

УДК 616.831-092.18:616.894-053.8-092.9

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-56-65

Для цитирования: Комлева Ю.К., Горина Я.В., Черных А.И., Лопатина О.Л., Шабалова А.А., Труфанова Л.В., Оловяникова Р.Я., Ендржеевская-Шурыгина В.Ю., Салмина А.Б. Особенности пролиферации и миграции клеток головного мозга при когнитивном тренинге животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 56–65

Особенности пролиферации и миграции клеток головного мозга при когнитивном тренинге животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера

Комлева Ю.К.¹, Горина Я.В.¹, Черных А.И.², Лопатина О.Л.¹,
Шабалова А.А.¹, Труфанова Л.В.¹, Оловяникова Р.Я.¹,
Ендржеевская-Шурыгина В.Ю.¹, Салмина А.Б.¹

¹ Красноярский государственный медицинский университет (КГМУ) имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

² Красноярская межрайонная клиническая больница (КМКБ) № 20 им. И.С. Берзона Россия, 660123, г. Красноярск, Инструментальная ул., 12а

РЕЗЮМЕ

Болезнь Альцгеймера является многофакторным нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся наличием бета-амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Бета-амилоид является важным фактором риска и играет центральную роль в возникновении и прогрессировании болезни Альцгеймера. Однако вопрос о влиянии бета-амилоида на гиппокампальный нейрогенез во взрослом мозге остается открытым.

Цель исследования – изучение влияния процесса обучения на нейрогенез, пролиферацию, выживаемость и миграцию клеток в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера.

Материал и методы. Исследование выполнено на самцах зрелых крыс линии Wistar в возрасте 7 мес. Опытная группа – животные с экспериментальной болезнью Альцгеймера после введения бета-амилоида 1-42 в СА1 зону гиппокампа билатерально по 5 мкл. Контрольная группа – ложно-оперированные животные, которым вводили растворитель для бета-амилоида – фосфатно-солевого буфера – в СА1 зону билатерально по 5 мкл. Для оценки рабочей памяти, а также консолидации памяти использовали нейроповеденческое тестирование в водном лабиринте Морриса. Изучение миграции клеток осуществляли путем введения бромдезоксисуридина (50 мг/кг). Экспрессию молекул-маркеров нейрогенеза (Ki-67, PSA-NCAM, PCNA) в гиппокампе исследовали методом иммуногистохимии с последующей конфокальной микроскопией.

Результаты. Показано, что моделирование болезни Альцгеймера приводит к нарушениям когнитивных функций и запоминания у животных. В группе с экспериментальной болезнью Альцгеймера выявлено снижение уровня пролиферации клеток ($p = 0,043$), нарушение миграции ($p = 0,031$), но не выживаемости клеток ($p = 0,985$) по сравнению с контрольной группой. Обучение в водном лабиринте Морриса животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера способствует миграции клеток-предшественников по ростральному миграционному пути ($p = 0,011$). Количество нейробластов ($p = 0,809$) и проли-

✉ Горина Яна Валерьевна, e-mail: yana_20@bk.ru

ферация клеток-предшественников нейронов ($p = 0,083$) значимо не меняется по сравнению с группой без обучения.

Заключение. При моделировании болезни Альцгеймера у животных наблюдается когнитивная дисфункция, снижение уровня пролиферации и миграции клеток, что свидетельствует о нарушении нейрогенеза за счет токсического действия амилоида. Обсуждается связь полученных результатов с механизмами развития локальной инсулинорезистентности.

Ключевые слова: PCNA, Ki-67, BrdU, миграция клеток, болезнь Альцгеймера, инсулинорезистентность.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой необратимое нейродегенеративное заболевание, вызывающее нарушение когнитивных функций, которое определяется сочетанием расстройств памяти с нарушением интеллектуальной деятельности у людей старше 65 лет [1]. Прогрессирование болезни Альцгеймера связано с тремя ключевыми нейропатологическими особенностями: образование бета-амилоидных бляшек в связи с мутациями генов пресенилин-1 и пресенилин-2 [2]; накопление внутриклеточных нейрофибриллярных клубков и синаптическая дисфункция [3]. Эти события происходят главным образом в неокортексе, гиппокампе и других подкорковых областях, которые являются ответственными за реализацию когнитивной функции [4]. Между тем бета-амилоид является важным фактором риска и играет центральную роль в возникновении и прогрессировании болезни Альцгеймера, а также развитию локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга, характерной для нейродегенерации альцгеймеровского типа [5–7]. Однако до настоящего времени остается открытым вопрос о том, как бета-амилоид влияет на гиппокампальный нейрогенез во взрослом мозге.

Цель исследования: изучение влияния процесса обучения на нейрогенез, пролиферацию, выживаемость и миграцию клеток в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментального исследования использовали самцов зрелых крыс линии Wistar в возрасте 7 мес. Животные содержались в виварии при стандартных условиях (температура $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ и световой цикл – 12 ч день и 12 ч ночь) в клетках со свободным доступом к пище и воде.

