
МЕТОДИКА

УДК 612.822

ХРОНИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МОРФОЛОГИИ ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКОВ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ГИБРИДНОЙ ЛИНИИ 5XFAD-М, ЯВЛЯЮЩИХСЯ МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2024 г. А. Е. Матухно^{1, *}, П. В. Ткачева¹, В. Б. Войнов¹, Л. В. Лысенко²,
Е. В. Евсюкова¹, А. О. Тайсаева¹, И. Б. Безпрозванный^{1, 3}

¹Научно-исследовательский технологический центр нейротехнологий Южного федерального университета,
Ростов-на-Дону, Россия

²Физический факультет Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

³Лаборатория молекулярной нейродегенерации,

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: aematuhno@sedu.ru

Поступила в редакцию 11.03.2024 г.

После доработки 25.07.2024 г.

Принята к публикации 09.09.2024 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) является хроническим нейродегенеративным заболеванием с поражением нейронных структур в разных областях головного мозга, включая утрату синапсов. Причины деструктивных изменений и гибели нейронов изучены недостаточно. Механизмы утраты синапсов неопределенны. При развитии БА происходят структурные и функциональные изменения в синапсах, которые взаимосвязаны с морфологией постсинаптических образований – дендритных шипиков. В работе описана технология хронической визуализации дендритных шипиков у трансгенных животных с помощью методов мультифотонной флуоресцентной микроскопии. Были использованы гибридные животные (5xFAD-М) с экспрессией зеленого флуоресцентного белка и моделью БА. Приведенные в работе методические решения позволили выявить многодневную динамику плотности дендритных шипиков, а также отследить преобразование их морфологических типов в течение длительного периода наблюдений.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, дендритные шипики, 5xFAD-М, хроническая визуализация, мультифотонная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0044467724060084

Болезнь Альцгеймера (БА) – это прогрессирующее в течение многих лет нейродегенеративное заболевание головного мозга, которое сопровождается развитием слабоумия (деменции) на фоне деструктивных изменений мозга (Soria Lopez et al., 2019). Семейная форма БА с ранним началом (~5% всех случаев заболевания, развивается от 40 до 65 лет) характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования мутаций в генах: *APP*, *PSEN1* и *PSEN2* (Leger, Massoud, 2013; Стефанова, Колесова, 2016). Сporадическая форма БА (~95% случаев заболевания, развивается после 65 лет) является результатом синергетического действия генетических факторов и факторов риска, одним из которых является возраст (Татарникова и др., 2015; Shao et al., 2017).

Современные методы лечения направлены на облегчение симптомов и не обеспечивают

купирование или замедление патогенеза болезни, включая дальнейшую потерю нейронов (Литвиненко и др., 2019; Bezprozvanny, 2022; Dahl et al., 2023). Исходя из существующих гипотез о механизмах развития БА, обсуждаются вопросы новых мультимодальных стратегий терапии (Bezprozvanny, Mattson, 2008; Bezprozvanny, 2009; Leger, Massoud, 2013; Татарникова и др., 2015; Левин, Васенина, 2016; Selkoe, Hardy, 2016; Holtzman et al., 2016; Cline et al., 2018; Walker, 2018; Литвиненко и др., 2019; Soria Lopez et al., 2019; Bezprozvanny, 2022; Olfati et al., 2022; Dahl et al., 2023). Высказываются предположения о том, что центральным фактором патогенеза БА может быть потеря синаптической пластичности и самих синапсов, однако причины утраты синаптических структур остаются неопределенными (Spires et al., 2005; Nelson et al., 2012;

Boros et al., 2017; Cline et al., 2018; Subramanian et al., 2020; Meftah, Gan, 2023).

Морфология дендритных шипиков играет важную роль в регуляции синаптической функции и взаимосвязана с механизмами синаптической пластичности, обуславливающими процессы обучения и памяти (Yuste et al., 2000; Попов и др. 2003; Tan, Waxman, 2015). В научном сообществе активно проводятся исследования дендритных шипиков с помощью разных средств микроскопии: на фиксированных срезах мозга с различным уровнем пространственного разрешения, от световой (включая широкопольную флуоресцентную), конфокальной лазерной сканирующей и заканчивая ультраструктурными исследованиями с использованием электронной микроскопии (Попов и др., 2003; Schooten et al., 2014). При появлении средств мультифотонной микроскопии появилась возможность исследований на живом организме (*in vivo*) в сильно рассеивающей ткани головного мозга на значительной (несколько сотен микрометров) глубине. Для мультифотонной визуализации используются животные с экспрессированными флуоресцентными белками в нейронах с помощью вирусной трансдукции генов с возможностью регистрации кальциевых сигналов (Lowery et al., 2009; Mittmann et al., 2011; Son et al., 2024) или генетическими манипуляциями у трансгенных животных (Holtmaat et al., 2005; Shao et al., 2021).

Многочисленные модели болезни Альцгеймера, реализованные с помощью трансгенных животных, играют ключевую роль в исследованиях механизмов развития заболевания и в поиске эффективных средств терапии. В литературных источниках приводятся исследования морфологии дендритных шипиков на модели 5xFAD методами конфокальной микроскопии на фиксированных срезах мозга (Ilina, Linkova, 2023). Прижизненных исследований динамики образования/утраты дендритных шипиков на 5xFAD-модели БА у трансгенных животных с экспрессией флуоресцентных белков в нейронах мозга мы в литературе на момент написания статьи не нашли.

Целью своей работы мы определили выявление многодневной динамики плотности дендритных шипиков и преобразования их морфологических типов на животной модели БА с помощью средств мультифотонной микроскопии.

Достижение поставленной цели потребовало реализации задач: (1) выведение гибридов трансгенных животных 5xFAD-М, у которых экспрессированы флуоресцентные белки (линия M-Line) и имеются мутации трансгенов, характерных для БА, на примере мышевой модели 5xFAD, что позволяет выполнить прижизненную визуализацию морфологии синаптических образований (дендритных шипиков) без травматической инъекции вирусов в мозг для флуоресцентного маркирования

нейронов; (2) разработка технологии хронической визуализации нейронных структур мозга с помощью средств мультифотонной флуоресцентной микроскопии. Такие технологии могут быть использованы для исследований патогенеза нейродегенеративных заболеваний и аprobации перспективных средств терапии.

Описанная в данной работе технология много-дневной хронической визуализации нейронных структур мозга позволила выявить динамику процессов образования/утраты дендритных шипиков, преобразование их морфологических типов у здоровых мышей с экспрессией GFP и у животных 5xFAD-М.

МЕТОДИКА

Животные. Мыши линии M-Line (Tg (Thy1-EGFP) MJrs/J, C57BL/6J background, Stock No: 007788) и линии 5xFAD (B6SJL-Tg (APPSwF1L, PSEN1 * M146L * L286V) 6799Vas/Mmjjax, Stock No:34840-JAX) были разработаны в Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) и переданы в НИТЦ нейротехнологий ЮФУ из Лаборатории молекулярной нейродегенерации СПбПУ им. Петра Великого. Животных содержали в условиях 12/12-часового цикла «свет/темнота» при постоянной температуре ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Животные имели свободный доступ к пище (полнорационный экспрудированный комбикорм) и очищенной воде.

Получение гибридов. Выведение гибридов 5xFAD-М продиктовано необходимостью получения мышей, у которых экспрессированы флуоресцентные белки (GFP), что позволяет выполнить прижизненную визуализацию морфологии синаптических образований на моделях БА без окрашивания тканей мозга или инъекции аденоассоциированных вирусов.

Получение гибридной линии 5xFAD-М осуществляли по аналогии с (Ilina, Linkova, 2023). Для этого скрещивали гемизиготную самку линии M-Line и гемизиготного самца линии 5xFAD. В первом поколении полученного потомства (F1 на рис. 1 (а)) животные имели разные трансгены: с тремя трансгенами APP, PSEN1 и Thy1-EGFP (5xFAD-М), только с трансгеном Thy1-EGFP (M-Line), только с трансгенами APP, PSEN1 (5xFAD) и дикий тип (WT). Из полученного потомства гемизиготную самку линии M-Line скрещивали с гибридным самцом 5xFAD-М. Потомство второго поколения (F2) включало трансгены APP, PSEN1 и Thy1-EGFP (5xFAD-М) и Thy1-EGFP (M-Line). Мыши M-Line и 5xFAD-М второго поколения (две группы) были использованы для хронического анализа морфологии синаптических образований.

