

*На правах рукописи*

**Экова Мария Рафаэлевна**

**Морфофункциональные изменения гиппокампа при моделировании  
комбинированного стресса**

14.03.02 – патологическая анатомия

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Волгоград – 2017**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Государственном бюджетном учреждении «Волгоградский медицинский научный центр»

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, **Григорьева Наталья Владимировна**

доктор медицинских наук, профессор **Смирнов Алексей Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

**Забродская Юлия Михайловна**

доктор медицинских наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией патологической анатомии научно-исследовательского отдела нейрохирургической патоморфологии, лучевой и лабораторной диагностики Российского научно-исследовательского нейрохирургического института имени профессора А. Л. Поленова – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

**Павлов Артём Владимирович**

доктор медицинских наук, доцент, доцент кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», г. Москва

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.01 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной научной библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; <http://www.volgmed.ru/ru/dsovet/thesis/805/>)

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Григорьева Наталья Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Рост продолжительности жизни населения сопровождается увеличением числа лиц с возрастзависимой патологией, в том числе с когнитивными нарушениями, что представляет одну из главных социальных, экономических и медицинских проблем [Turpin F. R. et al., 2011; Niccoli T., Partridge L., 2012; Bettio, L. E. V. et al., 2017]. Обширные исследования когнитивных функций стареющего организма, выполненные на экспериментальных животных, свидетельствуют о том, что ухудшение памяти связано, как с нарушением синаптических связей между нейронами, так и нарушением пластичности головного мозга, в том числе гиппокампа [Dun Y. et al., 2008; Kim E. J. et al., 2015]. Гиппокамп является одной из наиболее чувствительных структур головного мозга к стрессовым воздействиям [Гуляева Н. В., 2013; Driscoll I., Sutherland R. J., 2005; Whitehead G. et al., 2013; Kim E. J. et al., 2015; Conrad C. D. et al., 2017], представляет мишень для стрессовых гормонов, нейромедиаторов и цитокинов, участвует в формировании стресс-реакции. Дорсальный отдел гиппокампа больше связан с пространственной ориентацией и обладает адаптивной пластичностью, вентральный отдел участвует в эмоциональных реакциях, возникающих в ответ на стрессогенные факторы [Гуляева Н. В., 2013; Hawley D. F. et al., 2012; Scorinho A. A. et al., 2013; Grigoryan G., Segal M., 2016; McEwen B. S. et al., 2016]. Кроме того, вентральный гиппокамп регулирует активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) [Гуляева Н. В., 2013; Freund T. F., Buzsa'ki G., 1996; de Kloet E. R. et al., 1998; Knott A. V., Bossy-Wetzel E., 2009; Wingefeld K., Wolf O. T., 2014].

Представления о патогенетических механизмах стрессовых реакций включают сведения об активации вслед за стресс-реализующими, стресс-лимитирующих систем организма, минимизирующих повреждающее действие стресса [Хлопонин П. А. и др., 2004; Herman J. P., Cullinan W. E., 1997]. Гиппокамп играет важную роль в процессах снижения ответа ГГНС при стрессе, и уменьшении повреждения [Jacobson L., Sapolsky R., 1991; Conrad C. D. et al., 2017]. Атрофия гиппокампа ухудшает его ограничительные влияния и ведет к более длительному ответу со стороны ГГНС на психологические стрессоры [Должиков А. А. и др., 2017; Herman J. P., 1993].

При старении отмечены нарушения в регуляции ГГНС, приводящие к увеличению длительности стресс-реакции, что способствует усугублению вероятности повреждения и ослаблению адаптивных возможностей центральной нервной системы [Wei Q. et al., 2007], и как следствие – развитию нейродегенеративных изменений [Гудошников В. И., 2011; McEwen B. S., 1998, 1999; Driscoll I. et al., 2006; Bartsch T., Wulff P., 2015; 180; Bettio, L. E. V. et al., 2017; Conrad C. D. et al., 2017]. Однако структурные механизмы реализации стрессовых реакций в гиппокампе при старении остаются малоизученными.

**Степень разработанности темы исследования.** В последние годы накоплено немало данных о морфофункциональных изменениях гиппокампа в процессе старения [Косарева П. В. и др., 2014; Максимова К. Ю. и др., 2014, 2015; Bettio, L. E. V. et al., 2017] и при стрессе [Orlowski D. et al., 2012; Kim E. J. et al., 2015; Schoenfeld T. J. et al., 2017], однако большинство исследователей не описывают различия в цитоархитектонике и иммунофенотипе дорсального и вентрального отделов гиппокампа как различных в функциональном аспекте регионов и рассматривают гиппокамп как цельную структуру без привязки к анатомическим ориентирам (например, брегме), что может создавать противоречивость данных [Косарева П. В. и др., 2014; Максимова К. Ю. и др., 2014; Wang, C. Y. et al., 2016; Qu T. T. et al., 2017]. Кроме того, при моделировании различных стрессовых воздействий используются в основном молодые животные [Ai H. et al., 2011; Qu T. T. et al., 2017; Schoenfeld T. J. et al., 2017], а основные механизмы, благодаря которым стрессовое воздействие способствует развитию нейродегенеративных изменений и повреждений в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа стареющего организма, остаются неясными.

Таким образом, механизмы клеточного повреждения и адаптации в гиппокампе при старении и в условиях сочетанного влияния стресса и возраста остаются малоизученными, что определяет целесообразность исследования морфологического субстрата, лежащего в основе морфофункциональной гетерогенности гиппокампа.

**Цель исследования** – охарактеризовать морфофункциональные изменения гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев в норме и при моделировании комбинированного стрессового воздействия.

#### **Задачи исследования**

1. Выявить качественные и количественные морфофункциональные изменения в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа крыс зрелого и старческого возрастов с позиции реализации процессов нейронального повреждения и аутофагии.

2. Охарактеризовать нейрогистологическими и иммуногистохимическими методами признаки повреждения нейронов, изменения экспрессии различных изоформ NO-синтаз (iNOS, eNOS, nNOS) и характеристики аутофагии в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа крыс при моделировании комбинированного стресса.

3. Определить иммунофенотипические особенности дорсального и вентрального отделов гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев в норме и под влиянием комбинированного стресса с позиции реализации нейропротективных механизмов с участием BDNF, GFAP, beclin-1, HSP70.

4. Дать сравнительную характеристику структурных механизмов адаптации в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа крыс зрелого и старческого возрастов с учетом экспрессии сериновой рацемазы и синаптофизина при моделировании комбинированного стрессового воздействия.

#### **Научная новизна исследования**

Впервые на основании комплексного морфологического исследования, включающего в себя оценку иммунофенотипа с применением программной компьютерной морфометрии, дана развернутая характеристика морфофункциональных изменений в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа у крыс зрелого и старческого возрастов. Показано, что повреждения нейронов, сопровождающиеся увеличением экспрессии caspase-3, преобладают в дорсальном отделе гиппокампа.

Впервые выявлено возрастзависимое снижение экспрессии сериновой рацемазы, наиболее выраженное в вентральном отделе гиппокампа, сопровождающееся перераспределением иммунореактивного материала в перикарионы нейронов пирамидного слоя из их дендритов, расположенных в радиальном слое.

Впервые при исследовании NOS-зависимых механизмов с участием iNOS, eNOS, nNOS у крыс зрелого и старческого возрастов выявлены различия в уровнях экспрессии в нейронах, нейропиле, а также в эндотелии капилляров дорсального и вентрального отделов гиппокампа; с участием нейропротективных механизмов в дорсальном отделе гиппокампа у животных в возрасте 24-х месяцев обнаружено появление экспрессии BDNF в нейронах и его увеличение в астроцитах, при реализации процессов аутофагии в вентральном отделе гиппокампа показано выраженное увеличение экспрессии beclin-1 в нейронах пирамидного слоя в сочетании с регрессивными изменениями астроглии в виде уменьшения уровня экспрессии GFAP.

Впервые при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12-ти месяцев наиболее выраженные признаки повреждения обнаружены в нейронах пирамидного слоя CA3 дорсального отдела гиппокампа и в CA1 вентрального отдела, сопровождающиеся увеличением количества нейронов с признаками апоптоза в дорсальном отделе гиппокампа; у крыс в возрасте 24-х месяцев отмечаются менее выраженные признаки повреждения в сочетании с менее выраженной активацией аутофагии по оценке экспрессии beclin-1.

При сравнительном анализе морфофункциональных изменений гиппокампа под влиянием стрессового воздействия выявлено наиболее выраженное снижение уровня экспрессии сериновой рацемазы в вентральном отделе гиппокампа у крыс в возрасте 12-ти месяцев, увеличение – у 24-х месячных животных, что сочетается с прогрессирующим снижением нейрональной пластичности и угнетением BDNF-опосредованных нейропротективных механизмов.

Впервые при воздействии комбинированного стресса проведено иммуногистохимическое исследование изоформ NO-синтаз (iNOS, eNOS, nNOS) в гиппокампе, выявлено увеличение экспрессии iNOS, наиболее выраженное у 12-ти месячных животных в вентральном отделе гиппокампа, снижение экспрессии - у 24-х месячных животных в вентральном отделе на фоне увеличения экспрессии в дорсальном отделе, что сочетается с выраженным снижением экспрессии eNOS в эндотелии капилляров, нейропиле радиального слоя дорсального отдела гиппокампа в обеих возрастных группах при увеличении удельного количества eNOS-иммунопозитивных нейронов у 24-х месячных крыс в пирамидном слое.