Для проведения исследования сформированы четыре группы. Контрольная группа 1: ложно-оперированные (ЛО) животные ($n = 5$) с тре-

нировкой в течение 5 дней в лабиринте Морриса. Контрольная группа 2: ЛО животные ($n = 5$) без тренировки в течение 5 дней в лабиринте Морриса. Группа 3: животные с экспериментальной БА ($n = 5$) с тренировкой в течение 5 дней в лабиринте Морриса. Группа 4: животные с экспериментальной БА ($n = 5$) без тренировки в течение 5 дней в лабиринте Морриса. Животным контрольных групп вводили фосфатно-солевой буфер. Животным групп 3, 4 вводили бета-амилоид.

Для подавления ноцицепции использовали ксилазин, анестезию проводили интраперитонеальным введением хлоралгидрата. Хирургический уровень анестезии сохранялся от 45 мин до 1 ч. После проверки болевой чувствительности, оценки частоты дыхания, сердечных сокращений и уверенности в безболезненности, отсутствии страдания животного крысу фиксировали в стереотаксической рамке. Моделирование болезни Альцгеймера, проведение ложных операций, а также оценку признаков данной патологии осуществляли согласно методике, представленной нами ранее [8]. Использовали нейроповеденческое тестирование в водном лабиринте Морриса для оценки оперативной и долговременной памяти в соответствии со стандартными протоколами [9].

Перед проведением диагностического оценочного теста выполнялась тренировка исследуемых животных в течение 4 последовательных дней. При исследовании параметров в течение 1 дня оценивали рабочую память, при изучении параметров на следующий день – консолидацию памяти.

Для идентификации мигрирующих нейробластов крысам был введен бромдезоксигидратин (Bromodeoxyuridin, BrdU) (Sigma-Aldrich, США) в дозе 50 мг/кг дважды в день в течение 3 последовательных дней, начиная с 7-го дня после введения бета-амилоида или PBS в соответствии со стандартным протоколом [10]. После окончания введения BrdU часть животных (ЛО животные и

животные с экспериментальной моделью БА) обучали в водном лабиринте Морриса в течение 4 дней. На 5-й день после инъекций BrdU (14-й день после моделирования) через 30 мин после тестирования в водном лабиринте Морриса осуществляли транскардиальную перфузию согласно ранее представленной методике [8].

Экспрессию маркеров нейрогенеза, а именно Ki-67 (маркер пролиферирующих клеток в G1-, S-, G2-фазах), PSA-NCAM (маркер нейробластов), PCNA (маркер пролиферирующих клеток в фазе S) оценивали методом иммуногистохимии для свободно плавающих срезов, который проводили согласно методике [8]. Изображения срезов головного мозга получали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i, затем подсчитывали количество клеток, которые экспрессируют маркеры нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа, латеральных стенках боковых желудочков (субвентрикулярная зона), ростральном миграционном пути и ольфакторных луковицах. При этом оценивали пять полей зрения для субвентрикулярной зоны, рострального миграционного пути и ольфакторных луковиц, для гиппокампа – семь полей зрения.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна – Уитни. Различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$, p – уровень значимости. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения консолидации памяти и влияния тренировок животных в водном лабиринте Морриса были использованы два протокола. Первый протокол – животные обучались в водном лабиринте Морриса в течение 4 дней с оценкой на 5-й день. Второй протокол – животные не подвергались обучению в водном лабиринте Морриса. Оценивали число входов в квадрат со скрытой платформой, время нахождения в данном квадрате.

В результате изучения поведения по двум разным протоколам, согласно которым различия состояли в особенностях тренировок животных, можно заключить, что при моделировании БА наблюдаются нарушения когнитивных функций и запоминания у животных, а именно значительно подавляются возможности оперативной памяти. При обучении животных в водном лабиринте

Морриса отмечается улучшение процесса консолидации памяти в группе ложно-оперированных животных и при экспериментальной болезни Альцгеймера, тогда как оперативная память значительно не меняется (рис. 1).

