
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ –
РЕГУЛЯТОРЫ НЕЙРОГЛИОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА, ПРИ ОБУЧЕНИИ
В ВОДНОМ ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА: ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СТРЕССА
И ФОРМИРОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ПАМЯТИ У КРЫС ВИСТАР**

© 2025 г. А. М. Ратмиров¹, М. А. Грудень¹, З. И. Сторожева^{1, *}

¹Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий, Москва, Россия

*E-mail: storozheva_zi@academpharm.ru

Поступила в редакцию 10.02.2024 г.

После доработки 12.05.2025 г.

Принята к публикации 24.05.2025 г.

Образование новых, а также модификация работы ранее существовавших нейронных сетей и синаптических контактов, лежащие в основе обучения и памяти, в значительной степени зависят от транскрипционной активности генов, вовлеченных в регуляцию сопряженных процессов нейроглиогенеза и апоптоза. При этом выявление изменений работы генома, специфичных для когнитивных функций, требует одновременной оценки влияния стрессирующих факторов как неотъемлемого компонента всех моделей обучения лабораторных животных. Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ экспрессии генов регуляторов нейроглиогенеза (*S100A6*, *Ascl1*), а также апоптоза (*Apaf1*, *Bax*, *Casp3*, *Bcl2*) у животных, обученных пространственному навыку в водном лабиринте Морриса и подвергнутых принудительному плаванию в соответствии с режимом обучения. Эксперименты проведены на молодых половозрелых самцах крыс Вистар, распределенных по следующим группам: Обучение (с формированием навыка поиска скрытой платформы в водном лабиринте в течение 4 дней), Контроль (плавание в лабиринте без платформы в течение 4 дней) и Интактные (пребывание в домашних клетках). В образцах ткани гиппокампа, фронтальной коры и мозжечка, выделенных сразу после окончания экспериментов в лабиринте, определяли экспрессию целевых генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Было обнаружено, что когнитивная активность снижает экспрессию проапоптотических генов, возрастающую в условиях стрессового воздействия, и, напротив, стимулирует активность генов, регулирующих нейроглиогенез и синаптогенез в структурах, релевантных для различных стадий формирования следа памяти. Полученные результаты наряду с теоретическим вкладом представляют интерес для определения мишеней направленной терапии когнитивных нарушений.

Ключевые слова: пространственная память, стресс, экспрессия генов, апоптоз, нейроглиогенез

DOI: 10.7868/S2658655X25070081, **EDN:** MVRQWS

ВВЕДЕНИЕ

Формирование индивидуального опыта и адаптивных форм поведения на разных этапах жизненного цикла организма связано с образованием и модификацией работы нейронных сетей, обеспечивающих клеточные механизмы долговременной памяти, включая генерацию и селекцию новых нейронов, а также формирование, элиминацию и изменение эффективности синаптических контактов [1, 2]. Исследование молекулярно-генетических механизмов этих процессов, в частности выявление роли отдельных генов, является одним из важнейших направлений современной нейробиологии. Сопряженные механизмы нейроглиогенеза и апоптоза, обеспечивающие формирование нервной системы на стадии эмбрионального развития, играют также существенную роль в механизмах нейропластичности на ранних этапах постнатального онтогенеза [3, 4]. С возрастом у млекопитающих наблюдается снижение интенсивности нейроглиогенеза, и в зрелом мозге в стандартном режиме условной нормы эти процессы наблюдаются в нескольких специализированных отделах, таких как субвентрикулярная зона, субгранулярная зона зубчатой фассии гиппокампа, а также, предположительно, гипоталамус [5, 6].

В последнее время появляются данные о нейрогенезе в других областях зрелого мозга млекопитающих, в частности в коре больших полушарий и стриатуме, однако многие исследователи считают, что новые глиальные и нейрональные клетки попадают в эти отделы из нейрогенных ниш через роstralную систему миграции, и этот вопрос остается пока открытым [6, 7].

Функциональная роль вновь образованных клеток в зрелом мозге является предметом активного изучения. Выдвинута гипотеза, что взаимодействие зрелых и вновь образованных гранулярных нейронов в зубчатой фассии гиппокампа обеспечивает процессы разделения и интеграции паттернов при кодировании данных, передаваемых в кору больших полушарий [8]. Также сформулировано предположение об участии астроцитов в организации сетевых пространств и формировании доменов (информационных файлов) [9, 10].

При различных патологических условиях могут наблюдаться разнонаправленные изменения интенсивности нейрогенеза в зрелом мозге. Так, при черепно-мозговых травмах, ишемических повреждениях, нейродегенеративных процессах, вызывающих массовую гибель нейронов, можно наблюдать его активацию [11], в то время как при нарушениях метаболизма, воспалении и воздействии хронического стресса наблюдается подавление процесса. Физические упражнения и обогащенная среда стимулируют нейрогенные механизмы, способствуя их восстановлению после патологических нарушений, например хронического стресса [12, 13].

Многие белки-морфогены, выступающие в эмбриональном и раннем постнатальном развитии индукторами и регуляторами нейроглиогенеза, в зрелых нейронных сетях участвуют в модуляции синаптической передачи [14, 15]. Значительное число таких морфогенов являются транскрипционными факторами, и в число их мишеней входят гены, влияющие на синаптическую пластичность. В связи с этим могут наблюдаться многочисленные связи между динамикой их активности и особенностями адаптивного поведения, изучение которых требует системного подхода.

Одним из ключевых регуляторов нейроглиогенеза является транскрипционный фактор *Ascl1* (*Achaete-scute complex homolog1*), участвующий в первичных стадиях трансформации клеток-предшественников и способствующий последовательной пролиферации и дифференцировке [16]. Ген *Ascl1* экспрессируется в нейрогенных зонах зрелого мозга, а среди мишеней самого фактора представлены гены, регулирующие синтез и высвобождение медиаторов, а также передачу нервного импульса [17]. Среди белков, не являющихся транскрипционными факторами, но регулирующих поддержание пролиферативной активности, значительный интерес представляет

Ca^{2+} - и Zn^{2+} -связывающий белок *S100A6*, экспрессирующийся в нейрональных и глиальных предшественниках [18, 19]. Внутри клетки *S100A6* оказывает влияние на активность циклинов, кроме того, его лигандами являются белки, от которых зависит структура цитоскелета и проницаемость мембраны, а также ряд протеинов, обладающих шаперонной активностью. *S100A6* также секретируется в межклеточное пространство и оказывает аутокринное и паракринное действие через рецепторы RAGE, модулирующие активность ряда сигнальных систем [20].

Апоптоз (программируемая клеточная гибель) является одним из основных механизмов селекции функционально активных клеток мозга на всех этапах жизненного цикла. В зрелом мозге в норме активность апоптотических процессов максимальна в тех же зонах, где наблюдается нейрогенез. Показано, что многие ключевые регуляторы апоптотических процессов, в частности *Apaf1*, *Bax* (проапоптотический член семейства *Bcl*), эффекторная каспаза *Casp3*, вовлечены также в генерацию и селекцию синаптических контактов и в механизмы таких форм синаптической пластичности, как долговременная потенция и долговременная депрессия [21–23]. Наблюдаемая в течение жизненного цикла динамика экспрессии “проапоптотических” генов и одновременное изменение эпигенетических механизмов ее регуляции [24], предположительно, могут отражать системные изменения в молекулярных механизмах формирования нейронных сетей, происходящие при созревании и старении. Таким образом, изучение изменений экспрессии генов, регуляторов апоптоза и нейроглиогенеза при когнитивной активности необходимо как для понимания принципов работы нервной системы, так и для выявления потенциальных мишеней терапии нарушений внимания, обучения и памяти. Следует отметить, что проведение таких исследований предъявляет особые требования к валидности контрольных групп, поскольку активность целевых генов существенно изменяется при стрессовых воздействиях, являющихся компонентом любой модели обучения. Для исследования гиппокамповозависимой памяти широко используется модель водного лабиринта Морриса. Однако лишь в единичных работах проводился сравнительный анализ влияния стресса, вызванного принудительным плаванием животных в стохастическом режиме, и формирования пространственной памяти с возможностью избегания опасности. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что обучение в лабиринте Морриса вызывает сильный стресс, к которому, однако, с течением времени происходит привыкание. При этом различия в уровне экспрессии генов кортикотропин-рилизинг-гормона и его рецептора между обученными крысами и животными, подвергнутыми принудительному плаванию, были незначительными [25].