Впервые на основании анализа полученных морфологических данных о реализации процессов клеточной гибели, адаптации, включая различные механизмы нейропластичности сформулирована научно-теоретическая концепция о цитоархитектонической и иммунофенотипической регион-специфической гетерогенности гиппокампа у крыс зрелого и старческого возрастов в норме и под влиянием комбинированного стресса.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты исследования существенно уточняют и расширяют имеющиеся данные об особенностях гистологического строения дорсального и вентрального отделов гиппокампа при старении, раскрывают сущность патоморфологических изменений в гиппокампе при моделировании комбинированного стресса. Выявленные в работе особенности экспрессии различных биомаркеров открывают новые перспективы для поиска и дальнейшего изучения веществ, обладающих нейропротективной активностью при лечении и профилактики возрастных изменений головного мозга, как в процессе нормального старения, так и в условиях стресса. Результаты морфометрического и иммуногистохимического исследований могут быть использованы при разработке способов фармакологической коррекции возрастзависимой и стресс-индуцированной патологии нервной системы.

#### **Методология и методы исследования**

Работа представляла собой экспериментальное исследование и была выполнена на 40 нелинейных белых крысах зрелого (12 месяцев) и старческого (24 месяца) возрастов [Западнюк И. П. и др., 1983]. Моделирование стрессового воздействия осуществлялось путём непредсказуемого комбинирования нескольких стрессирующих факторов (шум, вибрация, пульсирующий яркий свет) на фоне ограничения подвижности и колебания температуры среды в течение 7 дней (ежедневно по 30 минут) [Тюренков И. Н. и др., 2013]. Эвтаназию проводили через 24 часа после последнего стрессового воздействия. Объектом для морфофункционального исследования являлся гиппокамп. В работе были использованы современные морфологические методы (нейрогистохимический, иммуногистохимический, метод программной компьютерной морфометрии), статистический анализ и специализированное технологическое оборудование ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России и лаборатории морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», что позволило выполнить поставленные цели и задачи.

Исследование было одобрено Региональным независимым этическим комитетом, протокол № 207-2014 от 25.12.2014 г.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Морфофункциональные изменения гиппокампа у экспериментальных животных старческого возраста характеризуются прогрессирующим повреждением нейронов в сочетании с развитием аутофагии, снижением нейрональной пластичности структур гиппокампа, в том числе нарушением NMDA-рецепторно-опосредованной нейротрансмиссии.

2. При моделировании комбинированного стресса на фоне возрастных изменений у экспериментальных животных в гиппокампе отмечается нарастание процессов повреждения нейронов с активацией аутофагии, в том числе с изменением экспрессии различных изоформ NO-синтаз, снижение способности эндотелия капилляров к синтезу NO и регуляции сосудистого тонуса, прогрессирующее снижение синаптической пластичности, уменьшение влияния компонентов стресс-лимитирующих систем и NMDAR-зависимой синаптической пластичности.

3. Особенности строения гиппокампа у крыс зрелого и старческого возрастов и происходящие в нем морфофункциональные изменения при комбинированном стрессе определяют регион-специфические иммунофенотипические особенности гиппокампа, развитие наиболее выраженных признаков повреждения с признаками аутофагии в дорсальном отделе гиппокампа, повышение продукции NO-синтаз с развитием NO-зависимых механизмов повреждения, преобладающих в вентральном отделе гиппокампа у более молодых животных и в дорсальном отделе гиппокампа – у более старых, повышение экспрессии нейротрофина BDNF в нейронах и астроцитах и снижение eNOS в эндотелии капилляров, наиболее выраженное у 12-ти месячных животных в дорсальном отделе гиппокампа вплоть до полного отсутствия в вентральном отделе у старых животных, прогрессирующее снижение синаптической пластичности, наиболее выраженное в вентральном гиппокампе у старых крыс.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, адекватных для поставленных задач современных методах исследования, статистическим анализом значимости выявленных изменений.

Основные результаты диссертационного исследования докладывались и обсуждались на XVIII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2013); 72, 73 научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014, 2015); научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива, посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета (Волгоград, 2015); научно-практической конференции с международным участием «Деадаптация различного генеза и пути ее фармакологической коррекции» (Пятигорск, 2015); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 120-летней годовщине со дня рождения профессора Б. М. Соколова (Рязань, 2016); XIII Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Петрозаводск, 2016); XI, XII Международной (XX, XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных (Москва, 2016, 2017); Alzheimer's Association International Conference (Canada, Toronto, 2016); V Съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, 2017).

### **Публикации по теме работы**

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 6 в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация изложена на 216 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 88 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 288 источников, в том числе, 27 отечественных и 261 зарубежный.

### **Внедрение результатов исследования**

Основные результаты работы использованы в педагогическом процессе на кафедрах патологической анатомии, гистологии, эмбриологии, цитологии и кафедре биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава РФ, внедрены в научную работу ГБУ ВМНЦ, ФГУП «НИИ гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России, практическую работу ГБУЗ ВОПАБ, НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Волгоград-1 ОАО «РЖД»».

### **Личный вклад**

Автору принадлежит основная роль в разработке дизайна исследования, заборе, фиксации, окраске экспериментального материала с применением иммуногистохимической реакции. Самостоятельно выполнено морфологическое и морфометрическое исследование, проведена статистическая обработка, полученных данных, их анализ и написание текста диссертации. Автор принимал непосредственное участие в написании тезисов, научных статей и подготовке их к публикации в научных изданиях. Участвовал в роли докладчика на различных отечественных и международных конференциях.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В главе 1 представлен **литературный обзор**, в котором рассматривается гистологическая характеристика гиппокампа на этапах старения и его физиологическое значение, отражены морфологические изменения в гиппокампе при различных видах стресса, показана роль стресса в возникновении и развитии нейродегенеративной патологии. **Глава 2** посвящена описанию **материала и методов исследования** и представляет экспериментальное моделирование комбинированного стресса<sup>1</sup>, которое проводилось в соответствии с правилами лабораторной диагностики (GLP), этическими нормами, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), приказами МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г. Дизайн исследования был согласован и одобрен Региональным независимым этическим комитетом, протокол № 207-2014 от 25.12.2014 г. Работа выполнена на 40 нелинейных белых крысах самцах в возрасте 12-ти и 24-х месяцев (ФГПУ Питомник лабораторных животных «Рапполово»). Были сформированы 4 группы по 10 животных в каждой. 1 группа - контрольные крысы в возрасте 12-ти месяцев, 2 группа - контрольные крысы в возрасте 24-х месяцев, 3 группа – стрессированные крысы в возрасте 12-ти месяцев, 4 группа – крысы, подвергшиеся стрессовому воздействию в возрасте 24-х месяцев. Животные подвергались длительному стрессированию в течение 7 дней (ежедневно по 30 минут) в специальной камере, состоящей из 6 изолированных отсеков, каждые 5 минут по стохастической схеме, таким образом, чтобы каждое последующее стрессирующее воздействие (пульсирующий яркий свет, громкий звук, вибрация) было непредсказуемым для животных. Во время стрессирования животные в ячейках были иммобилизованы, а температура внутри камеры повышалась на 7-8°C. Эвтаназию проводили с помощью гильотинного метода с использованием «Гильотины для крыс» (AE0702, производитель «Open Science») через 24 часа после последнего стрессового воздействия. Головной мозг извлекали из полости черепа

<sup>1</sup> *Выражаем искреннюю благодарность зав.кафедрой фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, член-корр. РАН, Заслуженному работнику высшей школы РФ, д.м.н., профессору И. Н. Тюренкову, д.м.н. Е. В. Волотовой, к.фарм.н. Д. В. Куркину и всем сотрудникам кафедры за помощь в проведении эксперимента*

полностью и разрезали во фронтальной плоскости: первая линия разреза – на уровне -1,72 относительно брегмы, вторая – на уровне -6,72, третьим разрезом отсекали мозжечок со стволом мозга. Головной мозг фиксировали в нейтральном забуференном 10 % формалине и далее обрабатывали по стандартной методике с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов возрастающей концентрации. Для получения препаратов гиппокампа второй участок заливали в парафин по стандартной методике и на роторном микротоме изготавливали серийные фронтальные срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по методу Ниссля.

Для иммуногистохимического исследования парафиновые срезы (4 мкм) подвергали депарафинизации. Высокотемпературную демаскировку антигенных детерминант проводили в соответствии с рекомендациями фирм производителей антител. С целью определения экспрессии различных антигенов использовали первичные антитела против: caspase-3, iNOS, eNOS, nNOS, beclin-1, BDNF (GeneTex, Inc), GFAP, HSP70 (Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA), сериновой рацемазы (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., USA), синаптофизина (Dako, Denmark). В качестве визуализирующей системы использовали полимерную систему UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). В качестве хромогена использовали 1 % раствор 3,3-диаминобензидина (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Затем препараты докрашивали гематоксилином Карацци (БиоВитрум, Россия) и заключали в монтирующую среду (Bio-Mount, Bio-Optica, Italy). Использовали позитивные и негативные контроли.

