

## ВНОВЬ ОБРАЗОВАННЫЕ В ЗРЕЛОМ МОЗГЕ ДОЛГОЖИВУЩИЕ НЕЙРОНЫ ВОВЛЕКАЮТСЯ В ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

© 2015 г. В. В. Шерстнев<sup>1,\*</sup>, М. А. Грудень<sup>1</sup>, О. Н. Голубева<sup>1</sup>,  
Ю. И. Александров<sup>2</sup>, О. А. Соловьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ “Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина” РАН,

<sup>2</sup>ФГБУ “Институт психологии” РАН

С помощью иммуногистохимического метода выявляли клетки, меченые BrdU (детекция вновь образованных клеток), NeuN (нейронспецифический маркер), c-Fos (маркер нейрональных пластических перестроек) и апоптотические клетки (ApoDNA) в черве мозжечка, зубчатой фасции и полях СА1–СА4 гиппокампа, моторной и ретроспленальной коре правого и левого полушария мозга у взрослых крыс. Животные обучались пространственному навыку в водном лабиринте либо подвергались “мягкому” принудительному плаванию через 6 мес. после 14-дневного внутримозгового введения BrdU. Обнаружены значимые различия в количестве и составе меченых клеток у обученных и контрольных крыс. Документирована взаимосвязь между числом новых нервных клеток и показателями формирования долговременной пространственной памяти. Полученные результаты свидетельствуют, что вновь образованные нейроны 6-месячного возраста, а также предсуществующие нервные клетки релевантных структур мозга избирательно вовлекаются в обеспечение процессов долговременной пространственной памяти.

*Ключевые слова:* постнатальный нейрогенез, долгоживущие новые нейроны, обучение, долговременная память, зрелый мозг.

DOI: 10.7868/S1027813315010082

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из ведущих направлений современных исследований роли нейрогенеза (постнатального нейрогенеза) в обеспечении когнитивных функций в норме и патологии является изучение участия и функционального значения образовавшихся в зрелом мозге нейронов различного возраста в процессах обучения и памяти [1–4]. Успешное развитие указанных исследований существенно затрудняется тем, что в настоящее время имеются лишь немногочисленные экспериментальные данные о морфофункциональных свойствах и роли вновь образованных в постнатальном онтогенезе долгоживущих нейронов, возраст которых составляет более 4–5 мес. Вместе с тем показано, что долгоживущие нервные клетки составляют значительную часть всех нейронов в мозге взрослых млекопитающих. Продолжительность жизни постнатально образованных нервных клеток сопоставима с продолжительностью жизни индивидуумов. У взрослых грызунов возраст мно-

гих новых нейронов гиппокампа и обонятельных луковиц составляет более 14–19 мес. У человека возраст вновь образованных нервных клеток коры и зубчатой фасции гиппокампа может превышать два года. С учетом постоянного нейрогенеза на протяжении жизни индивидуума возможно значительное обновление определенных популяций нейронов, в частности, нервных клеток обонятельных луковиц, дофаминэргических нейронов черной субстанции, гранулярных нейронов зубчатой фасции гиппокампа [3, 5, 6]. Следует отметить, что имеющиеся единичные экспериментальные работы о возможности участия новых долгоживущих нейронов в процессах обучения и памяти ограничиваются изучением нервных клеток зубчатой фасции гиппокампа [7, 8].

Выполненная работа направлена на исследование вовлечения вновь образованных в зрелом мозге нервных клеток 6-месячного возраста релевантных церебральных структур (различных отделов гиппокампа, черве мозжечка, моторной и ретроспленальной коре правого и левого полушария головного мозга) в процессы долговременной пространственной памяти, формирую-

\* Адресат для корреспонденции: 125009, Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 4, тел. (495) 601-2130, e-mail: sherstnev@inbox.ru.

шейся у взрослых крыс при обучении в водном лабиринте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в соответствии с принципами гуманности, изложенными в директиве Европейского сообщества (86/609 ЕС) на крысах-самцах линии Wistar изначального 12-недельного возраста, массой тела 220–250 г (питомник лабораторных животных “Столбовая” НЦБМ, РАМН). На момент выполнения поведенческих и иммуногистохимических экспериментов животные достигали 36-недельного возраста и массы тела 450–470 г. Перед началом работы крысы были на протяжении двух недель адаптированы к условиям клиники животных института. Крыс содержали по четыре особи в клетках при постоянной комнатной температуре  $+21 \pm 1^\circ\text{C}$  и 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к пище и воде. Время проведения экспериментов с 11.00 до 15.00.

Синтетический аналог тимидина 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU, Sigma, 1 мг/мл в стерильном физиологическом растворе) вводили в течение 14 дней с помощью осмотических мини-насосов (объем 200 мкл, Alzet, USA) в правый боковой желудочек мозга с скоростью 0.5 мкл/ч [9]. Мини-насосы через разрез в холке животного имплантировали подкожно и соединяли с помощью тубинга с направляющим зондом, который вживляли в мозг с помощью стереотаксиса (TSE, Germany) по координатам В – 1; L – 1.4; Н – 3.4 [10]. Через 14 дней после введения BrdU у животных в состоянии ингаляционного наркоза мини-насосы и направляющие зонды были удалены.