Мы не скрещивали между собой гибридов 5xFAD-М, так как линия 5xFAD при своих мутациях

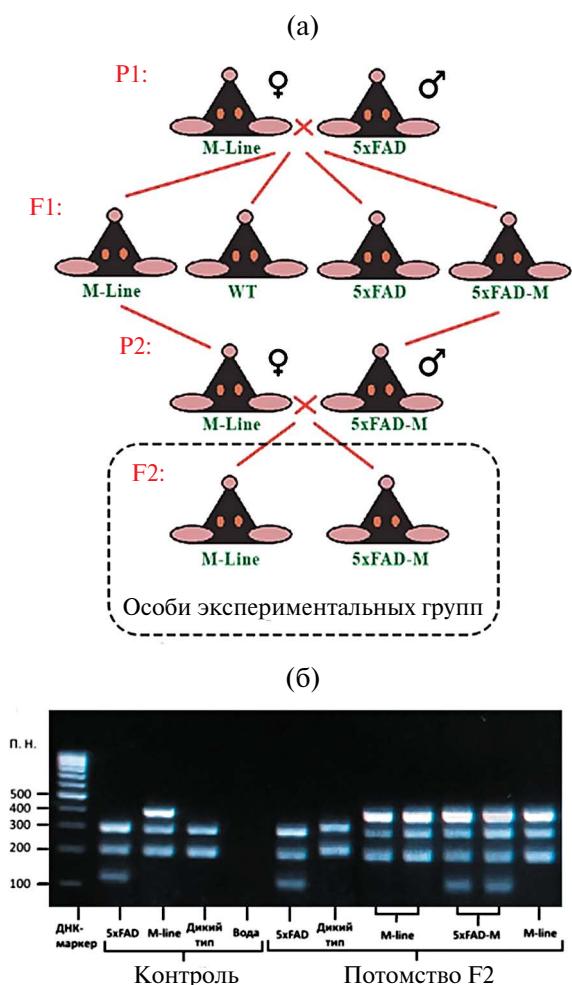


Рис. 1. Выведение трансгенных мышей линии M-Line и 5xFAD-M. (а) – схема выведения. (б) – результаты ПЦР-анализа потомства при скрещивании мышей двух линий.

Fig. 1. Breeding of M-Line and 5xFAD-M transgenic mice. (a) scheme. (b) – the results of PCR analysis of offspring.

склонна к возрастной потере слуха, дегенерации сетчатки и другим генетическим заболеваниям, которые мы старались минимизировать.

Генотипирование мышей. Генотипирование мышей осуществляли стандартными процедурами ПЦР-анализа с помощью детекции продуктов амплификации гель-электрофорограммой. Для генотипирования отбирали молодых мышей в возрасте от 10 дней до трех недель. Выделение генома ДНК проводили из кончика хвоста. Для определения трансгенов использовали праймеры: для Thy1-EGFP (прямой тип – ACA GAC ACA CAC CCA GGA CA, обратный – CGG TGG TGC AGA TGA ACT T); для 5xFAD-трансгенов (общий – ACC CCC ATG TCA GAG TTC CT, обратный – CGG

GCC TCT TCG CTA TTA C); внутренний положительный контроль (прямой – CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT, обратный – GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C); дикий тип (обратный – TAT ACA ACC TTG GGG GAT GG).

В результате ПЦР-анализа потомства при скрещивании двух линий мышей было установлено, что удалось успешно получить мышей-гибридов 5xFAD-M (рис. 1 (б)). У мышей гибридной линии 5xFAD-M определяли 4 типа фрагментов ДНК: 1) фрагмент ДНК длиной 129 пар нуклеотидов (п. н.) – трансгенность 5xFAD; 2) фрагмент ДНК длиной 216 п. н. – образец дикого типа 5xFAD; 3) фрагмент ДНК длиной 415 п. н. – трансгенность Thy1-GFP-M; 4) фрагмент ДНК длиной 324 п. н. – образец дикого типа Thy1-GFP-M.

Анализ фиксированных (10%-й формалин с помощью интракардиальной перфузии) неокрашенных срезов мозга генотипированных 5xFAD-M-мышей с использованием мультифотонной микроскопии подтвердил формирование амилоидных бляшек в коре и гиппокампе в возрасте 4.5 месяцев и более, что является ключевой гистопатологической особенностью БА. На рис. 2 (б) наличие амилоидных бляшек у животного 5xFAD-M (самец, возраст 11 месяцев) обозначено красными стрелками и окружностями в области глубоких слоев коры (Кор) и гиппокампа (Гп). Формирование амилоидных бляшек в коре и гиппокампе в указанном возрасте согласуется с данными Oblak и соавт. (Oblak et al., 2021) и Bader и соавт. (Bader et al., 2023), полученными на животных линии 5xFAD. У мышей линии M-Line подобных аномалий не обнаружено (рис. 2 (а)).

Наркоз и хирургические процедуры. Для хронической визуализации морфологических структур мозга были использованы взрослые самцы возрастом 6 месяцев весом от 25 до 35 г. Операцию с имплантацией оптически прозрачного краиального окна проводили под газовым наркозом (изофлуран 1.5–2%). Местная анестезия – лидокаин подкожно (0.1 мл). Во время операции температуру тела поддерживали в пределах 37.0 ± 0.5 °C. Проведение хирургической операции осуществляли с помощью стереомикроскопа Leica M50 (увеличение до 40Х). Координаты краиального отверстия диаметром 3 мм над соматосенсорной областью коры определяли с помощью окуляр-микрометра с центром 1.1 мм каудально от брегмы и 2.5 мм латерально от сагиттального шва. Трепанационное отверстие закрывали с помощью покровного стекла толщиной 0.17 мм (Gerhard Menzel), закрепляя его стоматологическим светоотверждаемым полимером. Для фиксации животного под объективом лазерного сканирующего микроскопа на голове закрепляли головодержатель в виде прямоугольной стальной пластины с отверстием для оптически прозрачного краиального окна.

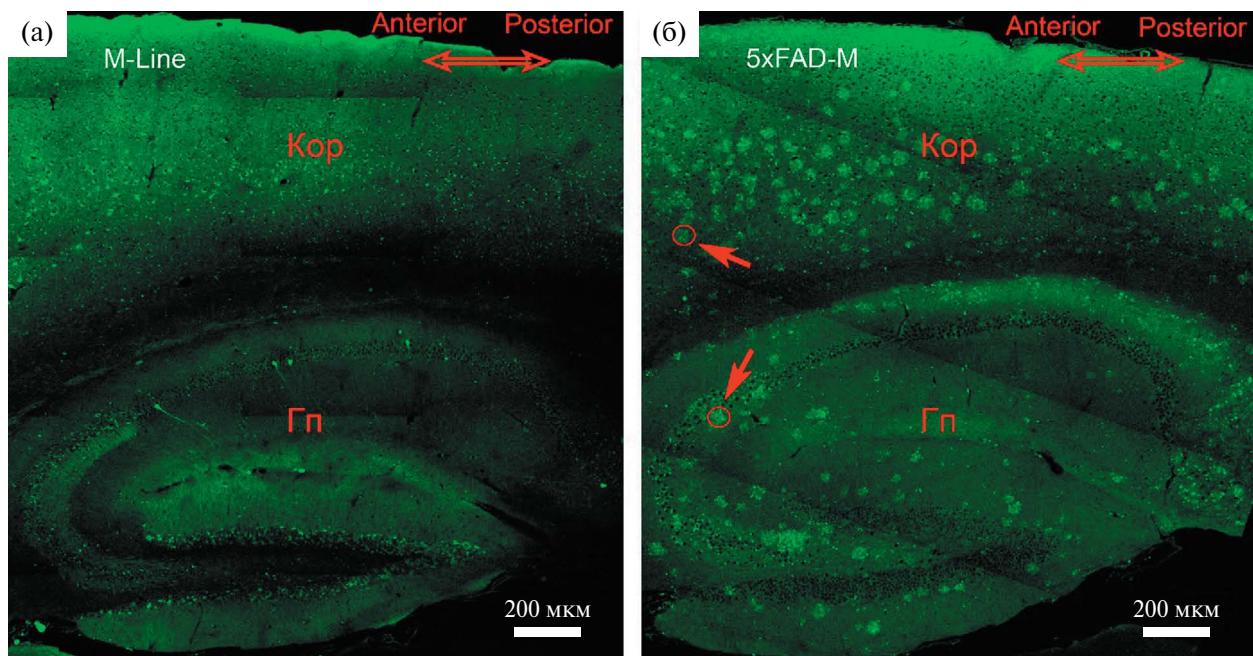


Рис. 2. «Сшитые» изображения фиксированных неокрашенных срезов мозга (сагиттальная плоскость сечения) генотипированных мышей линии M-Line (а) и 5xFAD-M (б), полученные с высоким разрешением (0.59 x 0.59 мкм/пиксель) при последовательном сканировании на большой площади в мультифотонном режиме. Антериорное и постериорное направления указаны соответствующими стрелками и подписями (Anterior, Posterior). Область коры мозга обозначена надписью «Кор», гиппокампа – «Гп». На рисунке (б) отдельные амилоидные бляшки обозначены красными стрелками, диаметр окружности составляет ≈ 35 мкм.