Фронтальные срезы головного мозга изучали на уровне от -2,28 мм до -6,12 мм относительно брегмы [Paxinos G., Watson C., 2007]. Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа «Axio Lab. A1» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany), фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Морфометрическое исследование гиппокампа проводили с использованием модуля Image Analysis программы ZEN 1.1.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

Морфометрическое исследование включало определение степени повреждения нейронов методом подсчёта удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы, ширины пирамидного слоя, площади перикарионов нейронов, площади ядер нейронов, площади цитоплазмы перикарионов нейронов, ядерно-цитоплазматического отношения, относительной площади перикарионов нейронов, относительной площади ядер нейронов, относительной площади цитоплазмы перикарионов нейронов, относительной площади нейропилия и отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропилию. Для оценки результатов иммуногистохимической реакции в CA1 и CA3 дорсального и вентрального отделов гиппокампа определяли: удельное количество иммунопозитивных нейронов, относительную площадь иммунореактивного материала (ИРМ), интенсивность окрашивания в баллах от 0 до 3 (0 – иммунонегативная реакция; 1 – слабовыраженное окрашивание; 2 – умеренно выраженное окрашивание; 3 – максимально выраженное окрашивание).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA). Обобщенные данные представляли в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного интервала (Q1-Q3), где Q1 – 25 перцентиль, Q3 – 75 перцентиль. Различия между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney, U-test) с поправкой Бонферрони.

**В главе 3** представлены **результаты собственных исследований**, дана характеристика морфофункциональным изменениям дорсального и вентрального отделов гиппокампа крыс возрасте 12-ти и 24-х месяцев в норме и в условиях моделирования комбинированного стресса.

**В обсуждении полученных результатов** приводится обобщение данных, полученных в ходе эксперимента, их интерпретация с учетом литературных фактов.

Обнаруженные нами у старых крыс (24 месяца) структурные признаки повреждения нейронов, преимущественно, пирамидного слоя CA1 и CA3 гиппокампа свидетельствуют о нарастании выраженности дистрофических и атрофических изменений нейронов и соотносятся с данными литературы о возрастзависимом увеличении дегенеративных изменений в CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа, что продемонстрировано на модели преждевременно стареющих крыс линии OXYS [Максимова К. Ю. и др., 2015]. Выявленное в нашем эксперименте сочетание процессов повреждения нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 гиппокампа с атрофическими изменениями у 12-ти и 24-х месячных крыс, подвергнутых длительному воздействию комбинированного стресса (Таблица 1), может быть связано с наблюдаемым при старении нарушением регуляции в ГГНС, что приводит к увеличению негативного влияния глюкокортикоидов в условиях продолжительного комбинированного стресса.

Признаки повреждений нейронов у 24-х месячных старых крыс и 12-ти месячных стрессированных крыс в дорсальном отделе гиппокампа были более выражены в пирамидном слое цитоархитектонической области CA3 и характеризовались увеличением удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы на 19,6 % ( $p < 0,001$ ) и 15,6 % ( $p < 0,001$ ), соответственно, а в вентральном отделе гиппокампа – в цитоархитектонической области CA1, удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы увеличивалось на 13,4 ( $p < 0,001$ ) % и 17 % ( $p < 0,001$ ), соответственно (Рисунок 1), что может быть связано с метаболическими и морфофункциональными особенностями нейронов различных отделов гиппокампа и с недостаточностью компенсаторно-приспособительных реакций у крыс при старении [Максимова К. Ю. и др., 2014], а при стрессе с функциональными регион-специфическими ответами гиппокампа на стрессоры.

Согласно литературным данным, в процессе развития необратимых изменений нейронов выделяют несколько механизмов клеточной гибели, в первую очередь - апоптоз. В нашем эксперименте в пирамидном слое дорсального отдела гиппокампа обнаружено увеличение удельного количества caspase-3 иммунопозитивных нейронов на 35,5 % ( $p = 0,016$ ) в CA1 и на 22,2 % ( $p < 0,001$ ) в CA3 у старых крыс, на 36,4 % ( $p = 0,007$ ) в CA1 и на 13,8 % ( $p < 0,001$ ) в CA3 у 12-ти месячных стрессированных животных, что свидетельствует о необратимых изменениях нейронов пирамидного слоя [Жаботинский Ю. М., 1965]. В вентральном отделе гиппокампа значимых различий в экспрессии caspase-3 обнаружено не было, что, по-видимому, связано с другими каспаза-независимыми механизмами клеточной гибели. Считается, что гибель нейронов при апоптозе связана с обильным притоком ионов  $Ca^{2+}$  в клетку, выходом цитохрома C и апоптоз индуцирующего фактора (AIF) из митохондрий в цитозоль, а также выходом ионов  $Ca^{2+}$  и факторов, модулирующих экспрессию про- и антиапоптотических генов из цистерн эндоплазматической сети. Немаловажная роль отводится перекисному окислению, которое может индуцировать митохондриальную проницаемость, приводя к снижению уровня нейротрофического фактора и гибели нейронов [Mattson M. P., Magnus T., 2006].

Общим механизмом повреждения нейронов гиппокампа как при многих нейродегенеративных расстройствах, так и при хроническом стрессе является эксайтотоксическое действие высоких концентраций глутамата, которое, согласно общепринятой точке зрения, осуществляется в основном за счёт сверхактивации NMDA-рецепторов [Fujikawa D. G., 2010]. К настоящему времени известно, что чрезмерная стимуляция extrasинаптических NMDA-рецепторов GluN2B вызывает множество эффектов, включая нарушение внутриклеточного кальциевого гомеостаза, образования свободных радикалов, активацию протеаз и киназ [Wang Y., Qin Z-H., 2010], запуск механизмов клеточной гибели путём активации сигнальных нейрональных комплексов смерти (NDC) [Tu W. et al., 2010]. Гибель клеток в эксайтотоксичности по большей части не

связана с каспаза-зависимым путём. Ранним патологическим событием эксайтотоксичности служит сверхактивация поли (АДФ-рибоза) полимеразы-1 (PARP-1), что приводит к уникальной форме клеточной гибели, называемой парфанатоз. Биохимические события в парфанатозе включают раннее накопление PARP-1 и ядерную транслокацию AIF из митохондрий [Fujikawa D. G., 2010]. Активность белков клеточной гибели caspase-3 и PARP-1 увеличивается в клетках головного мозга во время нормального процесса старения [Mattson M. P., Magnus T., 2006].

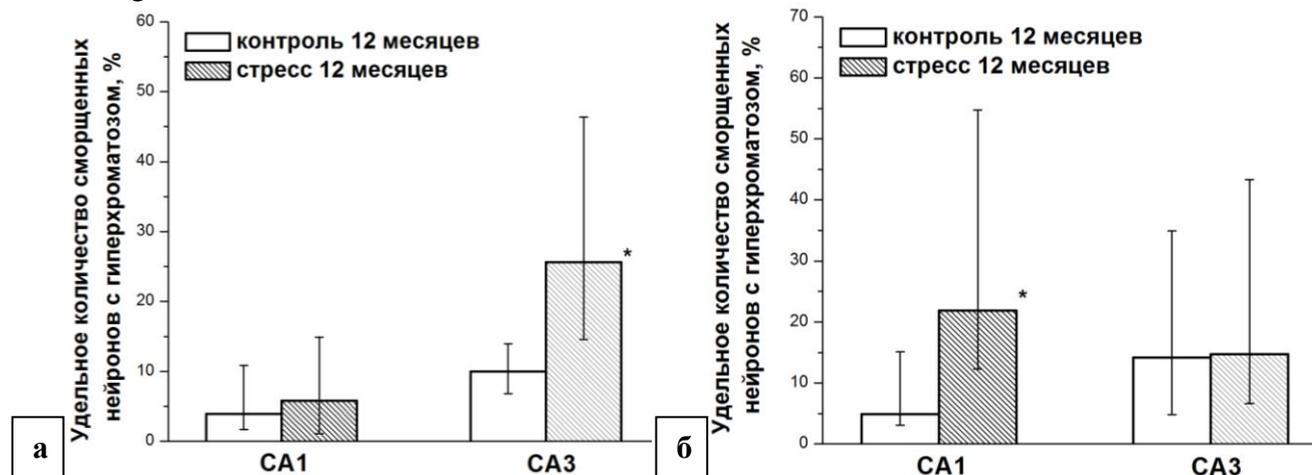


Рисунок 1. Динамика изменения удельного количества сморщенных нейронов пирамидного слоя с гиперхроматозом цитоплазмы в CA1 и CA3 дорсального (а) и вентрального отдела (б) гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс (б). \* - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони)

