотности НКП, что может указывать как на снижение интенсивности нейрогенеза, так и на усиление созревания нейронов в ЗИ в результате обучения. Обучение, проведенное как в возрасте 12, так и в 18 мес., не вызвало изменений плотности клеток-предшественников в ЗИ гиппокампа ни у крыс OXYS, ни у Вистар (рис.12 А,Б).

Таким образом, обучение привело к активации клеток-предшественников в гиппокампе только у молодых животных. Сниженная плотность НКП у крыс Вистар может свидетельствовать о начале их дифференцировки в нейробласты, тогда как у крыс OXYS мы наблюдаем пик деления НКП - более раннюю стадию нейрогенеза.

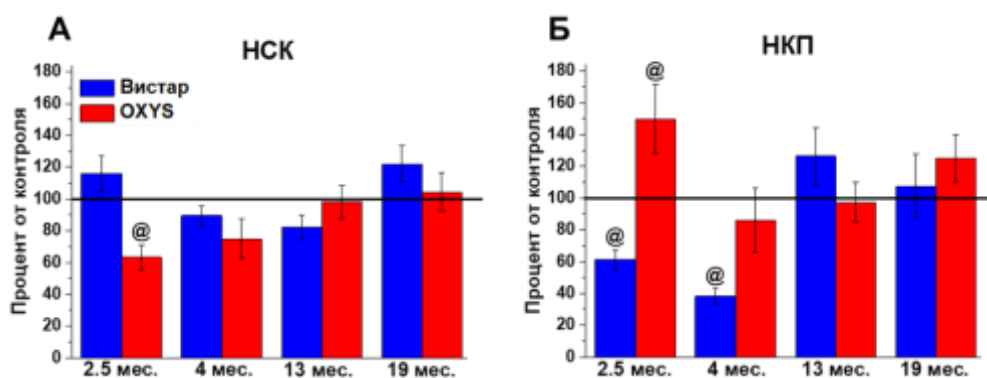


Рис. 12. Влияние обучения в тесте Морриса на плотность НСК (А) и НКП (Б) в ЗИ гиппокампа крыс разного возраста. @ - достоверный эффект обучения ($p < 0,05$). Данные представлены в % к одновозрастному контролю (чёрная линия).

Далее мы оценили влияние обучения на плотность нейробластов, незрелых и зрелых нейронов в ЗИ гиппокампа животных. Обучение, проведенное в возрасте 1.5 месяцев, не повлияло на плотность клеток нейронального ряда у крыс обеих линий (рис.13 А, Б и В). Помимо активации нейрогенеза, процессу успешного обучения животных может способствовать усиление синаптогенеза (Nelson et al., 2015; Stevenson et al., 2021). Возможно, в раннем возрасте в головном мозге животных отсутствует потребность в образовании новых нейронов и увеличении астроцитарной поддержки для выполнения задачи успешного обучения - достаточно усиления синаптогенеза, однако в настоящем исследовании оценку синаптогенеза мы не проводили.

Обучение, проведенное в возрасте 3 месяцев, привело к снижению плотности нейробластов в ЗИ как у крыс Вистар, так и у OXYs ($p < 0,02$ и $p < 0,04$, соответственно; рис.13 А,Б,В), однако обучение, проведенное в более зрелом возрасте, не повлияло на их плотность у крыс обеих линий. Обучение с возраста 12 мес. увеличило плотность незрелых и зрелых нейронов у крыс Вистар ($p < 0,05$) и не изменило её у крыс OXYs (рис.13В). Обучение, проведенное в возрасте 18 мес., привело к уменьшению плотности незрелых нейронов у крыс OXYs ($p < 0,04$; рис.13Б).

Таким образом, обучение повлияло на плотность клеток нейронального ряда в ЗИ гиппокампа молодых и зрелых животных, при этом незрелые клетки дошли до стадии зрелых функционирующих нейронов только в мозге годовалых крыс Вистар, что может быть обусловлено отсутствием потребности в новообразованных клетках - животные успешно справлялись с поставленной перед ними обучающей задачей.