Спустя 6 мес. после введения BrdU животных ( $n = 8$ ) обучали в водном лабиринте навыку нахождения скрытой под водой платформы. Водный лабиринт представлял собой круглый бассейн диаметром 160 см и высотой 60 см с серой внутренней поверхностью, наполненный водой ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) до высоты 40 см. Расположение в бассейне прозрачной платформы диаметром 9 см, находившейся на 2 см ниже поверхности воды, как и обстановочных стимулов в экспериментальной камере, было постоянным. Крыс обучали в течение четырех дней с перерывом между сеансами в 24 ч. Во время сеанса животных помещали в воду с четырех разных случайно выбранных точек. После достижения животным платформы его оставляли на ней на 15 с, затем помещали в отдельную клетку на 60 с. Крыс, не нашедших платформу в течение 30–60 с, мягко направляли к ней. В каждой пробе фиксировали время, необходимое для достижения животным платформы. Крыс

группы “активный контроль” ( $n = 8$ ) подвергали принудительному плаванию в отсутствие платформы в течение четырех дней, по четыре пробы ежедневно. Протокол экспериментов был составлен таким образом, что время плавания “контрольного” животного в каждой из проб соответствовало времени, проведенному в воде обучающимся животным, т.е. каждому обучившемуся животному по времени и паттерну плавания соответствовала одна “контрольная особь”. Группы “пассивного контроля” составили крысы ( $n = 6$ ), постоянно находившиеся в домашних клетках.

Животных декапитировали через 5 мин по окончании последнего сеанса обучения или процедуры принудительного плавания. Крыс, находящихся в домашних клетках, декапитировали в тот же день, что и животных других групп. Извлеченный из черепной коробки мозг крыс замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^\circ\text{C}$ . В последующем готовили фронтальные срезы толщиной 20 мкм на криостате HR 400 (Микром, Германия). Границы анализируемых церебральных структур определяли в соответствии с атласом мозга крысы [10]: гиппокамп ( $-2.80$  mm до  $-4.30$  mm от Bregma), моторная кора ( $+2.5$  до  $+3.5$  mm от Bregma) и ретроспленальная кора мозга ( $14.0$  to до  $5.0$  mm от Bregma), червь мозжечка ( $-10.52$  mm до  $-11.6$  mm от Bregma). Общее количество срезов мозга одного животного составило: гиппокамп и ретроспленальная кора ( $n = 75$ ), моторная кора ( $n = 100$ ), червь мозжечка ( $n = 50$ ). Серийные срезы мозга фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и подвергали первичному иммунофлуоресцентному окрашиванию для выявления BrdU, далее последовательно вторичному окрашиванию на экспрессируемый ранний ген c-Fos (BrdU+/c-Fos+), маркер развивающихся и зрелых нейронов – NeuN, neuron specific nuclear protein (BrdU+/NeuN+) и (NeuN+/c-Fos+), а также на маркер апоптоза – специфические фрагменты ДНК (BrdU+/ApoDNA+), (NeuN+/ApoDNA+). Выявление BrdU проводили по методу, описанному в работе [11], используя моноклональные IgG мышей к BrdU (Sigma, USA). В качестве флуоресцентной метки для выявления BrdU-позитивных клеток использовали краситель Alexa Fluor-488, конъюгированный с козьими IgG против мыши в разведении 1 : 800. С целью определения фенотипа BrdU-позитивных клеток, проводили детекцию нейронспецифического маркера – NeuN. Для выявления NeuN-позитивных клеток в качестве первичных антител использовали моноклональные антитела мыши к NeuN, конъюгированные с биотином (US Biological, USA) в разведении 1 : 100, с последующей обработкой стрептавидином (в разведении 1 : 100) и окрашиванием срезов конъюгатом флуоресцент-

