

**АНАЛИЗ НЕЙРОГЕНЕЗА В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ
ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОМ ВЫВЕШИВАНИИ**

© 2022 г. Е. А. Олейник¹, А. А. Наумова¹, Ю. С. Григорьева¹, В. Т. Бахтеева¹,
Е. А. Лаврова¹, Е. В. Черниговская¹, М. В. Глазова¹, *

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

*E-mail: mglazova@iephb.ru

Поступила в редакцию 16.05.2022 г.
После доработки 24.06.2022 г.
Принята к публикации 24.06.2022 г.

Длительные космические полеты и симулируемая микрогравитация оказывают негативное влияние на целый ряд когнитивных функций, включая память, обучение, ориентацию в пространстве и принятие решений. В то же время известно, что в регуляции когнитивных процессов важную роль играет гиппокампальный нейрогенез. В настоящей работе было исследовано влияние 3-дневной двигательной разгрузки задних конечностей (антиортостатического вывешивания) на активность нейрогенеза в гиппокампе мышей. В экспериментах были использованы взрослые самцы мышей линии CD1. Наши результаты показали, что 3-дневное вывешивание не оказывает влияния на пролиферацию клеток и численность незрелых doublecortin-позитивных нейронов, однако вызывает снижение числа ранних nestin-позитивных нейрональных предшественников. Анализ сигнальных каскадов, вовлеченных в регуляцию гиппокампального нейрогенеза, не выявил изменений в активности протеинкиназ ERK1/2, однако показал повышение экспрессии и фосфорилирования транскрипционного фактора CREB. Кроме того, после 3-дневного вывешивания у мышей наблюдалось значительное увеличение концентрации кортикостерона в крови, а также экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гранулярных клетках и поле СА3 гиппокампа, что свидетельствует о развитии стрессорного ответа. Таким образом, стресс, отражающий адаптацию организма к двигательной разгрузке, может являться ключевым фактором, опосредующим нарушения гиппокампального нейрогенеза при кратковременном воздействии симулируемой микрогравитации.

Ключевые слова: антиортостатическое вывешивание, гиппокамп, нейрогенез, кортикостерон, глюкокортикоидные рецепторы, CREB

DOI: 10.31857/S0869813922070081

Впервые постнатальный нейрогенез у млекопитающих был открыт Altman и Das в 1965 г. [1]. В головном мозге взрослых млекопитающих выявлены две основные нейрогенные ниши: субгранулярная зона зубчатой извилины и субвентрикулярная зона боковых желудочков мозга. Десятилетия исследований показали, что гиппокампальный нейрогенез представляет собой гибкий процесс, который зависит от множества различных факторов [2]. В частности, физически активная жизнь и обогащенная среда стимулируют нейрогенез, что коррелирует с улучшением когнитивных функций [2]. И наоборот, произвольный малоподвижный образ жизни или гипокинезия, вызванная травмами или заболеваниями, могут негативно сказаться

как на нейрогенезе, так и на когнитивных функциях [3, 4]. В то же время молекулярные механизмы регуляции нейрогенеза при различных патологических состояниях до сих пор остаются малоизученными.

Было показано, что микрогравитация в условиях длительных космических миссий не только влияет на опорно-двигательный аппарат, сердечно-сосудистую и другие периферические системы, но и приводит к целому ряду нарушений в центральной нервной системе как у человека, так и у животных [5, 6]. МРТ-исследования выявили различные морфологические изменения в головном мозге астронавтов после длительного космического полета, в том числе изменение плотности и объема серого вещества, увеличение объема желудочков и снижение функциональных связей [6–8]. Сходные отклонения наблюдались у добровольцев в аналоговых экспериментах, позволяющих симулировать влияние микрогравитации на Земле, в первую очередь – в модели антиортостатической гипокинезии (АНОГ, или Head-down bed rest, HDBR) [7–10]. Кроме того, длительные космические полеты и АНОГ могут вызвать некоторые когнитивные изменения, такие как нарушения кратковременной памяти, переключения внимания, ориентации в пространстве и т.д. [11]. Очевидно, что выявленные патологии связаны с нарушением нейрохимических и молекулярных механизмов, которые были выявлены в экспериментах на животных. В частности, когнитивные нарушения могут быть связаны с нарушением работы гиппокампа, который участвует в обучении, формировании памяти и эмоций, пространственной ориентации, а также является нейрогенной зоной взрослого мозга. Сдвиг цереброспинальной жидкости и морфологические изменения, выявленные в коре, также указывают на изменения работы нейронов. Показано, что изменения окружающей среды и некоторые патологии, такие как эпилепсия и нейродегенеративные заболевания, могут существенно влиять на микроанатомию и функции гиппокампа [12–14]. В то же время данные о влиянии микрогравитации на гиппокамп пока ограничены. На данный момент опубликована только одна работа, в которой при помощи МРТ продемонстрировано уменьшение объема серого вещества в гиппокампе человека после 30-дневного воздействия АНОГ [15]. При этом полностью отсутствуют данные об уровне активности постнатального нейрогенеза во время или после космического полета. С другой стороны, в нескольких работах продемонстрировано негативное влияние длительной разгрузки задних конечностей на нейрогенез гиппокампа грызунов [16, 17]. Метод антиортостатической разгрузки задних конечностей (метод вывешивания по Новикову–Ильину в модификации Morey–Holton) является широко используемой моделью симулированной микрогравитации, воспроизводящей такие изменения, как снижение двигательной активности, атрофия мышц задних конечностей и сдвиг жидкости к голове [18, 19].