Известно, что мягкий стресс может вызывать аутофагический ответ, который повышает порог индукции апоптоза [Martins I. et al., 2011]. В настоящее время в контексте нейродегенеративных нарушений индукция аутофагии представляет собой нейропротективный ответ [Tan C. C. et al., 2014]. Цитозольная форма beclin-1 регулирует аутофагию [Pattingre S. et al., 2008]. Обнаруженное нами в вентральном отделе гиппокампа увеличение степени экспрессии beclin-1 (2-3 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя CA1 у старых и 12-ти месячных стрессированных животных и увеличение относительной площади beclin-1-ИРМ на 3,6 % ( $p=0,016$ ) в CA1 дорсального отдела гиппокампа только у 12-ти месячных стрессированных крыс, а также увеличение относительной площади beclin-1-ИРМ на 5,9 % ( $p=0,003$ ) в CA1 вентрального отдела гиппокампа у 24-х месячных стрессированных животных, может свидетельствовать об активации процессов аутофагии. Поскольку, процесс аутофагии индуцируемый физиологическими стрессорами способствует как выживанию клеток, так и их гибели, базовый уровень аутофагической активности может быть нейропротективным при удалении нежелательных или аномальных белков в нейронах, с другой стороны, длительная аутофагия может привести к гибели клеток [Yu S. et al., 2008]. Таким образом, полученные нами данные о морфологических изменениях в гиппокампе могут свидетельствовать о топографических отличиях в реализации механизмов аутофагии у взрослых и старых крыс в норме и в ответ на действие факторов комбинированного стресса.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о преимущественном увеличении экспрессии биомаркера iNOS в гиппокампе, как у крыс старческого возраста, так и у животных на фоне длительного комбинированного стрессового воздействия, что может свидетельствовать о повышенной продукции NO и приводить к накоплению свободных радикалов пероксинитритов, активации перекисного окисления липидов, оксидативному повреждению нейронов, нарушению структуры белка в головном мозге за счет нитрования, что оказывает нейротоксическое действие, как в условиях нормального старения, так и при развитии нейродегенеративных состояний [Ховряков А. В. и др., 2009; Chakraborti A. et al.,

Таблица 1 – Изменение морфометрических параметров нейронов пирамидного слоя гиппокампа крыс, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>2</sub>)

Морфометрические показатели	Дорсальный отдел гиппокампа								Вентральный отдел гиппокампа							
	Контроль 12 месяцев		Контроль 24 месяца		Стресс 12 месяцев		Стресс 24 месяца		Контроль 12 месяцев		Контроль 24 месяца		Стресс 12 месяцев		Стресс 24 месяца	
	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3
Площадь ядер нейронов, мкм <sup>2</sup>	57,7 (49,9-66,1)	64,5 (47,8-80,2)	61,4* (50,3-73,6)	65,1 (44,6-83,5)	46,7* (37,6-58,5)	49,1* (32,1-72,7)	50 <sup>#</sup> (33,9-65)	60,7 (40,7-82,3)	48,9 (37,7-62)	67,1 (50,1-82,5)	60,8* (46,7-76,2)	66,2 (39,9-86,8)	51 (38,7-63,2)	60,9 (33,6-82,6)	61,8 (42,2-85,4)	58,3 (39,2-84,5)
Площадь перикарионов нейронов, мкм <sup>2</sup>	117,9 (101,7-136,2)	140,7 (107,1-172,8)	126,9* (106,4-151,9)	154,2* (111,2-193,6)	100* (83,9-119,1)	126,4* (85,7-164,1)	102,6 <sup>#</sup> (81,9-130,5)	142,3 (98,4-183,1)	105,5 (84,9-132,1)	158,8 (130,4-190)	132,2* (108,9-161,6)	154,3 (110-196,1)	100,4 (83-118,9)	132,8* (89,8-166,7)	120,8 <sup>#</sup> (90,1-157,5)	140,3 (104,4-179,5)
Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм <sup>2</sup>	59,5 (49,1-74,4)	73,6 (53,6-96,5)	63,1 (50,6-81)	86,2* (63,4-109,8)	51,1* (42,6-64,2)	72,9 (50,9-94,1)	52,9 <sup>#</sup> (40,8-65,3)	74,6 <sup>#</sup> (52,2-103,7)	55,8 (44-71,3)	88,7 (74,2-111,9)	70,9* (56,6-89,5)	85,7 (65,8-117,5)	48* (37,7-60,4)	66,8* (50,5-83,7)	58,1 <sup>#</sup> (44,9-75,7)	77 <sup>#</sup> (59,6-98,4)
Относит. площадь ядер нейронов, %	20 (17,9-23,1)	18,5 (16,9-20,6)	20,7 (16,1-24,1)	16,9* (14,8-19,8)	19,4 (16,7-22,2)	14,1* (11,3-19,1)	20,2 (15,4-23,1)	14,8 (12,5-19,6)	18,4 (15,5-21,1)	15,5 (13,9-18,1)	19,4 (16,3-21,8)	15,3 (12,5-17,1)	19,9 (14,2-26)	18,4 (14,6-20,5)	19,6 (14,2-22,8)	13,1 (12,3-16,7)
Относит. площадь перикарионов нейронов, %	42,5 (37,2-45,6)	41,3 (36,1-46,9)	43,6 (36,9-47,4)	41,9 (35,2-46,7)	41,1 (31,3-48,9)	35,4* (30,5-44,8)	42,4 (33,4-48,4)	36,5 <sup>#</sup> (28-44,1)	39,6 (35,1-44,9)	38,2 (33,3-43,6)	43,3 (31,1-47,9)	35,4 (30,1-41,3)	41,1 (30,2-46,8)	35,4 (31,3-42,5)	36,5 <sup>#</sup> (33,8-42,7)	30,7 (30-32,1)
Относит. площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	22,2 (19-22,9)	23,1 (18,9-25,8)	22,1 (19,9-24,2)	23,1 (19,5-27,2)	20,4 (18-24,5)	21,4 (18,5-24,3)	22,1 (18,2-25,1)	19,9 <sup>#</sup> (15,7-23,9)	21,3 (19,1-24,2)	22,1 (19,9-25,2)	24,2 (20,6-26,1)	21,1 (17,3-25,2)	19,4 (15,3-22,9)	18,6* (15,9-23)	18,1 <sup>#</sup> (17,3-20,5)	17,2 <sup>#</sup> (14,7-18,2)
Относит. площадь нейротила, %	57,5 (54,4-62,8)	58,7 (53,1-63,9)	56,4 (52,6-63,1)	58,1 (53,3-64,8)	58,9 (51,1-68,7)	64,6* (55,2-69,5)	57,6 (51,6-66,6)	63,5 <sup>#</sup> (56-72,1)	60,4 (55,1-64,9)	61,8 (56,4-66,7)	56,7 (52,1-62,9)	64,4 (58,7-69,9)	58,9 (53,2-69,8)	64,6 (57,5-68,7)	63,5 <sup>#</sup> (57,3-66,2)	69,3 (67,9-70)

Значимые различия обозначены при сравнении: (\*) - с группой контроль 12 месяцев; (<sup>#</sup>) - с группой контроль 24 месяца (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони)

2011]. При этом в вентральном отделе гиппокампа, по сравнению с дорсальным отделом у 24-х месячных животных обнаружено наиболее выраженное возрастзависимое, а у 12-ти месячных животных, подвергнутых комбинированному стрессу, стресс-индуцированное увеличение экспрессии iNOS. Поскольку у старых крыс отмечалось как повышение процента иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя в СА1 на 52,9 % ( $p < 0,001$ ) и в СА3 на 48,9 % ( $p < 0,001$ ), так и увеличение степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов всех слоёв (2-3 балла).

При этом у 12-ти месячных стрессированных животных увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя в СА1 на 39 % ( $p < 0,001$ ) и в СА3 на 54,3 % ( $p < 0,001$ ) сочеталось с увеличением относительной площади ИРМ в СА1 на 17 % ( $p < 0,001$ ) и в СА3 на 11,5 % ( $p < 0,001$ ). У стрессированных животных в возрасте 24-х месяцев, по сравнению с 12-ти месячными крысами, изменения в экспрессии биомаркера iNOS в дорсальном отделе гиппокампа имели более выраженный характер. Кроме того, нейрональная атрофия и нейродегенеративные процессы могут активировать iNOS в клетках микроглии и астроцитах, которые высвобождают токсические количества NO, способствуя тем самым развитию нейродегенеративных изменений, наблюдаемых в процессе старения. Экспериментальные данные показывают, что в процессе старения в коре головного мозга появляются iNOS-позитивные нейроны, связанные со значительным увеличением нитротирозина [Calabrese V. et al., 2007; Peng Y. L. et al., 2012]. Действие хронического стресса вызывает усиление экспрессии iNOS как в новой коре, так и в гиппокампе у крыс и мышей [Ховряков А. В. и др., 2009; Peng Y. L. et al., 2012]. Обнаруженные нами у 24-х месячных стрессированных крыс в дорсальном и в вентральном отделах гиппокампа разнонаправленные изменения в характере распределения биомаркера iNOS, которые в дорсальном отделе выражались увеличением степени цитоплазматической экспрессии iNOS-ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 (2 балла), в сочетании с увеличением удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1 на 90,7 % ( $p < 0,001$ ) и СА3 на 53,4 % ( $p < 0,001$ ), а также увеличением относительной площади ИРМ в цитоархитектонической области СА1 на 8,8 % ( $p < 0,001$ ), а в вентральном отделе снижением степени цитоплазматической экспрессии iNOS-ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 (1 балл), в сочетании с уменьшением удельного количества иммунопозитивных нейронов как в СА1 на 55,8 % ( $p < 0,05$ ), так и в СА3 на 73,8 % ( $p < 0,001$ ), а также снижением относительной площади ИРМ в цитоархитектонической области СА3 на 11 % ( $p < 0,001$ ), по нашему мнению, могут быть связаны с регион-специфическими ответами гиппокампа на стрессоры при старении в условиях моделирования комбинированного стресса. Принимая во внимание данные о снижении уровня iNOS в гиппокампе крыс при остром стрессе с предшествующей 21-дневной социальной изоляцией [Zlatković, J. et al., 2014], можно предположить, что уровень экспрессии различных изоформ NOS при стрессе зависит от длительности стрессового воздействия, что косвенно подтверждается временными и количественными различиями вклада изоформ NOS в продукцию пероксинитрита при моделировании черепно-мозговой травмы [Hall E. D. et al., 2012]. Необходимо отметить, что у животных всех экспериментальных групп нами выявлены особенности распределения iNOS-ИРМ, который экспрессируется в нейроне радиального слоя СА1-СА3 дорсального отдела гиппокампа в виде полумесяца.