Fig. 2. “Stitched” images of formalin-fixed unpainted brain slices (sagittal cross-section) of genotyped mice: M-Line – (a) and 5xFAD-M – (b). Images were obtained by sequential scanning over a large area with a resolution of 0.59x0.59 microns/pixel in multiphoton scanning mode. The anterior and posterior directions are indicated by the corresponding arrows (Anterior, Posterior). The area of the cerebral cortex is marked with the inscription “Kop”, the hippocampus – “Гп”. In Figure (b), individual amyloid plaques are indicated by red arrows, the diameter of the circle is ≈ 35 microns.

После операции животное отсаживали в отдельную клетку. Послеоперационный уход осуществляли под наблюдением ветеринарного врача с применением ненаркотических анальгетиков (анальгин 0.01 мг/г) и противовоспалительных препаратов (дексаметазон 0.02 мг/г).

Оборудование и хроническая визуализация. Хроническую (*in vivo*) визуализацию морфологии шипиков апикальных дендритов пирамидных нейронов на уровне I–III слоев коры мозга (на глубину 50–300 мкм от поверхности) проводили в мультифотонном режиме с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 NLO (Carl Zeiss), оснащенного 20-кратным объективом (W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC D = 0.17 M27 VIS-IR). Флуоресцентный белок GFP возбуждали с помощью фемтосекундного лазера Chameleon Discovery (Coherent) на длине волны 910 нм. Эмиссию света регистрировали в диапазоне 505–577 нм. Последовательное получение изображений (слоев) на различных глубинах фокальной плоскости в дорсовентральном направлении (формирование z-стека) осуществляли с 50%-м перекрытием для каждого последующего шага. Толщина одного

слоя составляла 0.63 мкм. Каждый z-стек включал от 15 до 44 слоев, что соответствовало толщине аксиального сканирования от 8.836 до 27.138 мкм. Каждый слой регистрировали как «8-битное» изображение с разрешением 1024x1024 пикселей, что соответствовало площади сканирования 31.49x31.49 мкм² (0.03x0.03 мкм/пиксель).

Перед сеансом хронической визуализации животных иммобилизовали с помощью легкого (0.5–0.7%) изофлуранового наркоза. Под объективом микроскопа животных размещали в стереотаксическом станке MAG-2 (Narishige) с возможностью изменения угла поворота головы в трехмерном пространстве для перпендикулярной ориентации относительно системы сканирования. Перемещение под объективом осуществляли с помощью моторизованного предметного стола ZDeck HZ101PM (Prior Scientific), интегрированного с LSM 880 NLO.

При многодневной визуализации одних и тех же фрагментов дендритов формировали для каждого фрагмента соответствующий z-стек на текущий день визуализации. Поиск фрагментов дендритов и их идентификацию по характерным

морфологическим признакам осуществляли с помощью многоуровневого последовательного (несколько итераций) увеличения объектов, находящихся в зоне сканирования. Начальную интересующую область сканирования устанавливали по характерным очертаниям кровеносных сосудов мозга в режиме отраженного света в диапазоне видимого глазом человека (подсветка светодиодами). Затем в результате экспресс-сканирования в мультифтонном режиме с последовательным увеличением зоны визуализации выявляли интересующие фрагменты апикальных дендритов. При однозначной идентификации фрагментов выполняли z-сканирование по дорсовентральной оси (z-стек) в автоматическом режиме с заданными параметрами.

Согласно данным литературы, кратковременное использование изофлурана (4–6 часов) увеличивает образование филоподиевидных дендритных шипиков, не оказывая влияния на остальные типы. При этом эффект изофлурана является обратимым в течение суток после наркотизации животных (Yang et al., 2011) и не вызывает долговременных нейропатологических изменений (Lin et al., 2012; Tong et al., 2019). В нашем исследовании длительность наркотизации (0.5–0.7%-й изофлуран для иммобилизации животного под объективом микроскопа) при выполнении одного сеанса визуализации не превышала 1.5 часов, что позволяет исключить влияние наркоза на динамику изменения числа и типов шипиков.

Обработка изображений и анализ данных. Обработку полученных изображений (корректировка контраста/яркости, подавление шума), анализ морфологии дендритных фрагментов на полученных z-стеках осуществляли с помощью программного обеспечения ZEN Black edition и ZEN Blue Edition 2.6. (Carl Zeiss).

Экспериментальная работа была выполнена с использованием 3 мышей линии M-Line и 3 мышей 5xFAD-M (возраст 6.0–6.5 мес, вес 25–30 г). В ходе экспериментальной работы с животными были проанализированы всего 64 идентифицированных дендритных фрагмента, наблюдавшихся в течение 21 дня (у линии M-Line: 15 мышь_1 + 7 мышь_2 + 7 мышь_3, итого 29; и у гибридов 5xFAD-M: 11 мышь_4 + 13 мышь_5 + 11 мышь_6, итого 35). У всех вовлеченных в эксперименты животных для анализа использовали одни и те же дендритные фрагменты, которые смогли найти, идентифицировать и визуализировать в течение указанного периода. Общая длина изученных фрагментов составляет 2027 мкм. На всех дендритных фрагментах оценивали плотность синаптических шипиков (количество шипиков/длина фрагмента мкм) по каждому животному в разные дни визуализации.

Был выполнен анализ количества шипиков по их морфологическим типам в течение 21 дня

наблюдения на всех 64 идентифицированных нейронных фрагментах у мышей M-Line и 5xFAD-M. В разных научных работах дендритные шипики по морфологическим признакам разделяют на несколько (от 2 до 5) типов (Jones, Powell, 1969; Попов и др., 2003; Rochefort, Konnerth, 2012; Chidambaram et al., 2019; Bell et al., 2019). Мы в своей работе определили 4 относительно простых морфологических типа: 1) филоподиевидные шипики, длина которых значительно превышает их диаметр; 2) пеньковые, длина и диаметр которых соразмерны; 3) тонкие, имеющие длинную или короткую «ножку» с головкой большего диаметра; и 4) гибридные – две головки на одной ножке (рис. 5 (а)). Рассчитывали процентное соотношение 4 типов дендритных шипиков по всем идентифицированным дендритным фрагментам у мышей M-Line (в количестве 29) и 5xFAD-M (35), наблюдавшихся в течение 21 дня.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами были использованы гибриды трансгенных мышей 5xFAD-M, полученные при скрещивании линии M-Line с экспрессией GFP и мышью модели BA – линии 5xFAD. У мышей линии M-Line с трансгеном Thy1-EGFP специфический промоутер Thy1 обуславливает экспрессию GFP избирательно в нейронах головного мозга (примерно 10% нейронов), включая корковые структуры (Vidal et al., 1990; Moehars et al., 1996; Laperchia et al., 2013). Линия 5xFAD является ускоренной моделью BA и включает избыточную экспрессию генов APP и PSEN1, содержащих 5 семейных мутаций BA (APP KM670/671NL (Swedish), APP I716V (Florida), APP V717I (London), PSEN1 M146L, PSEN1 L286V).

В ходе многодневной хронической визуализации нейронных структур мозга у животных из экспериментальной группы M-Line и 5xFAD-M, после имплантации животным оптически прозрачного краиального окна, выявлена устойчивая (на весь период работы с животными – 21 день и более) экспрессия GFP-белка в отдельных нейронах соматосенсорной коры головного мозга.