В другом исследовании, включавшем контроль на принудительное плавание, не было выявлено существенных различий между контрольными и обучавшимися крысами в уровне экспрессии немедленных ранних генов *c-Fos*, *Egr-1*, *Arc* [26]. Авторы высказывают предположение, что специфичные изменения экспрессии генов могут быть выявлены при анализе генов второй и последующих “волн”.

Ранее при изучении генов *Ascl1*, *S100A6* и *Casp3* в гиппокампе, фронтальной коре и мозжечке нами были показаны различия в характере влияния обучения и стресса принудительного плавания в лабиринте Морриса на уровень экспрессии этих генов, а также на профиль корреляций между показателями экспрессии в различных структурах [27]. На основании этих данных была выдвинута гипотеза о том, что стрессирующее воздействие в виде принудительного плавания повышает уровень экспрессии генов, кодирующих белки – регуляторы апоптоза, а специфичными изменениями, связанными с формированием пространственной памяти, являются снижение их экспрессии и повышение экспрессии генов, кодирующих стимуляторы нейро- и синаптогенеза.

Для проверки этой гипотезы в настоящем исследовании была поставлена цель провести сравнительную оценку влияния обучения и стресса на экспрессию более широкого, чем ранее, набора генов, включающего наряду с *Ascl1*, *S100A6* и *Casp3* гены *Bax*, *Apaf1* и *Bcl2*. В исследовании также использован обновленный протокол обучения

с повышением временных лимитов поиска платформы и числа проб в сеансах обучения. Это позволило несколько увеличить время принудительного плавания у животных группы активного контроля, что создает дополнительные возможности для дифференциации эффектов стресса и обучения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на взрослых крысах-самцах линии Вистар, полученных из питомника “Столбовая” Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства” России, массой 220 ± 20 г ($n = 36$). Животные содержались по 4–5 особей в клетках в стандартных условиях вивария со сменой темной и светлой фаз суток 12 / 12 ч при свободном доступе к корму и воде. Крыс случайным образом распределяли по трем экспериментальным группам: группа 1 – Интактные крысы ($n = 12$), группа 2 – Контроль ($n = 12$), 3-я группа – Обучение крысы, обучавшиеся в водном лабиринте ($n = 12$). Эксперименты выполнены с соблюдением ГОСТ 33215-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур) и ГОСТ 33216-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами).

Обучение в водном лабиринте

Водный лабиринт Морриса представлял собой круглый бассейн серого цвета диаметром 180 см, наполненный водой, имеющей температуру 21 °С, на высоту 40 см. Бассейн располагался в центре комнаты с большим количеством обстановочных стимулов [28]. В центре одного из квадрантов находилась скрытая под водой на глубине 2.0 см прозрачная круглая платформа диаметром 15 см. Животных погружали в воду в случайно расположенных точках возле стенки бассейна, время свободного поиска платформы составляло 120 с, а крыс, не нашедших платформу за это время, мягко направляли к ней. Время пребывания на платформе составляло 30 с, после чего животное помещали в отдельную клетку на 90 с. Обучение проводили в течение 4 дней по 5 проб в каждый из дней. С помощью программы Ethovision XT 8.5 (Noldus, Голландия) фиксировали время достижения платформы и пройденную дистанцию.

Животных из группы Контроля заставляли плавать в отсутствие платформы ежедневно в течение 4 дней (5 попыток в день). Протокол эксперимента был разработан таким образом, что временной профиль периодов принудительного плавания каждого животного из группы Контроля соответствовал таковому для одного, случайным образом поставленного ему в соответствие животного из группы Обучения, а интервал между пробами составлял 120 с.

Определение экспрессии генов

Через 24 ч после окончания поведенческих экспериментов животных каждой группы декапитировали, извлекали мозг и выделяли на холоде образцы церебральных структур: гиппокампа (координаты AP, от -2.0 до -7.0 ; L, ± 4.0 ; DV, от 1.8 до 4.0), фронтальной коры (ФК, координаты AP, от $+2.5$ до $+5.0$; L, 0 ± 4.0 ; DV, от 1.8 до 4.0) и мозжечка (координаты AP, от -9.0 до -15.0 ; L, ± 5.0 ; DV, от 1.1 до 7.0). Образцы сразу после выделения замораживали в жидком азоте. Для определения координат при выделении структур мозга использовали атлас мозга крыс [29].

Из выделенных структур мозга всех животных экстрагировали общую фракцию РНК с помощью реагента TRIzol (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом

производителя, применяя гомогенизатор DIAХ 100 (Heidolph, Германия), режим: 5000 об/мин в течение 15 с. Полученные препараты РНК очищали от примесей геномной ДНК, обрабатывая ферментом ДНКазой I в течение 30 мин при 37 °С в реакционном буфере (40 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 10 мМ MgSO₄, 1 мМ СаСl₂), а затем добавляли стоп-раствор (2 мМ этиленгликоль-тетрауксусная кислота, рН 8.0) и прогревали 10 мин при 65 °С (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, США). Концентрацию выделенной РНК определяли на флуориметре Qubit с применением Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя.

Для проведения обратной транскрипции 0.5 мкг выделенных образцов тотальной РНК из церебральных структур инкубировали с 2 мкл олиго-(dT)15 (10 мкМ) и 1 мкл (1 е.а./мкл) ингибитора РНКаз RiboCare (Promega, США) в течение 2 мин при +70 °С, после чего сразу помещали на лед. При этом 1 е.а. – это количество ингибитора РНКаз RiboCare, которое соответствует таковому в мкг и инактивирует 5 нг РНКазы А на 50%.

Обратную транскрипцию проводили в объеме 30 мкл в среде, содержащей (мМ) 10 Трис-НСl (рН 8.3), 25 KCl, 0.6 MgCl₂, 2 дитиотреитол, с добавлением 200 единиц ревертазы М-MLV (Promega, США) и 4 мкл dNTP (10 мМ) и последующей инкубацией в течение 1 ч 45 мин при 37 °С. Фермент затем инактивировали нагреванием до 95 °С в течение 5 мин. Полученную кДНК разводили деионизированной водой в 10 раз и хранили при –80 °С. В качестве отрицательного контроля вместо РНК использовали деионизированную воду.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили в объеме 25 мкл с использованием 1 мкл разведенной кДНК, 0.2 мкМ готовой смеси праймеров (SABiosciences, США) и готовой смеси qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия), однократный состав которой включал интеркалирующий краситель SYBR Green I, Taq-полимеразу с горячим стартом, 3 мМ MgCl₂, по 0.2 мМ каждого нуклеотидтрифосфата. Были использованы праймеры (“Евроген”, Россия), структуры которых приведены в табл. 1.

Использовали детектирующий амплификатор ДТпрайм (“ДНК-Технологии”, Россия). Программа амплификации: 94 °С – 1.5 мин; 50 циклов: денатурация при 94 °С – 30 с, отжиг праймеров при 64 °С – 15 с, элонгация при 72 °С – 30 с. Специфичность ПЦР-продуктов подтверждали проведением электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, окрашенном этидиумом бромидом; использовали маркер длин ДНК GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). В качестве референсного использовали ген β-актина для последующего расчета относительного уровня экспрессии изучаемых генов по методу 2^{-ΔCt} [30]. Затем показатели экспрессии в группах Обучения и Контроля нормировали по отношению к показателям Интактной группы, средние значения которых принимали за единицу.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для проведения полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени

Ген	Праймер	
	Прямой	Обратный
<i>ASCL1</i>	CTTCGCAGTCCCCTTCCTT	TCTCCTGCCATCCTGCTTCCAA
<i>S100A6</i>	TCATTGTCTGACGTGTGCTTCTAGC	ATCAAAGCCAAGGCCCCCAG
<i>Apa1</i>	GGCAAGTCCATCGAGGTGAT	CGAGCATGAGCCAAGCCT
<i>Bcl2</i>	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
<i>Bax</i>	AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT	TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA
<i>Casp3</i>	CGAGCTTGGAACGCGAAGA	CCAGTGCTCACAAGGTGGGT

Статистический анализ

Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США). С учетом размеров выборок и характера их распределения для анализа применяли следующие непараметрические методы: дисперсионный анализ с повторными измерениями Фридмана (Friedman ANOVA) при оценке динамики обучения в водном лабиринте группы Контроля и дисперсионный анализ Краскелла – Уоллиса с последующими парными сравнениями методом Манна – Уитни при сравнении показателей экспрессии генов. Тест Манна – Уитни применяли, кроме того, при сравнении пройденной дистанции и скорости плавания животных групп Контроля и Обучения. Вычисляли также ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика выполнения пространственного навыка в ходе обучения

Анализ показателей времени и пройденной дистанции до достижения скрытой платформы в группе Обучения с использованием непараметрического теста для зависимых переменных Friedman ANOVA показал, что значения этих параметров статистически значимо снижались в течение 4 дней обучения ($\text{Chi Sqr. } (N = 12, \text{df} = 3) > 28.10, p < 0.001$) (рис. 1a, b). Животные группы Контроля и Обучения не различались по средней скорости плавания ($11.8 \pm 1.4 \text{ см/с}$ и $12.6 \pm 0.9 \text{ см/с}$ соответственно, $Z = 1.01, p = 0.31$). Также ни в один из дней не было обнаружено различий между группами по показателю пройденной дистанции ($Z < 0.68, p > 0.69$, рис. 1b).