ного красителя тирамида с антителами кролика к стрептавидину (Perkin Elmer, USA). Для определения количества клеток, экспрессирующих ранний ген *c-Fos*, фиксированные срезы мозга крыс отмывали (3 раза по 5 мин) 0.1 М фосфатным буфером, pH 7.4 помещали в 2.5%-ный раствор нормальной сыворотки осла на 1М фосфатным буфером, pH 7.4 осла для блокирования неспецифического связывания на 30 мин. Затем срезы подвергали инкубации с кроличьими поликлональными антителами против *c-Fos* (Calbiochem, Ab-5, Cat. #PC38, USA), в разведении 1 : 2000 на 0.1 М фосфатным буфером, pH 7.4 в течение 18 ч, после чего их отмывали (6.5 мин) 0.3%-ным Triton X-100 на 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4. После этого срезы обрабатывали биотинилированными козьими вторичными антителами против кролика (Vector Laboratories, USA) в разведении 1 : 300 на 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4 в течение 2 ч, отмывали трижды по 5 мин и помещали в раствор, содержащий 1%-ный раствор комплекса биотина с стрептовидином (PK-6101, Vector Laboratories) на 1 ч. После (45 мин) отмывания 1 М фосфатным буфером, pH 7.4 обрабатывали раствором антител к стрептовидину с флуоресцентным красителем Alexa-350 (Perkin Elmer, USA). Для контрастирования ядер использовали смесь DAPI/Antifage Solution (Chemicon, USA). Выявление BrdU-позитивных и BrdU-негативных апоптотических клеток осуществляли с помощью коммерческих наборов ApoptTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit и ApoptTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, USA), основанных на детекции специфических фрагментов ДНК, образующихся при апоптотической гибели клеток. Визуализацию окрашенных срезов проводили на микроскопе Olympus BX51- Reflected fluorescence system (Olympus, USA) используя специализированные фильтры – U-MWU2 (Alexa Fluor-350 и DAPI), U-MNB2 (Alexa Fluor-488, Tyramide), а также компьютерную программу обработки информации Viewfinder Lite (USA). Подсчет позитивно окрашенных клеток проводили на каждом исследованном срезе при увеличении  $\times 200$ . Определяли количество клеток, меченных использованными в работе маркерами, в 1 мм<sup>2</sup> каждой из исследованных структур мозга. В качестве BrdU-позитивных клеточных элементов подсчитывали клетки с интенсивно окрашенными ядрами. При подсчете клеток с двойным окрашиванием обязательным критерием также являлось наличие отчетливо видимой границы ядра в плоскости среза.

При обработке данных использовали непараметрические критерии Манна–Уитни и Вилкоксона, а также ранговый коэффициент корреляции

Спирмена с помощью программы IBM SPSS Statistics 18.0 для Windows (IBM, USA). Статистически значимыми считали различия с уровнем  $p < 0.05$ .

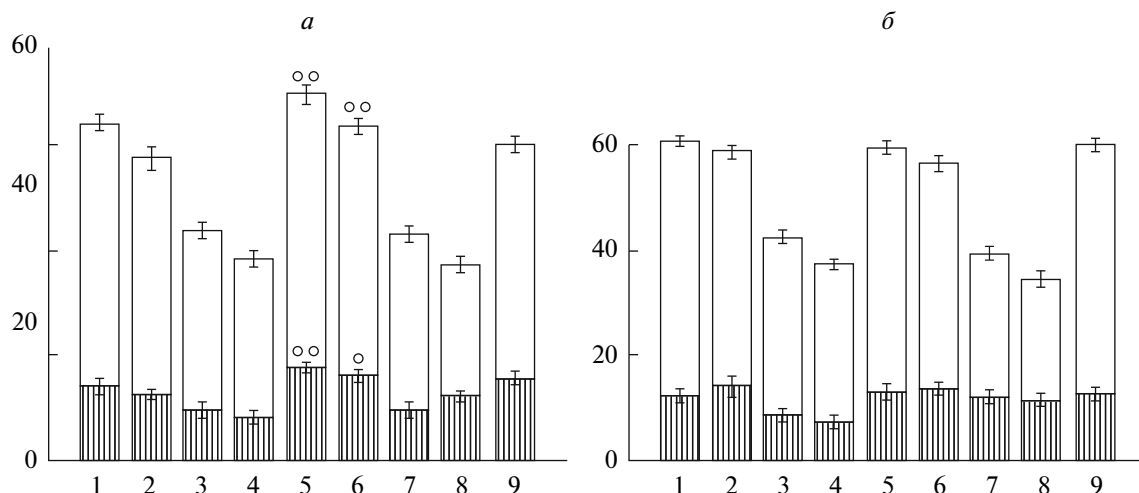
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При анализе процесса обучения обнаружено, что время достижения платформы в первых пробах – наиболее валидного показателя формирования у животных долговременной пространственной памяти, составило  $46.63 \pm 6.35$  с;  $37.5 \pm 6.55$  с;  $34.63 \pm 7.63$  с и  $20.25 \pm 6.96$  с на первый, второй, третий и четвертый день обучения соответственно. Статистически значимое снижение времени достижения скрытой платформы в первой пробе по сравнению с исходным показателем (первая проба первого сеанса) документировано на четвертый день обучения (тест Вилкоксона,  $z = -2.201$ ,  $p = 0.028$ ). Указанные показатели соответствуют результатам, полученным ранее о формировании у обучавшихся животных долговременной пространственной памяти [12].

Количественное содержание меченых маркерами клеток определяли в зубчатой фасции и полях CA1–CA4 гиппокампа левого и правого полушария мозга (ЛЗФ, ПЗФ, ЛГП, ПГП), моторной и ретроспленальной коре левого и правого полушария мозга (ЛМК, ПМК и ЛРК, ПРК соответственно), а также черве мозжечка (ЧМ) – церебральных структурах, которые непосредственно вовлекаются в формирование долговременной пространственной памяти у крыс и мышей при обучении в водном лабиринте [13].

