

На правах рукописи

Максимова Ксения Юрьевна

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИППОКАМПА
ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОМ СТАРЕНИИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ
(экспериментальное исследование)

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология
03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор Логвинов Сергей Валентинович

Кандидат биологических наук Стефанова Наталья Анатольевна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Соловьев Георгий Сергеевич

Доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделом фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга». Плотников Марк Борисович

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится « ____ » _____ 2015 г. в ____⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тр., 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета А. В. Герасимов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время поиск способов профилактики старения приобрел особую актуальность, как в развитых странах, в которых средняя продолжительность жизни перешагнула за 80 лет (Швеция, Япония), так и в тех государствах, где ее величина по экономическим, социальным или иным причинам не достигает 60 лет или лишь немного превышает эти значения [World health statistics, 2014].

Изучение механизмов, определяющих скорость старения и продолжительность жизни, является важным направлением биологических и медицинских исследований. С возрастом происходит постепенное снижение функциональных возможностей мозга, в том числе способности к обучению, нарушение процессов мышления, памяти, дезориентация во времени и пространстве [Анисимов В. Н., 2014].

Физиологическое старение является сложным процессом для исследования. В течение жизни на организм действует множество факторов: стрессы, неблагоприятные воздействия среды, неполноценное питание, заболевания, активирующие свободнорадикальные процессы, приводящие к смещению в клетке прооксидантно-антиоксидантного баланса в сторону прооксидантов и оксидативному стрессу, который в свою очередь может приводить к повреждению липидов, белков и нуклеиновых кислот, нарушению мобилизации антиоксидантной защиты, активации апоптоза и некроза [Владимиров Ю. А., 2012]. Возрастные изменения представляют собой комплекс процессов, определяемых множественными нарушениями в генетическом аппарате, приводящих к накоплению метаболических ошибок и вытекающих из них тканевых повреждений [Хавинсон В. Х., Кузник Б. И., Тарновская С. И., 2014]. Кроме того, в процесс старения вовлекаются и адаптивные изменения, приспособливающие организм к функционированию в условиях накопления метаболических дефектов [Хавинсон В. Х., Соловьев А. Ю., Жилинский Д. В., 2012].

В настоящее время недостаточно изучены характер и динамика морфологических и ультраструктурных изменений гиппокампа в процессе старения. Данных о взаимоотношении морфологических изменений гиппокампа с нарушениями процесса памяти, обучения в доступной литературе не представлено.

Нарушение пространственной памяти является одним из наиболее ранних проявлений ускоренного старения [Wills T. J., 2001]. Л. В. Крушинский (1967) провел этиологическое исследование на птицах и доказал, что гиппокамп ответствен за формирование пространственной памяти.

Позднее полученные данные были подтверждены другими исследователями на млекопитающих [Gutbrod K., 1987; Nunn J. A., 1999; Tucker D. M., 1999].

Биологические модели с ускоренным темпом старения помогают исследователям в разработке и тестировании лекарственных средств, приводящих к снижению и предупреждению возрастных морфологических и поведенческих изменений. В последние годы получены убедительные аргументы в пользу то-

го, что уникальной моделью для изучения механизмов старения может служить созданная в Институте цитологии и генетики СО РАН линия преждевременно стареющих крыс OXYS. Линия создана селекцией и инбридингом крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы. В пяти первых поколениях развитие катаракты провоцировали нагрузкой галактозой, в дальнейшем отбор вели по ранней спонтанной катаракте, сцепленно с которой животные унаследовали комплекс признаков преждевременного старения, в том числе ускоренное старение мозга [Колосова Н. Г., Стефанова Н. А., Корболина Е. Е., 2014]. На фенотипическом уровне оно проявляется формированием уже к возрасту 3 месяца пассивного типа поведения, повышенной тревожностью, нарушением способности к обучению на фоне нейродегенеративных изменений, выявленных методами магниторезонансной томографии [Агафонова И. Г., Колосова Н. Г., Мищенко Н. П., 2010]. Крысы OXYS активно используются для оценки эффективности новых геропротекторов, однако структурно-функциональные основы ускоренного старения их мозга ранее не исследовались.

В настоящее время ведущей концепцией преждевременного старения является свободнорадикальная теория, высказанная Д. Харманом еще в 1954 году [Harman D., 1956, 2000]. Ввиду этого в качестве перспективных препаратов, защищающих клетки от повреждающего действия активных форм кислорода, используются препараты антиоксидантной группы [Бизунок Н. А., 2012].

В диссертационной работе проведена оценка возрастных изменений структуры гиппокампа и его функций. Кроме того, изучался нейропротекторный потенциал мелатонина и антиоксиданта нового поколения – пластохинонил-децил-трифенилфосфония, способного проникать и накапливаться в митохондриях.

Цель исследования: изучить структурно-функциональные основы преждевременного старения гиппокампа крыс OXYS и оценить способность антиоксиданта SkQ1 и мелатонина влиять на развитие его возрастных изменений.

Задачи исследования:

1. Изучить характер и структурные изменения пирамидных нейронов и межнейрональных синапсов пирамидного слоя CA1, CA3 регионов и зубчатой извилины гиппокампа крыс OXYS и Вистар в процессе старения.

2. Оценить возрастные структурные изменения глиальных клеток, сосудов гиппокампа крыс OXYS и Вистар.

3. Сравнить динамику возрастных изменений гиппокампа крыс OXYS с признаками преждевременного старения и крыс Вистар с нормальным темпом старения.

4. Оценить влияние антиоксиданта SkQ1 и мелатонина на возрастные структурные изменения гиппокампа, а также на способность к обучению и память крыс OXYS в «восьмирукавном радиальном лабиринте» и водном тесте Морриса.

Научная новизна. Впервые детально описаны морфофункциональные особенности гиппокампа крыс OXYS. Показано, что у крыс OXYS и Вистар с возрастом увеличивается число измененных нейронов гиппокампа, особенно в CA1 регионе, но у крыс OXYS это происходит ускоренными темпами. У крыс OXYS в более ранние сроки наблюдалось усиление компенсаторной синаптической активности в виде редукции численной плотности синапсов, реорганизации контактов в положительно искривленные. Большая степень глиоза, сосудистых изменений определялась у преждевременно стареющих крыс по сравнению с таковым у линии Вистар.

Впервые изучены морфология и ультраструктура клеточно-тканевых элементов гиппокампа крыс OXYS при введении мелатонина и антиоксиданта SkQ1. Установлено, что препараты уменьшают возникающие в процессе старения изменения нейронов, глиальных элементов, сосудов микроциркуляторного русла, способствуют сохранению числа межнейронных контактов. Введение антиоксидантов препятствует снижению способности к обучению и памяти крыс OXYS в «восьмирукавном радиальном лабиринте» и водном тесте Морриса. Определена неодинаковая протекторная эффективность препаратов. Впервые установлено, что эффекты антиоксидантов зависят от генотипа и возраста животных.