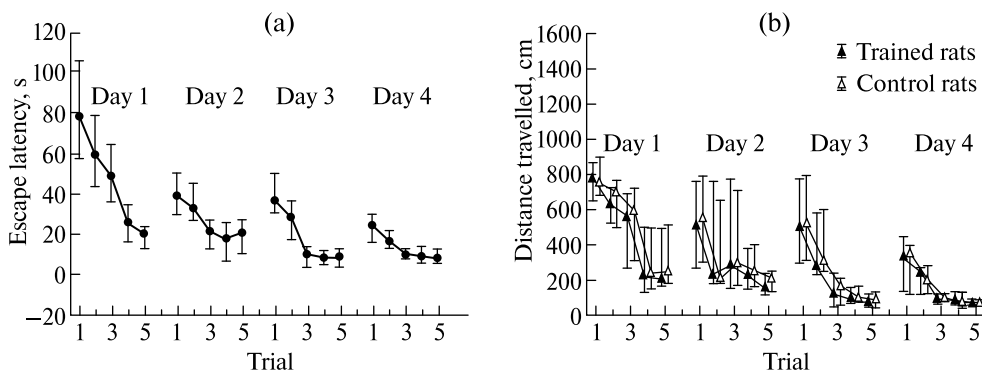


Рис. 1. (a) – Показатели времени достижения скрытой платформы в лабиринте Морриса у крыс из группы Обучения (и соответственно времени принудительного плавания в группе Контроля). (b) – Показатели дистанции до скрытой платформы в лабиринте Морриса у крыс из групп Обучения и Контроля. Приведены значения медиан, верхних и нижних квартилей.

Показатели экспрессии исследованных генов в гиппокампе животных разных групп

Тест Краскелла – Уоллиса выявил статистически значимые межгрупповые различия экспрессии всех исследованных генов, за исключением экспрессии гена *S100A6* в гиппокампе (табл. 2).

Таблица 2. Результаты анализа межгрупповых различий экспрессии исследованных генов с использованием теста Краскелла – Уоллиса

Ген	Структура		
	Гиппокамп	Фронтальная кора	Мозжечок
<i>Apafl</i>	H (2, N = 36) = 21.1, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 16.4, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 20.1, $p < 0.001$
<i>Bax</i>	H (2, N = 36) = 21.4, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 10.2, $p < 0.01$	H (2, N = 36) = 21.9, $p < 0.001$
<i>Bcl2</i>	H (2, N = 36) = 25.7, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 19.3, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 25.7, $p < 0.001$
<i>Casp3</i>	H (2, N = 36) = 7.1, $p = 0.046$	H (2, N = 36) = 13.5, $p < 0.01$	H (2, N = 36) = 11.2, $p < 0.01$
<i>SI00A6</i>	H (2, N = 36) = 4.1, $p = 0.329$	H (2, N = 36) = 11.9, $p < 0.01$	H (2, N = 36) = 11.1, $p < 0.01$
<i>Ascl1</i>	H (2, N = 36) = 22.2, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 17.6, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 17.7, $p < 0.001$

Анализ попарных различий между группами проводили с помощью теста Манна – Уитни. В гиппокампе экспрессия гена *Apafl* повышалась у животных группы Контроля по сравнению с Интактной группой ($Z = 2.88, p = 0.002$). У обученных животных этот показатель не демонстрировал отличий от уровня интактных крыс ($Z = 1.12, p = 0.31$) и был существенно ниже, чем в Контроле ($Z = 2.74, p = 0.006$), (рис. 2а). Сходный с *Apafl* профиль экспрессии в гиппокампе был выявлен для генов *Bax* (рис. 2б) и *Bcl2* (рис. 2с). Повышение этих показателей относительно Интактной группы наблюдалось только в группе Контроля ($Z = 2.90, p = 0.004$ и $Z = 3.02, p = 0.002$ соответственно), но не Обучения ($Z = 1.33, p = 0.29$ и $Z = 0.16, p = 0.94$ соответственно), при этом у обученных крыс они были статистически значимо ниже, чем в Контроле ($Z = 2.90, p = 0.004$ и $Z = 2.88, p = 0.004$ соответственно).

Экспрессия гена *Casp3* в гиппокампе была повышена по сравнению с интактными животными как у контрольных ($Z = 2.88, p = 0.004$), так и у обученных крыс ($Z = 2.40, p = 0.016$), однако в группе Обучения этот показатель был существенно ($Z = 2.56, p = 0.010$) ниже, чем в Контроле (рис. 2д). Межгрупповых различий в уровне экспрессии *SI00A6* в гиппокампе выявлено не было ($Z < 0.64, p > 0.52$), (рис. 2е).

Экспрессия гена *Ascl1* в гиппокампе была статистически значимо выше интактного уровня (рис. 2ф) как в группе Контроля ($Z = 2.56, p = 0.010$), так и в группе Обучения ($Z = 2.90, p = 0.004$). При этом обученные животные демонстрировали повышенный уровень активности гена в сравнении с контрольными ($Z = 2.18, p = 0.038$).

Показатели экспрессии исследованных генов во фронтальной коре животных разных групп

Во ФК экспрессия гена *Apafl* повышалась у контрольных животных (рис. 3а) по сравнению с Интактной ($Z = 1.86, p = 0.063$), при этом у обученных животных ее уровень не демонстрировал отличий от уровня интактных крыс ($Z = 1.12, p = 0.31$) и был существенно ниже, чем в Контроле ($Z = 2.29, p = 0.022$).

Экспрессия гена *Bax* во ФК контрольных животных была существенно ($Z = 2.65, p = 0.008$) выше, чем у интактных (рис. 3б); у обученных животных ее уровень не демонстрировал отличий от такового у интактных крыс ($Z = 0.85, p = 0.39$) и на уровне тенденции ($Z = 1.86, p = 0.063$) был ниже, чем в Контроле.

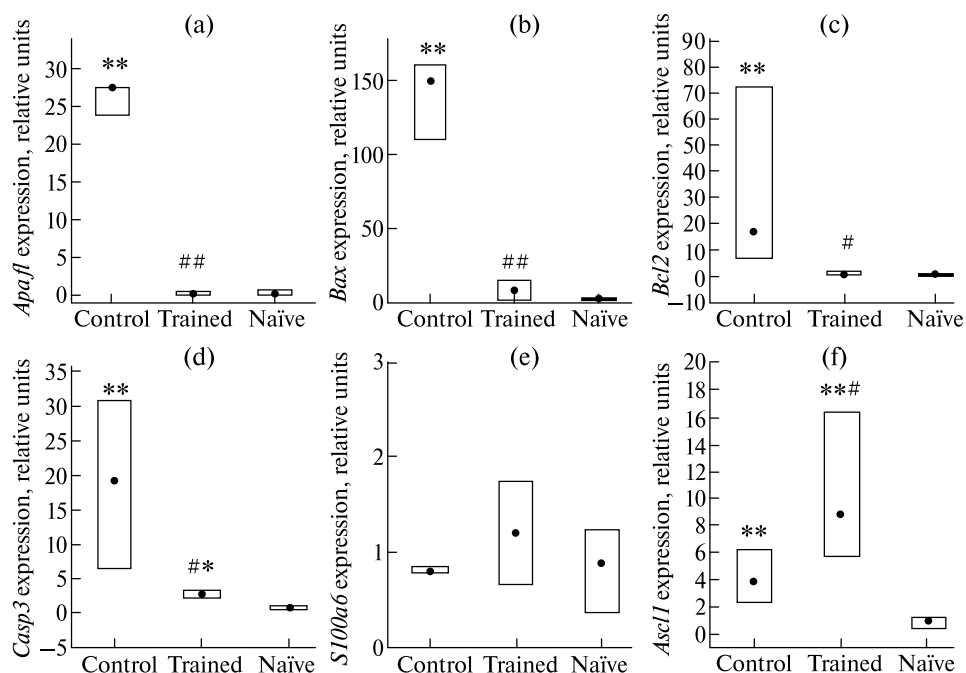


Рис. 2. Показатели экспрессии исследованных генов в гиппокампе животных разных групп. Приведены значения медиан, верхних и нижних квартилей.