У животных группы “пассивный контроль” в исследованных структурах головного мозга обнаружен низкий уровень, не превышающий  $5.75 \pm 0.48$  клеток/мм<sup>2</sup>, экспрессии *c-Fos*, либо его отсутствие, что согласуется с имеющими данными [13, 14]. Учитывая полученные факты, оценку числа клеток, меченых другими маркерами, у крыс указанной группы не проводили.

В группе крыс “активный контроль” количество BrdU<sup>+</sup>-клеток составило в ЛМК –  $48.13 \pm 0.72$  клеток/мм<sup>2</sup>, ЛРК –  $33.50 \pm 0.87$  клеток/мм<sup>2</sup>, ЛЗФ –  $46.25 \pm 0.9$  клеток/мм<sup>2</sup>, ЛГП –  $27.88 \pm 0.91$  клеток/мм<sup>2</sup> и ЧМ –  $47.20 \pm 0.97$  клеток/мм<sup>2</sup>. В структурах правого полушария мозга –  $44.38 \pm 0.94$  клеток/мм<sup>2</sup>,  $30.0 \pm 0.71$  клеток/мм<sup>2</sup>,  $42.75 \pm 1.06$  клеток/мм<sup>2</sup>,  $23.13 \pm 1.19$  клеток/мм<sup>2</sup>, соответственно. Содержание клеток, меченых BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> в исследованных церебральных структурах, в 2.5–3.5 раза ниже числа BrdU-позитивных (BrdU<sup>+</sup>) клеток: в ЛМК –  $12.38 \pm 0.84$  клеток/мм<sup>2</sup>; ПМК –  $14.13 \pm 1.78$  клеток/мм<sup>2</sup>; ЛРК –  $8.75 \pm$



**Рис. 1.** Количественное содержание BrdU-положительных клеток (BrdU<sup>+</sup>) и BrdU-положительных клеток меченых нейрон-специфическим маркером NeuN (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>) в релевантных структурах мозга обученных крыс (*а*) и животных группы “активный контроль” (*б*).

По оси абсцисс — структуры головного мозга: 1 — левая моторная кора; 2 — правая моторная кора; 3 — левая ретроспленниальная кора; 4 — правая ретроспленниальная кора; 5 — зубчатая фасция левого гиппокампа; 6 — зубчатая фасция правого гиппокампа; 7 — поля СА1–СА4 левого гиппокампа; 8 — поля СА1–СА4 правого гиппокампа; 9 — червь мозжечка. По оси ординат — количество меченых клеток в 1 мм<sup>2</sup> ткани. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

Графическое обозначение: столбцы без заливки — BrdU<sup>+</sup>-клетки; столбцы с вертикальной штриховкой — BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>-клетки. ○○ —  $p \leq 0.01$ ; ○ —  $p \leq 0.05$ ; по сравнению с соответствующими показателями у животных группы “активный контроль”

± 0.94 клеток/мм<sup>2</sup>; ПРК — 7.38 ± 0.94 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛЗФ — 13.00 ± 1.07 клеток/мм<sup>2</sup>; ПЗФ — 13.63 ± 0.92 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛГП — 11.88 ± 0.91 клеток/мм<sup>2</sup> и ПГП — 11.5 ± 0.87 клеток/мм<sup>2</sup>. Этот показатель в ЧМ составил 12.80 ± 0.86 клеток/мм<sup>2</sup>.

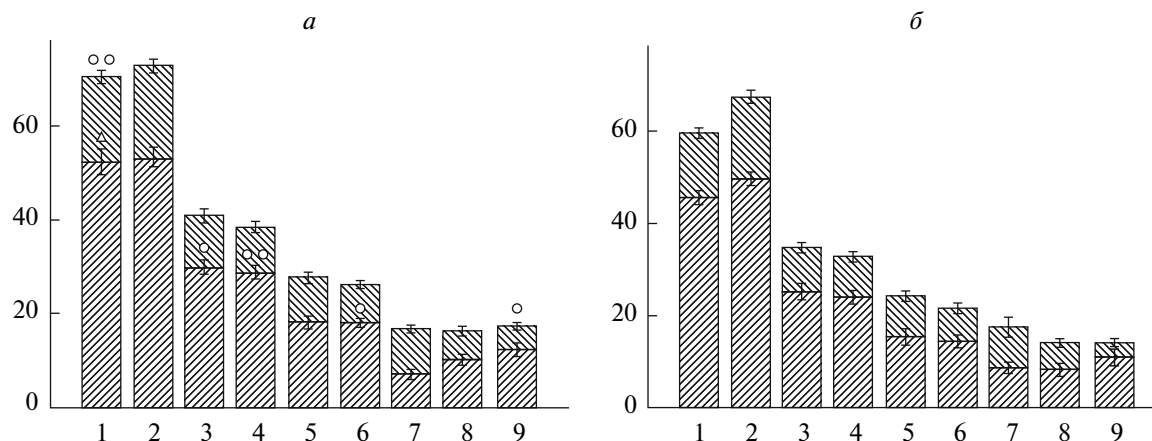
Вновь образованные BrdU-положительные клетки, экспрессирующие *c-Fos* (BrdU<sup>+</sup>/*c-Fos*<sup>+</sup>) в изученных структурах левого полушария мозга выявлены в следующих количествах: ЛМК — 13.38 ± 0.78 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛРК — 9.38 ± 0.80 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛЗФ — 8.50 ± 0.80 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛГП — 8.25 ± 1.76 клеток/мм<sup>2</sup>. В соответствующих структурах правого полушария мозга число указанных клеток составило 17.38 ± 1.02 клеток/мм<sup>2</sup>; 8.25 ± 0.75 клеток/мм<sup>2</sup>; 7.38 ± 0.65 клеток/мм<sup>2</sup>; 5.50 ± 0.38 клеток/мм<sup>2</sup>; а в ЧМ — 3.6 ± 0.51 клеток/мм<sup>2</sup>.