Практическая значимость. Полученные результаты расширяют существующие представления о влиянии мелатонина и SkQ1 на структурные компоненты гиппокампа крыс линий OXYS и Вистар в процессе старения. Выявленные в работе эффекты мелатонина и SkQ1 открывают новые перспективы для дальнейшего изучения роли антиоксидантов в лечении и профилактике возрастных нарушений структуры и функций мозга.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На модели преждевременно стареющих крыс OXYS установлено раннее появление возрастных нейрональных, синаптических, глиальных и сосудистых изменений гиппокампа.

2. Введение мелатонина и SkQ1 преждевременно стареющим крысам OXYS уменьшает выраженность морфологических изменений гиппокампа и улучшает их способность к обучению и память в используемых поведенческих тестах.

Апробация диссертации. Материалы диссертации доложены и обсуждены на 51-й международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2013); 5-th International Young Scientists School «System Biology & Bioinformatics» (Новосибирск, 2013); International Symposium «Human Genetics» (Новосибирск, 2014); седьмой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 9 публикаций в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 5 – в зарубежных рецензируемых журналах, цитируемых в Web of Science.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста и состоит из 4 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов) и выводов. Работа иллюстрирована 23 рисунками и содержит 21 таблицу. Библиографический список включает 243 источника, из них 56 на русском языке и 187 на иностранных языках.

Личный вклад. Автором проведена работа по анализу отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние данной научной проблемы. Самостоятельно выполнено физиологическое и гистологическое исследование, проведено ультрамикроскопическое изучение материала, морфометрическое исследование гистологических срезов, выполнена статистическая обработка полученных данных, их анализ и написание диссертации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен на 70 преждевременно стареющих крысах OXYS и 50 крысах Вистар (контроль), на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом дневном и 12-часовом ночном режиме. Получали гранулированный корм («Чара», производитель ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия) и воду без ограничения. При содержании и умерщвлении животных руководствовались положением Федерального Закона «О защите животных от жестокого обращения» (1997).

Профилактический прием мелатонина (Мелаксен Unipharm, США; в дозе, эквивалентной рекомендуемой людям (0,04 мг/кг массы тела ежедневно) и SkQ1 (250 нмоль/кг массы тела ежедневно), оценивали на крысах с возраста 1,5 до 5 месяцев. Лечебный прием мелатонина и SkQ1 (в аналогичных дозах) оценивали на крысах с возраста от 12 до 18 месяцев.

Материалом для исследования служил гиппокамп крыс. Забой экспериментальных животных производили одновременно с контрольной группой. Материал получали от животных на 14-й день, 5-й и 18-й месяцы жизни.

СВЕТОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Для исследования материала с помощью световой микроскопии под эфирным наркозом проводили транскардиальную перфузию 10% раствором формалина на фосфатном буфере (рН 7,4). Мозг извлекали и дополнительно фиксировали в том же растворе в течение суток. После фиксации материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливку в парафин выполняли по стандартной методике. С помощью санного микротомы готовили

сагиттальные срезы головного мозга толщиной 5 мкм. Для оценки морфологических изменений на светооптическом уровне использовали следующие методы окраски: общегистологический обзорный метод – окраска срезов гематоксилином и эозином, выявление хроматофильного вещества в перикарионах нейронов крезильным фиолетовым по Нисслю.

Просмотр и фотографирование полученных срезов производили на микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия). В регионах CA1, CA3, зубчатой извилины гиппокампа, окрашенных крезильным фиолетовым по Нисслю, подсчитывали процент нейронов с признаками очагового и тотального хроматолиза, гиперхромные нейроны сморщенные и без сморщивания.

На фотоснимках при помощи программы Axio Vision 8.0 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении ок. $\times 10$, об. $\times 100$ определяли среднюю площадь тел и ядер нейронов (мкм^2), вычисляли ядерно-цитоплазматическое соотношение, измеряли диаметр капилляров (мкм), численную плотность капилляров в 1 мм^2 плоскости среза.

При помощи окулярной рамки с известной площадью подсчитывали количество общей суммарной глии, а по соотношению среднего количества глии к среднему числу нейронов в окулярной рамке определяли глионейрональный индекс.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Для проведения ультраструктурного анализа головной мозг фиксировали путем транскардиальной перфузии раствором, содержащим смесь параформальдегида (4 %) и глутаральдегида (0,5 %), приготовленным на основе 0,2 М какодилатного буфера (рН 7,4). Материал постфиксировали в 2 % растворе четырехоксида осмия при $+4^\circ\text{C}$ в течение 3 часов, затем дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, ацетоне, пропиленоксиде и заливали в Эпон-812. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме «Leica EM UC7» («Leicamicrosystems», Австрия). Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие серебристые и бледно-золотистые срезы наносили на сетки-подложки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по E. Reynolds (1963), изучали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-7A (Япония).

Морфометрию органелл пирамидных нейронов гиппокампа проводили с помощью сетки Автандилова, при увеличении $\times 10000$, определяли удельную площадь органелл в пирамидных нейронах (в % от общей площади цитоплазмы).

Для оценки изменений синаптоархитектоники фотографировали по 15 случайно выбранных полей зрения нейропиля пирамидного слоя CA1 региона гиппокампа с 5 срезов при стандартном увеличении $\times 10000$. Определяли количество межнейрональных контактов (площадь поля зрения – 50 мкм^2) и высчитывали численную плотность синапсов на 100 мкм^2 . Подсчитывали количество определенных контактов с асимметричной и симметричной организацией системы субсинаптических единиц (ССЕ). Синапсы по протяженности активной

зоны контакта (АЗК) подразделяли на мелкие (100—200 нм), малые (200—300 нм), средние (300—500 нм), крупные (500—700 нм) и очень крупные (> 700 нм). Подсчитывали численную плотность плоских, положительно и отрицательно искривленных, гипертрофированных (длина АЗК больше 700 нм) и перфорированных синапсов.

ИССЛЕДОВАНИЕ НА СПОСОБНОСТЬ К ОБУЧЕНИЮ И ПАМЯТЬ ТЕСТ «ВОСЬМИРУКАВНЫЙ РАДИАЛЬНЫЙ ЛАБИРИНТ»

Для оценки пространственной рабочей и референтной памяти крыс использовали установку «радиальный восьмирукавный лабиринт» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия). В течение 10 последовательных дней крыс обучали поиску пищи в лабиринте (Manahan-Vaughan and Schwegler, 2011). За день до обучения проводили габитуацию (привыкание) крыс к лабиринту дважды в течение 10 минут с интервалом между сессиями 2 часа. При этом корм был рассыпан во всех рукавах. Во время обучения пищевое подкрепление предъявляли в 4 из 8 рукавов лабиринта. Для этого в конце каждого из 4 рукавов устанавливали кормушку с зерновым шариком. В каждой сессии крысу помещали в центр установки с закрытыми перегородками рукавами, давали ей освоиться в течение 20 секунд, затем перегородки убирали и наблюдали поведение животных в течение 10 минут или пока крыса не войдет во все подкрепляемые кормом рукава. В каждом сеансе обучения подсчитывали число ошибок референтной памяти (входы в неподкрепляемые рукава), число ошибок рабочей памяти (повторные входы в подкрепляемые рукава в течение 1 сеанса), общее число входов в рукава (моторно-исследовательская активность).