На рис. 3 приведены данные, демонстрирующие многодневную визуализацию дендритных шипиков, являющихся постсинаптическим образованием, на одном и том же фрагменте дендрита на примере трансгенной мыши линии M-Line. Многодневный доступ к поиску и идентификации выбранного фрагмента дендрита через прозрачное краиальное окно (рис. 3 (б)) осуществлялся благодаря исключению дополнительных процедур инъекционного (болюсного) введения в мозг флуоресцентных красителей или аденоовирусов, экспрессирующих GFP, что

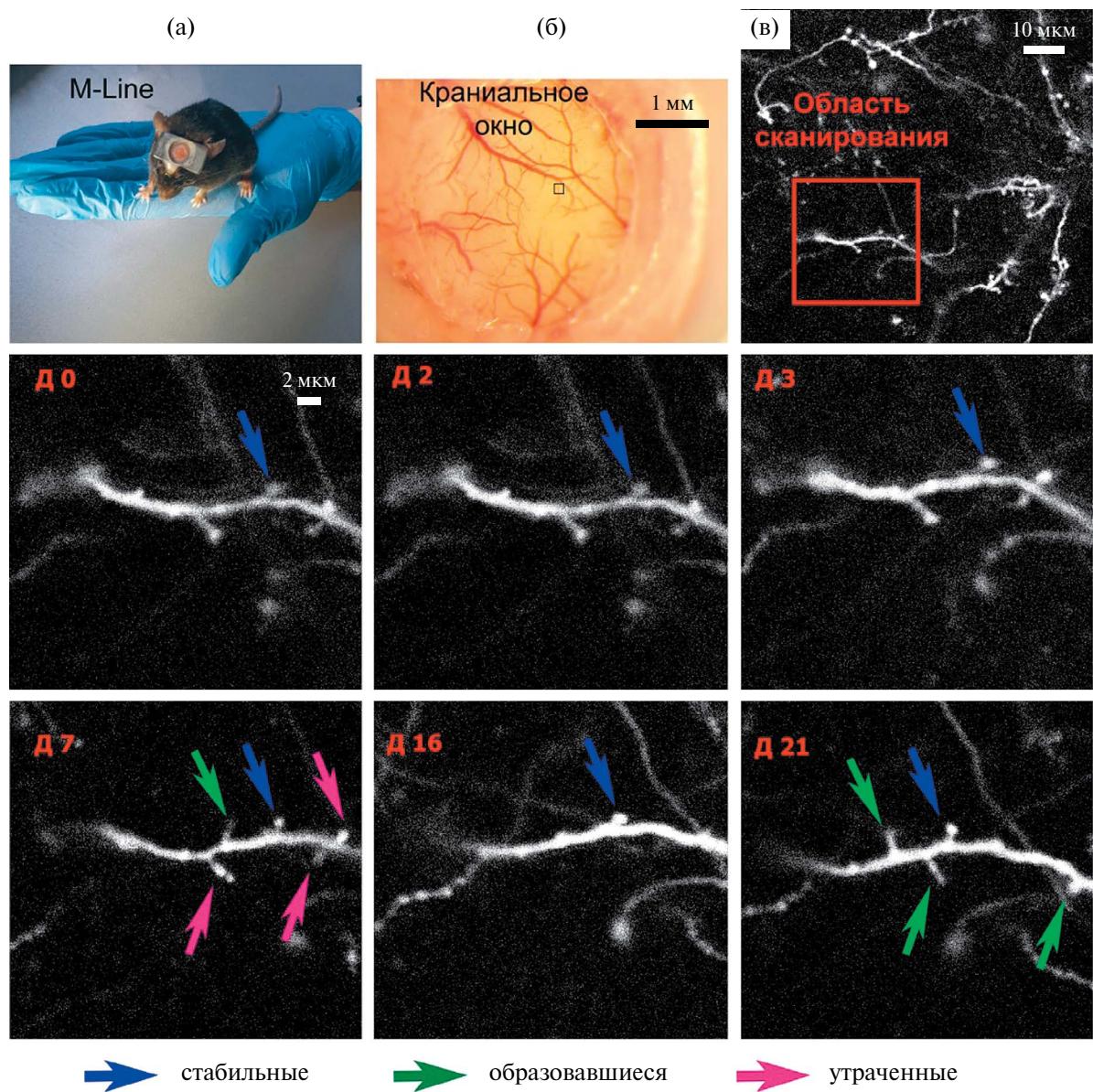


Рис. 3. Изменения дендритных шипиков в течение длительного периода хронической визуализации фрагмента апикального дендрита нейрона соматической коры трансгенной мыши линии M-Line. (а) – мышь с имплантированным краинальным окном. (б) – оптически прозрачное краинальное окно. (в) – область многодневного хронического сканирования. D0 – D21 – фрагмент исследуемого дендрита в разные дни визуализации (D0 соответствует дню имплантации). В верхнем правом углу размерная шкала с обозначением длины на изображениях (б), (в) и D0. Стрелками обозначены процессы синаптогенеза согласно цветовой кодировке (синий – стабильные, зеленый – образовавшиеся, розовый – утраченные).

Fig. 3. Changes in the quantitative composition of dendritic spines during a long period of chronic visualization of an apical dendrite fragment of a neuron in the somatosensory cortex (M-Line mouse). (a) – a mouse with an implanted cranial window. (б) – optically transparent cranial window. (в) – the area of a multi-day chronic scanning. D0 – D21 is a fragment of the dendrite under study on different days of visualization (D0 corresponds to the day of implantation). In the upper right corner of the image there is a dimensional scale with the length designation (б), (в) and D0. The arrows indicate the processes of synaptogenesis (formation/loss), according to the color coding (blue – stable, green – formed, pink – lost).

сопровождается, как правило, нарушением структур мозга и воспалительными процессами с сопутствующими микропроводами.

Сложной, нетривиальной задачей является поиск и идентификация заданных фрагментов дендритов нейронов коры мозга. Ее решение

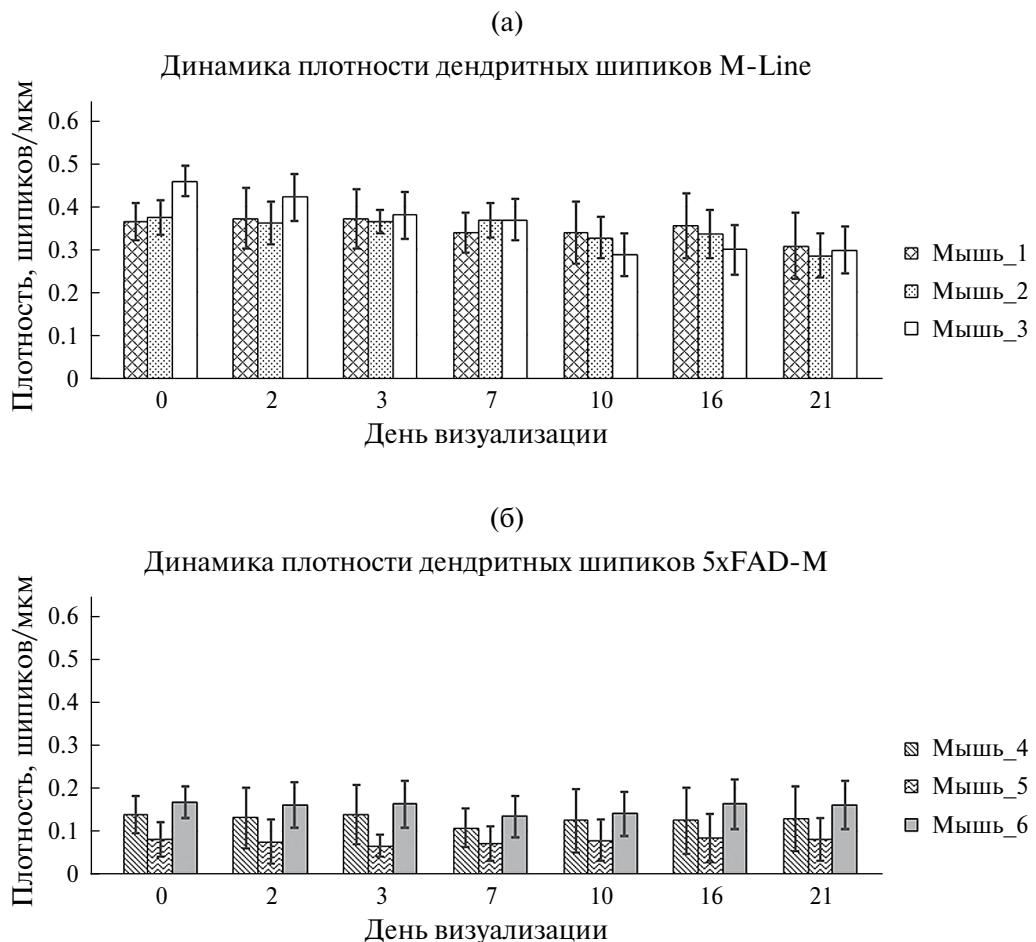


Рис. 4. Динамика плотности (средние значения) дендритных шипиков у мышей линии M-Line (а) и 5xFAD-M (б) в течение 21 дня наблюдений.