Структурное распределение NeuN-положительных клеток, экспрессирующих *c-Fos*<sup>+</sup> (NeuN<sup>+</sup>/*c-Fos*<sup>+</sup>) соответствовало таковому для BrdU<sup>+</sup>/*c-Fos*<sup>+</sup>-клеток, но при значительно меньшем (2–3 раза) числе последних. Так, в ЛМК — 45.75 ± 1.40 клеток/мм<sup>2</sup> и ПМК — 50.13 ± 1.04 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛРК — 25.25 ± 1.3 клеток/мм<sup>2</sup> и ПРК — 24.25 ± 1.03 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛЗФ — 15.25 ± 1.29 клеток/мм<sup>2</sup> и ПЗФ — 14.25 ± 0.96 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛГП — 0.25 ± 0.86 кле-

ток/мм<sup>2</sup> и ПГП — 8.38 ± 0.89 клеток/мм<sup>2</sup>. В ЧМ количество меченых NeuN<sup>+</sup>/*c-Fos*<sup>+</sup>-клеток составило 10.60 ± 1.25 клеток/мм<sup>2</sup> (рис. 1б, 2б).

Количественное содержание Apo DNA<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> и Apo DNA<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>-клеток во всех исследованных структурах значимо не различалось, составляя для Apo/DNA<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>: в левом полушарии мозга ЛМК — 31.63 ± 0.86 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛРК — 25.38 ± 0.91 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛЗФ — 21.88 ± 0.97 клеток/мм<sup>2</sup>; ЛГП — 13.63 ± 1.15 клеток/мм<sup>2</sup>; ЧМ — 5.20 ± 0.58 клеток/мм<sup>2</sup>. В правом полушарии мозга клеток, меченых Apo DNA<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>, обнаружено 34.0 ± 0.91; 21.00 ± 1.94; 21.38 ± 0.75; 13.38 ± 1.03 клеток/мм<sup>2</sup> соответственно.

У обученных животных по сравнению с крысами группы “пассивный контроль” достоверно увеличено количество BrdU<sup>+</sup>-клеток в ЛЗФ ( $p = 0.007$ ) и ПЗФ ( $p = 0.001$ ). При этом, как в ЛЗФ, так и в ПЗФ увеличено число ( $p = 0.003$  и  $p = 0.05$ ) BrdU- и NeuN-положительных клеток (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>), экспрессирующих *c-Fos*. Количество BrdU<sup>+</sup>/*c-Fos*<sup>+</sup>-клеток в ЛМК и ЧМ обученных животных значимо превышало содержание этих клеток в указанных структурах головного мозга у контрольных крыс ( $p = 0.007$  и  $p = 0.032$ ). Значитель-



**Рис. 2.** Количественное содержание BrdU-позитивных клеток (BrdU<sup>+</sup>) экспрессирующих c-Fos (BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup>) и NeuN-позитивных клеток экспрессирующих c-Fos (NeuN<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup>) в релевантных структурах мозга обученных крыс (а) и животных группы “активный контроль” (б).

По оси абсцисс – структуры головного мозга: 1 – левая моторная кора; 2 – правая моторная кора; 3 – левая ретроспленниальная кора; 4 – правая ретроспленниальная кора; 5 – зубчатая фасция левого гиппокампа; 6 – зубчатая фасция правого гиппокампа; 7 – поля СА1–СА4 левого гиппокампа; 8 – поля СА1–СА4 правого гиппокампа; 9 – червь мозжечка. По оси ординат – количество меченых клеток в 1 мм<sup>2</sup> ткани. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

Графическое обозначение: столбцы с правой диагональной штриховкой – BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup>-клетки; столбцы с левой диагональной штриховкой – NeuN<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup>-клетки. ○○ –  $p \leq 0.01$ ; ◐ –  $p \leq 0.05$ ; △ –  $p \leq 0.056$  по сравнению с соответствующими показателями у животных группы “активный контроль”.