Для оценки референтной памяти крыс данные считали по следующей формуле:

$$RME (\%) = RME / TN * 100 \%, \text{ где}$$

RME (%) – процент ошибки референтной памяти, RME – число входов в неподкрепляемые рукава, TN – общее число входов в рукава.

За исключением первого дня обучения, показатели рабочей и референтной памяти были объединены по 3 сессии (дня) для каждой крысы (Manahan-Vaughan and Schwegler, 2011).

ВОДНЫЙ ТЕСТ МОРРИСА

Водный тест Морриса [Morris R., 1984] использовали для исследования обучения, долговременной пространственной памяти. Установку помещали в комнате (размером 3×3 м), содержащей инвариантные пространственные стимулы, а именно: дверь, шкаф. Бассейн условно поделили на 4 равных сектора при помощи 4 различных крупных меток, нанесенных на его стенки изнутри; сектора получили условную нумерацию (№ 1, 2, 3, 4 по часовой стрелке). В середине четвертого сектора помещали квадратную платформу из оргстекла с размером площадки 0,13×0,13 м и высотой 0,4 м. Бассейн заполняли водой с температурой 26±2°С так, чтобы платформа была погружена на 3 см.

Исследование проводили в одно и то же время суток, с 11 до 14 часов. Каждая крыса выполняла ежедневно по 4 попытки в течение 5 дней. Животное помещали в лабиринт у его стенки в середине сектора, соответствующего номеру попытки. Далее животному давали 70 секунд для того, чтобы отыскать погруженную платформу, потраченное на это время фиксировали при помощи секундомера («латентный период нахождения платформы»). Отыскав платформу, крыса находилась на ней в течение 20 секунд, после чего животное вынимали из установки и помещали в сухую обогреваемую клетку до выполнения следующей попытки (на 12 минут). В случае, если животное не отыскивало платформу самостоятельно по истечении отведенного на попытку времени, крысу помещали на платформу, где она находилась в течение 20 секунд, в протоколе фиксировали латентный период 70 секунд. По истечении 4 попыток крыс помещали обратно в их «жилые» клетки до следующего дня. Показателем способности к обучению и пространственной памяти животных в водном тесте Морриса являлся латентный период нахождения невидимой платформы. На 6 день (оценка референтной памяти) платформу убирали, животных сажали в бассейн в первом месте выпуска, давая им по одной попытке длительностью 70 секунд. При этом регистрировали время, проведенное в секторе, где ранее находилась платформа.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистическую обработку результатов оценки способности к обучению животных проводили с помощью пакета программ Statistica 6,0 for Windows. Использовали сравнение межгрупповых различий по критерию Newman-Keuls test и зависимые парные сравнения. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Анализ полученных морфологических данных осуществляли методами описательной статистики с вычислением медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q_1-Q_3). Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между показателями в разных группах считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИППОКАМПА В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

При светомикроскопическом исследовании гиппокампа 5-месячных животных было выявлено, что у крыс линии OXYS в регионе CA1 достоверно больше как нейронов с признаками тотального хроматолиза – 1,78 (0,41—1,91) %, так и гиперхромных нейронов без сморщивания – 5,39 (3,97—10,87) % по сравнению с таковыми показателями у крыс линии Вистар – 0,17 (0,01—0,41) % и 1,61 (0,42—3,01) % соответственно ($p < 0,05$). В CA3 регионе у крыс линии OXYS также преобладали гиперхромные нейроны без сморщивания – 4,82 (3,61—6,51) %, а также нейроны с очаговым хроматолизом – 6,02 (3,52—9,56) %, процент которых у крыс линии Вистар был значимо ниже – 2,93 (1,47—4,02) % и 2,68 (2,33—4,11) % соответственно ($p < 0,05$). Достоверно увеличивалось содержание гиперхромных нейронов без сморщивания у крыс линии OXYS и в зубчатой извилине – 1,52 (1,29—2,38) % по сравнению с таковым показателем у крыс линии Вистар – 0,81 (0,72—1,11) % ($p < 0,05$).

В возрасте 18 месяцев у животных обеих линий изменения нарастали по сравнению с наблюдавшимися у 5-месячных, но в большей степени у крыс OXYS. Так, у крыс линии OXYS в регионе CA1 возрастало число нейронов с признаками тотального – 11,92 (11,39—12,55) % и очагового – 11,61 (10,38—12,35) % хроматолиза, гиперхромных нейронов без сморщивания – 7,55 (7,28—8,76) %, что практически вдвое превышало аналогичные значения у крыс линии Вистар – соответственно 6,43 (5,41—6,87) %, 5,45 (5,16—5,98) %, 4,87 (4,33—5,01) % ($p < 0,05$). В CA3 регионе у крыс линии OXYS превалировали как гиперхромные нейроны без сморщивания – 9,66 (9,24—11,42) %, так и нейроны с признаками тотального хроматолиза – 10,08 (9,21—10,97) %, что также значимо превышало таковые показатели у крыс линии Вистар – 6,79 (6,75—7,91) % и 5,91 (4,46—6,08) % соответственно ($p < 0,05$). Анализ нейронов зубчатой извилины позволил выявить достоверное увеличение гиперхромных сморщенных нейронов – 5,64 (4,48—5,84) % и гиперхромных нейронов без сморщивания – 11,96 (9,73—12,64) % у крыс линии OXYS по сравнению с таковыми показателями у крыс линии Вистар – соответственно 2,15 (2,07—2,47) % и 4,84 (4,33—6,66) % ($p < 0,05$). Оценка средней площади ядер пирамидных нейронов у 5-месячных животных выявила уменьшение их размеров у крыс линии OXYS по сравнению с таковыми показателями у крыс линии Вистар.

Так, наиболее значимое снижение показателя отмечалось в CA1 регионе гиппокампа – до 68,76 (67,98—80,13) мкм^2 (у крыс линии Вистар – 110,79 (81,86—118,71) мкм^2 ; $p < 0,05$). В CA3 регионе средняя площадь ядер пирамидных нейронов у крыс OXYS составляла 103,08 (99,08—109,82) мкм^2 , что было значимо ниже средней площади ядер пирамидных нейронов у крыс линии Вистар – 110,79 (81,86—118,71) мкм^2 ($p < 0,05$).