Fig. 4. Density dynamics (average values) of dendritic spines in M-Line (a) and 5xFAD-M (b) mice during 21 days of visualization.

достигается путем многоуровневого последовательного (3–4 итерации) увеличения зоны сканирования с топологической привязкой к индивидуальному расположению кровеносных сосудов мозга (см. разд. «Оборудование и хроническая визуализация»). На рис. 3 (в) представлены заключительные процедуры последовательного увеличения зоны сканирования. Изображения Д0 – Д21 демонстрируют идентифицированные фрагменты одного и того же дендрита в разные дни наблюдения. Д0 соответствует дню операционной подготовки животного с имплантацией краинального окна. На данных рисунках можно рассмотреть динамичные процессы образования новых дендритных шипиков (обозначены зелеными стрелками), утраты ранее образованных (розовые стрелки). Есть также стабильные шипики (синие стрелки), которые сохраняются на весь период наблюдения.

Таким образом, достигнутые нами успехи согласуются с научными исследованиями (Holtmaat et al., 2005; Laperchia et al., 2013; Merlini et al., 2019), в которых использовали трансгенных (Thy1-) животных с экспрессией GFP или желтого флуоресцентного пептида (YFP) в популяциях нейронов для многодневных *in vivo* исследований субклеточных структур мозга (дендритные шипики) с помощью двухфотонной флуоресцентной микроскопии. Laperchia и соавт. (Laperchia et al., 2013) отмечают, что Thy1-GFP-трансгенные мыши представляет собой перспективную животную модель для изучения широкого спектра явлений, таких как ремоделирование дендритных синаптических структур после обучения/опыта, нейровоспаление и лазерная диссекция.

Плотность синаптических шипиков у мышей с БА (5xFAD-M) более чем в два раза меньше, чем у контрольной группы (M-Line), на весь период

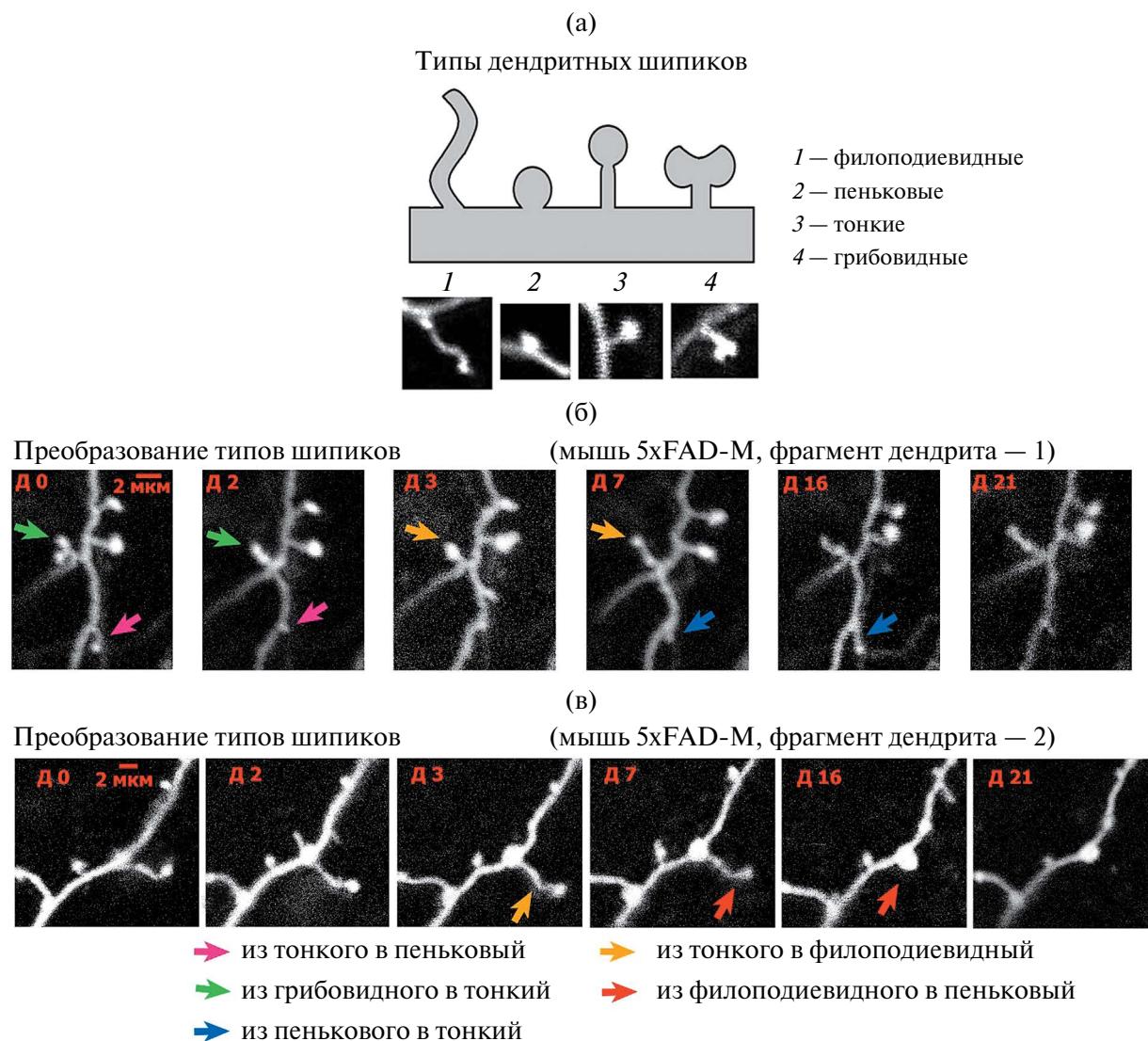


Рис. 5. Преобразование типов дендритных шипиков на примере мышей линии 5xFAD-M. (а) – типы дендритных шипиков. (б), (в) – преобразование типов шипиков. Стрелками обозначено преобразование из одного типа в другой, согласно цветовой кодировке (розовый – из тонкого в пеньковый, зеленый – из грибовидного в тонкий, оранжевый – из тонкого в филоподиевидный, синий – из пенькового в тонкий, красный – из филоподиевидного в пеньковый).

Fig. 5. Transformation of dendritic spike types in 5xFAD-M mice. (a) – dendritic spike types. (b), (v) – transformation of spike types. The arrows indicate the conversion from one type to another, according to the color coding (pink – from thin to stubby, green – from mushroom to thin, orange – from thin to filopodia, blue – from stubby to thin, red – from filopodia to stubby).

визуализации. Плотность дендритных шипиков на весь период наблюдений у мышей M-Line представлена на рис. 4 (а), у 5xFAD-M – на рис. 4 (б).

Возможность использования технологии многодневной хронической визуализации нейронных структур мозга с помощью методов мультифотонной флуоресцентной микроскопии позволила выявить интересные факты преобразования типов дендритных шипиков из одного в другой (рис. 5 б, в). На этом рисунке представлены два разных фрагмента дендритов на примере мыши 5xFAD-M,

наблюдаемых в течение 21 дня (Д0-Д21). Шкала, соответствующая 2 мкм, приведена в верхнем правом углу на Д0. Преобразование типов дендритных шипиков обозначено стрелками согласно цветовой кодировке: розовый – из тонкого в пеньковый; зеленый – из грибовидного в тонкий; синий – из пенькового в тонкий; желтый – из тонкого в филоподиевидный; красный – из филоподиевидного в пеньковый. Важно отметить, что некоторые дендритные шипики последовательно в течение нескольких дней наблюдения преобразуются как