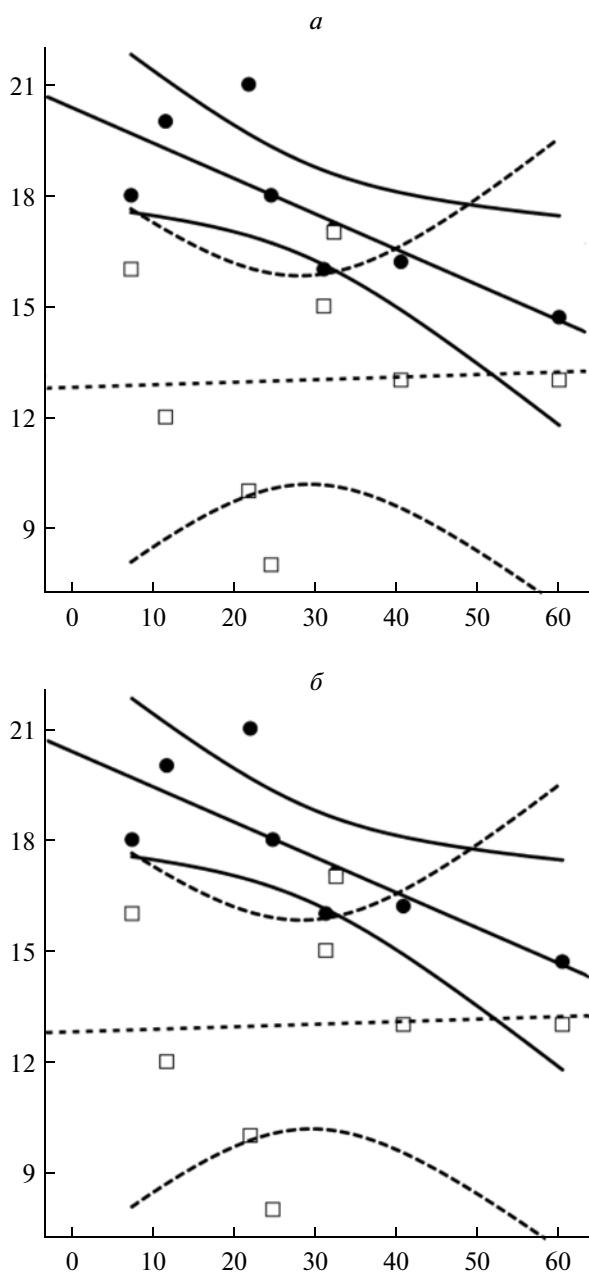
ное превышение числа клеток, которые экспрессируют нейрональный маркер NeuN, а также c-Fos (NeuN<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup>) отмечено в ЛФК ( $p = 0.028$ ), ПРК ( $p = 0.007$ ) и ПЗФ ( $p = 0.015$ ) при наличии выраженной тенденции в ЛМК у обученных крыс по сравнению с группой “активный контроль” (рис. 1а и 2а). Достоверное возрастание численности апоптотических клеток, меченных BrdU (Apo/DNA<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>,  $p = 0.032$ ), и, вместе с тем, снижение Apo/DNA<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>-клеток документировано в ЧМ животных из группы “обучение”. Других значимых межгрупповых различий в количественном содержании меченых клеток не выявлено.

Анализ показал, что при сравнении парных коэффициентов корреляции количества меченых клеток с показателями плавания и времени достижения животными платформы у контрольных и обученных крыс статистически значимо различались пары коэффициентов корреляции числа BrdU-положительных клеток, меченых NeuN (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>), в ЛЗФ с временем достижения платформы на 3-й и 4-й дни эксперимента. У крыс группы “активный контроль” количество BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> в ЛЗФ недостоверно коррелировало в 1-й (тест ранговой корреляции Спирмена  $r = -0.55$ , 2-сторонний уровень  $p = 0.157$ ), 3-й ( $p = 0.156$ ,  $p = 0.713$ ) и 4-й ( $p = 0.132$ ,  $p = 0.756$ )

дни. В то время как у обученных животных эти показатели в 1-й день незначительно положительно коррелировали между собой ( $r = 0.551$ ,  $p = 0.157$ ), а на 3-й и 4-й дни документированы значимые отрицательные связи ( $r = -0.765$ ,  $p = 0.027$ ) и ( $r = -0.853$ ,  $p = 0.007$ ) (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные эксперименты выявили, что в ЗФ левого и правого полушария мозга обученных крыс по сравнению с животными группы “активный контроль” значимо увеличено как число BrdU-позитивных клеток (BrdU<sup>+</sup>), так и количество вновь образованных клеток, меченных нейрон-специфическим маркером NeuN (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>), т.е. новых нейронов 6-месячного возраста. Вместе с тем, документирована достоверная отрицательная взаимосвязь между количеством новых 6-месячных нейронов в ЛЗФ там, где отмечено значительное возрастание числа вновь образованных долгоживущих нервных клеток, и показателями времени достижения платформы на 3-й и 4-й дни обучения, т.е. в период упрочения формируемой у крыс долговременной пространственной памяти. Этот факт указывает, что большее количество новых нейронов в зубчатой фасции гиппокампа способствует более успешному обучению и фор-



**Рис. 3.** Диаграмма рассеяния. Данная диаграмма отражает связь количества 6-месячных новых нейронов ( $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ ) в зубчатой фасции левого гиппокампа со временем достижения платформы либо плавания в бассейне на 3-й и 4-й дни у обученных крыс и животных из группы “активный контроль”.