У 18-месячных животных сохранялась аналогичная тенденция: статистически значимое снижение средней площади ядер пирамидных нейронов определялось в СА1 (103,54 (102,76—106,96) мкм²) и СА3 (140,65 (139,99—153,32) мкм²) регионах гиппокампа у крыс линии ОХУС, у крыс линии Вистар соответственно 120,87 (117,75—124,97) мкм² и 157,65 (150,45—168,34) мкм² (p<0,05).

У животных линии ОХУС уже в 5-месячном возрасте в СА1 регионе гиппокампа численная плотность нейронов на 1 мм² среза пирамидного слоя гиппокампа составила 417,77 (413,44—437,75), а в СА3 регионе – 583,37 (561,29—634,66), что было ниже количества пирамидных нейронов у крыс линии Вистар – 472,29 (438,04—490,18) в СА1 и 681,11 (606,42—692,41) в СА3 соответственно (p<0,05). К 18-месячному возрасту численная плотность нейронов у животных обеих линий продолжала снижаться и в СА1 регионе у крыс линии ОХУС достигала 294,11 (276,59—312,24), в СА3 регионе – 413,42 (401,01—418,54), у крыс линии Вистар – 351,41 (341,71—365,37) и 459,89 (448,17—472,04) соответственно (p<0,05).

Таким образом, выявленные межлинейные различия по степени изменений пирамидных нейронов отражают ускоренный темп старения гиппокампа крыс линии ОХУС. Наиболее уязвимым регионом гиппокампа крыс обеих линий становится СА1, о чем свидетельствуют редукция численной плотности нейронов и значительное увеличение процента измененных нейронов в нем.

Ультрамикроскопическое изучение пирамидных нейронов гиппокампа 5-месячных крыс ОХУС позволило выявить начальные проявления деструкции митохондрий и появление гранул липофусцина – пигмента старения. Для 18-месячных животных была более характерна деструкция митохондрий и гранулярной ЭПС. Нарастающие с возрастом структурно-функциональные изменения митохондрий у крыс линии ОХУС рассматриваются как один из ключевых факторов их преждевременного старения [Колосова Н. Г., 2007]. Существенным изменением является накопление липофусцина в цитоплазме нейронов у линии ОХУС. Увеличение у крыс линии ОХУС относительной доли лизосом указывает на усиленную аутофагию, направленную на удаление повреждённых мембран и органелл.

При этом, наряду с деструктивными изменениями, в нейронах наблюдались отчетливо выраженные адаптационные, компенсаторные процессы: увеличение складчатости оболочки ядра и числа ядерных пор, гипертрофия ядрышек, смещение их на периферию ядра.

Морфометрический анализ органелл пирамидных нейронов 5-месячных животных позволил установить, что у крыс линии ОХУС снижены показатели удельной площади митохондрий – 10,87 (9,06—12,68) % и гранулярной ЭПС – 26,73 (23,12—30,34) % по сравнению с таковыми показателями у крыс линии Вистар – 12,48 (11,01—13,95) % и 37,62 (32,17—43,07) % соответственно (p<0,05). Удельная площадь вакуолей и лизосом, напротив, была статистически значимо увеличена и составила соответственно 4,78 (3,64—5,96) % (у крыс линии Вистар – 2,72 (1,84—3,65) %) и 10,87 (9,38—12,36) % (у крыс линии Вистар – 8,43 (7,32—9,54) %).

В перикарионах 18-месячных животных наблюдались аналогичные изменения: у крыс линии OXYS при сравнении с крысами линии Вистар выявлялось значимое снижение не только удельной площади митохондрий – 3,17 (2,48—3,86) % и 10,23 (9,41—11,05) % соответственно), но и гранулярной ЭПС (11,05 (8,38—13,72) % и 27,22 (23,05—31,39) % соответственно), при этом продолжала увеличиваться удельная площадь лизосом – 11,75 (9,04—14,46) % и 8,24 (6,78—9,74) % соответственно и вакуолей – 8,19 (4,78—11,67) % и 3,93 (2,13—6,86) % соответственно.

Ультраструктура синапсов CA1 региона гиппокампа крыс в возрасте 5 месяцев была однотипна у животных обеих линий. Для оценки функциональной активности синапсов определяли степень их кривизны. Известно, что плоские синапсы являются неактивными, а искривленные – активно функционирующими, причем положительно искривленные контакты находятся в фазе экзоцитоза везикул [Семченко В. В., Боголепов Н. Н., 1995].

В настоящем исследовании было выявлено увеличение числа симметричных синапсов на 100 мкм² среза пирамидного слоя гиппокампа у 5-месячных крыс OXYS до 1,74 (1,16—2,13), что втрое превышало показатели у крыс линии Вистар – 0,58 (0,38—0,68) ($p < 0,05$). Численная плотность положительно искривленных синапсов у крыс OXYS составила 4,85 (4,07—5,23), что также было значимо выше показателей у крыс линии Вистар – 2,81 (2,31—3,49). Численная плотность отрицательно искривленных синапсов у крыс линии OXYS, напротив, была снижена по сравнению с таковым показателем у крыс линии Вистар и составила соответственно 0,38 (0,21—0,58) и 1,16 (1,06—1,24) ($p < 0,05$). Выявленное увеличение числа высокоактивных положительно искривленных синапсов может свидетельствовать об активации компенсаторных механизмов синаптической пластичности у крыс линии OXYS.

Не менее важным является изучение динамики синапсов с различной длиной АЗК. Исследования, проведенные ранее, продемонстрировали, что в мозге старых животных происходит увеличение размеров синаптического устройства, что является увеличением потенциала синаптической пластичности [Masliah E., 2006]. Численная плотность синапсов на 100 мкм² с длиной АЗК 300—500 нм была выше у крыс линии OXYS и составляла 5,04 (4,46—5,04) против 2,32 (2,13—2,52) у крыс линии Вистар ($p < 0,05$). При этом численная плотность синапсов с длиной АЗК 500—700 нм преобладала у крыс линии Вистар, составив 3,49 (2,91—3,68), а у крыс линии OXYS снижалась до 1,16 (1,06—1,35) ($p < 0,05$).

Ультраструктурные изменения синапсов в гиппокампе 18-месячных животных также были однотипными у крыс обеих линий и характеризовались изменением пресинаптических отростков, нарушением взаиморасположения синаптических пузырьков в пресинаптической части. Согласно данным других исследователей, синапсы подвержены дегенеративным нарушениям преимущественно по «светлому» типу, однако встречались контакты, измененные по «темному» типу [Боголепов Н. Н., 1975].

Изучение межнейрональных контактов в процессе старения выявило единичные синапсы с выраженными деструктивными изменениями. К ним относилось появление в пресинаптическом отростке лизосом и липидных включений, что сочеталось с образованием в отростке гранулярного и фибриллярного материала.