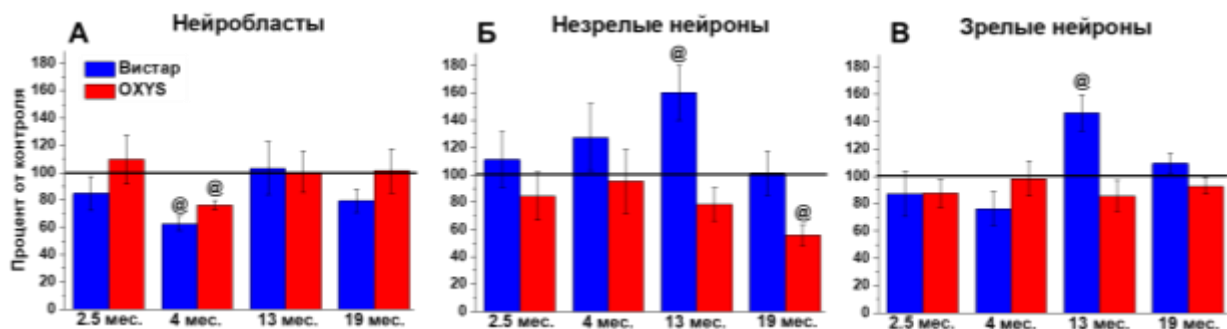


Рис.13. Влияние обучения в тесте Морриса на плотность клеток нейронального ряда в ЗИ гиппокампа крыс разного возраста. @ - достоверный эффект обучения ($p < 0,05$). Данные представлены в % к одновозрастному контролю (черная линия).

Влияние обучения на процесс созревания астроцитов в ЗИ гиппокампа животных оказалось более существенным, чем на нейрогенез. Так, обучение, проведенное в возрасте 1.5 мес., не повлияло на плотность АКП у крыс OXYs, но снизило её у крыс Вистар ($p < 0,03$; рис.14А), в то время как обучение в возрасте 3 мес. усилило астроцитогенез у крыс OXYs ($p < 0,008$; рис.14А). Обучение, проведенное в возрасте 12 мес., повысило плотность астроцитов только у крыс OXYs ($p < 0,05$) (рис.14Б), а обучение с возраста 18 мес. повысило плотность АКП только у крыс

Вистар ($p < 0,02$; рис.14А), а плотность астроцитов - у крыс обеих линий ($p < 0,0003$ для крыс Вистар и $p < 0,003$ для OXYS; рис.14А). Таким образом, обучение в возрасте 1.5 и 3 мес. оказало влияние только на клетки-предшественники астроцитов, но не на зрелые астроциты. При этом, обучение в более позднем возрасте значительно повысило плотность астроцитов в ЗИ гиппокампа крыс обеих линий. Это может быть связано с необходимостью в усилении астроцитарной поддержки в более зрелом мозге и рассматривается как компенсаторный механизм, помогающий клеткам нейронального ряда выполнять свои функции (Nanclares et al., 2021).