Имеются противоречивые данные о характере экспрессии nNOS в головном мозге при старении и стрессе [Ховряков А. В. и др., 2009; Liu P. et al., 2003; Siciliano R. et al., 2011]. Нами не обнаружено достоверного изменения экспрессии nNOS в гиппокампе.

Важная роль системы оксида азота в процессе старения головного мозга обусловлена не только нейротоксическим, но и нейропротекторным действием NO [Calabrese V. et al., 2007; Garry P. S. et al., 2015], синтезируемым eNOS, который выступает в роли сосудорасширяющего агента, участвует в контроле вазодилатации и местного кровотока,

модулирует процессинг APP, влияет на функциональное состояние микроглии и когнитивные функции [Hall E. D. et al., 2012]. Обнаруженное нами преимущественное снижение экспрессии биомаркера eNOS в гиппокампе экспериментальных животных свидетельствует об уменьшении базового уровня продукции eNOS в нервной ткани гиппокампа стареющих животных, что отражает возрастзависимые и стресс-индуцированные процессы снижения нейрональной пластичности структур гиппокампа [Zhao Y. et al., 2015].

В дорсальном отделе гиппокампа, по сравнению с вентральным отделом, у 24-х месячных животных обнаружено наиболее выраженное возрастзависимое, а у 12-ти месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, стресс-индуцированное уменьшение экспрессии eNOS, поскольку отмечалось снижение степени экспрессии eNOS-ИРМ (0-1 балл), не только в эндотелии капилляров различных слоёв гиппокампа, но и наблюдались различия в характере экспрессии ИРМ в нервной ткани гиппокампа. При этом у старых крыс в дорсальном отделе гиппокампа отмечалось уменьшение удельного количества eNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя не только в цитоархитектонической области CA1 на 56,1 % ( $p < 0,001$ ), но и в CA3 на 78 % ( $p < 0,001$ ), а также снижение степени экспрессии биомаркера в нейропиле радиального слоя CA1 и CA3 (0-1 балл), и относительной площади ИРМ в CA1 на 24,8 % ( $p < 0,0501$ ), в CA3 на 18,5 % ( $p < 0,001$ ).

Уменьшение уровня продукции и содержания eNOS в структурах гиппокампа в группе старых 24-х месячных животных может способствовать развитию повышенной чувствительности нейронов к ишемии при старении, так как в исследованиях на нокаутных мышцах продемонстрировано участие eNOS в механизмах защиты нейронов головного мозга при ишемии [Austin S. A. et al., 2010], так как селективная потеря эндотелиального NO приводит к нарушению функционального состояния нейронов, что позволяет рассматривать эндотелиальный NO в качестве ключевой молекулы, объединяющей в единый морфофункциональный блок сосуды головного мозга и нейроны [Katusic Z. S., Austin S. A., 2014]. При изучении экспрессии eNOS в сосудах микроциркуляторного русла в гиппокампе выявлено снижение степени экспрессии в капиллярах у старых крыс (1 балл), что рассматривается нами как фактор, способствующий возникновению вазоспастических реакций в сосудах головного мозга при старении, поскольку NO является мощным вазодилататором [Calabrese V. et al., 2007]. Вместе с этим у 12-ти месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса в CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа, в отличие от вентрального, где обнаружено снижение степени экспрессии eNOS только в эндотелии капилляров (1 балл), выявлено снижение степени экспрессии eNOS в нейропиле радиального слоя (до 0 баллов) и практически полное исчезновение в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (0 баллов) CA1 и CA3, в сочетании с уменьшением удельного количества иммунопозитивных нейронов в CA1 на 61,2 % ( $p < 0,001$ ), в CA3 - на 44 % ( $p < 0,001$ ) и относительной площади ИРМ в CA1 на 33,5 % ( $p < 0,001$ ), в CA3 - на 19,5 % ( $p < 0,001$ ).

Обнаруженные в нашем эксперименте у 24-х месячных стрессированных крыс, в отличие от 12-ти месячных стрессированных крыс, разнонаправленные изменения в характере экспрессии eNOS в нервной ткани гиппокампа при сохранении уменьшения исследуемого биомаркера в эндотелии сосудов (0-1 балл) в обеих группах, преимущественное увеличение в дорсальном отделе и снижение в вентральном, выражающееся увеличением степени экспрессии eNOS-ИРМ в нейронах пирамидного слоя CA3 (2 балла), в сочетании с повышением удельного количества иммунопозитивных нейронов в CA1 на 50,8 % ( $p < 0,001$ ), в CA3 - на 78 % ( $p < 0,001$ ) и снижением относительной площади eNOS-ИРМ в CA1 на 5,4 % ( $p = 0,004$ ) в дорсальном отделе гиппокампа, практически полным отсутствием экспрессии ИРМ в нейропиле радиального слоя (0-1 балл) в сочетании с увеличением удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 на

10 % ( $p=0,006$ ) в вентральном отделе гиппокампа могут объяснить выявленные ранее различия в нарушениях мнестических и когнитивных функций у стареющих крыс при стрессе [Волотова Е. В. и др., 2014]. Кроме того, выявленные морфологические изменения могут свидетельствовать об активации процессов ускоренного старения у крыс в условиях хронического стрессового воздействия при длительной сохранности механизмов увеличения образования эндотелиальной NO-синтазы у старых животных.

С NO сопряжена активация NMDA-рецепторов, максимальная концентрация которых у крыс представлена в CA1 зоне гиппокампа. NO по принципу обратной связи гомеостатической регуляции вызывает уменьшение активности сериновой рацемазы (CP) и тем самым снижает уровень D-серина, что, в свою очередь, приводит к уменьшению NMDA-зависимой нейротрансмиссии [Mustafa A. K. et al., 2009]. Полученные нами данные свидетельствуют об однонаправленном характере изменения распределения CP в вентральном и дорсальном отделах гиппокампа у 24-х месячных старых крыс и у 12-ти месячных стрессированных животных, которые выражаются как в перераспределении ИРМ с его преимущественной локализацией в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, так и возрастзависимым и стресс-индуцированным снижением степени экспрессии CP в дендритах радиального слоя (0-1 балл) в сочетании с уменьшением относительной площади ИРМ в CA1 и CA3, что по-видимому, связано с нарушением интранейронального транспорта фермента и рассматривается как признак нарушения NMDAR-опосредованной нейротрансмиссии в гиппокампе. Таким образом, отмеченная нами преимущественная экспрессия CP в цитоплазме нейронов гиппокампа, согласуются с литературными данными о локализации фермента в нейронах и лишь незначительно в астроцитах [Campanini B. et al., 2013]. Обнаруженные нами возрастзависимые изменения в степени и характере экспрессии CP были наиболее выражены в вентральном отделе гиппокампа, по сравнению с дорсальным, и характеризовались, не только снижением степени экспрессии CP в дендритах радиального слоя CA1 (0-1 балл), а полным отсутствием экспрессии в дендритах радиального слоя цитоархитектонических областей CA1 и CA3 в сочетании со снижением относительной площади ИРМ в CA1 на 7,4 % ( $p<0,001$ ), в CA3 на 12,1 % ( $p<0,001$ ), что может способствовать ухудшению гиппокамп-зависимых когнитивных процессов при старении, поскольку у мышей с отсутствием гена CP наряду с дефицитом памяти [Guercio G. D. et al., 2014]. Стресс-индуцированные изменения характеризовались в дорсальном отделе гиппокампа снижением степени экспрессии CP (0-1 балл) в дендритах радиального слоя CA1 и CA3, в вентральном отделе гиппокампа отмечалось снижение относительной площади CP-ИРМ в CA3 на 8,1 % ( $p<0,001$ ). При моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 24-х месяцев, в отличие от 12-ти месячных стрессированных животных в вентральном отделе гиппокампа отмечается увеличение степени экспрессии биомаркера CP (3 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя в сочетании с увеличением относительной площади CP-ИРМ в CA1 на 8,3 % ( $p=0,004$ ) и в CA3 на 3 % ( $p=0,004$ ). Напротив экспрессия iNOS в пирамидном слое вентрального отдела гиппокампа стрессированных старых крыс снижалась, что, по-видимому, способствовало уменьшению образования NO, а также активации CP по принципу обратной связи. Однако интранейронального транспорта фермента не наблюдалось, поскольку ИРМ был локализован в цитоплазме перикарионов нейронов. При этом, по-видимому, происходило уменьшение синтеза D-серина и, как следствие, нарушение когнитивных и мнестических функций. Данная гипотеза подтверждается обнаружением снижения двигательной и ориентировочно-исследовательской активности у крыс 12-ти и 24-х месячного возраста, а у старых животных - ухудшение мнестической функции при длительном комбинированном стрессовом воздействии [Волотова Е. В. и др., 2014].