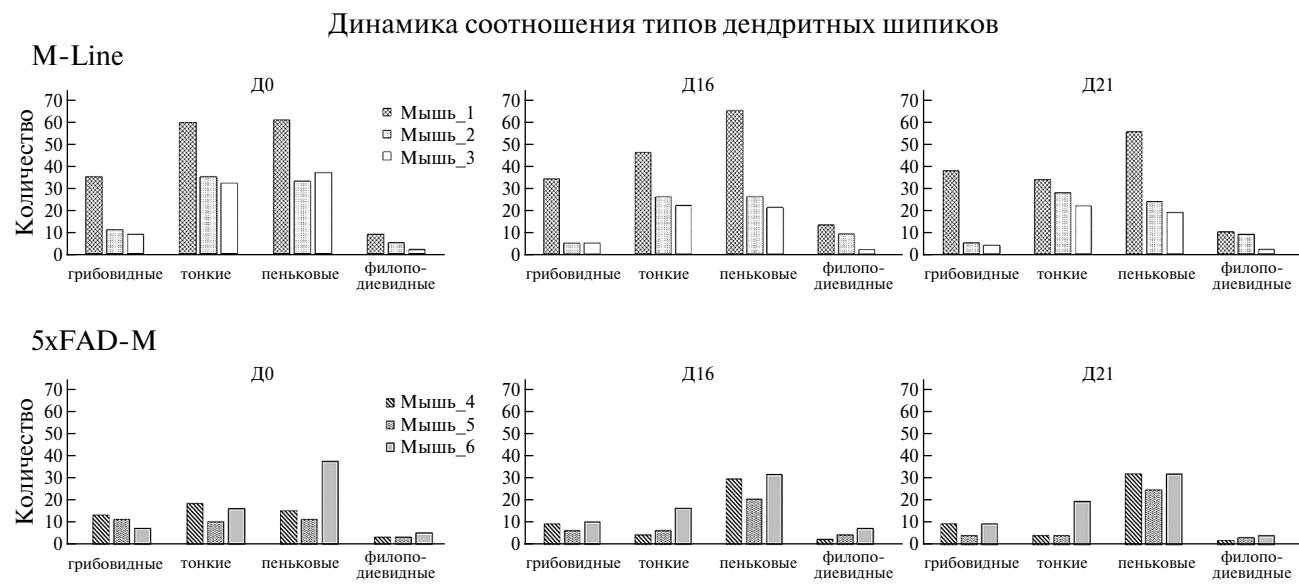


Рис. 6. Динамика соотношения типов дендритных шипиков у мышей линий M-Line и 5xFAD-M в разные дни (Д0, Д16 и Д21) наблюдений.

Fig. 6. Dynamics of the ratio of dendritic spine types in M-Line and 5xFAD-M mice on different days (D0, D16 and D21) of visualization.

минимум в 3 морфологических типа: грибовидный – тонкий – филоподиевидный (зеленые, желтые стрелки на рис. 5 (б)) и тонкий – филоподиевидный – пеньковый (желтые, красные стрелки на рис. 5 (в)). Возможно, что на этом рисунке представлены три разных модели преобразования или развития шипиков.

Динамика преобразования морфологических типов дендритных шипиков, выявленная у мышей M-Line и 5xFAD-M, представлена на рис. 6. На этом рисунке отражено количество дендритных шипиков по разным морфологическим типам (4 группы: грибовидные, тонкие, пеньковые и филоподиевидные) для каждого животного (соответствующая окраска / штриховка данных) в разные дни наблюдения (Д0, Д16 и Д21). Из представленных данных видно, что у мышей M-Line и 5xFAD-M количественный состав морфологических типов дендритных шипиков меняется в течение всего периода наблюдений. Однако стоит отметить, что у животных 5xFAD-M количество пеньковых шипиков заметно увеличивается к 21-му дню наблюдений по сравнению с другими типами шипиков.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дендритные шипики (их морфология и плотность) играют важнейшую функциональную роль в синаптической пластичности и, следовательно, в процессах обучения и памяти (Grutzendler et al.,

2002; Попов и др., 2003; Rochefort, Konnerth, 2012; Lu, Zuo, 2017; Chidambaram et al., 2019; Bell et al., 2019). При развитии болезни Альцгеймера нейронные структуры в разных областях головного мозга подвергаются обширной дегенерации, включая утрату синапсов (дендритных шипиков) и значительную потерю нейронов (Spires et al., 2005; Oakley et al., 2006; Devi, Ohno, 2010; Jawhar et al., 2012; Kalinin et al., 2012; Eimer, Vassar, 2013; Forner et al., 2021). Потеря синапсов представляется особенно актуальной, поскольку она тесно коррелирует со степенью когнитивных нарушений (Spires et al., 2005; Eimer, Vassar, 2013; Boros et al., 2017). БА все чаще рассматривается как нейродегенеративное заболевание, при котором нарушения функционирования синапсов и/или их утрата являются ключевым компонентом патогенеза (Meftah, Gan, 2023). В работе Subramanian et al. (2020), опирающейся на исследования, реализованные методами *in vivo* мультифотонной микроскопии на разных мышиных моделях БА, отмечается, что потеря синапсов (в частности, дендритных шипиков) может быть спровоцирована как внеклеточными факторами (отложением бета-амилоида (β А), трансформацией функций микроглии), так и внутриклеточными (накоплением β А, нарушением функций тау-белка с образованием скоплений в виде клубков, повышением уровня кальция).

Известно, что у мышей 5xFAD интранейрональный β А начинает накапливаться уже в возрасте 1.5 месяцев (Amram, Frenkel, 2017). Формирование

внеклеточных патогенных β А бляшек начинается в возрасте 2–4 месяцев. Сначала бляшки появляются в глубоких слоях коры головного мозга, а у взрослых мышей (9–12 месяцев) бляшки заполняют большую часть коры и гиппокампа. Временные рамки появления амилоидных бляшек позволяют предположить, что некоторые бляшки могут образовываться из интранейрональных агрегатов β А. Появление амилоидных бляшек сопровождается стойким микроглиозом и воспалительными процессами (Oakley et al., 2006; Jawhar et al., 2012; Forner et al., 2021). У взрослых мышей (9–12 мес) наблюдается снижение уровня синаптических маркеров (синаптофизин, синтаксин), что свидетельствует о частичной утрате синапсов, а также нейрональная потеря, в частности норадренергических и холинергических нейронов (Oakley et al., 2006; Devi, Ohno, 2010; Jawhar et al., 2012; Kalinin et al., 2012; Forner et al., 2021). Когнитивный дефицит (cognitive deficits) у этих трансгенных мышей развивается в возрасте 4–5 месяцев (Oakley et al., 2006; Avrahami et al., 2013).

Важно отметить, что, по нашим данным, утрата синапсов (дendритных шипиков) наблюдается уже в возрасте 6–6.5 месяцев (рис. 4). Этот факт согласуется с данными Ilina, Linkova (2023), которые отмечают значительное уменьшение dendритных шипиков у мышей 5xFAD-M в возрасте 4–5 месяцев.

Размеры dendритных шипиков имеют огромное значение, поскольку внутриклеточная среда этих постсинаптических образований включает основные органеллы (гладкий ретикулум, микротрубочки, полирибосомы, постсинаптическое уплотнение, шипиковый аппарат, эндосомы). Указанные внутриклеточные структуры обеспечивают активную доставку от сомы нейрона и/или синтез на месте белков, необходимых для постоянного обновления мембранных хеморецепторов и ионных каналов в процессе синаптической передачи сигналов (Попов и др., 2003; Rochefort, Konnerth, 2012 Chidambaram et al., 2019; Bell et al., 2019). Существующие данные свидетельствуют о том, что каждый dendритный шипик функционирует как частично автономный компартмент, который в дополнение к транссинаптической передаче сигналов, за счет функциональных перестроек (лабильности), играет важнейшую роль в модуляции силы синаптической связи. Способность шипиков модулировать входящие пресинаптические сигналы обуславливает синаптическую пластичность, которая является механизмом реализации памяти и обучения.

В процессе формирования памяти происходит либо образование новых шипиков, либо структурное/функциональное изменение существующих (Chidambaram et al., 2019). Таким образом, dendритные шипики можно рассматривать как анатомическую структуру хранения памяти.

Взаимосвязь между морфологией шипиков и пластичностью активно обсуждается, однако принято считать, что тонкие и филоподиевидные относятся к лабильным, а более крупные пеньковые и грибовидные являются более функционально активными, которые остаются морфологически устойчивыми, возможно, на протяжении всей взрослой жизни животного (Grutzendler et al., 2002; Holtmaat et al., 2005; Lu, Zuo, 2017). Высказываются предположения о том, что кратковременная память обусловлена образованием и развитием новых шипиков из-за их повышенной лабильности и способности к деструкции (утрате) при отсутствии пресинаптической стимуляции; долговременная – за счет более функционально активных шипиков при созревании и стабилизации ранее образованных (увеличение размеров головок при уменьшении общей длины, уменьшение лабильности) (Chidambaram et al., 2019).

Особую роль определяют филоподиевидным структурам, которая заключается в образовании новых шипиков. Считается, что филоподиевидные выросты, богатые актином, образуются на поверхности dendритов с целью поиска пресинаптических контактов с последующим формированием, в конечном итоге, новых тонких шипиков (Попов и др., 2003; Majewska et al., 2006; Chidambaram et al., 2019). То есть «филоподии» являются промежуточным звеном в формировании новых dendритных шипиков.