* $-p < 0.05$, ** $-p < 0.01$ по сравнению с Интактной группой, # $-p < 0.05$, ## $-p < 0.01$ по сравнению с Контролем.

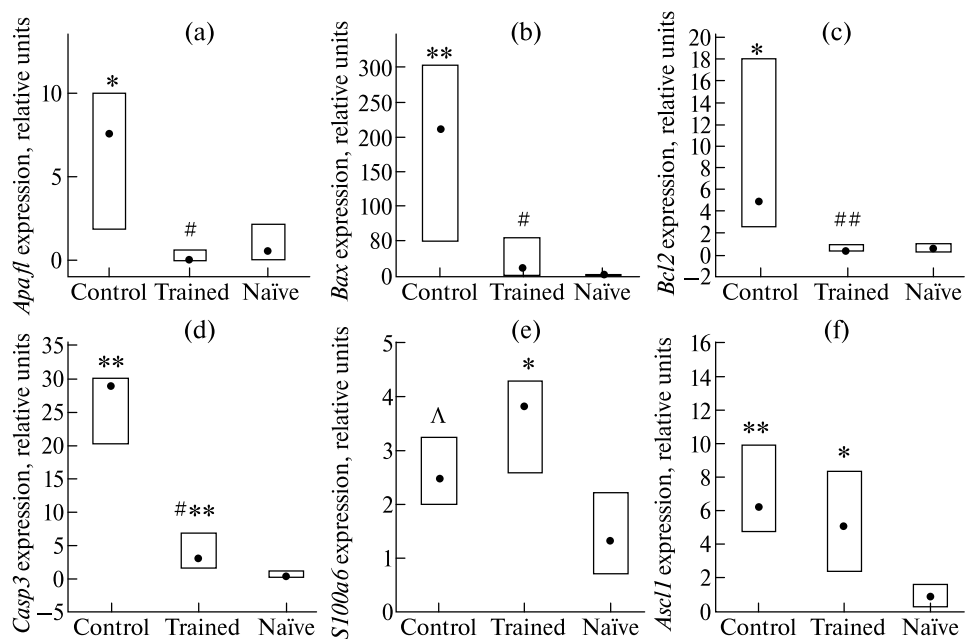


Рис. 3. Показатели экспрессии исследованных генов во фронтальной коре животных разных групп. Приведены значения медиан, верхних и нижних квартилей.

* $-p < 0.05$, ** $-p < 0.01$ по сравнению с Интактной группой, # $-p < 0.05$, ## $-p < 0.01$ по сравнению с Контролем.

Профиль межгрупповых различий в экспрессии *Bcl2* во ФК был сходным с таковым для *Apafl*: наблюдалось существенное возрастание ее в Контроле ($Z = 2.37, p = 0.018$), отсутствие различий между обученными и интактными животными и снижение по сравнению с Контролем у обученных крыс ($Z = 2.88, p = 0.004$), (рис. 3с).

Как и в гиппокампе, экспрессия *Casp3* во ФК была повышена по сравнению с интактными животными и у контрольных ($Z = 3.00, p = 0.003$), и у обученных крыс ($Z = 2.10, p = 0.043$), однако в группе Обучения этот показатель был существенно ($Z = 2.88, p = 0.004$) ниже, чем в Контроле (рис. 3д).

Экспрессия *S100A6* во ФК у контрольных крыс демонстрировала тенденцию к повышению относительно уровня Интактной группы ($Z = 1.70, p = 0.08$). У обученных животных такое повышение было статистически значимо ($Z = 2.27, p = 0.02$), (рис. 3е), при этом отличий от Контрольной группы выявлено не было.

Экспрессия гена *Ascl1* во ФК была статистически значимо выше интактного уровня (рис. 3ф) в группе Контроля ($Z = 2.64, p = 0.008$) и в группе Обучения ($Z = 2.34, p = 0.019$). При этом различий между контрольными и обученными крысами выявлено не было ($Z = 0.85, p = 0.39$).

Показатели экспрессии исследованных генов в мозжечке животных разных групп

В мозжечке экспрессия *Apafl* была повышена у животных Контрольной группы относительно интактных животных ($Z = 2.84, p = 0.004$) и снижена у обученных крыс по сравнению с интактными ($Z = 2.19, p = 0.028$) и с контрольными ($Z = 2.88, p = 0.002$) животными (рис. 4а). По сравнению с Интактной группой экспрессия *Vax* была повышена как у контрольных ($Z = 2.65, p = 0.008$), так и у обученных ($Z = 2.34, p = 0.019$) животных (рис. 4б), однако у обученных крыс этот показатель был ниже, чем в Контроле ($Z = 2.29, p = 0.022$). Экспрессия *Bcl2* в мозжечке была повышена у контрольных крыс ($Z = 2.69, p = 0.007$) по сравнению с интактными животными (рис. 4с), в то время как между интактными и обученными крысами различий не наблюдалось ($Z = 0.36, p = 0.43$). В группе Обучения экспрессия *Bcl2* была значимо ниже, чем в Контроле ($Z = 2.73, p = 0.004$).

Экспрессия гена *Casp3* не различалась у контрольных и интактных животных ($Z = 1.29, p = 0.2$), однако была снижена в мозжечке обученных крыс по сравнению с показателями Интактной ($Z = 2.88, p = 0.003$) и Контрольной ($Z = 2.00, p = 0.046$) групп (рис. 4д). Экспрессия гена *S100A6* была снижена у контрольных животных относительно показателей интактных крыс ($Z = 2.08, p = 0.038$), (рис. 4е). У обученных крыс этот показатель не отличался от уровня Интактной группы ($Z = 0.21, p = 0.83$) и был существенно ($Z = 2.57, p = 0.010$) выше, чем в группе Контроль. Экспрессия гена *ASCL1* в мозжечке у контрольных крыс не отличалась от уровня Интактной группы ($Z = 0.05, p = 0.99$), а у обученных крыс этот показатель был существенно выше ($Z > 2.13, p < 0.033$), чем у интактных особей и контрольных животных (рис. 4ф).

Профили корреляционных связей между исследованными показателями

Анализ профилей корреляционных связей между показателями экспрессии изученных генов показал, что у интактных животных во всех трех исследованных структурах наблюдаются корреляции экспрессии индукторов пролиферации и дифференцировки генов *Ascl1* и *S100A6* с активностью проапоптотических генов. В Контроле такие связи отсутствуют, при этом появляются положительные связи между экспрессией *Vax* и *Bcl2*, которых не было в Интактной группе.

У животных из группы Обучения была выявлена только положительная корреляция между показателями экспрессии *Ascl1* и *Casp3* в гиппокампе (рис. 5).

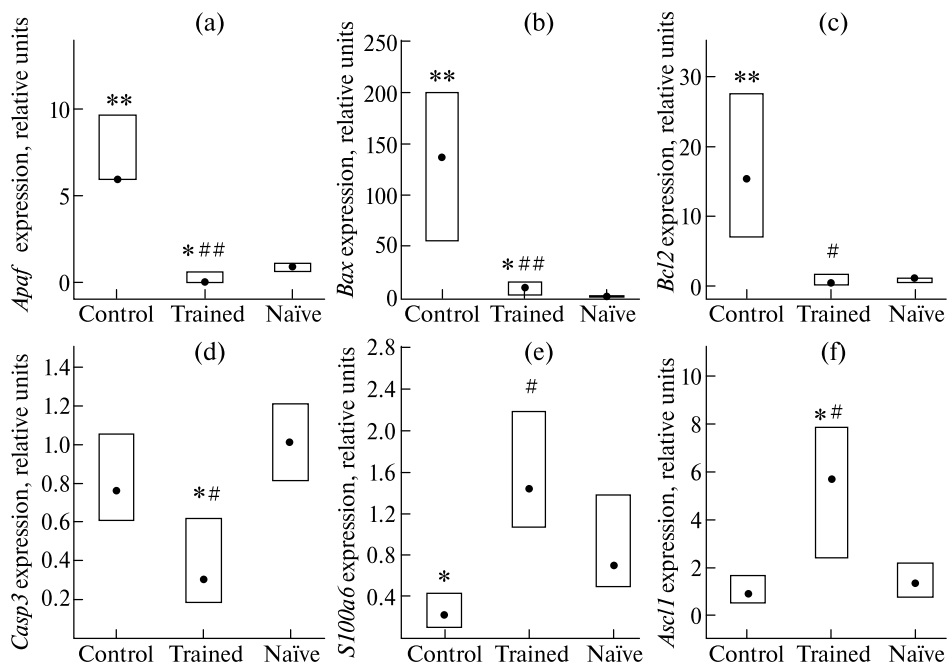


Рис. 4. Показатели экспрессии исследованных генов в мозжечке животных разных групп. Приведены значения медиан, верхних и нижних квартилей.