Многочисленные исследования подтверждают уменьшение числа межнейрональных контактов в процессе старения [Bertoni-Freddari C., Fattoretti P., Giorgetti B., 2006].

Так, в настоящем исследовании у крыс линии OXYS к возрасту 18 месяцев в 1,5 раза снижалась численная плотность синапсов на 100 мкм^2 по сравнению с таковой у 5-месячных животных и составила 6,79 (5,82—6,98) и 9,73 (9,31—10,08) соответственно ($p < 0,05$). Это происходило в основном за счет асимметричных контактов, численная плотность которых у 5-месячных крыс составила 7,95 (7,41—8,14), а у 18-месячных животных – 5,04 (4,46—5,23) ($p < 0,05$). При этом численная плотность положительно искривленных синапсов, являющихся отражением межнейрональной активности, снижалась у 18-месячных крыс в 2,5 раза по сравнению с таковой у 5-месячных животных, составив соответственно 1,92 (1,55—2,52) и 4,85 (4,07—5,23) ($p < 0,05$).

У крыс линии Вистар с возрастом отмечалась обратная тенденция: число контактов с положительным искривлением увеличивалось с возрастом. Так, у 5-месячных животных данный показатель составил 2,81 (2,31—3,49), у 18-месячных – 4,46 (4,32—4,85) ($p < 0,05$).

Численная плотность синапсов с длиной АЗК 300—500 нм у крыс линии Вистар также возрастала в 5 месяцев от 2,32 (2,13—2,52) к 18 месяцам до 5,62 (5,43—6,21) ($p < 0,05$). Вместе с тем численная плотность синапсов с длиной АЗК 500—700 нм с возрастом снижалась, у 5-месячных животных она составила 3,49 (2,91—3,68), тогда как у 18-месячных – 1,45 (1,16—2,13) ($p < 0,05$).

Таким образом, активация компенсаторных механизмов синаптической пластичности была выявлена у крыс линии OXYS в 5-месячном возрасте, а у крыс линии Вистар намного позже – в 18-месячном. Определялась редукция численной плотности синапсов, приводящая к компенсаторной реорганизации сохранившихся синапсов в положительно искривленные, что обеспечивало максимальное усиление эффективности синаптических контактов.

В настоящем исследовании установлено, что изменения глиальных клеток гиппокампа в процессе старения носили как регрессивный, так и прогрессивно-пролиферативный характер. Регрессивный характер заключается в деструктивном поражении глиоцитов, прогрессивно-пролиферативный – в увеличении численной плотности глии.

Так, у животных линии OXYS уже в 5-месячном возрасте определялась компенсаторная активация глиальных клеток на фоне увеличения количества измененных нейронов гиппокампа. В СА1 регионе гиппокампа численная плотность глии на 1 мм^2 у крыс линии OXYS составила 735,29 (723,52—752,94), а в СА3 регионе – 723,52 (705,88—735,87), что превышало количество

глиальных клеток у крыс линии Вистар – 647,05 (617,64—667,05) в СА1 регионе и 647,05 (594,11—664,71) в СА3 регионе ($p < 0,05$) соответственно.

К 18-месячному возрасту численная плотность глиоцитов у животных обеих линий продолжала нарастать; так, в СА1 регионе у крыс линии ОХУС данный показатель достигал значения 911,76 (888,23—923,52), в СА3 регионе – 870,58 (817,64—876,47), что также преобладало над показателями крыс линии Вистар – 823,52 (811,76—829,41) и 752,94 (747,05—758,82) ($p < 0,05$) соответственно.

В процессе старения сосуды головного мозга характеризовались однотипными морфологическими изменениями у животных обеих линий. Ультрамикроскопически базальная мембрана капилляров, как правило, обладала повышенной электронной плотностью, неравномерной толщиной и складчатостью, содержала вакуоли. Перициты накапливали в своей цитоплазме липиды, большое количество лизосом. Вероятно, выявленные на ранних сроках у крыс ОХУС изменения сосудов вызваны развитием мозга на фоне гипоксии в раннем постнатальном периоде, связанной с задержкой формирования микроциркуляторного русла [Sergeeva S. et al., 2006]. Сравнительный анализ наиболее подверженного изменениям СА1 региона показал, что численная плотность сосудов к 5-месячному возрасту у крыс линии ОХУС снижалась на 14,29 %, а у крыс линии Вистар – до 12,68 %. К 18 месяцам снижение показателя численной плотности сосудов у крыс линии ОХУС достигало 57,15 %, у крыс линии Вистар – 52,21 % ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные результаты указывают на бóльшую подверженность к возрастным изменениям гемокapилляров гиппокампа крыс линии ОХУС, чем у животных линии Вистар, а также подтверждают тесную связь между сосудистыми изменениями головного мозга и развитием изменений нейронов в процессе старения.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА КРЫС ОХУС НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ

В настоящем исследовании проведена сравнительная оценка влияния мелатонина и антиоксиданта Скулачева (SkQ1) на структуру нейронов, межнейронных контактов, глиальных клеток, сосудов гиппокампа крыс линии ОХУС в процессе старения.

Известно, что молекулы SkQ1 свободно проникают через бислойные липидные мембраны, имеют способность накапливаться в митохондриях клеток и защищать их от апоптоза и некроза, вызванных АФК [Антоненко Ю. Н., Скулачев В. П., 2008]. Кроме того, SkQ1 способствует снижению уровня перекисного окисления липидов и белков в тканях стареющих животных, что оказывает положительный терапевтический эффект при различных возрастных заболеваниях [Нероев В. В., 2008].

Эндогенный мелатонин обладает антиоксидантными свойствами, а его метаболиты являются сильнодействующими поглотителями свободных радикалов [Tan D., Manchester L. C., Reiter R. J., 2000]. Также известно его действие при нейровоспалительных процессах [Ganguly K., Swarnakar S., 2009]. Кроме того, мелатонин защищает клетки от экзогенного осаждения β -амилоида, возникающего вследствие митохондриальной дисфункции, что было доказано на модели нейродегенеративных заболеваний [Ni C., Tan G., Luo A., 2013].

В регионе CA1 гиппокампа в группе 5-месячных крыс линии OXYS с применением препаратов число нейронов с признаками тотального хроматолиза в группе крыс с применением мелатонина составила 1,01 (0,93—0,19) %, в группе животных, получавших SkQ1, – 0,36 (0,33—0,39) %, что было ниже, чем в группе крыс без использования препарата, – 1,78 (0,41—1,91) % ($p < 0,05$).