В регуляции постнатального нейрогенеза в гиппокампе взрослых млекопитающих задействован целый ряд сигнальных механизмов. Одним из основных регуляторов нейрональной дифференцировки являются протеинкиназы ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1, 2) [20]. Кроме того, было показано, что в регуляции дифференцировки нейронов гиппокампа участвует нейромедиатор глутамат [21, 22]. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что 3-дневное антиортостатическое вывешивание приводит к снижению глутаматергической нейротрансмиссии [23] и уменьшению числа незрелых doublecortin (DCX)-позитивных нейронов в гиппокампе крыс [24]. Эти изменения сопровождались значительным снижением активности ERK1/2 киназ. В то же время известно, что скорость нейрогенеза у разных млекопитающих различается [25]. В частности, уровень пролиферации нейрональных стволовых клеток и скорость созревания нейронов в гиппокампе у крыс значительно выше, чем у мышей [26]. В данной работе мы провели исследование влияния 3-суточного вывешивания на уровень нейрогенеза в гиппокампе мы-

шей. Полученные данные показали, что в отличие от крыс у мышей кратковременное вывешивание не оказало значительного влияния на пролиферацию клеток и на популяцию DCX-позитивных незрелых нейронов в гиппокампе, но приводило к значительному снижению числа nestin-позитивных нейрональных прогениторных клеток. Эти изменения сопровождались повышением активности транскрипционного фактора CREB (cAMP responsive element binding protein), однако активность ERK1/2-киназ при этом не изменялась. При этом повышенное содержание кортикоостерона в крови, а также повышенная экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, наблюдаемые после кратковременной двигательной нагрузки, свидетельствовали о развитии стрессорного ответа, который может являться ключевым фактором снижения нейрогенеза в условиях двигательной нагрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В экспериментах были использованы половозрелые самцы мышей линии CD1 в возрасте 4–5 мес. ($n = 20$). Мышей содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к еде и воде. Все процедуры с использованием животных проводились в соответствии с Правилами обращения с лабораторными животными Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, согласующимися с директивой Европарламента 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г.

Животные были разделены на две группы: 1. Контроль ($n = 10$); 2. Антиорто статическое вывешивание по методу Новикова–Ильина в модификации Morey–Holton (hindlimb unloading, HU; $n = 10$). Каждое животное из группы HU помещали в индивидуальную клетку. Хвост животного прикрепляли с помощью пластыря к гибкому подвесу, который присоединяли через систему карабинов к горизонтальному металлическому стержню в верхней части клетки. Угол между телом животного и дном клетки составлял 30 градусов. Таким образом, задние конечности мыши не взаимодействовали с опорой и не участвовали в локомоции, однако животное могло свободно перемещаться по клетке с использованием передних конечностей. Животные контрольной группы помещались в такие же индивидуальные клетки, но не испытывали никаких ограничений локомоции. Длительность вывешивания составляла 3 суток. Все животные были выведены из эксперимента на следующий день.

По окончании эксперимента у всех животных брали кровь для дальнейшего иммуноферментного анализа концентрации кортикоостерона. 5 животных из каждой экспериментальной группы были декапитированы, гиппокампы иссекали из мозга, гомогенизировали в лизирующем буфере (20 мМ Tris, pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA), содержащем ингибиторы протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и фосфатаз (Roche, #04906837001), и центрифугировали 15 мин при 12000 g при комнатной температуре. Полученный супернатант разводили в соотношении 1 : 2 трехкратным SDS буфером (0.2 М Tris-HCl, pH 6.7; 6% SDS; 15% глицерин; 0.003% бромфеноловый синий, 10% β -меркаптоэтанол), инкубировали 10 мин при 96°C, замораживали и хранили при –20°C для дальнейшего Вестерн-блот анализа.

Остальных животных наркотизировали внутрибрюшинным введением смеси золетила и ксилазина (60 + 10 мг/кг; Virbac) и перфузировали транскардиально холодным 4%-ным параформальдегидом. Мозг извлекали и постфиксировали в 4%-ном параформальдегиде в течение 3 сут при 4°C, далее инкубировали в 20%-ном растворе сахарозы на фосфатно-солевом буфере, замораживали и хранили при –80°C для дальнейшего иммуногистохимического анализа.

Имуноферментный анализ. Содержание кортикоостерона в сыворотке крови определяли с помощью коммерческого набора реактивов “Кортикоостерон кры-

са/мышь-ИФА” (ООО “ХЕМА”, #K210R) в соответствии с инструкцией производителя.

Иммуногистохимический/иммунофлуоресцентный анализ. Чередующиеся серии срезов мозга толщиной 10 мкм изготавливали на криостате Leica. Анализ каждого белка интереса проводился одновременно в контрольной и экспериментальной группах животных в стандартных условиях. После стандартной предварительной обработки гистологические срезы, содержащие дорсальный гиппокамп, инкубировали с первичными антителами против doublecortin (DCX) (1 : 300; Cell Signaling, #4604), Ki67 (1 : 300; Millipore, #AB9260), nestin (1 : 400; Cell Signaling, #4760), глюкокортикоидного рецептора (glucocorticoid receptor, GR) (1 : 400; Cell Signaling) и phospho-CREB (Ser133; 1 : 1000; Novus Biologicals, NB300-273) в течение ночи при комнатной температуре. Затем для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии DCX, Ki67 и nestin препараты инкубировали в растворе вторичных антител, конъюгированных с Alexa488 (1 : 1000; Invitrogen, #913909) или Alexa568 (1 : 1000; Invitrogen, #762708) в течение часа при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали DAPI (1 : 2000; Sigma-Aldrich, #32670). Для иммуногистохимического анализа экспрессии GR и фосфо-CREB препараты инкубировали в растворе биотинилированных вторичных антител против иммуноглобулинов кролика (1 : 300, Vector Laboratories Inc., #BA-1000) в течение часа, а затем – в течение часа в растворе стрептавидин-пероксидазы (1 : 500; Supelco, #S2438). Выявление специфической реакции проводили в буферном растворе, содержащем 0.05% 3,3'-диаминобензидина (DAB; Sigma-Aldrich, #D5637) и 0.3% пероксида водорода. Флуоресцентную реакцию анализировали с помощью микроскопа Leica DMI 6000B fluorescent microscope (Leica Microsystems GmbH), световую – с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager A1 fluorescent microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Полученные микрофотографии обрабатывали в программе ImageJ. Далее подсчитывали число DCX, Ki67 и nestin-позитивных клеток, а также оценивали оптическую плотность pCREB и GR иммунопозитивного вещества в гиппокампе мышей.