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с Интактной группой, # – $p < 0.05$, ### – $p < 0.01$ по сравнению с Контролем.

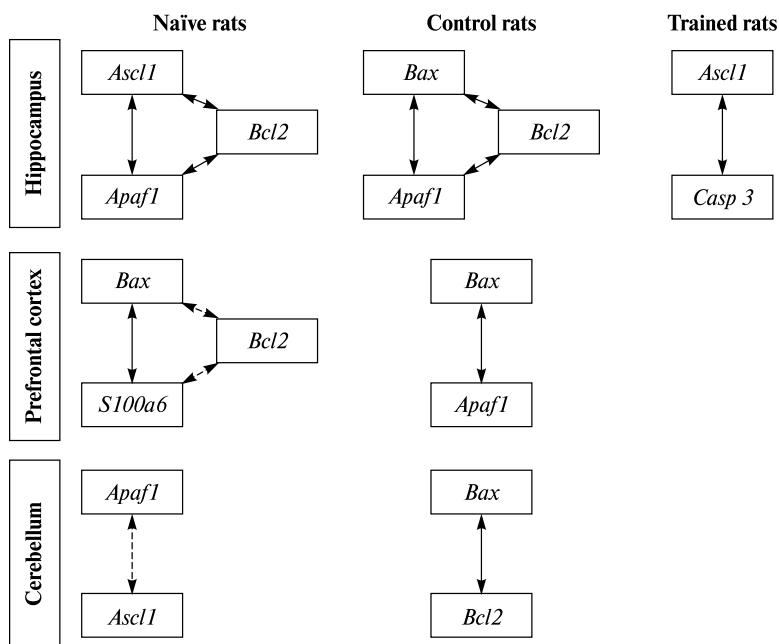


Рис. 5. Корреляционные связи экспрессии исследованных генов в структурах мозга у крыс различных групп. Приведены корреляции со значениями $R > 0.85$, $p < 0.01$.

↔ – положительные корреляции, прерывистые стрелки – отрицательные корреляции.

В группе Контроля была обнаружена негативная корреляция суммарного времени плавания с экспрессией *Sl00A6* ($R = -0.78$, $t = 2.84$, $p = 0.036$) и позитивная – с экспрессией *Apafl* ($R = 0.94$, $t = 5.56$, $p = 0.004$), *Bax* ($R = 0.93$, $t = 5.02$, $p = 0.005$), *Bcl2* ($R = 0.95$, $t = 5.0$, $p = 0.004$) в гиппокампе. Также у контрольных животных наблюдалась положительная корреляция времени плавания в 4-й день эксперимента и суммарного времени плавания за 4 дня с экспрессией *Casp3* ($R = 0.89$, $t = 4.43$, $p = 0.007$ и $R = 0.86$, $t = 3.72$, $p = 0.014$ соответственно) во ФК.

В группе Обучения выявлены отрицательные корреляции среднего времени достижения платформы в 3-й и в 4-й дни с экспрессией *Ascl1* в мозжечке ($R = -0.89$, $t = 3.81$, $p = 0.019$ и $R = -0.82$, $t = 2.96$, $p = 0.042$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленном исследовании проведен сравнительный анализ изменений экспрессии генов, кодирующих белки – регуляторы процессов нейроглиогенеза и апоптоза, в различных структурах мозга животных после формирования пространственной памяти в лабиринте Морриса и после стрессового воздействия в виде принудительного плавания, осуществленного по протоколу, соответствующему временному режиму поиска платформы у обучавшихся животных (табл. 3).

Таблица 3. Схематичное изображение изменений экспрессии в структурах мозга контрольных и обученных крыс

Гены	Гиппокамп			Фронтальная кора			Мозжечок		
	Контроль/ Нативные	Обучение/ Нативные	Обучение/ Контроль	Контроль/ Нативные	Обучение/ Нативные	Обучение/ Контроль	Контроль/ Нативные	Обучение/ Нативные	Обучение/ Контроль
<i>Apafl</i>	↑	↔	↓	↑	↔	↓	↑	↓	↓
<i>Bax</i>	↑	↔	↓	↑	↔	↓	↑	↑	↓
<i>Bcl2</i>	↑	↔	↓	↑	↔	↓	↑	↔	↓
<i>Casp3</i>	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↔	↓	↓
<i>Sl00A6</i>	↔	↔	↔	↑	↑	↔	↓	↔	↑
<i>Ascl1</i>	↑	↑	↑	↑	↑	↔	↔	↑	↑

Стрелка вверх – повышение; стрелка вниз – понижение; стрелка двусторонняя – горизонтальная – отсутствие отличий; стрелка прерывистая вниз – тенденция к снижению ($0.05 < p < 0.1$); стрелка прерывистая вверх ($0.05 < p < 0.1$) – тенденция к повышению.

Было обнаружено, что принудительное плавание без возможности избегания приводит к повышению экспрессии проапоптотических генов *Apafl*, *Bax* и *Casp3* в гиппокампе и фронтальной коре, а также *Apafl* и *Bax* в мозжечке. Существенно, что при этом во всех исследованных структурах наблюдается также повышение экспрессии гена *Bcl2*, продукт активности которого подавляет апоптоз.

Данные о повышении экспрессии гена *Casp3* в гиппокампе и фронтальной коре контрольных животных и выявленные корреляции ее с длительностью принудительного плавания в целом согласуются с полученными нами ранее результатами [27].

В литературе также имеются сведения о стимулирующем влиянии стресса на активность гена *Casp3* [31].

Возрастание экспрессии гена *Bax* в гиппокампе и коре П ФК мозга под влиянием хронических стрессовых воздействий было показано ранее [32], кроме того, обнаружено, что экспрессия гена *Bax* повышается в течение 4–7 дней после однократного стрессового воздействия, включающего иммобилизацию и принудительное плавание [33, 34]. Примечательно, что в этих работах также наблюдали повышение экспрессии гена *Bcl2*. В нашем исследовании положительные корреляции между экспрессией *Bcl2* и *Bax* наблюдались в гиппокампе и мозжечке контрольных (стрессированных) крыс, но не у интактных животных. Совокупность наших данных и сведений, имеющих в литературе, позволяет рассматривать повышение экспрессии *Bcl2* у контрольных животных как элемент компенсаторных механизмов в условиях индукции проапоптотических изменений под воздействием стресса [33, 34]. Подобное компенсаторное повышение также можно наблюдать при воздействии токсинов и при развитии нейродегенеративных процессов [35–37].

Повышение в мозге активности гена *Apafl*, одного из ключевых факторов апоптоза, в условиях эмоционального стресса и ассоциация его экспрессии с длительностью стрессирующего воздействия (принудительного плавания) показаны нами впервые.

Так же как и в исследовании, проведенном ранее [27], в данной работе обнаружено снижение экспрессии *Casp3* у обученных животных по сравнению с Контролем. Аналогичные различия между крысами, подвергнутыми принудительному плаванию, и животными со сформированным пространственным навыком наблюдались и при сравнении экспрессии генов *Apafl*, *Bax* и *Bcl2* во всех исследованных структурах. Эти результаты позволяют предположить, что процесс обучения с возможностью избегания угрожающей ситуации (получение подкрепления) снижает интенсивность проапоптотических процессов, вызванных ситуацией принудительного плавания. Согласно данным литературы, процедура обучения в водном лабиринте Морриса приводит к повышению уровня сывороточного кортикостерона, что свидетельствует о ее стрессогенном воздействии [38]. К сожалению, в литературе отсутствуют исследования, посвященные сравнительному анализу показателей стресса при обучении пространственному навыку в лабиринте Морриса и после принудительного плавания в сопоставимом временном режиме. Вместе с тем при использовании другой оригинальной модели пространственного обучения показано, что когнитивная активность повышает такой маркер эмоциональной устойчивости, как отношение дегидроэпиандростерон ДГЭА/кортикостерон в сыворотке крови крыс [39]. Показано также, что ДГЭА стимулирует нейрогенез в зрелом гиппокампе и повышает выживаемость новых клеток, в том числе в условиях повышенного уровня кортикостерона [40]. Можно предположить, что изменения соотношения кортикостероидов в мозге являются одним из механизмов наблюдаемых антиапоптотических эффектов когнитивной активности в стрессовых ситуациях, однако в целом этот феномен нуждается в дальнейших исследованиях на системном уровне.