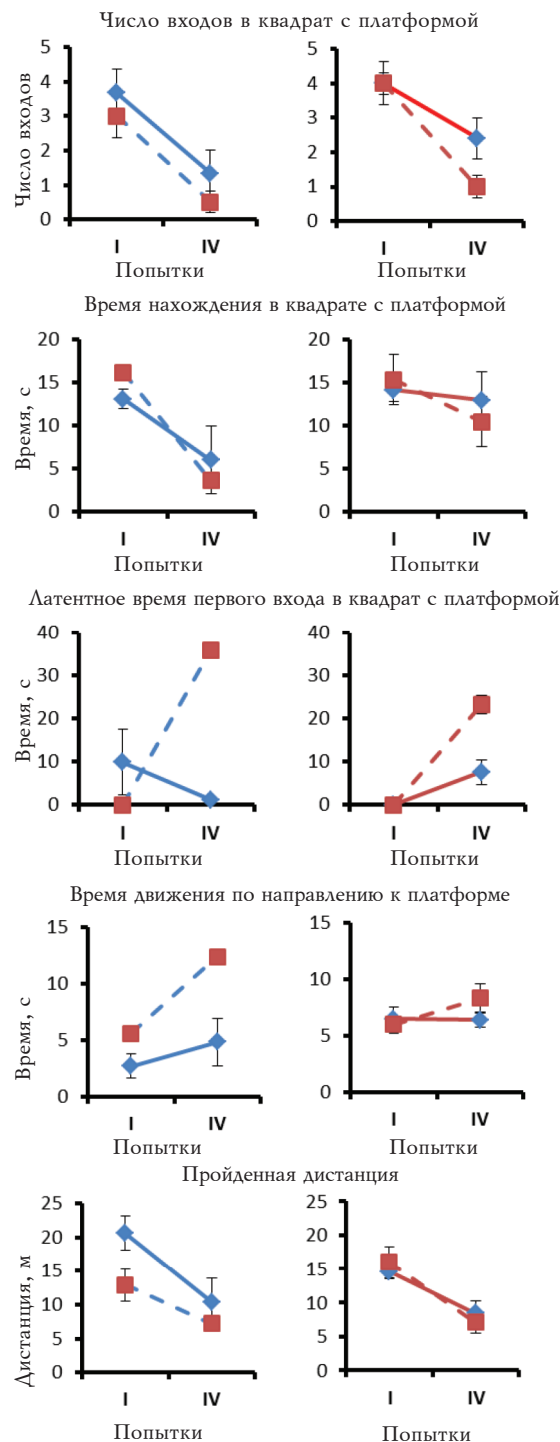


Рис. 1. Результаты нейропсихического тестирования в водном лабиринте Морриса на 5-й день тестирования: синий цвет – ложно-оперированные животные (сплошной – с тренировками, пунктиром – животные без тренировок); красный цвет – животные с нейродегенерацией (сплошной – с тренировками, пунктиром – животные без тренировок)

Для идентификации мигрирующих нейробластов крысам был введен BrdU, поэтому миграцию по роstralному пути из субвентрикулярной зоны в ольфакторные луковицы изучали по количеству клеток BrdU+/PSA-NCAM+ (рис. 2).

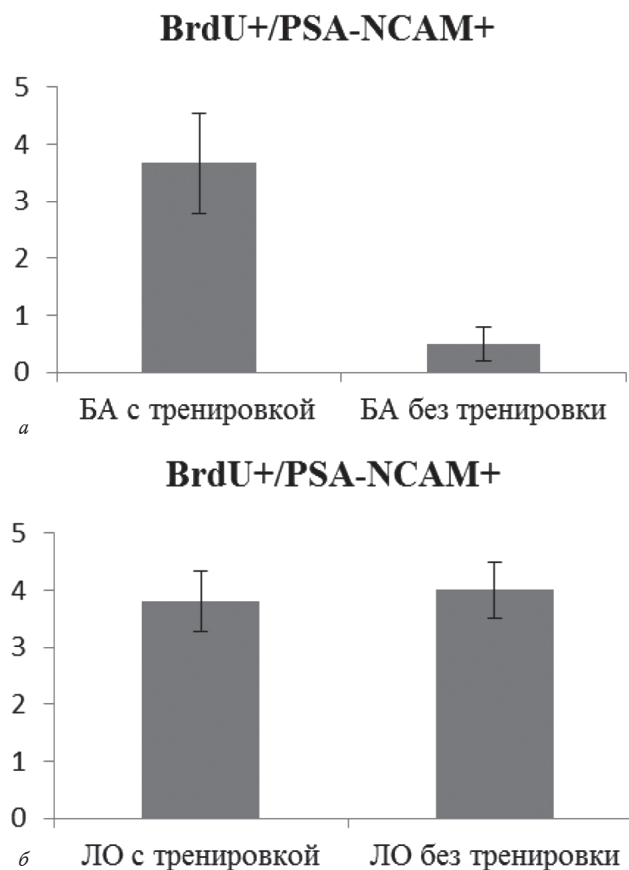


Рис. 2. Экспрессия BrdU+/PSA-NCAM+ клеток в роstralном миграционном пути: *а* – при нейродегенерации ($p = 0,011$), *б* – при проведении ложной операции ($p = 0,809$)

Выявлено, что у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера количество клеток BrdU+/PSA-NCAM+ статистически значимо снижалось $0,50 \pm 0,29$ по сравнению с ложно-оперированными животными: $4,00 \pm 0,49$ ($p = 0,031$). Таким образом, нарушение миграции нейробластов по роstralному миграционному пути может быть вызвано токсическим действием бета-амилоида [11]. Мы определяли экспрессию клеток BrdU+/NeuN+ в зубчатой извилине гиппокампа для изучения выживаемости зрелых гранулярных нейронов. При моделировании нейродегенерации и при проведении ложной операции не выявлено статистически значимых различий ($p = 0,985$) в субгранулярном слое зубчатой извилины BrdU+/NeuN+ клеток ($1,40 \pm 0,46$ и $1,44 \pm 0,38$ соответственно). Это свидетельствует о том, что бета-амилоид не оказывает значимого влияния на

выживаемость зрелых нейронов. В результате исследования пролиферирующих клеток в G1-, S-, G2-фазах (в интерфазе) отмечено снижение экспрессии маркера Ki67 в субгранулярной зоне зубчатой извилины при моделировании нейродегенерации $4,24 \pm 0,25$ по сравнению с проведением ложной операции $7,42 \pm 1,30$ ($p = 0,043$) (рис. 3). При изучении пролиферирующих клеток в фазе S было выявлено статистически значимое снижение клеток PCNA+ в субгранулярной зоне при нейродегенерации $2,50 \pm 0,99$ по сравнению с ложно-оперированными животными $6,4 \pm 0,6$ ($p = 0,021$). Таким образом, происходит снижение уровня пролиферации клеток в зубчатой извилине гиппокампа при моделировании нейродегенерации (рис. 4).