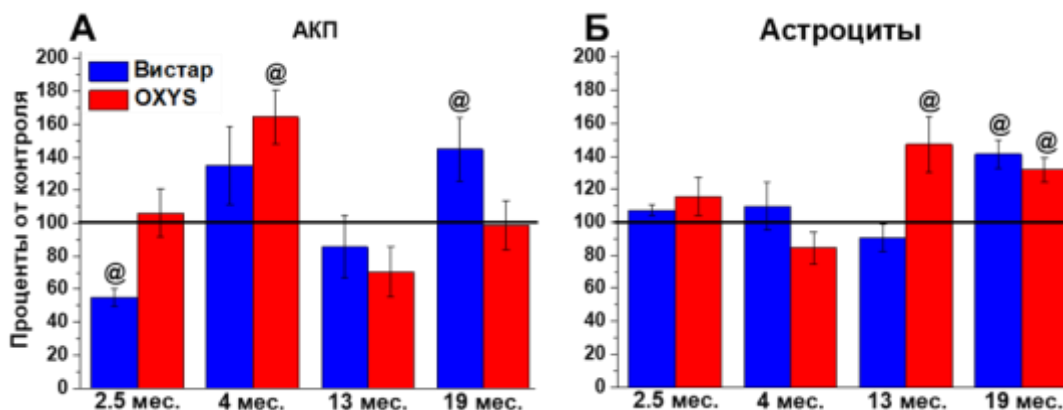


Рис. 14. Влияние обучения в тесте Морриса на плотность АКП и астроцитов. @ - достоверный эффект обучения ($p < 0,05$). Данные представлены в % к одновозрастному контролю (черная линия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленная у крыс OXYS более высокая, чем у крыс Вистар, плотность НСК в ЗИ гиппокампа в возрасте 18 мес. может свидетельствовать о меньшем истощении пула стволовых клеток в период прогрессии у них признаков БА и, соответственно, о снижении интенсивности нейрогенеза в гиппокампе в более раннем возрасте. Мы полагаем, что повышенная плотность АКП на стадии активного накопления Аβ в головном мозге крыс OXYS с последующим повышением плотности астроцитов на стадии усиленной прогрессии признаков БА может быть проявлением патологического астроглиоза, сопровождающего нейродегенеративные изменения гиппокампа. Исследование глутаматергической и ГАМКергической систем в гиппокампе выявило возрастное снижение их активности у крыс обеих линий. В то же время, существенных изменений глутаматергической и ГАМКергической систем, которые могут быть связаны с развитием характерных для БА нейродегенеративных процессов, у крыс OXYS не обнаружено. Установлено, что гиппокамп-зависимое пространственное обучение может служить модулятором нейрогенеза и астроцитогенеза и оказывать влияние на различные этапы этих процессов. Эффекты когнитивных упражнений зависят от возраста, в котором обучение было проведено, а также от генотипа животных. Исследование на крысах OXYS показало, что для эффективной стимуляции нейрогенеза обучение следует начинать до развития нейродегенеративных изменений, а, значит, и до появления первых симптомов БА.

ВЫВОДЫ

1. С возрастом интенсивность нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа у крыс OXYS, как и у крыс Вистар, снижается, при этом у крыс OXYS это снижение происходит на фоне усиления астроцитогенеза.
2. Развитие признаков БА у крыс OXYS не связано с изменением в гиппокампе крыс OXYS содержания глутамата и исследованных субъединиц его рецепторов (NMDAR1, NMDAR2B и GluA1), транспортеров (GLAST и GLT-1), ферментов синтеза (глутаминазы) и деградации (глутаминсинтетазы).
3. Содержание ГАМК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар значимо не различается, но на всех стадиях развития признаков БА содержание фермента синтеза ГАМК белка GAD67 выше, а фермента деградации GABA-T у крыс OXYS ниже, чем у крыс Вистар.
4. Экспрессия генов, связанных с глутамат- и ГАМКергическими системами, с возрастом снижается в гиппокампе как крыс Вистар, так и OXYS, при этом значимых межлинейных различий не выявлено.
5. В молодом возрасте (1.5 и 3 мес.) способность к пространственному обучению, переобучению и долговременная память у крыс OXYS снижена, в возрасте 12 мес. способность крыс OXYS к обучению не отличается от таковой у крыс Вистар, но долговременная память у них снижена. В возрасте 18 мес. нарушения пространственной памяти и способности к обучению у крыс OXYS ярко выражены.
6. Способность обучения влиять на нейрогенез в гиппокампе зависит от возраста, в котором оно начато, и от генотипа животных. Обучение, начатое в молодом возрасте, способствует усиленному созреванию в нейрогенной нише гиппокампа клеток-предшественников нейронального и астроцитарного рядов и нейробластов у крыс обеих линий, при этом у крыс OXYS оно активизирует нейрогенез на более ранней стадии, чем у крыс Вистар. Обучение, начатое в более зрелом возрасте, оказывает значительный эффект на астроцитогенез у крыс обеих линий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах:

1. Rudnitskaya E.A., Kozlova T.A., **Burnyasheva A.O.**, Kolosova N.G., Stefanova N.A. Alterations of hippocampal neurogenesis during development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats // *Exp. Gerontol.* 2019. Vol.115 P. 32-45. doi: 10.1016/j.exger.2018.11.008.
2. **Burnyasheva A.O.**, Kozlova T.A., Stefanova N.A., Kolosova N.G., Rudnitskaya E.A. Cognitive Training as a Potential Activator of Hippocampal Neurogenesis in the Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. No.19. doi: 10.3390/ijms21196986.
3. **Бурняшева А.О.**, Стефанова Н.А., Рудницкая Е.А. Нейрогенез в зрелом головном мозге: изменения при старении и развитии болезни Альцгеймера // *Успехи*

геронтологии. 2020. Том 33. Номер 6. Стр. 1080-1087. doi: 10.34922/AE.2020.33.6.008.

4. Rudnitskaya E.A., Kozlova T.A., **Burnyasheva A.O.**, Tarasova A.E., Pankova T.M., Starostina M.V., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Features of postnatal hippocampal development in a rat model of sporadic Alzheimer's disease // *Front. Neurosci.* 2020. Vol. 14. eCollection 2020. doi: 10.3389/fnins.2020.00533.