Вестерн-блоттинг. Белки в пробах разделяли в 10%-ном полиакриамидном геле (SDS-PAGE) по Лэммли и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa-Cruz, #sc-3718). Мембраны инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке в течение часа, а затем – в растворе первичных антител против phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; 1 : 1000; Cell Signaling, #4376), CREB (1 : 1000; Cell Signaling, #9197) и actin (1 : 1000; Abcam, #ab3280) при 4°C в течение ночи. Затем мембраны отмывали в ТВСТ и инкубировали в течение часа в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, против иммуноглобулинов кролика (1 : 10000; Sigma-Aldrich, #A0545) или мыши (1 : 40000; Sigma-Aldrich, #A9044). Результаты визуализировали с помощью SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075) с использованием ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc.). Денситометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ. Уровень экспрессии специфических белков нормировали с помощью сигнала actin, выявляемого для оценки общего содержания белка в пробах.

Статистический анализ. Полученные результаты статистически обрабатывали при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни в коммерческой программе GraphPad Prism 7. Данные представлены в виде медианы ± интерквартильное отклонение. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ показателей нейрогенеза. В первую очередь мы оценили уровень пролиферативной активности в зубчатой извилине мышей. Полученные результаты показали, что после 3-суточного вывешивания число Ki67-позитивных клеток досто-

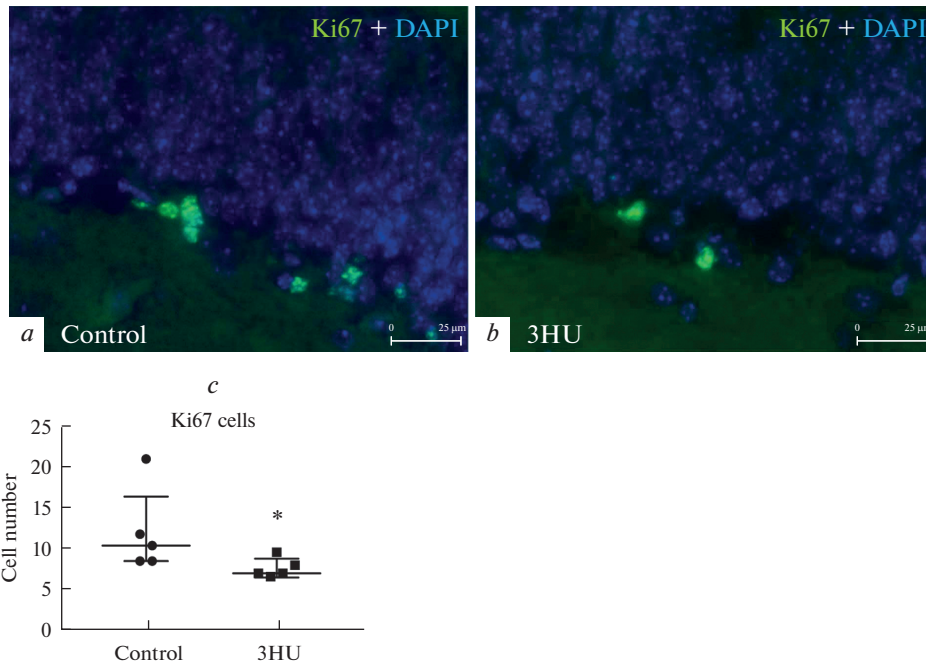


Рис. 1. Анализ уровня пролиферации в зубчатой извилине. *a, b* – Иммунофлуоресцентное выявление Ki67 у контрольных мышей (*a*) и после 3-дневного вывешивания (ЗНУ) (*b*). *c* – На графике представлено число Ki67 позитивных клеток у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы \pm интерквартильное отклонение. * $p < 0.05$.

верно снизилось (рис. 1), что свидетельствует об ингибирующем влиянии краткосрочного вывешивания на активность пролиферации нейрональных стволовых клеток.

В то же время число nestin-позитивных нейрональных прогениторных клеток в зубчатой извилине у мышей после 3-суточного вывешивания также был значительно снижен по сравнению с контролем (рис. 2).

Анализ популяции незрелых DCX-позитивных нейронов также не выявил различий между экспериментальной и контрольной группами (рис. 3).

Анализ активности протеинкиназ ERK1/2. ERK1/2 играют важную роль в регуляции нейрональной дифференцировки [20], при этом уровень их фосфорилирования по остаткам Thr202/Tyr204 напрямую свидетельствует об уровне киназной активности. Полученные данные показали, что 3-суточное вывешивание не оказывало влияния на активность ERK1/2 (рис. 4).

Анализ активности транскрипционного фактора CREB. Транскрипционный фактор CREB контролирует экспрессию множества генов, участвующих в регуляции нейрогенеза [27], нейроадаптивных процессов, таких как обучение и память [28], а также опосредует эффекты стресса [29]. Иммуногистохимическое выявление активной формы CREB, фосфорилированной по Ser133, показал, что в результате вывешивания активность CREB значительно повысилась в гранулярном слое зубчатой извилины и зоне CA3 (рис. 5).