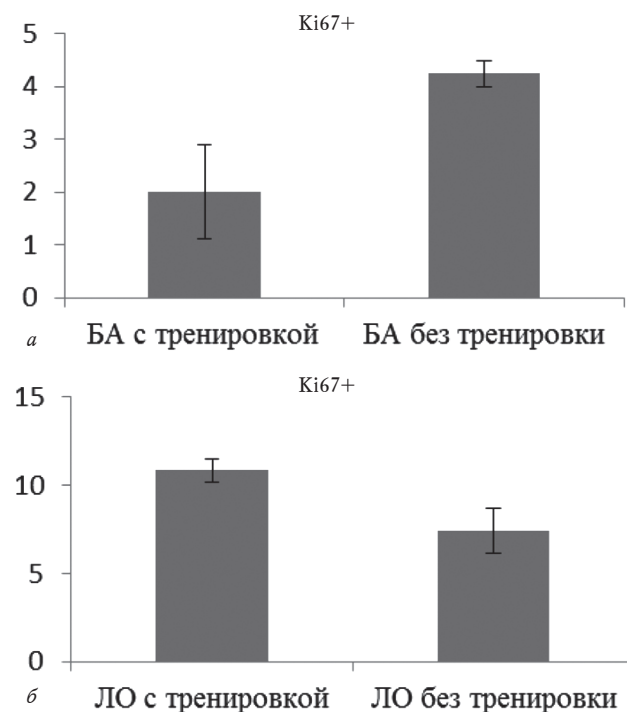


Рис. 3. Экспрессия Ki67+ клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа: *а* – при нейродегенерации ($p = 0,083$), *б* – при проведении ложной операции ($p = 0,038$)

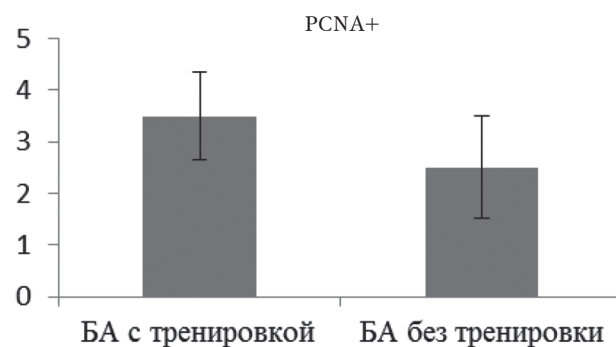


Рис. 4. Экспрессия PCNA+ клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа при нейродегенерации ($p = 0,461$)

При изучении мигрирующих нейробластов при нейродегенерации у крыс с тренировкой памяти выявили значимое увеличение количества BrdU+/PSA-NCAM+ клеток $3,67 \pm 0,88$ по сравнению с нетренированными крысами $0,50 \pm 0,29$ ($p = 0,011$) (см. рис. 2, а). На ложно-оперированных животных стимуляция когнитивных функций такого влияния не оказывает. В контрольной группе после тренировок количество мигрирующих нейробластов составило $3,80 \pm 0,52$, что практически не отличается от группы без обучения $4,00 \pm 0,49$ ($p = 0,809$) (см. рис. 2, б). Таким образом, когнитивная стимуляция у животных с нейродегенерацией способствует восстановлению миграции клеток-предшественников по роstralному пути.

При изучении выживаемости зрелых гранулярных нейронов не выявлено статистически значимых различий в субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа BrdU+/NeuN+ клеток при проведении ложной операции с обучением $0,75 \pm 0,37$ и без него $1,40 \pm 0,46$ ($p = 0,311$) и при моделировании нейродегенерации с обучением и без него ($1,67 \pm 0,21$ и $1,44 \pm 0,38$, соответственно) ($p = 0,662$). Это свидетельствует о том, что на выживаемость зрелых нейронов как при моделировании нейродегенерации, так и в контрольной группе тренировки в водном лабиринте Морриса значимого влияния не оказывают.

Также не оказывает значимого влияния и обучение в водном лабиринте Морриса на экспрессию маркера Ki67 в субгранулярной зоне зубчатой извилины при моделировании нейродегенерации $2,00 \pm 0,89$ по сравнению с группой без обучения $4,24 \pm 0,25$ ($p = 0,083$) (см. рис. 3, а). При проведении ложной операции тренировки в водном лабиринте Морриса вызывают увеличение экспрессии Ki67 у тренированных животных $10,83 \pm 0,65$ по сравнению с животными без обучения $7,42 \pm 1,30$ ($p = 0,042$) (см. рис. 3, б).

При изучении экспрессии маркера PCNA в зависимости от обучения не выявлено статистически значимого изменения клеток PCNA+ в субгранулярной зоне при нейродегенерации после обучения $3,50 \pm 0,85$ по сравнению с животными без тренировок $2,50 \pm 0,99$ ($p = 0,461$) (рис. 4).