5. Rudnitskaya EA, Kozlova TA, **Burnyasheva AO**, Stefanova NA, Kolosova NG. Glia Not Neurons: Uncovering Brain Dysmaturation in a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Biomedicines.* 2021. Vol. 9. No. 7. doi:10.3390/biomedicines9070823

6. Rudnitskaya E.A., **Burnyasheva A.O.**, Kozlova T.A., Peunov D.A., Kolosova N.G., Stefanova N.A. Changes in Glial Support of the Hippocampus during the Development of an Alzheimer's Disease-Like Pathology and Their Correction by Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 // *Int. J. Mol.* 2022. Vol. 23. No. 3. doi: 10.3390/ijms23031134.

7. **Бурняшева А.О.**, Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Телегина Д.В. Изменения в системе глутамат/ГАМК в гиппокампе крыс с возрастом и при развитии признаков болезни Альцгеймера // *Биохимия.* 2023. Том. 88, №. 12, с. 2358-2374.

Тезисы конференций:

1. **Бурняшева А.О.**, Рудницкая Е.А., Телегина Д.В. Дисбаланс глутаматергической и ГАМКергической систем при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS. Сборник Тезисов IX международной конференции молодых ученых биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и вирусологов» OpenBio-2022. Новосибирск. 2022.
2. **Burnyasheva A.O.**, Rudnitskaya E.A., Telegina D.V. Alterations of glutamatergic/GABAergic systems during healthy aging and Alzheimer's disease-like pathology in rats. BGRS/SB-2022. Новосибирск. 2022.
3. **Burnyasheva A.O.**, Rudnitskaya E.A., Telegina D.V. Changes in glutamatergic and GABAergic systems during development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. Конференция Российского нейрохимического общества RUSNEUROCHEM. Санкт-Петербург. 2022.
4. **Burnyasheva A.O.**, Rudnitskaya E.A., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Changes in Expression of Genes Associated with Neurogenesis during Development of Alzheimer's Disease Signs in OXYS Rats. 12th International young scientists school «System Biology and Bioinformatics», SBB-2020. Крым. 2020.
5. **Burnyasheva A.O.**, Kozlova T.A., Rudnitskaya E.A., Stefanova N.A. Spatial learning as activator of hippocampal neurogenesis during aging and development of Alzheimer's disease-like pathology. BGRS/SB-2020. Новосибирск. 2020.
6. **Бурняшева А.О.**, Рудницкая Е.А., Стефанова Н.А. Особенности созревания гиппокампа преждевременно стареющих крыс OXYS // XVIII Конференция-школа с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития». Москва. 2019.

7. **Бурняшева А.О.** Изменения нейрогенеза в гиппокампе крыс OXYS при развитии и прогрессии признаков болезни Альцгеймера // Сборник тезисов МНСК секции биологии. Новосибирск. 2019.
8. Rudnitskaya E., Kozlova T., **Burnyasheva A.**, Kolosova N., Stefanova N. Alterations of hippocampal neurogenesis precede development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. The 14th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Lisbon. 2019.
9. Rudnitskaya E., Kozlova T., **Burnyasheva A.**, Kolosova N., Stefanova N. Alterations of neurogenesis in dentate gyrus precede development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. 13th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society. Göttingen. 2019.
10. **Burnyasheva A.O.**, Kolosova N.G., Stefanova N.A., Rudnitskaya E.A. Alterations of neurogenesis during development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats // BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE\systems biology (BGRS\SB-2018). The Eleventh International Conference. Abstracts. Novosibirsk. 2018.
11. **Бурняшева А.О.** Анализ изменений нейрогенеза в гиппокампе крыс OXYS при развитии признаков болезни Альцгеймера. Сборник тезисов МНСК секции биологии. Новосибирск. 2018.
12. Козлова Т.А., **Бурняшева А.О.**, Рудницкая Е.А. Изменение нейрогенеза в гиппокампе при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS. Тезисы Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов. Новосибирск. 2018.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКП – астроцитарные клетки-предшественники
АФК – активные формы кислорода
БА – болезнь Альцгеймера
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ЗИ – зубчатая извилина гиппокампа
ИФА – иммуноферментный анализ
мРНК – матричная РНК
НСК – нейрональные стволовые клетки
НКП – нейрональные клетки-предшественники
СВЗ – субвентрикулярная зона
ЦНС – центральная нервная система
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
ЭК – энторинальная кора
APP – белок-предшественник А β
BSA – бычий сывороточный альбумин
СА – аммониев рог
APP – белок предшественник А β
А β – бета-амилоид
GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
M \pm S.E.M. – среднее \pm стандартная ошибка среднего

Соискатель

А.О. Бурняшева