Анализ содержания кортикостерона в крови. Снижение нейрональной дифференцировки и повышение активности CREB в гиппокампе может быть связано не

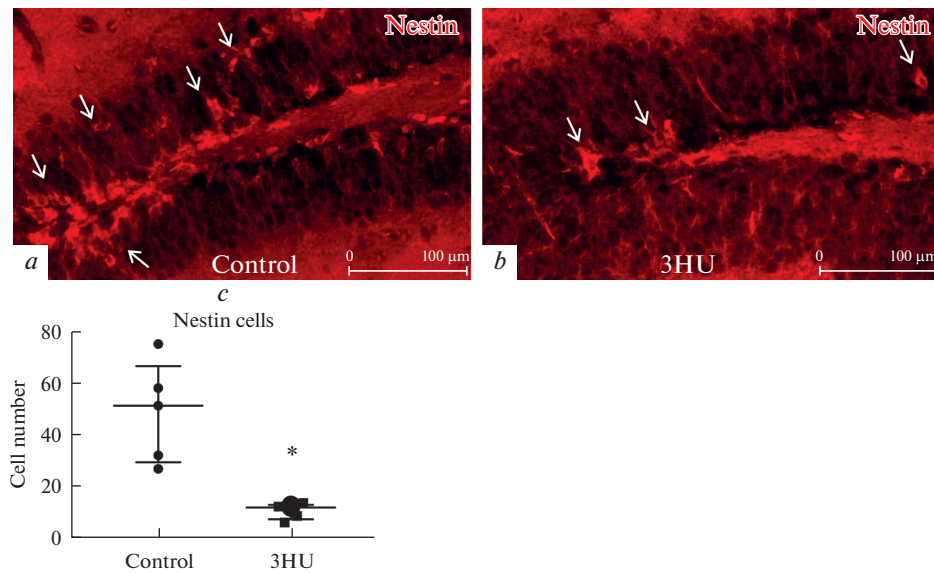


Рис. 2. Анализ популяции nestin-положительных клеток. *a, b* – Иммунофлуоресцентное выявление nestin у контрольных мышей (*a*) и после 3-дневного вывешивания (ЗНУ) (*b*). *c* – На графике представлено число nestin-положительных клеток у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы \pm интерквартильное отклонение. * – $p < 0.05$.

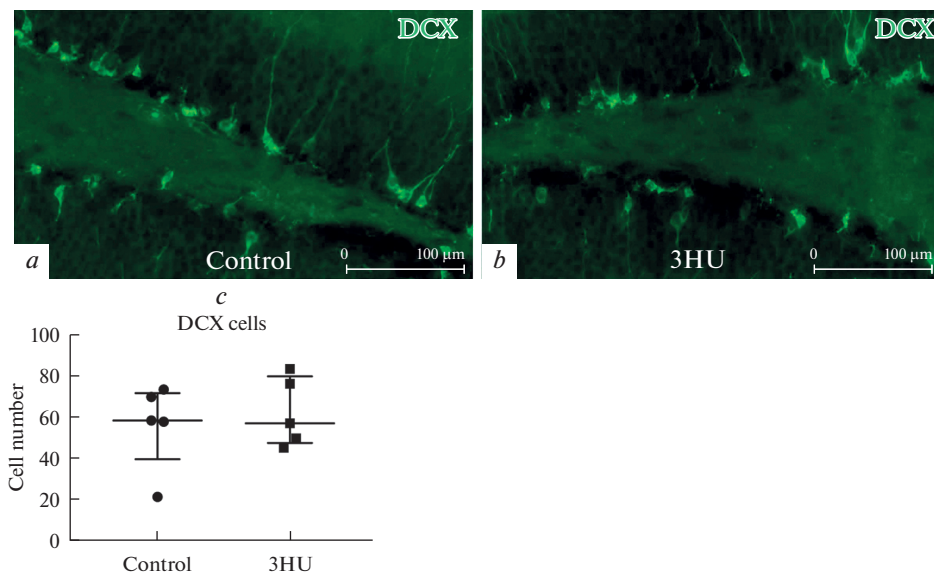


Рис. 3. Анализ популяции DCX-положительных клеток в зубчатой извилине. *a, b* – Иммунофлуоресцентное выявление DCX у контрольных мышей (*a*) и после 3-дневного вывешивания (ЗНУ) (*b*). *c* – На графике представлено число DCX-положительных клеток у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы \pm интерквартильное отклонение.

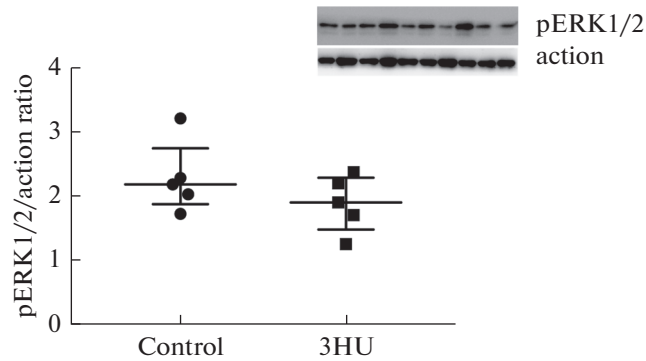


Рис. 4. Анализ уровня активности ERK1/2 в гиппокампе мышей. Уровень активности протеинкиназы ERK1/2 оценивали Вестерн-блоттингом по отношению уровня фосфорилированной формы ERK1/2 (pERK1/2) к уровню актин у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (3HU). Данные представлены в виде медианы \pm интерквартильное отклонение.