Доля нейронов с признаками очагового хроматолиза была достоверно ниже в группе крыс, получавших мелатонин – 3,25 (2,88—3,57) %, а также в группе с применением SkQ1 – 1,84 (1,47—2,31) % в сравнении с таковым показателем у интактных животных – 4,92 (4,52—6,61) ($p < 0,05$). Процент гиперхромных нейронов без сморщивания был ниже у животных как с применением мелатонина – 2,63 (2,51—2,68) % и 1,83 (1,56—2,31) %, так и у животных с применением SkQ1 в сравнении с таковым показателем у интактных крыс – 5,39 (3,97—10,87) % ($p < 0,05$). Численная плотность нейронов в CA1 регионе была больше на 12,64 % в группе крыс с применением SkQ1, в группе крыс с мелатонином выше на 21,87 % по сравнению с таковым показателем в интактной группе. В CA3 регионе показатель был на 11,12 % выше, чем в группе получавших мелатонин крыс по сравнению с интактной группой. В зубчатой извилине численная плотность нейронов была больше на 7,75 % в группе SkQ1, в группе мелатонин на 5,25 % выше по сравнению с таковым показателем у интактных животных.

В регионе CA1 в возрасте 18 месяцев в группе крыс линии OXYS с применением препаратов выявлен более низкий процент нейронов с признаками тотального хроматолиза: в группе с применением мелатонина – 3,76 (3,62—3,82) %, в группе с SkQ1 – 3,28 (2,71—3,47) %, что оказалось ниже, чем в группе животных без использования препарата – 11,92 (11,39—12,55) % ($p < 0,05$). Доля нейронов с признаками очагового хроматолиза была достоверно ниже в группе получавших мелатонин крыс – 4,03 (3,43—4,77) % и в группе с применением SkQ1 – 3,43 (2,86—4,21) % в сравнении с интактными животными – 11,61 (10,38—12,35) % ($p < 0,05$). Процент гиперхромных нейронов без сморщивания был ниже у животных с применением мелатонина – 4,61 (4,41—4,67) % и 4,82 (4,76—5,12) % у животных с SkQ1 в сравнении с таковым показателем у интактных крыс – 7,55 (7,28—8,76) % ($p < 0,05$). Численная плотность нейронов в CA1 регионе была на 24,37 % больше в группе с SkQ1, на 16,07 % выше в группе с мелатонином по сравнению с таковым показателем в интактной группе. В CA3 регионе показатель был выше в группе получавших мелатонин крыс на 14,38 %, на 11,01 % больше в группе с применением SkQ1 по сравнению с интактной группой. В зубчатой извилине численная плотность нейронов

была на 5,64 % больше в группе с SkQ1, на 8,28 % выше в группе с применением мелатонина по сравнению с таковым показателем у интактных животных.

Таким образом, применение препаратов препятствует развитию возрастных нарушений пирамидных нейронов гиппокампа преждевременно стареющих крыс линии OXYS и уменьшает степень редукции нейронов.

Подсчет удельной площади органелл выявил наиболее выраженное их увеличение в группе животных, получавших SkQ1, менее эффективным оказалось назначение мелатонина. Так, удельная площадь митохондрий в группе животных, получавших SkQ1, составила 7,69 (6,78—8,63) %, получавших мелатонин – 5,51 (4,05—6,97) %, в интактной группе – 3,17 (2,48—3,86) % ($p < 0,05$). Удельная площадь гранулярной ЭПС у крыс с применением SkQ1 составляла 17,81 (15,56—20,06) %, у получавших мелатонин крыс – 16,27 (12,81—19,75) %, у интактных животных – 11,05 (8,38—13,72) % ($p < 0,05$).

Величина удельной площади лизосом, напротив, преобладала у интактных животных – 11,75 (9,04—14,46) %, что статистически значимо отличалось от показателей в группе крыс, получавших SkQ1, – 9,23 (7,62—10,86) % и в группе животных с назначением мелатонина – 9,06 (7,97—10,15) % ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенные исследования показывают, что курсовое введение антиоксидантов преждевременно стареющим крысам линии OXYS препятствует появлению ультраструктурных изменений пирамидных нейронов гиппокампа в процессе старения.

Подсчет численной плотности синапсов на 100 мкм^2 у 18-месячных животных линии OXYS выявил значимое их увеличение при введении мелатонина до 8,53 (8,36—8,73) и при применении SkQ1 до 7,17 (6,49—7,56) по сравнению с таковым показателем у животных, не получавших препараты, – 6,79 (5,82—6,98) ($p < 0,05$).

Ранее было показано, что производные пластохинона (SkQ1 и SkQR1) действуют как высокоэффективные антиоксиданты в водных растворах, липидных мицеллах, липосомах, изолированных митохондриях и клеточных культурах, в том числе и нейрональных [Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н., 2010]. С их помощью можно корректировать нарушения синаптической пластичности в гиппокампе, вызванные β -амилоидом, которые лежат в основе нарушений памяти и других когнитивных функций при болезни Альцгеймера [Stefanova N. A., Fursova A. Zh., Kolosova N. G., 2010].

При исследовании численной плотности асимметричных положительно изогнутых синапсов показатели были выше в группе крыс с применением SkQ1 – 3,15 (2,71—3,52) и в группе животных с введением мелатонина – 2,52 (2,35—2,84), что статистически значимо отличалось от значений интактной группы – 1,94 (1,55—2,52) ($p < 0,05$). Сходная динамика определялась и при подсчете удельной плотности плоских контактов.

Наибольшее количество межнейрональных контактов, независимо от наличия/отсутствия препарата, как у 5-, так и 18-месячных животных были представлены синапсами с длиной АЗК 300—500 нм.

Таким образом, использование препаратов приводит к активации компенсаторных процессов, таких, например, как увеличение численной плотности положительно искривленных контактов. Кроме того, применение SkQ1 и мелатонина указывает на относительно стабильное состояние межнейрональных контактов, о чем свидетельствуют высокие показатели общей численной плотности контактов и увеличение числа плоских контактов.

В возрасте 5 месяцев в СА1 регионе гиппокампа численная плотность глиальных клеток на 1 мм² среза пирамидного слоя гиппокампа у крыс линии ОХУС, принимавших SkQ1, статистически значимо снижалась до 660,07 (651,21—673,36), у принимавших мелатонин животных – до 705,88 (694,11—723,52), соответственно у крыс интактной группы составила 735,29 (723,52—752,94) ($p < 0,05$). В СА3 регионе исследуемый показатель имел следующие значения: 606,91 (698,05—655,64) – у крыс, принимавших SkQ1, 629,41 (594,12—688,23) – у получавших мелатонин животных, 723,52 (705,88—735,87) – у интактных животных ($p < 0,05$).

В возрасте 18 месяцев в регионе СА1 у крыс с использованием SkQ1 показатель был равен 752,94 (735,29—764,71), у принимавших мелатонин – 764,71 (758,82—805,88) и в интактной группе – 911,76 (888,23—923,52) ($p < 0,05$). В СА3 регионе численная плотность глии в группе с применением SkQ1 составила 647,05 (635,29—676,47), в группе принимавших мелатонин – 705,88 (700,11—723,52), в интактной группе животных – 870,58 (817,64—876,47) ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенное исследование показало, что используемые препараты препятствуют пролиферации клеток глии.