Следует отметить, что экспрессия гена *Casp3* в гиппокампе и П ФК обученных крыс, хотя и была снижена по сравнению с контролем, однако статистически значимо превышала уровень, наблюдавшийся у интактных животных. Согласно данным литературы, каспаза-3 играет особую роль в таких механизмах синаптической пластичности, как селекция синапсов и регуляция количества синаптических везикул, что обусловлено особенностями в регуляции ее активности и локализации в нейронах [41]. Показано также вовлечение каскада Bad-Bax-Caspase3 в молекулярные механизмы формирования условного страха [42].

Существенно, что у обученных животных, в отличие от контрольных, не наблюдалось корреляций активности генов *Bax*, *Bcl2*, *Apafl* и *Casp3* с длительностью плавания. Эти различия являются дополнительным подтверждением антиапоптотического

влияния фактора обучения и негативного подкрепления (возможности избегания) на экспрессию генов в условиях умеренного стрессового воздействия.

Наблюдаемый после обучения и принудительного плавания профиль изменений экспрессии генов *S100A6* и *Ascl1*, продукты которых вовлечены в регуляцию нейроглиогенеза, существенно отличался от такового для генов, регулирующих апоптоз.

В частности, после принудительного плавания у животных контрольной группы не наблюдалось изменений экспрессии *S100A6* в гиппокампе и ПФК, а в мозжечке наблюдалось ее снижение по сравнению с Интактной группой животных. В то же время у обученных животных во ПФК и гиппокампе наблюдалась активация экспрессии гена *S100A6* относительно уровня контрольных крыс. В литературе имеются сведения об экспрессии гена *S100A6* стволовыми клетками – предшественниками нейронов и глии зрелого гиппокампа [18], а также стволовыми клетками субэпендимальной нейрогенной зоны [19], в том числе мигрирующими через ростральную систему миграции в обонятельную луковицу и, возможно, во ПФК [43]. Кроме того, *S100A6* экспрессируется зрелыми нейрональными и глиальными клетками различных отделов мозга и оказывает множественные влияния на их функции [44]. В исследовании, посвященном оценке влияния 4-дневного стресса на содержание белка *S100A6* в мозге мышей, обнаружено его снижение в мозжечке, гиппокампе и дугообразном ядре гипоталамуса [45]. Полученные этими авторами данные о снижении *S100A6* в мозжечке согласуются с нашими результатами. В то же время использованное нами стрессовое воздействие было более мягким, с этим может быть связано отсутствие у контрольных животных снижения активности гена *S100A6* в гиппокампе. Тем не менее нами была выявлена отрицательная корреляция экспрессии гена *S100A6* в гиппокампе контрольных крыс и времени принудительного плавания, указывающая на связь между продолжительностью стрессового воздействия и снижением активности гена.

Следует отметить, что белок *S100A6* рассматривают в качестве маркера нейродегенеративных процессов, однако значительное количество данных позволяет предположить, что его повышение связано с компенсаторными механизмами, например, в случае болезни Альцгеймера со связыванием Zn^{2+} и деградацией амилоидных бляшек [46]. Кроме того, показано, что черепно-мозговая травма приводит к снижению экспрессии *S100A6* в гиппокампе крыс, которая возвращается к нормальному уровню через 14 дней после повреждения, параллельно с восстановлением нарушенной пространственной памяти [47]. Таким образом, совокупность сведений литературы и полученных нами данных указывает на вовлеченность гена *S100A6* в обеспечение когнитивных функций, и механизмы этого участия должны стать предметом дальнейших исследований. Тот факт, что возрастания экспрессии гена *S100A6* при обучении не наблюдалось в гиппокампе, позволяет высказать предположение, что роль этого белка в молекулярных механизмах пространственной памяти связана преимущественно с его влиянием на функциональную активность зрелых клеток нервной ткани, в том числе на процессы синаптогенеза.

Влияние группы на экспрессию гена *Ascl1* существенно различалось в исследованных отделах мозга. Наиболее выраженные эффекты наблюдались в гиппокампе – структуре, включающей одну из основных нейрогенных зон зрелого мозга и вовлеченной как в механизмы пространственной памяти, так и в обеспечение адаптивных реакций на стрессовые воздействия [48]. Из всех исследованных генов экспрессия гена *Ascl1* в гиппокампе демонстрировала уникальный паттерн изменений таким образом, что ее повышение наблюдалось у животных с опытом принудительного плавания и было еще более значительным в группе обучения. Это позволяет предположить, что рост экспрессионной активности гена *Ascl1* у животных группы контроля отражает адаптивный компонент реакции на умеренные стрессовые воздействия. В определенной степени подтверждением такого предположения могут служить данные литературы о том, что среди стволовых клеток зрелого гиппокампа наибольшая устойчивость

к воздействию жесткого стресса (6-часовая иммобилизация в течение 7 дней) наблюдается в популяции, экспрессирующей ген *Ascl1* [49]. Возрастание экспрессии гена *Ascl1* в гиппокампе крыс наблюдалось также после физической нагрузки (бег в тредбане 15 мин/день, 7 дней) [50]. В то же время превышение транскрипционной активности гена *Ascl1* в гиппокампе обученных животных над контрольным уровнем свидетельствует об участии кодирующего данным геном белка *Ascl1* в механизмах долговременной пространственной памяти. Возможно, что наблюдаемое при обучении повышение экспрессии *Ascl1* в гиппокампе отражает активацию процессов нейрогенеза, а специфичная для группы Обучения корреляция между активностью *Ascl1* и *Casp3* может отражать сопряженность механизмов образования и селекции новых нейронов как одного из факторов дальнейшей консолидации/модификации пространственного навыка.

Во ФК принудительное плавание вызывало повышение экспрессии *Ascl1*, при этом обучение не приводило к ее изменению относительно уровня, наблюдавшегося у стрессированных животных контрольной группы. Согласно данным литературы, в коре больших полушарий зрелого мозга в состоянии физиологического покоя активность транскрипционного фактора *Ascl1* мала [51]. Вместе с тем показано, что ишемические повреждения вызывают повышение числа клеток, экспрессирующих *Ascl1* [52, 53]. Таким образом, отсутствие различий между обученными и контрольными животными с учетом литературных данных о значительном влиянии стресса на экспрессию генов после обучения в лабиринте Морриса [25, 26] позволяет предположить, что, в отличие от гиппокампа, повышение экспрессии гена *Ascl1* во фронтальной коре не свидетельствует о вовлечении вновь образованных клеток этого отдела мозга в механизмы когнитивной активности.

В мозжечке повышение активности гена *Ascl1* наблюдалось только у обучавшихся животных. Согласно современным представлениям, нейрогенез в зрелом мозжечке млекопитающих в состоянии физиологического покоя не детектируется. Несмотря на то что стволовые клетки, меченные бромдезоксисуридином, выявляются в этой структуре мозга в достаточном количестве, большинство из них находятся в состоянии покоя и лишь немногие являются *Ascl1*- или нестин-позитивными [54]. Вместе с тем даже внешние по отношению к этой структуре воздействия (такие, как повреждение периферического нерва) вызывают активацию нейрогенеза с повышением экспрессии регулирующих его генов [55]. Результаты данного исследования свидетельствуют, что формирование пространственной памяти вызывает активацию регулятора нейрогенеза гена *Ascl1*. Более того, повышенная экспрессия гена *Ascl1* в мозжечке демонстрирует ассоциацию с высоким уровнем выполнения пространственного навыка на стадии его закрепления (3-й и 4-й дни), что подтверждает специфичность вклада транскрипционной активности гена в механизмы автоцентрической стадии формирования пространственного навыка, связанной с регуляцией собственных движений в условиях сформированной карты пространства [56].