Выявленное в нашем эксперименте уменьшение ширины пирамидного слоя цитоархитектонической области CA1 дорсального отдела гиппокампа на 9 % ( $p<0,001$ ) у 24-х

месячных старых крыс, свидетельствует о признаках возрастной атрофии, которая связана с апоптозом нейронов в постнатальном периоде развития, поскольку известно, что при рождении пирамидный слой у крыс состоит из 6-10 рядов нейронов, а с возрастом становится тоньше; и у взрослых крыс он состоит из двух или трех слоев клеток [Andersen P., 2007]. Снижение ширины пирамидного слоя цитоархитектонических областей CA1 на 8,4 % ( $p=0,010$ ) и CA3 на 13,1 % ( $p<0,001$ ) у 12-ти месячных стрессированных крыс, по-видимому, может быть связано с ускоренными темпами старения в условиях комбинированного стресса. У 24-х месячных крыс по сравнению с 12-ти месячными животными в пирамидном слое вентрального отдела гиппокампа обнаружены дистрофические изменения нейронов, наиболее выраженные в CA1, поскольку сопровождалось не только увеличением средней площади перикарионов на 25,3 % ( $p<0,001$ ), но и увеличением средней площади ядер на 24,3 % ( $p<0,001$ ) (Таблица 1), что может свидетельствовать о компенсаторной гипертрофии пирамидных нейронов, так как цитоплазма сохраняла нормохромность при окраске по методу Ниссля.

При моделировании комбинированного стресса у 12-ти и 24-х месячных стрессированных крыс в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа нами обнаружены признаки атрофических изменений нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 (Таблица 1), что может рассматриваться как морфологическое подтверждение уменьшения влияния компонентов стресс-лимитирующих систем в условиях комбинированного стрессового воздействия и способствовать ослаблению ингибирующих эффектов на ГГНС и более длительному ответу на стрессоры [Herman J. P. et al., 2005]. Показано, что хронический стресс или чрезмерное воздействие глюкокортикоидов ухудшает функции гиппокампа на различных уровнях нервной организации, вызывает уменьшение количества и плотности нейронов в гиппокампе грызунов и приматов [Lucassen P. J. et al., 2014], атрофию дендритов и исчезновение дендритных шипиков в пирамидном слое CA3 зоны гиппокампа, а также приводит к нарушению синаптических механизмов пластичности [Ghosh S. et al., 2013], что сопровождается когнитивными нарушениями [Волотова Е. В. и др., 2014], приводит к потере памяти и способствует снижению способности к обучению [Aliev G. et al., 2009]. Под влиянием комбинированного 14-суточного стрессового воздействия у 3 месячных крыс наблюдались структурные отличия в вентральном и дорсальном субрегионах гиппокампа [Hawley D. F. et al., 2012]. Различия в выживании, нейрональной дифференцировке в субрегионах гиппокампа при стрессе авторы связывают с уменьшением в вентральном и увеличением в дорсальном уровня экспрессии мозгового фактора роста BDNF, что может способствовать формированию локальных атрофических изменений нейронов на фоне реализации процессов клеточного повреждения, поскольку BDNF являясь наиболее распространенным нейротрофином в головном мозге, регулирует процессы выживаемости клеток, нейрогенез и нейропластичность [Mattson M. P. et al., 2004; Kowiański P. et al., 2017].

Таким образом, обнаруженное нами отсутствие экспрессии BDNF в вентральном отделе гиппокампа и повышение уровня экспрессии BDNF в CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа, выражающееся у старых крыс и крыс в возрасте 12-ти месяцев, находившихся под воздействием комбинированного стресса, увеличением степени экспрессии BDNF как в цитоплазме нейронов пирамидного слоя (1-2 балла), так и в цитоплазме астроцитов (3 балла), а у 24-х месячных стрессированных крыс только в цитоплазме нейронов (1-2 балла), может быть связано с функциональными регион специфическими особенностями гиппокампа и с его регион специфической реакцией на стрессоры. Выявленная в нашем эксперименте экспрессия BDNF в цитоплазме нейронов пирамидного слоя и цитоплазме астроцитов, согласуется с литературными данными о его локализации в астроцитах, нейронах, шванновских клетках [Kowiański P. et al., 2017].

Обнаруженное нами у 24-х месячных стрессированных животных в вентральном отделе гиппокампа появление экспрессии белков теплового шока HSP70 (1 балл) в

цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3, а в дорсальном отделе только в СА3 (1 балл), по-видимому, отражает активацию нейропротективных механизмов на фоне атрофических изменений в гиппокампе в ответ на стрессоры у стареющих животных и согласуется с данными литературы об экспрессии HSP70 в гиппокампе крыс на моделях хронического иммобилизационного и мягкого стресса [Li Q. et al., 2006].

У 24-х месячных животных нами выявлено увеличение степени экспрессии синаптофизин (СФ)-ИРМ (3 балла) в нейроне пирамидного, радиального и молекулярного слоёв СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа, мы полагаем, что это связано с перераспределением синаптических пузырьков в пресинаптической части синапсов с их преимущественной локализацией у пресинаптической мембраны, что и определяет увеличение степени экспрессии СФ. Данная гипотеза подтверждается в исследовании, проведённом Максимовой К. Ю. и соавт. [Максимова К. Ю. и др., 2014], у 18 месячных крыс линии Вистар и OXYs, по сравнению с 5 месячными животными в цитоархитектонической области СА1 гиппокампа наблюдались признаки дезорганизации синаптических везикул, происходило увеличение их концентрации у пресинаптической мембраны. Обнаруженное нами у 12-ти и 24-х месячных животных в нейроне пирамидного слоя СА1-СА4 дорсального отдела гиппокампа распределение СФ-ИРМ на фронтальных срезах в виде полумесяца, наиболее выраженное у старых животных, а в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа у крыс в возрасте 12-ти месяцев распределение СФ-ИРМ по поверхности дендритов пирамидного и радиального слоев гиппокампа, наиболее выраженные в цитоархитектонической области СА1, отражает регион-специфические иммунофенотипические особенности гиппокампа в процессе старения. Распределение СФ-ИРМ по поверхности дендритов, вероятно, может быть связано с расположением синаптических контактов на шипиках дендритов, образующих цепочку следующих друг за другом межнейрональных контактов по типу “муфты” [Боголепов Н. Н., 2010], большое количество таких контактов определено на дендритах пирамидных нейронов гиппокампа [Falougy El. et al., 2008]. Выявленное в нашем эксперименте у стрессированных крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев в СА1 и СА3 дорсального и вентрального отделов гиппокампа снижение относительной площади СФ-ИРМ, наиболее выраженное в СА1 (на 30,7 % ( $p < 0,001$ )) вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных стрессированных животных, у животных старшей возрастной группы в сочетании с уменьшением степени экспрессии СФ-ИРМ (1 балл) в нейроне всех слоев гиппокампа может свидетельствовать о снижении процессов синаптической пластичности при воздействии комбинированного стресса, так как численность СФ отражает синаптическую плотность [Колос Е. А. и др., 2015; Коржевский Д. Э. и др., 2015]. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о снижении экспрессии СФ в гиппокампе при моделировании различных видов стрессового воздействия [Amin S. N. et al., 2015; Das S. K. et al., 2016].

Обнаруженное нами преобладание регрессивных реакций астроглии в вентральном отделе гиппокампа у 24-х месячных животных, по сравнению с более молодыми животными, выражающиеся уменьшением относительной площади GFAP-ИРМ в СА1 на 5 % ( $p < 0,001$ ) и в СА3 на 6,8 % ( $p < 0,001$ ), может свидетельствовать о подавлении астроглиальной реактивности, что увеличивает уязвимость нейронов, способствует развитию патологических изменений в нервной ткани и изменяет процессы регенерации при старении [Pekny M. et al., 2014]. Напротив, при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев в СА1 и СА3 дорсального и вентрального отделов гиппокампа обнаружено прогрессивное увеличение астроцитарной глии, наиболее выраженное в вентральном отделе гиппокампа 24-х месячных стрессированных животных, по сравнению с дорсальным отделом, и характеризующиеся увеличением относительной площади GFAP-ИРМ в СА1 на 4,7 % ( $p < 0,001$ ), в СА3 на 10,3 % ( $p < 0,001$ ), что отражает адаптивный результат реактивного астроглиоза, который обычно полезен [Pekny M. et al., 2014]. Атрофия астроглии может

уменьшить охват эндотелия сосудов головного мозга, что будет способствовать развитию дефицита кровоснабжения [Bell R. D., Zlokovic B. V., 2009]. Выявленное нами у 24-х месячных животных перераспределение GFAP-иммунопозитивных астроцитов с преимущественной локализацией их тел и отростков не между нейронами пирамидного слоя, а в радиальном и молекулярном слоях CA1 и CA3, вероятно, может быть связано с морфологической атрофией астроглиальных клеток, которая отражает уменьшение их территориальных областей и, скорее всего, указывает на уменьшение астроглиального охвата нейронов и синапсов, расположенных в этих областях [Rodríguez-Arellano J. J et al., 2016].