Однако, согласно нашим наблюдениям, тонкие шипики могут преобразовываться в филоподиевидные (рис. 5 (б), (в)), а также может происходить утрата филоподиевидного выроста на месте локализации пенькового шипика (рис. 5 (в)). Это может свидетельствовать о более сложных функциях «филоподий», которые еще предстоит выяснить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку молекулярные механизмы образования синапсов, формирования синаптической пластичности и роль dendритных шипиков остаются предметом дискуссий, нейротехнологии для хронической *in vivo* визуализации нейронных структур мозга с помощью средств флуоресцентной микроскопии, на наш взгляд, являются актуальными. Идентификация морфологических признаков нейродегенеративных заболеваний с помощью такого рода технологий должна в перспективе способствовать более глубокому пониманию механизмов патогенеза заболеваний, улучшению дифференциальной диагностики патологий и созданию принципиально новых эффективных средств терапии.

Весьма перспективным направлением для развития настоящего исследования, способным существенно улучшить качество технологий многодневной хронической визуализации нейронных структур

мозга, является разработка математических средств и программных продуктов цифровой обработки изображений с возможностями трехмерной реконструкции флуоресцирующих объектов на разной глубине фокальной плоскости с целью создания автоматической системы детекции дендритных шипиков и классификации их морфологических типов.

ВЫВОДЫ

1. Получены гибриды 5xFAD-М трансгенных животных, сочетающих в себе экспрессию флуоресцентных белков в корковых нейронах мозга с моделью нейродегенеративной болезни Альцгеймера. Использование мышей линии 5xFAD-М исключает необходимость инфицирования аденоассоциированными вирусами для трансфекции генов, экспрессирующих флуоресцентные белки в мозге животных, что является важным преимуществом при изучении динамики дендритных шипиков на фоне развития нейродегенеративных процессов.

2. Разработана технология хронической визуализации дендритных шипиков нейронов 2/3-го слоя коры мозга, позволяющая не менее трех недель визуализировать нейронные структуры с помощью двухфотонной микроскопии. Использование данной технологии позволило отследить многодневную динамику плотности дендритных шипиков у «здоровых» мышей и с БА, а также выявить интересные факты преобразования морфологических типов шипиков в течение длительного периода наблюдений.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ КАЖДОГО АВТОРА (AUTHOR CONTRIBUTIONS)

А.Е. Матухно – написание текста и редактирование, проведение экспериментов, обработка и анализ данных, обсуждение результатов исследования; П.В. Ткачева – проведение экспериментов, обработка и анализ экспериментальных данных; В.Б. Войнов – редактирование текста статьи, обсуждение результатов исследования; Л.В. Лысенко – редактирование текста статьи, обсуждение результатов исследования, администрирование проекта; Е.В. Евсюкова – проведение экспериментов; А.О. Тайсаева – проведение экспериментов; И.Б. Безпрозванный – концепция и руководство работой, привлечение финансирования, редактирование текста.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ РАБОТЫ (FUNDING)

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Южного

федерального университета «Приоритет 2030»; проект СП01/S4_0708Приоритет_08.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ (CONFLICTS OF INTEREST)

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ (COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS)

Все экспериментальные процедуры и уход за животными были заранее одобрены Комитетом по этике Южного федерального университета (дата 28.04.2022 / № 4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Левин О.С., Васенина Е.Е. 25 лет амилоидной гипотезе происхождения болезни Альцгеймера: достижения, неудачи и новые перспективы. Журнал неврологии и психиатрии. 2016. 6 (2): 3–9.
- Литвиненко И.В., Емелин А.Ю., Лобзин В.Ю., Колмакова К.А., Наумов К.М., Лупанов И.А., Киливаева Г.А., Ализаде М.Р. Амилоидная гипотеза болезни Альцгеймера: прошлое и настоящее, надежды и разочарования. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2019. 11 (3): 4–10.
- Попов В.И., Медведев Н.И., Рогачевский В.В., Игнатьев Д.А., Стюарт М.Г., Фесенко Е.Е. Трехмерная организация синапсов и астроглии в гиппокампе крыс и сусликов: новые структурно-функциональные парадигмы работы синапса. Биофизика. 2003. 48 (2): 289–308.
- Стефанова Н.А., Колосова Н.Г. Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера. Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. 2016. № 1. С. 6–13.
- Татарникова О.Г., Орлов М.А., Бобкова Н.В. Бета-амилоид и тау-белок: структура, взаимодействие и прионоподобные свойства. Успехи биологической химии. 2015. 55: 351–390.
- Amram S., Frenkel D. Chapter 3 – Animal Models of Alzheimer’s Disease. Neuroprotection in Alzheimer’s Disease. Academic Press. 2017. 31–58 pp.
- Avrahami L., Farfara D., Shaham-Kol M., Vassar R., Frenkel D., Eldar-Finkelman H. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 ameliorates beta-amyloid pathology and restores lysosomal acidification and mammalian target of rapamycin activity in the Alzheimer disease mouse model: *in vivo* and *in vitro* studies. J. Biol. Chem. 2013. 288 (2): 1295–1306.
- Bader A.S., Gnädig M.U., Fricke M., Büschgens L., Berger L.J., Klafki H.W., Meyer T., Jahn O., Weggen S., Wirths O. Brain Region-Specific Differences in

- Amyloid- β Plaque Composition in 5XFAD Mice. *Life (Basel)*. 2023;13 (4): 1053.
- Bell M., Bartol T., Sejnowski T., Rangamani P.* Dendritic spine geometry and spine apparatus organization govern the spatiotemporal dynamics of calcium. *J Gen Physiol*. 2019; 151 (8): 1017–1034.
- Bezprozvanny I.* Alzheimer's disease e Where do we go from here? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022; 633: 72–76.
- Bezprozvanny I.* Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med*. 2009; 15 (3): 89–100.
- Bezprozvanny I., Mattson M.P.* Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 2008; 31:454–463.
- Boros B.D., Greathouse K.M., Gentry E.G., Curtis K.A., Birchall E.L., Gearing M., Herskowitz J.H.* Dendritic spines provide cognitive resilience against Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2017; 82(4): 602–614.
- Chidambaram S.B., Rathipriya A.G., Bolla S.R., Bhat A., Ray B., Mahalakshmi A.M., Manivasagam T., Thenmozhi A.J., Essa M.M., Guillemin G.J., Chandra R., Sakharakar M.K.* Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019; 8 (92): 161–193.
- Cline E.N., Bicca M.A., Viola K.L., Klein W.L.* The amyloid-oligomer hypothesis: Beginning of the third decade. *J Alzheimers Dis*. 2018; 64 (1): 567–610.
- Dahl R., Moore A.C., Knight C., Mauger C., Zhang H., Schiltz G.E., Koss W.A., Bezprozvanny I.* Positive Allosteric Modulator of SERCA Pump NDC-1173 Exerts Beneficial Effects in Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(13): 11057.
- Devi L., Ohno M.* Phospho-eIF2alpha level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD. *PLoS One*. 2010; 5(9): e12974.
- Eimer W.A., Vassar R.* Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Molecular Neurodegeneration*. 2013; 8: 2–12.
- Forner S., Kawauchi S., Balderrama-Gutierrez G., Kramár E.A., Matheos D.P., Phan J., Javonillo D.I., Tran K.M., Hingco E., da Cunha C., Rezaie N., Alcantara J.A., Baglietto-Vargas D., Jansen C., Neumann J., Wood M.A., MacGregor G.R., Mortazavi A., Tennen A.J., LaFerla F.M., Green K.N.* Systematic phenotyping and characterization of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Data*. 2021; 8 (1): 270.
- Grutzendler J., Kasthuri N., Gan W.-B.* Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*. 2002; 420: 812–816.
- Holtmaat A.J., Trachtenberg J.T., Wilbrecht L., Shepherd G.M., Zhang X., Knott G.W., Svoboda K.* Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*. 2005; 45 (2): 279–91.
- Holtzman D.M., Carrillo M.C., Hendrix J.A., Bain L.J., Catafau A.M., Gault L.M., Goedert M., Mandelkow E., Mandelkow E.M., Miller D.S., Ostrowitzki S., Polydoro M., Smith S., Wittmann M., Hutton M.* Tau: From research to clinical development. *Alzheimers Dement*. 2016; 12(10):1033–1039.
- Ilina A., Linkova N. A.* Transgenic 5xFAD-M Line of Mice for Dendritic Spine Morphology Analysis in Alzheimer's Disease. *Brain Sci*. 2023; 13(2):307.
- Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., Bayer T.A., Wirths O.* Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol*. 2012; 196: e129–140.
- Jones E.G., Powell T.P.* Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J Cell Sci*. 1969; 5(2): 509–29.
- Kalinin S., Polak P., Lin S.* The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol*. 2012; 33(8): 1651–1663.
- Laperchia C., Allegra Mascaro A.L., Sacconi L., Andrioli A., Mattè A., De Franceschi L., Grassi-Zucconi G., Bentivoglio M., Buffelli M., Pavone F.S.* Two-photon microscopy imaging of thy1GFP-M transgenic mice: a novel animal model to investigate brain dendritic cell subsets in vivo. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e56144.
- Leger G.C., Massoud F.* Novel disease-modifying therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2013; 6 (4): 423–442.
- Lin D., Cao L., Wang Z., Li J., Washington J.M., Zuo Z.* Lidocaine attenuates cognitive impairment after isoflurane anesthesia in old rats. *Behav Brain Res*. 2012; 228(2): 319–327.
- Lowery R.L., Zhang Y., Kelly E.A., Lamantia C.E., Harvey B.K., Majewska A.K.* Rapid, long-term labeling of cells in the developing and adult rodent visual cortex using double-stranded adeno-associated viral vectors. *Dev Neurobiol*. 2009; 69 (10): 674–688.
- Lu J., Zuo Y.* Clustered structural and functional plasticity of dendritic spines, *Brain Research Bulletin*. 2017; 129: 18–22.
- Majewska A.K., Newton J.R., Sur M.* Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo. *J. Neurosci*. 2006; 26: 3021–3029.
- Meftah S., Gan J.* Alzheimer's disease as a synaptopathy: Evidence for dysfunction of synapses during disease progression. *Front Synaptic Neurosci*. 2023; 15:1129036.
- Merlini M., Rafalski V.A., Rios Coronado P.E., Gill T.M., Ellisman M., Muthukumar G., Subramanian K.S., Ryu J.K., Syme C.A., Davalos D., Seeley W.W., Mucke L., Nelson R.B., Akassoglou K.* Fibrinogen Induces Microglia-Mediated Spine Elimination and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *Neuron*. 2019; 101 (6): 1099–1108.
- Mittmann W., Wallace D.J., Czubayko U., Herb J.T., Schaefer A.T., Looger L.L., Denk W., Kerr J.N.* Two-photon calcium imaging of evoked activity from