По оси абсцисс — среднее время (секунды) достижения платформы либо плавания в бассейне на 3-й (а) и 4-й (б) дни. По оси ординат — количество меченых клеток в  $1 \text{ мм}^2$  ткани. Графические обозначения: ● — обученные крысы; □ — контрольные крысы. Аппроксимация линейной связи между показателями представлена отдельно для каждой группы животных: — — обученные животные; --- — активный контроль.

У обученных крыс количество новых нейронов статистически значимо отрицательно связано с временем достижения платформы на 3-й (коэффициент детерминации  $R^2 \leq 0.585$ ;  $p = 0.027$ ), на 4-й день ( $R^2 \leq 0.728$ ;  $p = 0.007$ ) обучения.

мированию долговременной пространственной памяти. Полученные данные подтверждают имеющие сведения о положительной связи выраженности гиппокампального неонейрогенеза и когнитивных функций у животных и человека [6, 15, 16]. Кроме того, указанные данные согласуются с наблюдениями о выраженном увеличении количества вновь образованных в зрелом мозге 4-месячных нервных клеток гиппокампа и морфофункциональных перестройках их “дендритного дерева” после обучения взрослых крыс в водном лабиринте Морриса [17, 18]. Таким образом, выявленные экспериментальные факты демонстрируют активную пластичность и способность вновь образованных долгоживущих нейронов ЗФ включаться в новые нейрональные сети.

В данной работе отмечено достоверное возрастание количества вновь образованных клеток, экспрессирующих *c-Fos* в ЛМК у обученных крыс по сравнению с “активным контролем”. Экспрессию раннего гена *c-Fos* считают достаточно надежным маркером пластических перестроек вновь образованных нейронов при обучении и формировании долговременной памяти, поскольку подавляющее число (более 90%) инициированных обучением клеток, экспрессирующих *c-Fos*, составляют нервные клетки [13, 14]. Эти данные позволяют полагать, что 6-месячные новые нейроны, локализованные в ЛМК, вовлекаются в обеспечение процессов долговременной пространственной памяти у взрослых крыс. Согласно результатам, представленным Samson H., Dager A., 2008, указанные вновь образованные нервные клетки коры мозга, по-видимому, являются ГАМКергическими интернейронами [19].

В черве мозжечка обученных крыс обнаружено достоверно большее число новых клеток, подвергнутых пластическим перестройкам ( $\text{BrdU}^+/\text{c-Fos}^+$ ), чем у животных группы “активный контроль”. При этом в ЧМ значимо снижено количество вновь образованных 6-месячных нейронов погибших путем апоптоза ( $\text{Apo}/\text{DNA}^+/\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ ). С учетом полученных ранее данных об участии процессов неонейрогенеза и нейроапоптоза, протекающих в ЧМ зрелого мозга крыс, в механизмах обучения и памяти [12], документированные факты могут рассматриваться как свидетельство вовлеченности новых долгоживущих нервных клеток ЧМ в нейрональное обеспечение долговременной пространственной памяти, сформировавшейся в условиях модели водного лабиринта.

Интересно, что математическая модель, разработанная на основе конкретных эксперименталь-

ных данных, предполагает возможность интеграции в новые нейрональные сети мозга взрослых крыс постнатально образованных нервных клеток гиппокампа, возраст которых не превышает 10 месяцев (301 день) [20].