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев и у животных, подвергнутых комбинированному стрессу в нейронах гиппокампа определены морфологические признаки повреждения, изменения синаптического аппарата, что может отражать нарушения молекулярных нейропротекторных механизмов, связанных с изменением локализации СФ, образованием D-серина и NO, а также со снижением eNOS в эндотелии капилляров гиппокампа.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного нами исследования были получены новые морфологические данные об особенностях изменений нейронов различных citoархитектонических областей и пространственной иммунофенотипической гетерогенности гиппокампа у крыс зрелого и старческого возрастов в норме и при моделировании комбинированного стрессового воздействия. Результаты иммуногистохимического исследования, в том числе с проведением программного морфометрического анализа вносят вклад в понимание процессов реализации нейропротективных механизмов, нейронального повреждения и аутофагии в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа у крыс различных возрастных групп в норме и при комбинированном стрессе. Отмечено, что длительное комбинированное стрессовое воздействие приводит к более значительной убыли нейронов в дорсальном отделе гиппокампа у взрослых крыс, по сравнению с крысами старческого возраста. При этом процессы клеточной гибели характеризуются активацией caspase-3-зависимого апоптоза на фоне реализации BDNF-опосредованных нейропротективных механизмов и астроглиоза, а также активации аутофагии, что сопровождалось увеличением экспрессии beclin-1, преимущественно в вентральном отделе гиппокампа. У старых крыс, помимо, BDNF-опосредованных нейропротективных механизмов, отмечено увеличение экспрессии белков теплового шока HSP70, способствующих сохранению третичной структуры белка. Выявленные нами морфофункциональные различия в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа позволяют определить регион-специфические структурные механизмы адаптации гиппокампа стареющего организма к стрессовому воздействию.

Исходя из полученных нами данных, одним из перспективных направлений с применением в качестве экспериментальной модели хронического комбинированного стресса может стать определение морфологического субстрата путей связи дорсального и вентрального отделов гиппокампа с другими структурами головного мозга на этапах старения. Принимая во внимание, что при хроническом комбинированном стрессе, действующие стрессоры (громкий звук, вибрация, яркие вспышки света, ограничение подвижности, изменение температуры) оказывают мягкое стрессовое воздействие на организм, а данная и схожие стресс-модели, описанные в литературе вызывают у животных симптомы депрессивноподобного поведения, имеющего сходство с клинической картиной депрессии [Тюренков И. Н. и др., 2013; Hill M. N. et al., 2012], то участие гиппокампа играет решающее значение в процессах эмоциональной окраски восприятия окружающей действительности у пожилых людей.

Таким образом, рассматривая стресс и депрессию как один из факторов риска нейродегенеративной патологии, приводящей к когнитивным расстройствам и снижающим качество жизни пожилых людей, результаты качественного и количественного нейроморфологического исследования, дополненного анализом иммунофенотипа, могут послужить основой для разработки способов фармакологической коррекции с применением веществ, обладающих нейро- и стресспротекторными свойствами в лечении и профилактике возрастзависимой патологии и нарушении структуры и функций головного мозга.

### ВЫВОДЫ

1. Комплексное нейрогистологическое исследование с программной компьютерной морфометрией и определением иммунофенотипа выявило регион-специфические различия морфофункциональных характеристик гиппокампа у крыс зрелого и старческого возраста. Установлено, что процессы нейронального повреждения у 24-х месячных крыс по сравнению с 12-ти месячными животными обнаруживаются преимущественно в дорсальном отделе гиппокампа и характеризуются увеличением в пирамидном слое CA1 и CA3 поврежденных нейронов, в том числе с признаками апоптоза в виде увеличения удельного количества caspase-3-иммунопозитивных нейронов в CA1 на 35,5 % ( $p=0,016$ ) и в CA3 на 22,2 % ( $p<0,001$ ). При этом iNOS-зависимые механизмы повреждения нейронов преобладают в вентральном отделе гиппокампа и выражаются увеличением удельного количества iNOS-иммунопозитивных перикарионов нейронов пирамидного слоя в CA1 на 52,9 % ( $p<0,001$ ), в CA3 на 48,9 % ( $p<0,001$ ), увеличением степени экспрессии iNOS-иммунореактивного материала (2-3 балла) в цитоплазме перикарионов нейронов всех слоёв и сочетаются с резко выраженным снижением экспрессии сериновой рацемазы (до 0-1 баллов) в дендритах радиального слоя CA1 и CA3, снижением относительной площади иммунореактивного материала в CA1 на 7,4 % ( $p<0,001$ ), в CA3 на 12,1 % ( $p<0,001$ ), что свидетельствует о нарушении процессов NMDAR-опосредованной нейротрансмиссии.

2. Морфологические признаки активации компенсаторно-приспособительных процессов у старых животных (24 месяца) в дорсальном отделе гиппокампа проявляются наиболее выражено в пирамидном слое CA3, а в вентральном - в CA1. В CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа нейропротективные механизмы характеризуются появлением экспрессии нейротрофина BDNF в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и увеличением экспрессии в астроцитах, а также увеличением в нейропиле экспрессии синаптофизин-иммунореактивного материала, что свидетельствует об активации процессов синаптической пластичности. Кроме того, выявлено уменьшение удельного количества eNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя в CA1 на 56,1 % ( $p<0,001$ ), в CA3 на 78 % ( $p<0,001$ ) и относительной площади иммунореактивного материала в CA1 на 24,8 % ( $p<0,001$ ), в CA3 18,5 % ( $p<0,001$ ), снижение экспрессии биомаркера eNOS в нейропиле и эндотелии капилляров, что свидетельствует о значимом участии eNOS-зависимых механизмов у крыс старческого возраста. В вентральном отделе гиппокампа регрессивные изменения астроглии в виде уменьшения относительной площади GFAP-иммунореактивного материала в CA1 на 5 % ( $p<0,001$ ) и в CA3 на 6,8 % ( $p<0,001$ ) сочетаются с активацией процессов аутофагии в CA1 и характеризуются увеличением экспрессии beclin-1-иммунореактивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов (3 балла).

3. При длительном комбинированном стрессовом воздействии у крыс в возрасте 12-ти месяцев, по сравнению с контролем, в CA3 дорсального отдела гиппокампа преобладают следующие признаки:

- выраженные повреждения нейронов пирамидного слоя, которые характеризуются увеличением удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы на 15,6 % ( $p<0,001$ ), увеличением удельного количества caspase-3-иммунопозитивных нейронов на 13,8 % ( $p<0,001$ );

- атрофические изменения, которые характеризуются уменьшением ширины пирамидного слоя на 13,1 % ( $p < 0,001$ ), снижением средней площади перикарионов нейронов на 10,2 % ( $p < 0,001$ ), снижением относительной площади перикарионов нейронов на 5,9 % ( $p = 0,007$ );
- реактивный астроглиоз в виде возрастания относительной площади GFAP-иммунореактивного материала на 8,9 % ( $p < 0,001$ ).

Напротив в вентральном отделе гиппокампа данные признаки проявляются преимущественно в СА1, что может свидетельствовать о развитии функционального регион-специфического ответа гиппокампа на стрессоры.

4. В ответ на стрессоры у животных в возрасте 24-х месяцев в СА1 вентрального отдела гиппокампа атрофические изменения нейронов пирамидного слоя, выражающиеся снижением средней площади перикарионов нейронов на 8,6 % ( $p = 0,002$ ) и относительной площади перикарионов нейронов на 6,8 % ( $p = 0,014$ ), реализуются на фоне активации нейропротективных механизмов с возрастанием относительной площади GFAP-иммунореактивного материала в СА1 на 4,7 % ( $p < 0,001$ ), в СА3 на 10,3 % ( $p < 0,001$ ) и появлением экспрессии HSP70 (1 балл) в цитоплазме нейронов пирамидного слоя в СА1 и СА3. В дорсальном отделе гиппокампа атрофические изменения нейронов пирамидного слоя СА1 были более выражены, по сравнению с вентральным отделом.

5. Участие NO-зависимых механизмов в формировании повреждения нейронов гиппокампа у крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, по сравнению с контролем, в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа характеризуется однонаправленными изменениями в виде увеличения экспрессии биомаркера iNOS, которые наиболее выражены в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа. У 24-х месячных животных напротив, наиболее выраженные иммунофенотипические изменения под влиянием стресса наблюдаются в дорсальном отделе гиппокампа и характеризуются увеличением удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1 на 90,7 % ( $p < 0,001$ ), в СА3 на 53,4 % ( $p < 0,001$ ), увеличением относительной площади иммунореактивного материала в СА1 на 8,8 % ( $p < 0,001$ ). При этом в вентральном отделе гиппокампа отмечается уменьшение удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1 на 55,8 % ( $p < 0,001$ ), в СА3 на 73,8 % ( $p < 0,001$ ), снижение относительной площади иммунореактивного материала в СА3 на 11 % ( $p < 0,001$ ) в сочетании с увеличением экспрессии сериновой рацемазы, что отражает принципы обратной связи в механизме регуляции синтеза d-серина и NO в ЦНС.

6. Под воздействием комбинированного стресса у 12-ти месячных животных в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа изменения экспрессии биомаркера eNOS носят однонаправленный характер, наиболее выраженный в дорсальном отделе: уменьшение удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1 на 61,2 % ( $p < 0,001$ ), в СА3 - на 44 % ( $p < 0,001$ ), относительной площади иммунореактивного материала в СА1 - на 33,5 % ( $p < 0,001$ ), в СА3 - на 19,5 % ( $p < 0,001$ ), уменьшение экспрессии eNOS в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, нейрпиле радиального слоя и в эндотелии капилляров различных слоёв (до 0 баллов) СА1 и СА3. У 24-х месячных животных стрессовое воздействие приводит к снижению относительной площади eNOS-иммунореактивного материала в СА1 дорсального отдела гиппокампа на 5,4 % ( $p = 0,004$ ), что сопровождается увеличением удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя на 50,8 % ( $p < 0,001$ ), а также снижением степени экспрессии eNOS в эндотелии, что свидетельствует о разнонаправленности иммунофенотипических изменений в нейронах и нейрпиле.