Таким образом, не происходит изменения уровня пролиферации клеток в зубчатой извилине гиппокампа при моделировании нейродегенерации со стимуляцией когнитивной функции и без нее. Вместе с тем на здоровый мозг обучение оказывает положительное влияние, проявляющееся увеличением экспрессии маркеров активно пролиферирующих клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания представляют собой хронический и медленно прогрессирующий процесс. Характерными признаками нейродегенерации являются нарушения нейрогенеза, синаптогенеза; интенсификация апоптоза; дисрегуляция ангиогенеза. Дополнительным признаком нейродегенерации альцгеймеровского типа считают локальную инсулинорезистентность, развивающуюся в ткани головного мозга. Нарушение нейрогенеза при нейродегенерации затрагивает все этапы этого процесса (от поддержания пула стволовых и прогениторных клеток до механизмов миграции и дифференцировки), что находит свое отражение в нарушении когнитивных функций и механизмов памяти [13].

Установлено, что нейротоксическое действие интрагиппокампа введеного бета-амилоида вызывает нарушение запоминания у животных за счет подавления рабочей памяти. Вместе с тем обучение животных в водном лабиринте Морриса способствует улучшению процесса консолидации памяти в группе ложно-оперированных животных и при экспериментальной болезни Альцгеймера, тогда как рабочая память значимо не меняется. Это сопровождается снижением количества пролиферирующих клеток в гиппокампе и числа мигрирующих BrdU+/PSA-NCAM+ клеток по роstralному пути из субвентрикулярной зоны в ольфакторные луковицы у животных с моделью болезни Альцгеймера. Однако статистически значимых различий в экспрессии BrdU+/NeuN+ клеток в субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа не обнаружено, что указывает на отсутствие существенного влияния бета-амилоида на выживаемость зрелых нейронов. Результаты исследования мигрирующих нейробластов при нейродегенерации у крыс с тренировкой памяти выявили значимое увеличение количества BrdU+/PSA-NCAM+ клеток по сравнению с нетренированными крысами. На ложно-оперированных животных стимуляция когнитивных функций такого влияния не оказывает. Это свидетельствует о том, что когнитивная стимуляция у животных с нейродегенерацией способствует восстановлению миграции клеток-предшественников по роstralному пути. Вместе с тем тренировки в водном лабиринте Морриса не оказывают значимого влияния на экспрессию BrdU+/NeuN+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа как при моделировании нейродегенерации, так и в контрольной группе. Интересно, что в отличие от группы ложно-оперированных животных экспрессия Ki67 в гиппокампе под дей-

ствием обучения в группе с экспериментальной болезнью Альцгеймера не меняется, но увеличивается количество нейробластов. В совокупности это позволяет сделать вывод о том, что при нейродегенерации обучение стимулирует преимущественно ранние этапы нейрогенеза.

Результаты исследований нейрогенеза в тканях головного мозга свидетельствуют о том, что с возрастом и при болезни Альцгеймера имеет место значительное снижение эффективности пролиферации прогениторных клеток и их количества [14]. Большинство исследований, в которых рассматривается нейрогенез в гиппокампе или субвентрикулярной зоне у трансгенных мышей, экспрессирующих одну или две мутации в гене, кодирующем APP (белок-предшественник амилоида), показывают нарушение пролиферации клеток-предшественников и (или) нарушение нейрональной дифференцировки [15, 16]. Кроме того установлено, что инъекция в дозе 5 мкл с концентрацией 1 мМ Аβ1-42 или Аβ25-35 в боковой желудочек уменьшает пролиферацию клеток в субвентрикулярной зоне в течение следующих 5 дней [17]. Экспериментально показано, что увеличение пролиферации клеток характерно для начальных этапов нейродегенерации, но затем нейрогенез подавляется [18].

Одним из важных факторов подавления нейрогенеза является локальная инсулинорезистентность [19]. Ранее было показано [20] снижение экспрессии инсулинзависимого глюкозного транспортера (GLUT4) на фоне увеличения экспрессии инсулинрегулируемой аминопептидазы IRAP в гиппокампе животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера (модель с интрагиппокампальным введением бета-амилоида, аналогичная представленной в данном исследовании). Известно, что инсулиноподобный фактор роста, играющий важную роль в развитии болезни Альцгеймера [21], стимулирует пролиферацию нейронных клеток-предшественников, способствуя интенсификации нейрогенеза в гиппокампе, регулирует синаптическую пластичность, повышает выживаемость нейронов, а также ингибирует их гибель [22]. Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные о нарушении процессов нейрогенеза и миграции клеток дополняют представления о негативном влиянии нарушения инсулиновой сигнальной трансдукции в гиппокампе при экспериментальной болезни Альцгеймера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обучение оказывает положительное влияние на здоровый мозг, что проявляется интенсификацией нейрогенеза и миграции клеток, тог-

да как при экспериментальной болезни Альцгеймера такой эффект отсутствует или носит неполноценный характер. Поскольку процесс обучения у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера восстанавливает количество нейробластов и миграционную способность клеток-предшественников, логично предположить, что эффект стимуляции процессом обучения механизмов консолидации памяти у животных с болезнью Альцгеймера, но не резистентных к действию тренировки процессов оперативной (рабочей) памяти, зависит от состояния «резервного» пула нейрональных предшественников, а именно нейробластов, способных быстро активироваться в ответ на развитие патологического процесса, реализуя компенсаторный механизм.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-10241.2016.7).

СООТВЕТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследования на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Эксперименты проводили после рассмотрения заявки и протокола на использования лабораторных животных на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» (выписка из протокола № 20 от 7 октября 2015 г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов благодарит студентку 4-го курса педиатрического факультета КГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого В.В. Волкову за техническое сопровождение эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Khorrami A., Ghanbarzadeh S., Mahmoudi J., Nayebi A.M., Maleki-Dizaji N., Garjani A. Investigation of the memory impairment in rats fed with oxidized-cholesterol-rich diet employing passive avoidance test // *Drug Res (Stuttg)*.

- 2015; 65 (5): 231–237. doi: 10.1055/s-0034-1370950. Epub. 2014. Mar. 25.
2. Cai Y., An S.S., Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders // *Clin Interv Aging*. 2014. 10 (6): 1163–1172. doi: 10.2147/CIA.S85808. eCollection 2015.
 3. Guerrero-Mucoz M.J., Gerson J., Castillo-Carranza D.L. Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease // *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 464. doi: 10.3389/fncel.2015.00464. eCollection 2015.
 4. Li Y., Wang X., Li Y., Sun Y., Sheng C., Li H., Li X., Yu Y., Chen G., Hu X., Jing B., Wang D., Li K., Jessen F., Xia M., Han Y. Abnormal Resting-State Functional Connectivity Strength in Mild Cognitive Impairment and Its Conversion to Alzheimer's Disease // *Neural Plast*. 2016: 4680972. doi: 10.1155/2016/4680972. Epub. 2015. Dec. 30.
 5. Rudolph S., Klein A.N., Tusche M., Schlosser C., Elfgen A., Brener O., Teunissen C., Gremer L., Funke S.A., Kutzsche J., Willbold D. Competitive Mirror Image Phage Display Derived Peptide Modulates Amyloid Beta Aggregation and Toxicity // *PLoS One*. 2016; 11 (2): e0147470. doi: 10.1371/journal.pone.0147470. eCollection 2016.
 6. Esparza T.J., Zhao H., Cirrito J.R., Cairns N.J., Bateman R.J., Holtzman D.M., Brody D.L. Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls // *Ann Neurol*. 2013; 73 (1): 104–119. doi: 10.1002/ana.23748. Epub. 2012. Dec. 7.
 7. Горина Я.В., Салмина А.Б., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Федюкович Л.В., Успенская Ю.А., Морозова Г.А., Демко И.В., Петрова М.М. Нейровоспаление и инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера // *Сибирское медицинское обозрение*. 2014; 4: 11–19.
 8. Комлева Ю.А., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Лопатина О.А., Волкова В.В., Салмина А.Б. Экспрессия молекул CD38 и CD157 в ольфакторных луковицах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // *Сибирское медицинское обозрение*. 2015; 5: 45–49.
 9. Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory // *Nat Protoc*. 2006; 1 (2): 848–858. doi:10.1038/nprot.2006.116.
 10. Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease // *Neuroscience*. 2007; 147 (1): 28–36. Epub. 2007. May. 17.
 11. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain // *Methods Cell Biol*. 2008; 85: 243–272.
 12. Tarczyluk M.A., Nagel D.A., Rhein Parri H., Tse E.H., Brown J.E., Coleman M.D., Hill E.J. Amyloid β 1–42 induces hypometabolism in human stem cell-derived neuron and astrocyte networks // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab*. 2015; 35 (8): 1348–1357. doi: 10.1038/jcbfm.2015.58. Epub. 2015. Apr. 8.
 13. Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions // *Neuron*. 2011; 70 (4): 687–702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
 14. Brinton R.D., Wang J.M. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent // *Curr. Alzheimer Res*. 2006; 3 (3): 185–190.
 15. Donovan M.H., Yazdani U., Norris R.D., Games D., German D.C., Eisch A.J. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease // *J. Comp. Neurol*. 2006; 495 (1): 70–83.
 16. Lazarov O., Marr R.A. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads // *Exp. Neurol*. 2010; Jun. 223 (2): 267–281. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.009. Epub. 2009. Aug. 19.
 17. Haughey N.J., Liu D., Nath A., Borchard A.C., Mattson M.P. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Neuromolecular Med*. 2002; 1 (2): 125–135.
 18. Mirochnic S., Wolf S., Staufienbiel M., Kempermann G. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease // *Hippocampus*. 2009; Oct. 19 (10): 1008–1018. doi: 10.1002/hipo.20560.
 19. Ziegler A.N., Levison S.W., Wood T.L. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis // *Nat. Rev. Endocrinol*. 2015; Mar. 11 (3): 161–170. doi: 10.1038/nrendo.2014.208. Epub. 2014. Dec. 2.
 20. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.А., Волкова В.В., Герцог Г.Е., Попова Н.Н., Салмина А.Б. Особенности экспрессии молекул-маркеров инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера // *Проблемы эндокринологии*. 2015; 4: 43–48.
 21. Gontier G., George C., Chaker Z., Holzenberger M., And S. Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer's Disease Pathology through Amyloid- β Clearance // *J. Neurosci*. 2015; Aug 19. 35 (33): 11500–11513. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0343-15.2015.
 22. Madathil S.K., Saatman K.E. IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome // *Source Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects* / Kobeissy FH, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2015. Chapter 7.