У 18-месячных крыс, получавших антиоксиданты, отмечалась меньшая выраженность ультраструктурных изменений сосудов гиппокампа по сравнению с интактной группой животных. В цитоплазме эндотелиоцитов реже обнаруживались везикулы, меньшее количество митохондрий подвергалось деструкции. В 5 месяцев численная плотность сосудов в СА1 регионе была 37,34 (34,16—41,89) в группе SkQ1, в группе с мелатонином – 38,23 (35,29—42,57) по сравнению с таковым показателем в интактной группе – 35,29 (33,18—41,37). В СА3 регионе показатель был выше в группе получавших мелатонин крыс – 41,17 (36,29—47,05) и в группе принимавших SkQ1 – 40,28 (37,83—42,35) по сравнению с таковым показателем в интактной группе – 40,19 (35,29—41,17). В 18 месяцев численная плотность сосудов в СА1 регионе была примерно на одном уровне – 16,65 (14,87—19,54) в группе с применением SkQ1, в группе получавших мелатонин – 16,59 (14,61—22,12) по сравнению с таковым показателем в интактной группе – 17,64 (11,76—18,64).

В СА3 регионе показатель был ниже в группе получавших мелатонин животных – 17,31 (15,42—23,42) и в группе с применением SkQ – 16,64 (14,16—22,51) по сравнению с таковым показателем в интактной группе – 19,64 (12,26—20,04).

Таким образом, введение препаратов оказывает положительное воздействие на состояние микрососудистой сети пирамидного слоя гиппокампа.

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА СПОСОБНОСТЬ К ОБУЧЕНИЮ И ПАМЯТЬ

Восьмирукавный радиальный лабиринт

Анализ результатов показал, что процент ошибки референтной памяти о местоположении целевого объекта (пищи), выраженный в отношении числа входов в неподкрепляемые рукава к общему числу посещенных рукавов (%), в 1-й, 2—4-й и 5—7-й дни тестирования был больше у 5-месячных крыс линии OXYs ($p < 0,05$ для всех дней), что свидетельствует о выявленной у них сниженной способности к обучению и памяти. Однако к 8—10-му дню обучения у крыс линии OXYs процент ошибки референтной памяти уже значительно не отличался от такового показателя у крыс линии Вистар ($p = 0,2$), животные запоминали рукава с кормом и меньше входили в рукава без него. Сравнение групповых средних показало отсутствие эффектов препаратов на процент ошибки референтной памяти у крыс обеих линий, однако стоит отметить, что у принимавших SkQ1 и мелатонин крыс линии OXYs этот показатель достоверно не отличался от значений крыс линии Вистар, начиная со 2-го дня обучения.

При зависимых парных сравнениях процент ошибки референтной памяти у контрольных крыс линии OXYs достоверно не различался ни в один из 10 дней тестирования ($p > 0,05$), что указывает на значительные нарушения в способности к обучению и памяти. Тогда как у контрольных линии Вистар и крыс, принимавших SkQ1 и мелатонин, процент ошибки достоверно снижался ко 2—4-му дням обучения. У крыс линии OXYs, принимавших SkQ1, процент ошибки референтной памяти также снижался уже ко 2—4-му дням обучения ($p < 0,05$), а у принимавших мелатонин животных – только к 8—10-му дням ($p < 0,05$). Общее число входов в рукава – показателя двигательной и исследовательской активности – было значительно меньше у крыс OXYs во все дни обучения ($p < 0,05$). Причем прием SkQ1 и мелатонина не влиял на этот показатель у крыс линий Вистар и OXYs ($p > 0,05$).

Состояние пространственной рабочей и референтной памяти оценивали путем обучения 18-месячных животных в восьмирукавном радиальном лабиринте после 5 месяцев приема антиоксидантов. Анализ результатов показал, что процент ошибки референтной памяти о местоположении целевого объекта (пищи), выраженный в отношении числа входов в неподкрепляемые рукава к общему числу посещенных рукавов, во все дни тестирования имел более высокие значения у 18-месячных крыс линии OXYs ($p > 0,05$), что свидетельствует о сниженной способности к обучению и памяти. Прием SkQ1 и мелатонина не влиял на способность к обучению крыс линии OXYs. У крыс линии Вистар, принимавших SkQ1 и мелатонин, процент ошибок референтной памяти во 2—4-й и 8—10-й дни тестирования имел более низкие значения, чем у животных контрольной группы ($p > 0,05$).

При зависимых парных сравнениях процент ошибки референтной памяти у животных контрольной группы и принимавших препараты крыс линии OXYS достоверно не различался ни в один из 10 дней ($p > 0,05$), что указывает на значительные нарушения долговременной памяти. При оценке профилактического приема SkQ1 и мелатонина (в срок от 1,5 до 5 месяцев) показано, что у крыс линии OXYS в возрасте 4,5 месяцев способность к обучению в данном тесте была снижена по сравнению с крысами линии Вистар, прием антиоксидант замедлил её снижение у крыс линии OXYS, но не влиял на неё у крыс линии Вистар.

Интересно, что в данном исследовании у 18-месячных крыс линии Вистар контрольной группы процент ошибки референтной памяти достоверно не изменялся за время обучения. Тогда как у принимавших SkQ1 и мелатонин крыс линии Вистар процент ошибки достоверно снижался уже ко 2—4-му дню обучения.

Общее число входов в рукава было значительно меньше у крыс линии OXYS во все дни обучения ($p < 0,05$). Прием SkQ1 и мелатонина не влиял на этот показатель у крыс линий Вистар и OXYS ($p > 0,05$).

Таким образом, прием SkQ1 и мелатонина не повлиял на способность к обучению 18-месячных крыс линии OXYS, однако замедлил её снижение у крыс линии Вистар.

Водный тест Морриса

Анализ результатов показал, что латентный период (ЛП) нахождения невидимой платформы во время обучения был более высоким у крыс линии OXYS ($p < 0,05$). 5,5-месячный прием SkQ1 и мелатонина не повлиял на способность к обучению крыс линии Вистар, но в то же время улучшил её у крыс линии OXYS.

Так, у принимавших мелатонин крыс линии OXYS ЛП нахождения невидимой платформы был достоверно меньше на 3-й день обучения, а у принимавших SkQ1 крыс различия по этому показателю были достоверными на 3-й и 4-й дни обучения. Проверка долговременной памяти (6-й день обучения) показала, что крысы линии OXYS, принимавшие SkQ1 и мелатонин, проводили значительно больше времени в секторе, в котором ранее в течение 5 последовательных дней находилась платформа ($p > 0,05$). У крыс линии Вистар, получавших препараты, этот показатель достоверно не изменялся.

Таким образом, прием SkQ1 и мелатонина не повлиял на способность к обучению 18-месячных крыс линии Вистар, однако замедлил её снижение у крыс линии OXYS.