Вместе с тем, в данной работе выявлены факты об интеграции предсуществующих нервных клеток исследованных отделов мозга в нейрональное обеспечение процессов долговременной пространственной памяти. Обнаружено, что количество клеток, меченых нейронспецифическим маркером и подвергнувшихся пластическим перестройкам, т.е. экспрессирующих *c-Fos* ( $\text{NeuN}^+/\text{c-Fos}^+$ ), значимо увеличено в ЛРК и ПРК, ПЗФ, а также ЛМК у обученных крыс по сравнению с “активным контролем”. В ряде работ также показано участие пренатально образованных клеток гиппокампа в процессах пространственной памяти, оцененное по индуцированной обучением экспрессии ранних генов. Авторы полагают, что для обеспечения механизмов гиппокампзависимой памяти необходима “функциональная конвергенция” пренатально и постнатально образовавшихся разновозрастных гранулярных нейронов ЗФ [14, 20]. Высказанное положение созвучно нашим представлениям о роли неонейрогенеза и нейроапоптоза в обеспечении процессов обучения и памяти [21, 22].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в процессы долговременной пространственной памяти, сформированной у взрослых крыс при обучении в водном лабиринте, вовлекаются вновь образованные 6-месячные нейроны зубчатой фасции гиппокампа левого и правого полушария мозга, моторной коры левого полушария мозга и червя мозжечка, а также предшествующие нервным клеткам левой и правой ретроспленальной коры и зубчатой фасции правого гиппокампа. Результаты выполненной работы позволяют полагать, что образованные в зрелом мозге долгоживущие нервны клетки и старые нейроны релевантных церебральных структур избирательно интегрируются в нейрональное обеспечение процессов долговременной пространственной памяти.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 12-06-00077.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гомазков О.А.* // Нейрогенез как адаптивная функция мозга. М.: ИКАР, 2013. 136 с.
2. *Koehl M., Abrous D.N.* // Eur. J. Neurosci. 2011. V. 33. P. 1101–1114.
3. *Shyder J.S., Cameron H.A.* // Behav. Brain Res. 2012. V. 227. P. 384–390.
4. *Zhao C., Deng W., Gage F.H.* // Cell. 2008. V. 132. P. 645–660.
5. *Gould E., Gross C.G.* // J. Neurosci. 2002. V. 22. P. 619–623.
6. *Kim W.R., Christian K., Ming G.-L., Song H.* // Behav. Brain Res. 2012. V. 227. P. 470–479.
7. *Chae C.-H., Lee H.-C., Jung S.-L., Kim T.-W., Kim N.-S., Kim H.-T.* // Neuroscience. 2012. V. 212. P. 30–37.
8. *Ramirez-Amaya V., Marrone D.F., Gage F.H., Warley P.H., Barnes C.A.* // J. Neurosci. 2006. V. 26. P. 237–241.
9. *Zhao M., Momma S., Delfani K., Carlen M., Cassidy R.M., Johanson C.D., Brismar H., Shupliakov O., Frisen J., Janson A.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 1925–1930.
10. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates // Oxford: Acad. Press, 1998. 474 p.
11. *Kempermann G.* // Adult neurogenesis, Stem Cells and Neuronal Development in Brain. Oxford: University Press, 2005. 546 p.
12. *Шерстнев В.В., Юрасов В.В., Сторожева З.И., Грудень М.А., Прошин А.Т.* // Нейрохимия. 2010. Т. 27. С. 130–127.
13. *Herdegen T., Leah J.D.* // Brain Res. Rew. 1998. № 28. P. 370–490.
14. *Stone S.S.D., Teixeira C.M., Zaslavsky R., Wheeler A.L., Martinez-Canabal A., Wang A.H., Sakaguchi M., Lozano A.M., Frankland P.W.* // Hippocampus. 2011. V. 21. P. 1348–1362.
15. *Coras R., Siebzehnrbil F.A., Pouli E. et al.* // Brain. 2010. V. 133. P. 3359–3372.
16. *Leuner D., Gould E., Shors T.J.* // Hippocampus. 2006. V. 16. P. 216–224.
17. *Lemaire V., Tronel S., Montaron M., Fabre F., Dugast E., Abrous D.N.* // J. Neurosci. 2012. V. 32. P. 3101–3108.
18. *Marrone D.F., Ramires-Amaya V., Barnes C.* // Hippocampus. 2012. V. 22. P. 1134–1142.
19. *Cameron H.A., Dayer A.G.* // Biol. Psychiatry. 2008. V. 63. P. 650–655.
20. *Sandoval C.J., Martinez-Claros M., Bello-Medina O., Perez O., Ramirez-Amaya V.* // PLoS One. 2011. V. 6. P. e17689.
21. *Шерстнев В.В.* // Тез. докл. межд. конф. “Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и пластических состояний мозга”. СПб. 2008. 161 с.
22. *Александров Ю.И.* // Журн. высш. нервн. деятельности им. И.П. Павлова. 2005. Т. 55. С. 842–860.

Поступила в редакцию  
18.08.2014 г.

## Long-Lived Newly Formed Neurons in the Mature Brain Are Involved in the Support of Learning and Memory Processes

V. V. Sherstnev<sup>a</sup>, M. A. Gruden<sup>a</sup>, O. N. Golubeva<sup>a</sup>, Yu. I. Aleksandrov<sup>b</sup>, O. A. Solov'eva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*

<sup>b</sup>*Institute of Psychology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Using immunohistochemistry, we stained cells with BrdU (for detection of newly formed cells), NeuN (a neuronal specific marker), c-Fos (a marker of neuronal plasticity), and ApoDNA (marker of apoptotic cells) in the cerebellar vermis, dentate gyrus and CA1–CA4 fields of the hippocampus, motor, and retrosplenial cortex of the right and left brain hemispheres in adult rats. Animals were trained in spatial skills in the Morris water maze or were subjected to a soft forced-swimming test 6 months after a 14-day intracerebral administration of BrdU. Significant differences in the amount and composition of the labeled cells in the trained and control rats were found. The relationship between the number of new neural cells and the parameters of the formation of long-term spatial memory was determined. The results indicate that the newly formed neurons with an age of 6 months, as well as the neural cell precursors of the relevant brain structures, are selectively involved in the support of long-term spatial memory.

*Keywords: postnatal neurogenesis, long-living newly formed neurons, learning, long-term memory, mature brain*