Поступила в редакцию 06.10.2016
Утверждена к печати 01.12.2016

Комлева Юлия Константиновна, канд. мед. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Горина Яна Валерьевна, канд. фарм. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Черных Анатолий Игоревич, врач-хирург, КМКБ № 20 им. И.С. Берзона, г. Красноярск.

Лопатина Ольга Леонидовна, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Шабалова Анна Андреевна, ассистент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Труфанова Людмила Васильевна, канд. биол. наук, доцент, декан фармацевтического факультета, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Оловянная Раиса Яковлевна, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Ендржеевская-Шурыгина Виктория Юлиановна, канд. хим. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) Горина Яна Валерьевна, e-mail: yana_20@bk.ru.

УДК 616.831-092.18:616.894-053.8-092.9

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-56-65

For citation: Komleva Yu.K., Gorina Ya.V., Chernykh A.I., Lopatina O.L., Shabalova A.A., Trufanova L.V., Olovyanikova R.Ya., Endrzhhevskaya-Shurygina V.Yu., Salmina A.B. Characteristics of brain cell proliferation and migration in animals with experimental Alzheimer's disease undergoing cognitive training. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 56–65

Characteristics of brain cell proliferation and migration in animals with experimental Alzheimer's disease undergoing cognitive training

Komleva Yu.K.¹, Gorina Ya.V.¹, Chernykh A.I.², Lopatina O.L.¹, Shabalova A.A.¹, Trufanova L.V.¹, Olovyanikova R.Ya.¹, Endrzhhevskaya-Shurygina V. Yu.¹, Salmina A.B.¹

¹ Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky 1, Partizana Geleznuyka Str., 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation

² Krasnoyarsk Inter-regional Clinical Hospital № 20 named after I.S. Berzona 12a, Instrumentalnay Str., 660123, Krasnoyarsk, Russian Federation

ABSTRACT

Aims. Alzheimer's disease is a multifactorial neurodegenerative disease characterized by the presence of amyloid beta peptide containing plaques, and neurofibrillary tangles. Beta-amyloid is a major risk factor and it plays a central role in the onset and progression of Alzheimer's disease. However, question of the influence of beta-amyloid on neurogenesis in the hippocampus in the adult brain is still open. The purpose of this paper is to study cognitive functions and their association with proliferation, survival and migration of newly-formed cells in normal adult rat brain and in the experimental Alzheimer's disease.

Materials and methods. Rats (Wistar, males, 7 months) were used. Experimental group (Alzheimer's disease model with the intrahippocampal administration of beta-amyloid 1-42 (5 µl) bilaterally in the CA1 area) and a control group (sham-operated animals with the intrahippocampal administration of Phosphate buffered saline (5 µl) bilaterally in the CA1) have been tested. The study was conducted from February to July. Neurobehavioral test (Morris water maze) was used to assess working memory and memory consolidation. The study of cell migration was performed by introducing bromodeoxyuridine (50 mg/kg). Expression of neurogenesis markers in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus was studied has been studied with indirect immunohistochemistry for free-floating sections followed by the confocal microscopy.

Results. Modelling of Alzheimer's disease leads to impaired cognitive function and memory in animals. We found that these events were associated with the suppression of proliferative ($p = 0,043$) and migratory activity of brain cells ($p = 0,031$), but not survival of cells ($p = 0,985$) compared to the control group. Training in Morris water maze of animals with experimental Alzheimer's disease promotes migration of progenitor cells along the rostral migration way ($p = 0,011$) compared with the group without training. However, the number of neuroblasts ($p = 0,809$) and proliferation of neuronal progenitor cells ($p = 0,083$) were not significantly affected compared with the group without training.

Conclusions. Decreased level of brain cells proliferation, alterations in their migration and development of cognitive dysfunction have been found in the rat model of Alzheimer's disease, thus suggesting impairment of neurogenesis induced by amyloid. Possible involvement of local insulin resistance into the development of neurogenesis alterations is discussed.

Key words: PCNA, Ki-67, BrdU, cell migration, Alzheimer's disease, insulin resistance.