7. При моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12-ти месяцев происходят наиболее выраженные изменения экспрессии сериновой рацемазы в СА3 вентрального отдела гиппокампа и характеризуются снижением относительной площади иммунореактивного материала на 8,1 % ( $p < 0,001$ ) в сочетании с его перераспределением и

накоплением в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя. В старшей возрастной группе (24 месяца) в вентральном отделе гиппокампа обнаруживается увеличение степени цитоплазматической экспрессии (3 балла) сериновой рацемазы в перикарионах нейронов пирамидного слоя и относительной площади иммунореактивного материала в CA1 на 8,3 % ( $p=0,004$ ), в CA3 на 3 % ( $p=0,004$ ), что, по-видимому, связано с нарушением интранейронального транспорта фермента и нарушением механизмов NMDAR-опосредованной нейротрансмиссии. Данные изменения сочетаются со снижением процессов синаптической пластичности в CA1 и CA3 дорсального и вентрального отделов гиппокампа у 12-ти и 24-х месячных стрессированных животных и заключаются в уменьшении относительной площади синаптофизин-иммунореактивного материала преимущественно в CA1 вентрального отдела на 30,7 % ( $p<0,001$ ) у старых животных.

8. Под влиянием комбинированного стресса обнаруживаются топографические различия в реализации процессов аутофагии и экспрессии нейротрофина BDNF у крыс различных возрастных групп. У взрослых крыс (12 месяцев) наблюдается увеличение относительной площади beclin-1-иммунореактивного материала в CA1 дорсального отдела гиппокампа на 3,6 % ( $p=0,016$ ) и повышение степени цитоплазматической экспрессии (2 балла) в нейронах пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа; у старых крыс (24 месяца) - увеличение относительной площади beclin-1-иммунореактивного материала в CA1 вентрального отдела гиппокампа на 5,9 % ( $p=0,003$ ). Наблюдается увеличение степени экспрессии BDNF-иммунореактивного материала (1-2 балла) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа обеих возрастных групп, а у 12-ти месячных крыс и в цитоплазме астроцитов (3 балла), что свидетельствует об активации различных механизмов нейропротекции.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Характеристика продемонстрированных структурных, в т.ч. иммунофенотипических изменений в различных отделах гиппокампа может быть использована для диагностики состояний, связанных с возраст- и стресс-зависимой патологией ЦНС.

Полученные данные об особенностях гистологического строения и патоморфологических изменениях в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа в норме и при моделировании комбинированного стресса можно использовать в учебном процессе для преподавания патологической анатомии, гистологии, цитологии, эмбриологии в высших медицинских учебных заведениях.

Результаты морфологического исследования гиппокампа могут быть использованы при проведении научно-исследовательских работ по изучению механизмов влияния стрессового воздействия и возраста как факторов риска в развитии патологии ЦНС, а также при разработке фармакологических препаратов направленного действия.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Морфологические изменения в вентральных отделах гиппокампа взрослых крыс при длительном воздействии комбинированного стресса [Текст] / А. В. Смирнов, М. В. Шмидт, **М. Р. Экова**, Д. С. Медников, Д. Д. Бородин, И. Н. Тюренков // Волгоградский научно-медицинский журнал. - 2013. - № 4. - С. 14-17.
2. **Экова, М. Р.** Макро- и микроскопические изменения головного мозга стареющих крыс при комбинированном стрессовом воздействии [Текст] / **М. Р. Экова**, Д. Д. Бородин // XVIII Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области: Тезисы докладов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. - С. 55-57.
3. **Экова, М. Р.** Морфологические изменения и экспрессия сериновой рацемазы в вентральном отделе гиппокампа крыс при комбинированном стрессовом воздействии [Текст] / **М. Р. Экова** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2014. - С. 299-300.
4. **Влияние комбинированного стресса на морфологические изменения и экспрессию NO-синтазы в вентральном отделе гиппокампа крыс** [Текст] / А. В. Смирнов, И. Н. Тюренков, М. В. Шмидт, **М. Р. Экова**, Д. С. Медников, Д. Д. Бородин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 7. – С. 110-114.
5. Особенности экспрессии индуцибельной NO-синтазы в гиппокампе стареющих крыс при моделировании комбинированного стресса [Текст] / А. В. Смирнов, И. Н. Тюренков, **М. Р. Экова**, М. В. Шмидт // Сборник трудов научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива, посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета / Под ред. В. И. Петрова. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2015. –С. 147-150.
6. **Экова, М. Р.** Особенности экспрессии эндотелиальной NO-синтазы в гиппокампе старых крыс при воздействии комбинированного стресса [Текст] / **М. Р. Экова** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием, посвящённой 80-летию ВолгГМУ – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2015. – С. 391-392.
7. Характеристика структурных изменений гиппокампа старых крыс при комбинированном стрессе и его фармакологической коррекции [Текст] / И. Н. Тюренков, А. В. Смирнов, Н. В. Григорьева, М. В. Шмидт, **М. Р. Экова**, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова // Фармация и фармакология. Приложение 1: Деадаптация различного генеза и пути её фармакологической коррекции. Материалы I научно-практической конференции с международным участием. 2-3 ноября 2015 г., г. Пятигорск– 2015. – С. 118-119.
8. **Сравнительная морфофункциональная характеристика вентрального гиппокампа у взрослых и старых крыс под влиянием комбинированного стресса** [Текст] / **М. Р. Экова**, А. В. Смирнов, М. В. Шмидт, И. Н. Тюренков, Е. В. Волотова, Д. В. Куркин, Н. В. Григорьева, В. В. Ермилов, Д. С. Медников // Успехи геронтологии. – 2016. - Т. 29, № 1. - С. 59-67.
9. **Экова, М. Р.** Экспрессия индуцибельной NO-синтазы в радиальном слое гиппокампа крыс в процессе старения [Текст] / **М. Р. Экова** // Российский медико-биологический вестник им. академика И. П. Павлова.– 2016. – Приложение 2. - С. 245-246.
10. **Экова, М. Р.** Морфологические изменения в вентральном и дорсальном отделах гиппокампа крыс при комбинированном стрессе [Текст] / **М. Р. Экова** // Сборник тезисов XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных. – г. Москва. – 2016.- С. 252 – 253.
11. Interconnection of structural and functional alterations in the ventral hippocampus of aged rats to mild stress [Text] / I. N. Tyurenkov, A. V. Smirnov, N. V. Grigoryeva, **М. Eкова**,

M. Schmidt, E. Volotova, D. Kurkin // *Alzheimer's and Dementia*. - 2016. - Vol. 12., № S7. - P. P738-P739.

12. Структурные возрастные изменения гиппокампа в норме и при цереброваскулярной патологии [Текст] / М. В. Шмидт, А. В. Смирнов, И. Н. Тюренков, Е. В. Горелик, М. Р. Экова, Д. С. Медников, В. С. Замараев, Д. А. Маланин, Р. П. Самусев, П. А. Хлопонин, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова // *Морфология*. – 2016. – № 3. - С.241-241а.

13. Характеристика структурных изменений дорсального отдела гиппокампа крыс на этапах старения с учётом экспрессии сериновой рацемазы [Текст] / А. В. Смирнов, Н. В. Григорьева, М. Р. Экова, М. В. Шмидт, Д. С. Медников, И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2016. – Т. 59, № 3. – С. 13-16.

14. Морфологические изменения и особенности экспрессии сериновой рацемазы в гиппокампе крыс при комбинированном стрессорном воздействии [Текст] / А. В. Смирнов, Н. В. Григорьева, М. Р. Экова, М. В. Шмидт, Д. С. Медников, И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова // *Морфология*. – 2016. – Т. 150, № 6. – С. 20-25.

15. Морфологические особенности вентрального отдела гиппокампа крыс при старении с учетом экспрессии индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз [Текст] / А. В. Смирнов, Н. В. Григорьева, М. Р. Экова, М. В. Шмидт, И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова // *Морфология*. – 2017. – Т. 151, № 1. – С. 13-19.

16. Экова, М. Р. Экспрессия BDNF в дорсальном отделе гиппокампа крыс при комбинированном стрессе [Текст] / М. Р. Экова // Сборник тезисов XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных. – г. Москва. – 2017. - С. 148 – 149.

17. Сравнительные аспекты влияния хронической ишемии и стресса на нейроглиальные взаимоотношения структур гиппокампа [Текст] / М. В. Шмидт, А. В. Смирнов, М. Р. Экова, Н. В. Григорьева, Е. В. Горелик, И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова, Д. А. Бакулин // *Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов*. Челябинск, 2017. – С. 366-367.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ИРМ – иммунореактивный материал

СР – сериновая рацемазы

СФ – синаптофизин

AIF – апоптоз индуцирующий фактор

APP – белок предшественник амилоида

BDNF – нейротрофический фактор мозга

Bcl-1 – белок регулятор аутофагии и клеточной гибели

CA1 - область I аммонова рога (*regio I cornus ammonis*)

CA3 - область III аммонова рога (*regio III cornus ammonis*)

eNOS – эндотелиальная нитрооксидсинтаза

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

HSP70 – белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа

iNOS – индуцибельная нитрооксидсинтаза

NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартата

nNOS – нейрональная нитрооксидсинтаза

PARP-1 – поли (АДФ-рибоза) полимеразы-1