- L5 somatosensory neurons *in vivo*. *Nat Neurosci*. 2011. 14 (8): 1089–1093.
- Moechars D., Lorent K., De Strooper B., Dewachter I.* Van Leuven F. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO*. 1996. 15: 1265–1274.
- Nelson P.T., Alafuzoff I., Bigio E.H., Bouras C., Braak H., Cairns N.J., Castellani R.J., Crain B.J., Davies P., Del Tredici K., Duyckaerts C., Frosch M.P., Haroutunian V., Hof P.R., Hulette C.M., Hyman B.T., Iwatsubo T., Jellinger K.A., Jicha G.A., Kovari E., Kukull W.A., Leverenz J.B., Love S., Mackenzie I.R., Mann D.M., Masliah E., McKee A.C., Montine T.J., Morris J.C., Schneider J.A., Sonnen J.A., Thal D.R., Trojanowski J.Q., Troncoso J.C., Wisniewski T., Woltjer R.L., Beach T.G.* Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012. 71 (5): 362–381.
- Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vassar R.* Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*. 2006. 26 (40): 10129–10140.
- Oblak A.L., Lin P.B., Kotredes K.P., Pandey R.S., Garceau D., Williams H.M., Uyar A., O'Rourke R., O'Rourke S., Ingraham C., Bednarczyk D., Belanger M., Cope Z.A., Little G.J., Williams S.G., Ash C., Bleckert A., Ragan T., Logsdon B.A., Mangravite L.M., Sukoff Rizzo S.J., Territo P.R., Carter G.W., Howell G.R., Sasner M., Lamb B.T.* Comprehensive Evaluation of the 5XFAD Mouse Model for Preclinical Testing Applications: A MODEL-AD Study. *Front Aging Neurosci*. 2021. 13:713726.
- Olfati N., Shoeibi A., Litvan I.* Clinical Spectrum of Tauopathies. *Front Neurol*. 2022. 13: 944806.
- Rochefort N.L., Konnerth A.* Dendritic spines: from structure to *in vivo* function. *EMBO Rep*. 2012. 13 (8): 699–708.
- Schouten M., De Luca G.M., Alastrite González D.K., de Jong B.E., Timmermans W., Xiong H., Krugers H., Manders E.M., Fitzsimons C.P.* Imaging dendritic spines of rat primary hippocampal neurons using structured illumination microscopy. *J Vis Exp*. 2014. 87: 51276.
- Selkoe D.J., Hardy J.* The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med*. 2016. 8 (6): 595–608.
- Shao L.X., Liao C., Gregg I., Davoudian P.A., Savalia N.K., Delagazza K., Kwan A.C.* Psilocybin induces rapid and persistent growth of dendritic spines in frontal cortex *in vivo*. *Neuron*. 2021. 109(16): 2535–2544.e4.
- Shao W., Peng D., Wang X.* Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *J. Clin. Neurosci*. 2017. 45: 1–8.
- Son S., Nagahama K., Lee J., Jung K., Kwak C., Kim J., Noh Y.W., Kim E., Lee S., Kwon H.B., Heo W.D.* Real-time visualization of structural dynamics of synapses in live cells *in vivo*. *Nat Methods*. 2024. 21 (2): 353–360.
- Soria Lopez J.A., González H.M., Léger G.C.* Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*. 2019. 167(3rd series). pp. 231–255.
- Spires T.L., Meyer-Luehmann M., Stern E.A., McLean P.J., Skoch J., Nguyen P.T., Bacska J., Hyman B.T.* Dendritic Spine Abnormalities in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Demonstrated by Gene Transfer and Intravital Multiphoton Microscopy. *Journal of Neuroscience*. 2005. 25 (31): 7278–7287.
- Subramanian J., Savage J.C., Tremblay M.-È.* Synaptic Loss in Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights Provided by Two-Photon *in vivo* Imaging of Transgenic Mouse Models. *Front. Cell. Neurosci*. 2020. V. 14. Article: 592607.
- Tan A.M., Waxman S.G.* Dendritic spine dysgenesis in neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2015. 601:54–60.
- Tong D., Godale C.M., Kadakia F.K., Gu Z., Danzer C.S.K., Alghamdi A., Zhao P., Loepke A.W., Danzer S.C.* Immature murine hippocampal neurones do not develop long-term structural changes after a single isoflurane exposure. *Br J Anaesth*. 2019. 123 (6): 818–826.
- Vidal M., Morris R., Grosveld F., Spanopoulou E.* Tissue-specific control elements of the Ty-1 gene. *EMBO J*. 1990. 9: 833–840.
- Walker L.C.* Prion-like mechanisms in Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*. 2018. 153: 303–319.
- Yang G., Chang P.C., Bekker A., Blanck T.J., Gan W.B.* Transient effects of anesthetics on dendritic spines and filopodia in the living mouse cortex. *Anesthesiology*. 2011. 115 (4): 718–726.
- Yuste R., Majewska A., Holthoff K.* From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci*. 2000. 3 (7): 653–659.

CHRONIC IMAGING OF DENDRITIC SPINE MORPHOLOGY IN 5XFAD-M HYBRID LINE MICE OF ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

A. E. Matukhno^a, P. V. Tkacheva^a, V. B. Voinov^a, L. V. Lysenko^b, E.V. Evsyukova^a,
A.O. Taisaeva^a, I. B. Bezprozvanny^{a,c}

^a*Research Center for Neurotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia*

^b*Department of Physics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia*

^c*Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter the Great Saint Petersburg State Polytechnic University,
Saint Petersburg, Russia*

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disorder of neural structures in different areas of the brain. Loss of synapses is a key stage in the development of AD and it precedes significant loss of neurons. However, the mechanisms of synapse loss are uncertain. Structural and functional changes in synapses are interrelated with the morphology of postsynaptic formations – dendritic spines. This paper describes the implementation of the technology of chronic imaging of dendritic spines in transgenic animals using the methods of multiphoton fluorescence microscopy. Mice of the 5xFAD-M hybrid line were used. 5xFAD-M was derived by crossing transgenic mice with expressions of green fluorescent protein GFP in individual neurons of the brain (M-Line) and a mouse model of AD (5xFAD line). Methodological achievements revealed the multi-day dynamics of the density of dendritic spines in M-Line and 5xFAD-M mice. Transformations of morphological types of spikes were revealed during a long period of observations.

Keywords: Alzheimer's disease, dendritic spines, 5xFAD-M, chronic imaging, multiphoton microscopy