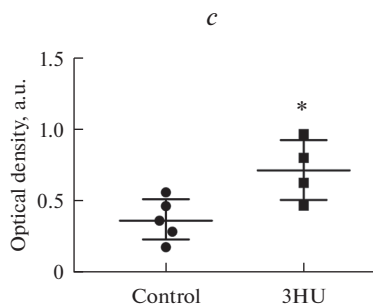
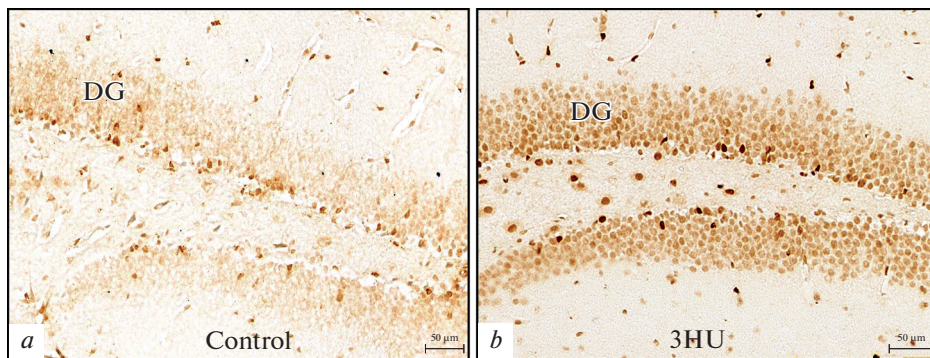


Рис. 5. Анализ pCREB в зубчатой извилине мышей. *a, b* – Иммуногистохимическое выявление pCREB у контрольных мышей (*a*) и после 3-х дневного вывешивания (3HU) (*b*). *c* – На графике представлена оптическая плотность pCREB-иммунопозитивного вещества, выраженная в условных единицах (a.u.) у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (3HU). Данные представлены в виде медианы \pm интерквартильное отклонение. * – $p < 0.05$.

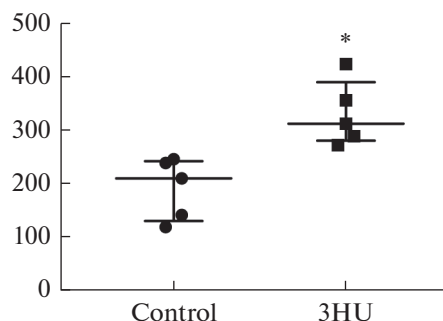


Рис. 6. Анализ содержания кортикостерона в крови мышей. Концентрация кортикостерона в крови мышей определяли иммуноферментным анализом. На графике представлены данные содержания кортикостерона (нг/мл) у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы \pm интерквартильное отклонение. * $p < 0.05$.

только с антиортостатическим вывешиванием, но и со стрессом, вызванным данным экспериментальным воздействием. Действительно, концентрация кортикостерона в сыворотке крови мышей после 3 сут вывешивания была значительно выше, чем у контрольных животных (рис. 6).

Анализ экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (GR). Известно, что при развитии стресса экспрессия GR значительно повышается в гранулярных клетках, а также GR начинает экспрессироваться в пирамидных клетках CA3, где в норме он не экспрессируется [30]. Наши данные показали значительное повышение экспрессии GR у мышей после 3-суточного вывешивания как в гранулярном слое зубчатой извилины (рис. 7a, c, e), так и в зоне CA3 гиппокампа (рис. 7b, d, f).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гиппокампальный нейрогенез у взрослых млекопитающих представляет собой сложный процесс, который начинается с пролиферации стволовых клеток и включает в себя несколько стадий дифференцировки, если выживают ранние постмитотические нейрональные предшественники [2]. Ранее в нескольких работах было показано, что длительная антиортостатическая разгрузка приводит к ингибированию нейрогенеза в гиппокампе [16, 17]. Однако нет каких-либо данных, показывающих, что при вывешивании нарушается в первую очередь: пролиферация, дифференцировка или и то, и другое. Наши данные выявили снижение количества nestin-позитивных клеток в зубчатой извилине без каких-либо изменений количества Ki67-позитивных пролиферирующих клеток и DCX-позитивных незрелых нейронов после 3-дневного вывешивания. Nestin относится к белкам промежуточных филаментов и выявляется в клетках на более ранних этапах нейрональной дифференцировки, чем DCX. Хотя первоначально этот белок был выявлен именно в нейрональных стволовых и прогениторных клетках, на сегодняшний день показано, что nestin экспрессируется также в миоцитах, сателлитных клетках скелетных мышц, поджелудочной железе, сердце, волосяных фолликулах и пр. [31]. В условиях *in vitro* большинство эмбриональных нейрональных стволовых клеток коэкспрессируют nestin и Ki67 [32]. Однако в гиппокампе взрослых мышей только около 20% nestin-позитивных клеток активно пролиферируют, о чем свидетельствует экспрессия в них Ki67 [33]. Наши данные также демонстрируют, что не все nestin-позитивные клетки являются пролиферирующими: в отличие от Ki67-позитивных