Совокупность полученных результатов свидетельствует в пользу правомерности высказанной гипотезы о том, что формирование пространственной памяти снижает экспрессию проапоптотических генов, возрастающую в условиях стрессового воздействия, и, напротив, стимулирует транскрипционную активность генов, кодирующих белки – регуляторы нейролигенеза и синаптогенеза, в мозговых структурах, вовлеченных в формирование следа памяти. В отличие от экспрессии “немедленных ранних” генов, для которой не было обнаружено существенных различий между группами принудительного плавания и обучения [26], изменения экспрессии изученных в настоящей работе “поздних” генов при формировании пространственной памяти продемонстрировали достаточно высокий уровень специфичности. Развитие исследований, направленных на выявление более полного комплекса генов, демонстрирующих такую специфичность, и механизмов, ее обеспечивающих, представляет интерес как для расширения представлений о молекулярных основах интегративной деятельности

ЦНС, так и для определения мишеней фармакологической коррекции когнитивных нарушений.

Ограничения при интерпретации результатов проведенного исследования связаны с тем, что была проведена оценка только транскрипционной активности генов без одновременного исследования содержания их белковых продуктов и их биологической активности (в частности, протеазной активности каспазы-3). Следует отметить, что для получения этих данных необходимо привлечение других подходов и методов в связи с ограниченным количеством биологического материала. Такое исследование может быть проведено в дальнейшем и направлено на комплексную оценку наиболее значимых генов и их белковых продуктов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея статьи (А. М. Р., М. А. Г.), проведение экспериментов (А. М. Р., З. И. С., М. А. Г.), анализ данных (А. М. Р., З. И. С.), подготовка черновика статьи (А. М. Р., М. А. Г.), редактирование и подготовка финальной версии (М. А. Г., З. И. С.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Федерального исследовательского центра оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий (протокол № 06 от 18.03.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chang WL, Hen R* (2024) Adult Neurogenesis, Context Encoding, and Pattern Separation: A Pathway for Treating Overgeneralization. *Adv Neurobiol* 38: 163–193.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-62983-9_10
2. *Forrest MP, Parnell E, Penzes P* (2018) Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 19(4): 215–234.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2018.16>
3. *Pumo GM, Kitazawa T, Rijli FM* (2022) Epigenetic and Transcriptional Regulation of Spontaneous and Sensory Activity Dependent Programs During Neuronal Circuit Development. *Front Neur Circ* 16: 911023.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2022.911023>
4. *Petanjek Z, Banovac I, Sedmak D, Hladnik A* (2023) Dendritic Spines: Synaptogenesis and Synaptic Pruning for the Developmental Organization of Brain Circuits. *Advanc Neurobiol* 34: 143–221.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-36159-3_4
5. *Gomazkov OA* (2016) Neurogenesis as an organizing function of the adult brain: is there enough evidence? *Biol Bull Rev* 6(6): 457–472.
<https://doi.org/10.1134/S2079086416060013>

6. Šimončičová E, Henderson Pekarik K, Vecchiarelli HA, Lauro C, Maggi L, Tremblay ME (2024) Adult Neurogenesis, Learning and Memory. *Advanc Neurobiol* 37: 221–242.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-55529-9_13
7. Jurkowski MP, Bettio LK, Woo E, Patten A, Yau SY, Gil-Mohapel J (2020) Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Front Cell Neurosci* 14: 576444.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.576444>
8. Chang WL, Hen R (2024) Adult Neurogenesis, Context Encoding, and Pattern Separation: A Pathway for Treating Overgeneralization. *Advanc Neurobiol* 38: 163–193.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-62983-9_10
9. Gomazkov OA (2019) Astrocytes as the elements of the regulation of higher brain functions. *Neurochem J* 13(4): 313–319.
<https://doi.org/10.1134/s1819712419030073>
10. Machado-Santos AR, Loureiro-Campos E, Patrício P, Araújo B, Alves ND, Mateus-Pinheiro A, Correia JS, Morais M, Bessa JM, Sousa N, Rodrigues AJ, Oliveira JF, Pinto L (2022) Beyond New Neurons in the Adult Hippocampus: Imipramine Acts as a Pro-Astroglialogenic Factor and Rescues Cognitive Impairments Induced by Stress Exposure. *Cells* 11(3): 390.
<https://doi.org/10.3390/cells11030390>
11. Toda T, Parylak SL, Linker SB, Gage FH (2019) The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry* 24(1): 67–87.
<https://doi.org/10.1038/s41380-018-0036-2>
12. Lambertus M, Geiseler S, Morland C (2024) High-intensity interval exercise is more efficient than medium intensity exercise at inducing neurogenesis. *J Physiol* 602(24): 7027–7042.
<https://doi.org/10.1113/JP287328>
13. Ghayourbabaie F, Farzin M, Keshavarzi Z, Saburi E, Khodadadegan MA, Hajali V (2025) Anxiety-like behaviors in rats exposed to the single and combined program of running exercise and environmental enrichment. *Neuroreport* 36(1): 31–38.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000002117>
14. Samoilova EM, Baklaushev VP, Belopasov VV (2021) Transcriptional factors of direct neuronal reprogramming in ontogenesis and ex vivo. *Mol Biol* 55(5): 645–669.
<https://doi.org/10.1134/S0026893321040087>
15. Khaspekov LG, Frumkina LE (2023) Molecular mechanisms of astrocyte involvement in synaptogenesis and brain synaptic plasticity. *Biochemistry (Moscow)* 88(4): 502–514.
<https://doi.org/10.1134/s0006297923040065>
16. Abashkin DA, Karpov DS, Kurishev AO, Marilovtseva EV, Golimbet VE (2023) ASCL1 Is Involved in the Pathogenesis of Schizophrenia by Regulation of Genes Related to Cell Proliferation, Neuronal Signature Formation, and Neuroplasticity. *Int J Mol Sci* 24(21): 15746.
<https://doi.org/10.3390/ijms242115746>
17. Soares DS, Homem CCF, Castro DS (2022) Function of Proneural Genes Ascl1 and Asense in Neurogenesis: How Similar Are They? *Front Cell Development Biol* 10: 838431.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.838431>
18. Yamada J, Jinno S (2014) *S100A6* (calcyclin) is a novel marker of neural stem cells and astrocyte precursors in the subgranular zone of the adult mouse hippocampus. *Hippocampus* 24(1): 89–101.
<https://doi.org/10.1002/hipo.22207>
19. Kjell J, Fischer-Sternjak J, Thompson AJ, Friess C, Sticco MJ, Salinas F, Cox J, Martinelli DC, Ninkovic J, Franze K, Schiller HB, Götz M (2020) Defining the Adult Neural Stem Cell Niche Proteome Identifies Key Regulators of Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell* 26(2): 277–293.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.002>
20. Leśniak W, Filipiek A (2023) *S100A6* Protein-Expression and Function in Norm and Pathology. *Int J Mol Sci* 24(2): 1341.
<https://doi.org/10.3390/ijms24021341>
21. Gu Q, Duan K, Petralia RS, Wang YX, Li Z (2022) BAX regulates dendritic spine development via mitochondrial fusion. *Neurosci Res* 182: 25–31.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.06.002>
22. Li Z, Sheng M (2012) Caspases in synaptic plasticity. *Mol Brain* 5: 15.
<https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-15>