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что способность к обучению и память зависят не только от генотипа и возраста животных, но и от используемого для их оценки поведенческого теста, поскольку известно, что на процессы обучения и памяти влияют эмоциональный фон и тревожность. Выявлена способность SkQ1 и мелатонина замедлять с возрастом снижение способности к обучению и памяти у крыс обеих линий.

ВЫВОДЫ

1. В процессе старения в гиппокампе крыс линий OXYS и Вистар происходит снижение численной плотности нейронов пирамидного слоя, увеличение доли нервных клеток с тотальным и очаговым хроматолизом, гиперхромией и сморщиванием, нарастает выраженность деструктивных изменений митохондрий, комплекса Гольджи, гранулярного эндоплазматического ретикулума и происходит уменьшение их удельного объема в перикарионах, возрастает содержание липофусцина. Наибольшие возраст-зависимые изменения нейронов зарегистрированы в CA1 регионе гиппокампа.

2. У стареющих крыс линии OXYS в гиппокампе снижается общая численная плотность межнейрональных синапсов, в основном за счет асимметричных контактов, уменьшается доля гипертрофированных синапсов и контактов с короткой активной зоной, что свидетельствует о снижении активности адаптивных процессов межнейрональных синапсов.

3. В гиппокампе крыс OXYS и Вистар, в процессе старения, происходят как регрессивные, так и пролиферативные реакции глии характеризующиеся увеличением их числа на фоне снижения численной плотности нейронов. Уменьшается численная плотность сосудов, возникают ультраструктурные изменения базальной мембраны в виде увеличения ее электронной плотности, неравномерной толщины, складчатости.

4. У крыс OXYS структурные изменения нейронов, глии, межнейрональных синапсов, сосудов гиппокампа прогрессируют ускоренными темпами.

5. SkQ1 и мелатонин способствуют сохранению значительной доли нормохромных нейронов гиппокампа крыс OXYS, препятствуют появлению деструкции эндоплазматического ретикулума, митохондрий, увеличению удельного объема липофусцина, вакуолей в перикарионе. Проведенная коррекция уменьшает пролиферацию и деструктивные изменения глии, препятствует снижению численной плотности синапсов и повышает их синаптическую пластичность у крыс OXYS.

6. SkQ1 и мелатонин не влияют на способность к обучению и память молодых крыс линий Вистар и OXYS, но замедляют их возрастные нарушения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Stefanova N. A., Muraleva N. A., Korbolina E. E., Kiseleva E., **Maksimova K. Yi.**, Kolosova N. G. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats // *J. Oncotarget*. (6,63). – 2014. – № 3. – P. 1396-1413.
2. Stefanova N. A., Kozhevnikova O. S., Vitovtov A. O., **Maksimova K. Y.**, Logvinov S. V., Rudnitskaya E. A., Korbolina E. E., Muraleva N. A., Kolosova N. G. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease // *Cell Cycle* (5,01). – 2014. – Mar 15. – 13 (6). – P. 898—909. doi:10.4161/cc.28255
3. Rudnitskaya E. A., **Maksimova K. Y.**, Muraleva N. A., Logvinov S. V., Yanshole L. V. Kolosova N. G., Stefanova N. A. Beneficial effects of melatonin in a rat model of sporadic Alzheimer's disease // *Biogerontology* (3,01). – 2015. doi: 10.1007/s10522-014-9547-7.
4. **Максимова К. Ю.**, Стефанова Н. А., Логвинов С. В. Морфологические изменения нейронов в гиппокампе крыс при преждевременном старении // *Бюллетень сибирской медицины* (0,34). – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 56–61.
5. Rudnitskaya E. A., **Maksimova K. Y.**, Stefanova N. A. Melatonin in prevention of Alzheimer disease-like pathology in OXYS rats // *International Symposium «Human Genetics» ISHG-2014* (июнь, 24—25, 2014). – Новосибирск, 2014. – P. 51. 12.
6. Гиенко Е. А., **Максимова К. Ю.** Оценка нейропротекторного потенциала мелатонина // *Студент и научно-технический прогресс: Материалы 51-й международной научной студенческой конференции* (Новосибирск, 12–18 апреля 2013 г.). – Секция Биология. – Новосибирск, 2013. – С. 126.
7. **Максимова К. Ю.**, Стефанова Н. А., Логвинов С. В. Ультраструктура синапсов в гиппокампе крыс в процессе старения // *Бюллетень сибирской медицины* (0,34). – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 49–54.
8. **Максимова К. Ю.** Влияние мелатонина на структуру нейронов гиппокампа преждевременно стареющих крыс OXYS и Wistar // *Врач-аспирант* (0,104). – 2014. – Т. 65, № 4. – С. 172—179.
9. **Максимова К. Ю.**, Логвинов С. В., Стефанова Н. А. Возрастные изменения нейронов гиппокампа крыс линии OXYS // *Морфология* (0,631). – 2014. – Т. 145, № 3. – С. 121—122.
10. **Maksimova K. Y.** Neuronal loss in senescence-accelerated OXYS rats hippocampus: histological examination // *5-th International Young Scientists School. «System Biology & Bioinformatics» SBB'13* (Новосибирск, 23–26 июня 2013 г.). – Новосибирск, 2013. – P. 33.

11. Рудницкая Е. А., **Максимова К. Ю.** Экспериментальное исследование перспективности использования мелатонина в профилактике болезни Альцгеймера // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы Седьмой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Новосибирск, 21—22 апреля 2015 г.). – Новосибирск, 2015. – С. 231—232.
12. **Максимова К.Ю.** Логвинов С.В. Стефанова Н.А. Морфологическая характеристика гиппокампа крыс линии OXYS и Вистар в процессе старения // Морфология (0,631). – 2015. – Т. 147, № 3. – С. 11—16.
13. Rudnitskaya E. A., Muralevaa N. A., Stefanova N. A., **Maksimova K. Y.**, Kiselevaa E., Kolosova N. G., Stefanova N. A. Melatonin attenuates memory impairment, amyloid- β accumulation, and neurodegeneration in a rat model of sporadic Alzheimer's disease // J. Alzheimer's dis. (3,612). – 2015. – 47 (3). – P. 103—116. doi: 10.3233/JAD-150161
14. Stefanova N.A., **Maksimova K.Yi.**, Kiseleva E., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., and Kolosova N.G. Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology // J Pineal Res. – 2015. – 59. –P. 163–177. doi: 10.1111/jpi.12248.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БА – болезнь Альцгеймера
АО – антиоксиданты
АФК – активные формы кислорода
АЗК – активная зона контакта
ЛП – латентный период
ЭПС – эндоплазматическая сеть

Подписано в печать __. __. 2015 г.

Усл. печ. листов 065. Печать на ризографе.

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ

634050, г. Томск, Московский тракт, 2. Тел. (83822)530408

Заказ № __ Тираж 100 экземпляров.