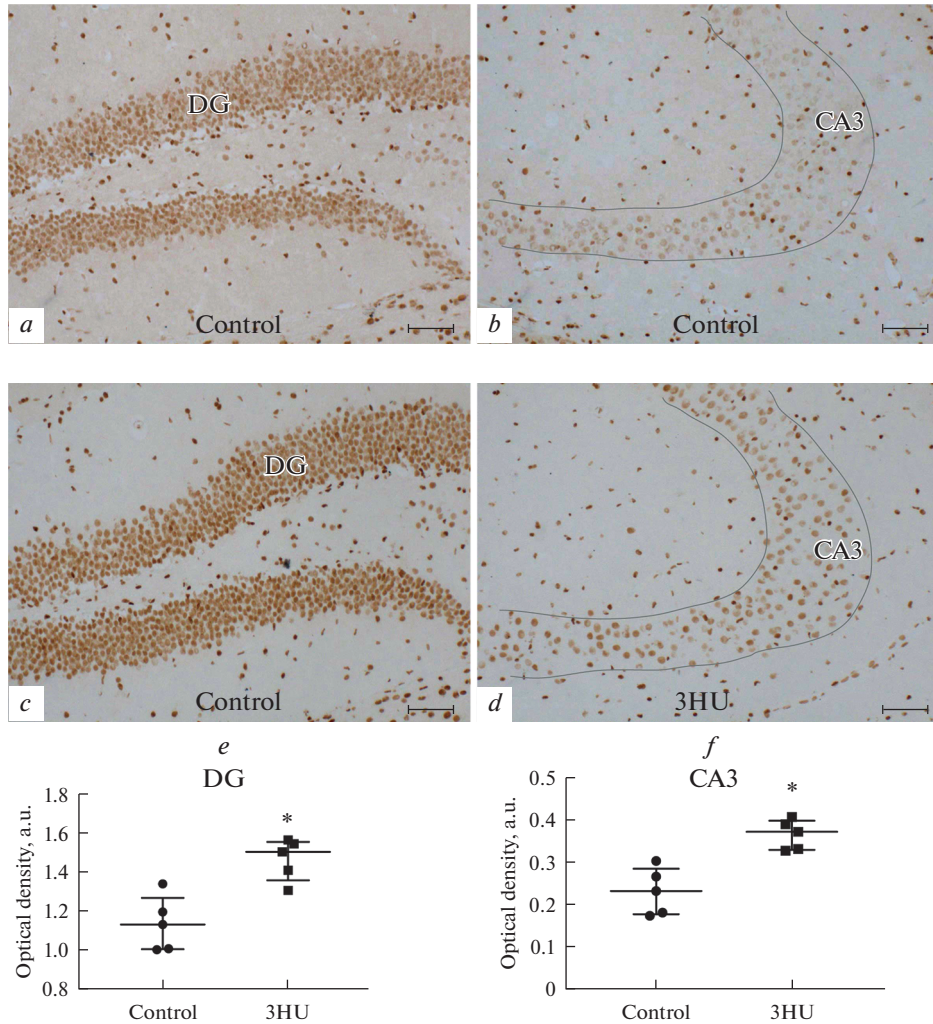


Рис. 7. Анализ экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (GR) в гиппокампе мышей. *a–d* – Иммуногистохимическое выявление GR у контрольных мышей в зубчатой извилине (*a*) и зоне CA3 (*b*), и у мышей после 3-суточного вывешивания (3HU) в зубчатой извилине (*c*) и CA3 (*d*). Шкала – 50 мкм. *e, f* – На графиках представлена оптическая плотность GR-иммунопозитивного вещества, выраженная в условных единицах (a.u.) у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (3HU) в зубчатой извилине (*e*) и зоне CA3 (*f*). Данные представлены в виде медианы \pm интерквартильное отклонение. * – $p < 0.05$.

тивных клеток, которые выявляются только в субгранулярной зоне зубчатой извилины, nestin-позитивные клетки выявлялись также в гранулярном слое.

Ранее нами было показано, что у крыс 3-дневная разгрузка задних конечностей также не приводит к изменению числа пролиферирующих клеток в гиппокампе, однако вызывает снижение популяции DCX-позитивных незрелых нейронов [24]. При этом после более длительного вывешивания (14 дней) у крыс значительно снижается не только численность DCX-позитивных незрелых нейронов, но и уровень пролиферации [16]. Выявленное несовпадение результатов у крыс и у мышей

можно объяснить данными о том, что скорость нейрогенеза у крыс значительно выше, и маркеры ранних стадий нейрональной дифференцировки, DCX и PSA-NCAM (polysialylated-neural cell adhesion molecule), в клетках, закончивших цикл деления, начинают экспрессироваться гораздо раньше [26].

Одним из основных регуляторов нейрональной дифференцировки являются протеинкиназы ERK1/2. Интересно, что вызванное двигательной разгрузкой снижение числа DCX-позитивных нейронов у крыс коррелирует со снижением активности протеинкиназ ERK1/2 [24]. В то же время в настоящей работе показано, что у мышей, которые демонстрируют отсутствие изменений в популяции DCX-позитивных клеток, не наблюдается изменений уровня фосфорилирования ERK1/2 по сравнению с контролем. Таким образом, у мышей при кратковременном вывешивании страдают более ранние нейрональные предшественники, а у крыс — более зрелые, однако можно заключить, что ранние этапы нейрональной дифференцировки являются главным уязвимым звеном при нарушениях регуляции нейрогенеза, вызванных кратковременной двигательной разгрузкой.

Наблюдаемые изменения гиппокампального нейрогенеза могут быть обусловлены стрессом, возникающим на коротких сроках вывешивания и отражающим адаптацию организма к гипокинезии, перераспределению мышечного тонуса, сдвигу жидкости и потере опорной афферентации. Ранее было установлено, что стресс может приводить к подавлению постнатального нейрогенеза в гиппокампе [34]. Одним из ключевых показателей стрессорного ответа у мышей и крыс является содержание кортикостерона в крови [35]. Имеющиеся сведения об изменениях уровня кортикостерона при антиортостатическом вывешивании противоречивы: по одним данным, повышение наблюдается в первый день эксперимента, а затем происходит стабилизация, по другим — повышенное содержание кортикостерона нормализуется только к седьмому дню [19]. В данном исследовании мы выявили повышенный уровень кортикостерона в крови мышей после 3-дневного вывешивания. Более того, результаты показали повышение экспрессии GR в гранулярном слое зубчатой извилины и зоне CA3 гиппокампа мышей. Эти данные также свидетельствуют о развитии стрессорного ответа, поскольку ранее было установлено, что при стрессе экспрессия GR появляется в зоне CA3, где он в норме не экспрессируется и значительно повышается в гранулярных клетках [30].