23. Kudryashova IV, Kudryashov IE, Gulyaeva NV (2006) Long-term potentiation in the hippocampus in conditions of inhibition of caspase-3: analysis of facilitation in paired-pulse stimulation. *Neurosci Behav Physiol* 36(8): 817–824.
<https://doi.org/10.1007/s11055-006-0092-y>
24. Jiang W, Chen L, Zheng S (2021) Global Reprogramming of Apoptosis-Related Genes during Brain Development. *Cells* 10(11): 2901.
<https://doi.org/10.3390/cells10112901>
25. Aguilar-Valles A, Sánchez E, de Gortari P, Balderas I, Ramírez-Amaya V, Bermúdez-Rattoni F, Joseph-Bravo P (2005) Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* 82(5-6): 306–319.
<https://doi.org/10.1159/000093129>
26. Carter SD, Mifsud KR, Reul JM (2015) Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training. *Front Behav Neurosci* 9: 156.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00156>
27. Gruden MA, Storozheva ZI, Sewell RD, Kolobov VV, Sherstnev VV (2013) Distinct functional brain regional integration of Casp3, Ascl1 and *S100A6* gene expression in spatial memory. *Behav Brain Res* 252: 230–238.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.024>
28. Terry AV, Jr (2009) Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In: Buccafusco (Ed), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis.
29. Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition. Acad Press. San Diego.
30. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocol* 3(6): 1101–1108.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
31. Pei H, Shen H, Bi J, He Z, Zhai L (2024) Gastrodin improves nerve cell injury and behaviors of depressed mice through Caspase-3-mediated apoptosis. *CNS Neurosci Therap* 30(3): e14444.
<https://doi.org/10.1111/cns.14444>
32. Parul MA, Singh S, Singh S, Tiwari V, Chaturvedi S, Wahajuddin M, Palit G, Shukla S (2021) Chronic unpredictable stress negatively regulates hippocampal neurogenesis and promote anxious depression-like behavior via upregulating apoptosis and inflammatory signals in adult rats. *Brain Res Bull* 172: 164–179.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.04.017>
33. Li Y, Han F, Shi Y (2013) Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Mol Neurosci* 51(1): 127–137.
<https://doi.org/10.1007/s12031-013-9965-z>
34. Li X, Han F, Liu D, Shi Y (2010) Changes of Bax, Bcl-2 and apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. *Neurol Res* 32(6): 579–586.
<https://doi.org/10.1179/016164110X12556180206194>
35. Ahmadian N, Mahmoudi J, Talebi M, Molavi L, Sadigh-Eteghad S, Rostrup E, Ziaee M (2018) Sleep deprivation disrupts striatal anti-apoptotic responses in 6-hydroxy dopamine-lesioned parkinsonian rats. *Iran J Basic Med Sci* 21(12): 1289–1296.
<https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.28546.6919>
36. Niu Q, Yang Y, Zhang Q, Niu P, He S, Di Gioacchino M, Conti P, Boscolo P (2007) The relationship between Bcl-gene expression and learning and memory impairment in chronic aluminum-exposed rats. *Neurotox Res* 12(3): 163–169.
<https://doi.org/10.1007/BF03033913>
37. Miguel-Hidalgo JJ, Paul IA, Wanzo V, Banerjee PK (2012) Memantine prevents cognitive impairment and reduces Bcl-2 and caspase 8 immunoreactivity in rats injected with amyloid β 1-40. *Eur J Pharmacol* 692(1–3): 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.07.032>
38. Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP (2009) Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 198(1): 247–251.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>

39. Crawford LE, Knouse LE, Kent M, Vavra D, Harding O, LeServe D, Fox N, Hu X, Li P, Glory C, Lambert KG (2020) Enriched environment exposure accelerates rodent driving skills. *Behav Brain Res* 378: 112309.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112309>
40. Karishma KK, Herbert J (2002) Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci* 16(3): 445–453.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02099.x>
41. Györfy BA, Kun J, Török G, Bulyáki É, Borhegyi Z, Gulyácssy P, Kis V, Szocsics P, Micsonai A, Matkó J, Drahos L, Juhász G, Kékesi KA, Kardos J (2018) Local apoptotic-like mechanisms underlie complement-mediated synaptic pruning. *Proceed Natl Acad Sci U S A* 115(24): 6303–6308.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1722613115>
42. Gu Q, Jiao S, Duan K, Wang YX, Petralia RS, Li Z (2021) The BAD-BAX-Caspase-3 Cascade Modulates Synaptic Vesicle Pools via Autophagy. *J Neurosci* 41(6): 1174–1190.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-20.2020>
43. De Bastiani MA, Bellaver B, Carello-Collar G, Zimmermann M, Kunach P, Lima-Filho RAS, Forner S, Martini AC, Pascoal TA, Lourenco MV, Rosa-Neto P, Zimmer ER (2023) Cross-species comparative hippocampal transcriptomics in Alzheimer's disease. *iScience* 27(1): 108671.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108671>
44. Filipek A, Leśniak W (2020) *S100A6* and Its Brain Ligands in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci* 21(11): 3979.
<https://doi.org/10.3390/ijms21113979>
45. Bartkowska K, Swiatek I, Aniszewska A, Jurewicz E, Turlejski K, Filipek A, Djavadian RL (2017) Stress-Dependent Changes in the CacyBP/SIP Interacting Protein *S100A6* in the Mouse Brain. *PloS One* 12(1): e0169760.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169760>
46. Tian ZY, Wang CY, Wang T, Li YC, Wang ZY (2019) Glial *S100A6* Degrades β -amyloid Aggregation through Targeting Competition with Zinc Ions. *Aging Disease* 10(4): 756–769.
<https://doi.org/10.14336/AD.2018.0912>
47. Fang B, Liang M, Yang G, Ye Y, Xu H, He X, Huang JH (2014) Expression of *S100A6* in rat hippocampus after traumatic brain injury due to lateral head acceleration. *Int J Mol Sci* 15(4): 6378–6390.
<https://doi.org/10.3390/ijms15046378>
48. McEwen BS (2001) Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann New York Acad Sci* 933: 265–277.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05830.x>
49. Jung S, Choe S, Woo H, Jeong H, An HK, Moon H, Ryu HY, Yeo BK, Lee YW, Choi H, Mun JY, Sun W, Choe HK, Kim EK, Yu SW (2020) Autophagic death of neural stem cells mediates chronic stress-induced decline of adult hippocampal neurogenesis and cognitive deficits. *Autophagy* 16(3): 512–530.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1630222>
50. Uda M, Ishido M, Kami K (2007) Features and a possible role of Mash1-immunoreactive cells in the dentate gyrus of the hippocampus in the adult rat. *Brain Res* 1171: 9–17.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.099>
51. Oproescu AM, Han S, Schuurmans C (2021) New Insights Into the Intricacies of Proneural Gene Regulation in the Embryonic and Adult Cerebral Cortex. *Front Mol Neurosci* 14: 642016.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.642016>
52. Zhang RL, Chopp M, Roberts C, Jia L, Wei M, Lu M, Wang X, Pourabdollah S, Zhang ZG (2011) Ascl1 lineage cells contribute to ischemia-induced neurogenesis and oligodendrogenesis. *J Cerebr Blood Flow Metabol* 31(2): 614–625.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.134>
53. Faiz M, Sachewsky N, Gascón S, Bang KW, Morshead CM, Nagy A (2015) Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* 17(5): 624–634.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.002>

54. Su X, Guan W, Yu YC, Fu Y (2014) Cerebellar stem cells do not produce neurons and astrocytes in adult mouse. *Biochem Biophys Res Communicat* 450(1): 378–383.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.131>
55. Rusanescu G, Mao J (2017) Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodelling. *J Cell Mol Med* 21(2): 299–314.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12965>
56. Storozheva ZI, Zakharova EI, Proshin AT (2021) Evaluation of the Activity of Choline Acetyltransferase From Different Synaptosomal Fractions at the Distinct Stages of Spatial Learning in the Morris Water Maze. *Front Behav Neurosci* 15: 755373.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.755373>

Transcriptional Activity of Genes Regulating Neurogliogenesis and Apoptosis in Rats Trained in Morris Water Maze: the Influence of Stress and Spatial Memory Formation

A. M. Ratmirov^a, M. A. Gruden^a, and Z. I. Storozheva^{a, *}

*^aFederal Research Center for Innovator and Perspective Biomedical and Pharmaceutical
Technologies, Moscow, Russia*

**e-mail: storozheva_zi@academpharm.ru*

The formation of new neural networks and the modification of pre-existing synaptic contacts, which underlie learning and memory, largely depend on the activity of genes involved in the regulation of the associated processes of neurogliogenesis and apoptosis. At the same time, the identification of changes in the functioning of the genome specific to cognitive functions requires a simultaneous assessment of the influence of stressful factors as a persistent component of all models of laboratory animal learning. The aim of this study was to compare the expression of genes regulating neurogliogenesis (*Sl100A6*, *Ascl1*), and apoptosis (*Apaf1*, *Bax*, *Casp3*, *Bcl2*) in animals trained in spatial Morris maze and those subjected to forced swimming in accordance with the training regime. The experiments were conducted on young adult male Wistar rats, distributed into the following groups: Training (trained to find a hidden platform in a water maze for 4 days), Control (swimming in a maze without a platform for 4 days) and Intact (staying in home cages). In tissue samples of the hippocampus, prefrontal cortex, and cerebellum obtained immediately after the end of experiments in the maze, the expression of target genes was determined by real-time polymerase chain reaction. It was found that cognitive activity reduces the expression of pro-apoptotic genes, which increases under stress conditions, and, on the contrary, stimulates the activity of genes regulating neurogliogenesis and synaptogenesis in structures relevant for various stages of memory trace formation. The results obtained, are of interest for understanding molecular mechanisms of stress and cognition as well as for determining the targets of therapy for cognitive disorders.

Keywords: spatial memory, stress, gene expression, apoptosis, neurogenesis