REFERENCES

1. Khorrami A., Ghanbarzadeh S., Mahmoudi J., Nayebi A.M., Maleki-Dizaji N., Garjani A. Investigation of the memory impairment in rats fed with oxidized-cholesterol-rich diet employing passive avoidance test // *Drug Res (Stuttg)*. 2015; 65 (5): 231–237. doi: 10.1055/s-0034-1370950. Epub. 2014. Mar. 25.
2. Cai Y., An S.S., Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders // *Clin Interv Aging*. 2014. 10 (6): 1163–1172. doi: 10.2147/CIA.S85808. eCollection 2015.
3. Guerrero-Mucoz M.J., Gerson J., Castillo-Carranza D.L. Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease // *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 464. doi: 10.3389/fncel.2015.00464. eCollection 2015.
4. Li Y., Wang X., Li Y., Sun Y., Sheng C., Li H., Li X., Yu Y., Chen G., Hu X., Jing B., Wang D., Li K., Jessen F., Xia M., Han Y. Abnormal Resting-State Functional Connectivity Strength in Mild Cognitive Impairment and Its Conversion to Alzheimer's Disease // *Neural Plast*. 2016: 4680972. doi: 10.1155/2016/4680972. Epub. 2015. Dec. 30.
5. Rudolph S., Klein A.N., Tusche M., Schlosser C., Elfgen A., Brener O., Teunissen C., Gremer L., Funke S.A., Kutzsche J., Willbold D. Competitive Mirror Image Phage Display Derived Peptide Modulates Amyloid Beta Aggregation and Toxicity // *PLoS One*. 2016; 11 (2): e0147470. doi: 10.1371/journal.pone.0147470. eCollection 2016.
6. Esparza T.J., Zhao H., Cirrito J.R., Cairns N.J., Bateman R.J., Holtzman D.M., Brody D.L. Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls // *Ann Neurol*. 2013; 73 (1): 104–119. doi: 10.1002/ana.23748. Epub. 2012. Dec. 7.
7. Gorina Ja.V., Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Komleva Ju.K., Fedjukovich L.V., Uspenskaja Ju.A., Morozova G.A., Demko I.V., Petrova M.M. Nejrovospalenie i insulinorezistentnost' pri bolezni Al'cgejmera [Neuroinflammation and insulin resistance in Alzheimer's disease] // *Sibirskoe medicinskoje obozrenie – Siberian Medical Review*. 2014; 4: 11–19 (in Russian).
8. Komleva Ju.K., Malinovskaia N.A., Gorina Ja.V., Lopatina O.L., Volkova V. V., Salmina A.B. Ehkspressiya molekul CD38 i CD157 v ol'faktornyh lukovica h golovno go mozga pri ehksperimental'noj bolezni Al'cgejmera [Expression of CD38 and CD157 molecules in the olfactory bulb of the brain in experimental Alzheimer's disease] // *Sibirskoe medicinskoje obozrenie – Siberian Medical Review*. 2015; 5: 45–49 (in Russian).
9. Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory // *Nat Protoc*. 2006; 1 (2): 848–858. doi:10.1038/nprot.2006.116.
10. Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease // *Neuroscience*. 2007; 147 (1): 28–36. Epub. 2007. May. 17.
11. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain // *Methods Cell Biol*. 2008; 85: 243–272.
12. Tarczylyk M.A., Nagel D.A., Rhein Parri H., Tse E.H., Brown J.E., Coleman M.D., Hill E.J. Amyloid β 1–42 induces hypometabolism in human stem cell-derived neuron and astrocyte networks // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab*. 2015; 35 (8): 1348–1357. doi: 10.1038/jcbfm.2015.58. Epub. 2015. Apr. 8.
13. Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions // *Neuron*. 2011; 70 (4): 687–702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
14. Brinton R.D., Wang J.M. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent // *Curr. Alzheimer Res*. 2006; 3 (3): 185–190.
15. Donovan M.H., Yazdani U., Norris R.D., Games D., German D.C., Eisch A.J. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease // *J. Comp. Neurol*. 2006; 495 (1): 70–83.

16. Lazarov O., Marr R.A. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads // *Exp. Neurol.* 2010; Jun. 223 (2): 267–281. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.009. Epub. 2009. Aug. 19.
17. Haughey N.J., Liu D., Nath A., Borchard A.C., Mattson M.P. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Neuromolecular Med.* 2002; 1 (2): 125–135.
18. Mirochnic S., Wolf S., Staufenbiel M., Kempermann G. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease // *Hippocampus.* 2009; Oct. 19 (10): 1008–1018. doi: 10.1002/hipo.20560.
19. Ziegler A.N., Levison S.W., Wood T.L. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015; Mar. 11 (3): 161–170. doi: 10.1038/nrendo.2014.208. Epub. 2014. Dec 2.
20. Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Volkova V.V., Gertsog G.E., Popova N.N., Salmina A.B. Osobennosti ekspressii molekul-markerov insulinorezistentnosti pri eksperimentalnoy bolezni Altsgeymera [Features of molecule expression markers of insulin resistance in experimental Alzheimer's disease] // *Problemy endokrinologii – Endocrinology problem.* 2015; 4: 43–48 (in Russian).
21. Gontier G., George C., Chaker Z., Holzenberger M., And S. Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer's Disease Pathology through Amyloid- β Clearance // *J. Neurosci.* 2015; Aug 19. 35 (33): 11500–11513. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0343-15.2015.
22. Madathil S.K., Saatman K.E. IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome // *Source Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects* / Kobeissy FH, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2015. Chapter 7.

Received October 06.2016

Accepted December 01.2016

Komleva Yuliya K., PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Gorina Yana V., PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Chernykh Anatolii I., Surgeon, Krasnoyarsk Inter-regional Clinical Hospital № 20, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Lopatina Olga L., PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Shabalova Anna A., Assistant of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Trufanova Lyudmila V., PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Olovyannikova Raisa Ya., PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Endrzhhevskaya-Shurygina Viktoriya Yu., PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Salmina Alla B., DM, Professor, Head of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

✉ **Gorina Yana V.**, e-mail: yana_20@bk.ru