Мы также показали, что 3-дневное вывешивание приводит к значительному увеличению экспрессии и активности транскрипционного фактора CREB в гиппокампе мышей. Ранее сходные изменения были выявлены нами и в гиппокампе крыс [23]. Показано, что активация CREB наблюдается как при остром, так и при хроническом стрессе [30]. Таким образом, выявленное нами повышение активности CREB в гиппокампе может служить еще одним показателем стресса, вызванного двигательной разгрузкой задних конечностей. Известно, что CREB контролирует экспрессию множества генов, в том числе играющих важную роль в регуляции нейрогенеза [36]. Показано, что активация CREB стимулирует пролиферацию и созревание клеток гиппокампа, а также способствует выживанию нейронов [27]. Наши исследования не выявили повышения активности CREB в субгранулярной зоне зубчатой извилины, однако активация CREB в гранулярных клетках и поле CA3 может служить компенсаторным механизмом, повышающим выживаемость новообразованных клеток на фоне нарушений нейрогенеза, вызванных антиортостатическим вывешиванием.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что кратковременная двигательная разгрузка задних конечностей вызывает у мышей стрессорный ответ, который, по-видимому, является одной из основных причин снижения гиппокампального нейрогенеза.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была профинансирована за счет гранта РФФИ № 20-015-00062 и государственного задания № 075-0152-22-00.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть работы была выполнена на оборудовании ЦКП ИЭФБ РАН (441590).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А.О. — проведение анализа Вестерн-блот, иммуногистохимия, иммунофлуоресценция, А.А.Н. — планирование экспериментов, обсуждение результатов, Ю.С.Г. — проведение экспериментов, сбор материала, проведение анализа Вестерн-блот; В.Т.Б. — обработка данных, редактирование рукописи; Е.А.Л. — обеспечение экспериментальной базы; Е.В.Ч. — обсуждение результатов, интерпретация данных; М.В.Г. — постановка задачи, планирование экспериментов, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Altman J, Das GD* (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319–335.
<https://doi.org/10.1002/CNE.901240303>
2. *Baptista P, Andrade JP* (2018) Adult hippocampal neurogenesis: Regulation and possible functional and clinical correlates. *Front Neuroanat* 12: 44.
3. *Adami R, Pagano J, Colombo M, Platonova N, Recchia D, Chiaramonte R, Bottinelli R, Cannepari M, Bottai D* (2018) Reduction of Movement in Neurological Diseases: Effects on Neural Stem Cells Characteristics. *Front Neurosci* 12: 336.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00336>
4. *Watson N, Ji X, Yasuhara T, Date I, Kaneko Y, Tajiri N, Borlongan C* (2015) No pain, No gain: Lack of exercise obstructs neurogenesis. *Cell Transplant* 24: 591–597.
<https://doi.org/10.3727/096368915X687723>
5. *Popova NK, Kulikov AV, Naumenko VS* (2020) Spaceflight and brain plasticity: Spaceflight effects on regional expression of neurotransmitter systems and neurotrophic factors encoding genes. *Neurosci Biobehav Rev* 119: 396–405.
6. *Roberts DR, Albrecht MH, Collins HR, Asemani D, Spampinato VM, Xun Zhu, Chimowitz MI, Antonucci MU* (2017) Effects of Spaceflight on Astronaut Brain Structure as Indicated on MRI. *N Engl J Med* 377: 1746–1753.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705129>
7. *Demertzi A, Van Ombergen A, Tomilovskaya E, Jeurissen B, Pechenkova E, Perri CD, Litvinova L, Amico E, Rumshiskaya A, Rukavishnikov I, Sijbers J, Sinitsyn V, Kozlovskaya I, Sunaert S, Parizel PM, Van de Heyning PH, Laureys S, Wuyts FL* (2016) Cortical reorganization in an astronaut's brain after long-duration spaceflight. *Brain Struct Funct* 221: 2873–2876.
<https://doi.org/10.1007/S00429-015-1054-3/FIGURES/1>
8. *Van Ombergen A, Demertzi A, Tomilovskaya E, Jeurissen B, Sijbers J, Kozlovskaya I, Parizel PM, Van de Heyning PH, Sunaert S, Laureys S, Wuyts FL* (2017) The effect of spaceflight and microgravity on the human brain. *J Neurol* 264: 18–22.
<https://doi.org/10.1007/S00415-017-8427-X>
9. *Koppelmans V, Bloomberg JJ, De Dios YE, Wood SJ, Reuter-Lorenz PA, Kofman IS, Riascos R, Mulavara AP, Seidler RD* (2017) Brain plasticity and sensorimotor deterioration as a function of 70 days head down tilt bed rest. *PLoS One* 12: e0182236.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0182236>
10. *Roberts DR, Zhu X, Tabesh A, Duffy EW, Ramsey DA, Brown TR* (2015) Structural Brain Changes following Long-Term 6° Head-Down Tilt Bed Rest as an Analog for Spaceflight. *Am J Neuroradiol* 36: 2048–2054.
<https://doi.org/10.3174/AJNR.A4406>
11. *Casler JG, Cook JR* (1999) Cognitive performance in space and analogous environments. *Int J Cogn Ergon* 3: 351–372.

12. Vecchio LM, Meng Y, Xhima K, Lipsman N, Hamani C, Aubert I (2018) The Neuroprotective Effects of Exercise: Maintaining a Healthy Brain Throughout Aging. *Brain Plast* 4: 17. <https://doi.org/10.3233/BPL-180069>
13. Dekeyser S, De Kock I, Nikoubashman O, Bossche SV, Eetvelde RV, De Groot J M, Wiesmann M, Deblaere K, Achten E (2017) “Unforgettable” – a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. *Insights Imaging* 8: 199. <https://doi.org/10.1007/S13244-016-0541-2>
14. Anand K, Dhikav V (2012) Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol* 15: 239–246.
15. Li K, Guo X, Jin Z, Ouyang X, Zeng Y, Jinsheng F, Wang Y, Yao L, Ma L (2015) Effect of Simulated Microgravity on Human Brain Gray Matter and White Matter – Evidence from MRI. *PLoS One* 10: e0135835. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0135835>
16. Yasuhara T, Hara K, Maki M, Matsukawa N, Fujino H, Date I, Borlongan CV (2007) Lack of exercise, via hindlimb suspension, impedes endogenous neurogenesis. *Neuroscience* 149: 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.045>
17. Nomura S, Kami K, Kawano F, Oke Y, Nakai N, Ohira T, Fujita R, Terada M, Imaizumi K, Ohira Y (2012) Effects of hindlimb unloading on neurogenesis in the hippocampus of newly weaned rats. *Neurosci Lett* 509: 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.12.022>
18. Qaisar R, Karim A, Elmoselhi AB (2020) Muscle unloading: A comparison between spaceflight and ground-based models. *Acta Physiol* 228: e13431. <https://doi.org/10.1111/apha.13431>
19. Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: Technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377.
20. Li Z, Theus MH, Wei L (2006) Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 48: 513–523. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00889.x>
21. Jansson LC, Åkerman KE (2014) The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J Neural Transm* 121: 819–836. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1174-6>
22. Schlett K (2006) Glutamate as a Modulator of Embryonic and Adult Neurogenesis. *Curr Top Med Chem* 6: 949–960. <https://doi.org/10.2174/156802606777323665>
23. Berezovskaya AS, Tyganov SA, Nikolaeva SD, Naumova AA, Merkulyeva NS, Shenkman BS, Glazova MV (2021) Dynamic Foot Stimulations During Short-Term Hindlimb Unloading Prevent Dysregulation of the Neurotransmission in the Hippocampus of Rats. *Cell Mol Neurobiol* 41: 1549–1561. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00922-2>
24. Berezovskaya AS, Tyganov SA, Nikolaeva SD, Naumova AA, Shenkman BS, Glazova MV (2021) Plantar stimulations during 3-day hindlimb unloading prevent loss of neural progenitors and maintain erk1/2 activity in the rat hippocampus. *Life* 11(5) : 449. <https://doi.org/10.3390/life11050449>
25. Charvet CJ, Finlay BL (2018) Comparing adult hippocampal neurogenesis across species: Translating time to predict the tempo in humans. *Front Neurosci* 12. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00706/FULL>
26. Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Heather A Cameron HA (2009) Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *J Neurosci* 29: 14484–14495. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009>
27. Ortega-Martínez S (2015) A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Front Mol Neurosci* 8: 46. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2015.00046/BIBTEX>
28. Bourchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioff D, Schutz G, Silva AG (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79: 59–68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90400-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90400-6)
29. Böer U, Alejel T, Beimesche S, Cierny I, Krause D, Knepel W, Flügge G (2007) CRE/CREB-Driven Up-Regulation of Gene Expression by Chronic Social Stress in CRE-Luciferase Transgenic Mice: Reversal by Antidepressant Treatment. *PLoS One* 2: e431. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000431>
30. Chen Y, Fenoglio KA, Dubé CM, Chen Y, Fenoglio KA, Dubé CM (2006) Cellular and molecular mechanisms of hippocampal activation by acute stress are age-dependent. *Mol Psychiatry* 11: 992. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4001863>

31. Bernal A, Arranz L (2018) Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* 75: 2177.
<https://doi.org/10.1007/S00018-018-2794-Z>
32. Marei HES, Ahmed AE, Michetti F, Pescatori M, Pallini R, Casalbore P, Cenciarelli C, Elhadidy M (2012) Gene Expression Profile of Adult Human Olfactory Bulb and Embryonic Neural Stem Cell Suggests Distinct Signaling Pathways and Epigenetic Control. *PLoS One* 7: e33542.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033542>
33. Pechnick RN, Zonis S, Wawrowsky K, Cosgayon R, Farrokhi C, Lacayo L, Chesnokova V (2011) Antidepressants Stimulate Hippocampal Neurogenesis by Inhibiting p21 Expression in the Subgranular Zone of the Hippocampus. *PLoS One* 6: e27290.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0027290>
34. Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16: 239–249.
<https://doi.org/10.1002/HIPO.20156>
35. Boucher P, Plusquellec P (2019) Acute Stress Assessment From Excess Cortisol Secretion: Fundamentals and Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 749.
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00749/BIBTEX>
36. Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem* 116: 1.
<https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.07080.X>

Analysis of Neurogenesis in the Hippocampus of Mice Exposed to Short-Term Hindlimb Unloading

E. A. Oleynik^a, A. A. Naumova^a, Y. S. Grigorieva^a, V. T. Bakhteeva^a, E. A. Lavrova^a,
E. V. Chernigovskaya^a, and M. V. Glazova^{a,*}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: mglazova@iephb.ru*

Long-term spaceflights and simulated microgravity negatively affect a number of cognitive functions including memory, learning, spatial orientation, and decision making. At the same time it was shown that cognitive processes are regulated by the hippocampal neurogenesis. In the present work we analyzed the effect of 3-day antiorthostatic (hindlimb) unloading on the activity of neurogenesis in the hippocampus of mice. Adult male CD1 mice were recruited in the experiments. Our results showed that 3-day unloading did not affect cell proliferation and population of immature doublecortin-positive neurons but induced the decrease in number of early nestin-positive neural progenitors. Analysis of signaling cascades involved in the regulation of the hippocampal neurogenesis showed no changes in the activity of ERK1/2, however, significant increase in expression and activity of transcriptional factor CREB was observed. In addition, mice exposed to 3-day unloading demonstrated elevated concentration of corticosterone in the blood serum and increased expression of glucocorticoid receptors in the granular cells and CA3 subfield of the hippocampus suggesting the development of stress response. Thus, stress associated with adaptation to the hindlimb unloading can be the crucial factor that mediates alterations in the hippocampal neurogenesis under short-term simulated microgravity.

Keywords: hindlimb unloading, hippocampus, neurogenesis, corticosterone, glucocorticoid receptors, CREB